

研究種目： 基盤研究(S)  
 研究期間： 2007 ~ 2011  
 課題番号： 19108001  
 研究課題名 (和文) アルタナリア病原菌の植物寄生性を決定する CD 染色体の比較ゲノミクス  
 研究課題名 (英文) Comparative genomics of the conditionally dispensable chromosomes controlling plant infection in *Alternaria alternata* pathogens  
 研究代表者  
 柘植 尚志 (TSUGE TAKASHI)  
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
 研究者番号： 30192644

研究分野： 農学  
 科研費の分科・細目： 農学 ・ 植物病理学  
 キーワード： 病原性因子、染色体

#### 1. 研究計画の概要

*Alternaria alternata* は本来腐生的な糸状菌であるが、本菌にはそれぞれ異なる作物に病気を引き起こす 7 つの病原性系統 (病原型) が存在する。これら病原型の植物寄生性は、宿主植物にのみ毒性を示す菌の 2 次代謝産物 (宿主特異的毒素) によって決定されている。したがって、7 つの病原型は、腐生的 *A. alternata* がそれぞれ固有の毒素生産能を獲得することによって病原菌化したと考えられ、病害発生の根本現象である“腐生菌からの病原菌誕生 (寄生性進化)”を研究するための好適なモデルである。

先に、5 つの病原型から毒素生合成遺伝子クラスターを単離するとともに、それらクラスターが小型 (<2.0 Mb) の conditionally dispensable (CD) 染色体にコードされていることを見出した。CD 染色体とは、生存には必要ではないが、植物寄生など特定の生活環にのみ必要な染色体を意味する。CD 染色体が最初に報告された生物は、エンドウに感染する糸状菌 *Nectria haematococca* (エンドウ根腐病菌) であり、*A. alternata* は 2 例目である。

本研究では、*A. alternata* 病原菌のうち、基本構造が異なる毒素を生産するイチゴ黒斑病菌 (AF 毒素生産菌)、リンゴ斑点落葉病菌 (AM 毒素生産菌)、トマトアルタナリア茎枯病菌 (AAL 毒素生産菌) の CD 染色体について、それらの構造と機能を植物病理学的、分子系統学的視点から比較解析し、*A. alternata* 病原菌の植物寄生性を決定する CD 染色体の実体解明を目指す。

具体的には、3 病原菌の CD 染色体の塩基配列の決定と構造比較、CD 染色体遺伝子群の分子系統学的解析、CD 染色体遺伝子群の

発現解析と 7 つの病原型と非病原性菌株における分布調査、毒素生合成遺伝子群の同定などによって、CD 染色体の構造と機能を総合的に解析する。さらに、プロトプラスト融合、菌糸融合による CD 染色体の種内さらに種間移動の可能性を検証する。

#### 2. 研究の進捗状況

先に、イチゴ菌の AF 毒素生合成遺伝子をコードする 1.05 Mb 染色体の塩基配列を決定した。本研究では、リンゴ菌の AM 毒素生合成遺伝子をコードする 1.4 Mb 染色体とトマト菌の AAL 毒素生合成遺伝子をコードする 1.0 Mb 染色体の構造解析に取り組んでいる。パルスフィールド電気泳動ゲルから回収した CD 染色体 DNA の高速シーケンサーによる配列解析、CD 染色体 DNA を含む BAC クローンの選抜と配列解析などによって、各染色体のほぼ全長をカバーするコンティグを同定した。それらの構造比較、コードされる遺伝子の同定と機能解析、毒素生合成遺伝子領域 (TOX 領域) の同定などによって、CD 染色体の以下の特徴を明らかにした。

(1) 3 病原菌の CD 染色体には、生存に不必要な遺伝子と毒素生合成遺伝子のみがコードされている。

(2) イチゴ菌とリンゴ菌の CD 染色体の TOX が存在しない片腕 (約 450 kb) の構造は全長にわたり類似しており、さらにその領域の一部 (約 220 kb) がトマト菌の CD 染色体にも保存されている。

(3) トマト菌の CD 染色体はセントロメアを挟んでほぼ左右対称構造であり、TOX 領域が両腕のテロメア近傍に分布する。

(4) 3 病原菌の CD 染色体には複数セットの

TOX 領域が存在する。なお、遺伝子破壊実験によって、安定した病原性を発揮するためには、複数コピーの毒素生合成遺伝子が必要であることを明らかにした。

(5) CD 染色体は、ゲノム中に付加的に共存し、維持される。プロトプラスト融合によって、トマト菌とリンゴ菌から AAL 毒素と AM 毒素、トマト菌とイチゴ菌から AAL 毒素と AF 毒素のダブル毒素生産株の作出に成功した。それぞれのダブル毒素生産株は、トマトとリンゴ、トマトとイチゴの両植物に病原性を示す。ダブル毒素生産株の主要染色体パターンは片親に類似しており、さらに両親株由来の 2 本の CD 染色体が共存している。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

リンゴ菌とトマト菌の CD 染色体は、大規模な反復構造を持つ予想以上に複雑な構造であったため、全構造を決定するには至っていないが、平成 22 年度にはほぼ全構造を解明できる見込みである。その他の課題については、順調に進展しており、予想しなかった成果も得られている。特に、3 病原菌の CD 染色体の構造の類似性、トマト菌の CD 染色体のユニークな構造などは、予想しなかった新規かつ重要な発見である。

3 病原菌の CD 染色体の構造類似性は、3 病原菌の CD 染色体が同一起源であることを示唆している。単純に考察すると、共通起源となった dispensable 染色体に異なる TOX 領域がそれぞれ組み込まれたと推定され、CD 染色体の起源、植物寄生性をもたらしたゲノムダイナミクスに関する画期的な新知見であると考えられる。

トマト菌の CD 染色体はセントロメアを挟んでほぼ左右対称構造である。このような構造を持つ染色体はこれまで報告がなく、極めてユニークな存在である。

また、プロトプラスト融合によるダブル毒素生産株の作出は、CD 染色体が宿主特異的な寄生性を付与する遺伝因子の実体であることを明確に示した。CD 染色体がゲノム中に付加的に共存できるという事実は、少なくとも *A. alternata* の菌株間を菌糸融合によって水平移動できること、すなわち腐生菌の病原菌化に関与し得ることを示唆している。

これまでに明らかとなった CD 染色体の特徴は、病害発生の根本現象である“腐生菌からの病原菌誕生”のメカニズムに加え、糸状菌におけるゲノム機能の多様性とゲノム構造の可塑性に関する新知見を提供した。

### 4. 今後の研究の推進方策

リンゴ菌とトマト菌の CD 染色体の構造決定に全力を注ぐとともに、主に下記の研究を

推進し、CD 染色体の実体解明を目指す。

- (1) 3 病原菌の CD 染色体の構造を確定し、詳細な比較解析、分子系統学的解析などによって、それらの起源を探る。
- (2) 3 病原菌の毒素生合成に関与する全遺伝子を同定し、TOX 領域の全貌を明らかにする。
- (3) 胞子または菌糸の共存培養による融合株の作出、さらにプロトプラスト融合による他種菌への CD 染色体の導入と毒素生産株の作出を試み、CD 染色体あるいは TOX 領域の水平移動の実験室レベルでの再現に挑戦する。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Imazaki, A., Tanaka, A., Harimoto, Y., Yamamoto, M., Akimitsu, K., Park, P., and Tsuge, T. Contribution of peroxisomes to secondary metabolism and pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Eukaryot. Cell* 9, doi: 10.1128/EC.00369-09, 2010 (査読有)
- ② Akagi, Y., Akamatsu, H., Otani, H., and Kodama, M. Horizontal chromosome transfer: a mechanism for the evolution and differentiation of a plant pathogenic fungus. *Eukaryot. Cell* 8, 1732-1738, 2009 (査読有)
- ③ Harimoto, Y., Tanaka, T., Kodama, M., Yamamoto, M., Otani, H., and Tsuge, T. Multiple copies of *AMT2* are prerequisite for the apple pathotype of *Alternaria alternata* to produce enough AM-toxin for expressing pathogenicity. *J. Gen. Plant Pathol.* 74, 222-229, 2008 (査読有)
- ④ Harimoto, Y., Hatta, R., Kodama, M., Otani, H., and Tsuge, T. Expression profiles of genes encoded by the supernumerary chromosome controlling AM-toxin biosynthesis and pathogenicity in the apple pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 1463-1476, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 32 件)

[図書] (計 1 件)

- ① Kodama, M., Akagi, Y., Akamatsu, H., Otani, H., Yamamoto, M., and Tsuge, T. A gene cluster on a conditionally dispensable chromosome controlling AAL-toxin biosynthesis and pathogenicity in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*: In: *Biology of Plant-Microbe Interactions* Vol. 6 (M. Lorito *et al.*, eds.), IS-MPMI, St. Paul, MN, USA, Paper No. 18 (CD-Rom), 2008 (査読無)