

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月24日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580055

研究課題名（和文） カビ毒汚染の原因となっている植物病原菌の宿主内進展遺伝子の解明

研究課題名（英文） The gene required for the plant pathogenic and mycotoxin producing fungus to spread in the host

研究代表者

須賀 晴久（SUGA HARUHISA）

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・准教授

研究者番号：20283319

研究成果の概要（和文）：ムギ類赤かび病菌は主要穀物にカビ毒汚染を起こしている植物病原菌である。本菌において宿主内を進展できない自然突然変異株が発見された。連鎖解析の結果、その変異は第2染色体の約54Kb中にあることが判明し、宿主内進展能欠損株ではそこに約3Kbの欠失が見出された。本来ならこの領域に存在するはずのFGSG02810遺伝子を野生株からクローニングして宿主内進展能欠損株に導入したところ、宿主内進展能の回復が見られた。従って、FGSG02810遺伝子がムギ類赤かび病菌の宿主内進展遺伝子と判明した。

研究成果の概要（英文）：Fusarium head blight fungus is a plant pathogen that causes mycotoxin contamination in major cereals. A natural pathogenicity mutant that could not spread beyond the inoculation point in host was found. The mutation locus was mapped to 54Kb-span in the chromosome 2 by linkage analyses and 3Kb in this region was deleted in the mutant. The FGSG02810 gene within the 3Kb of wild type strain was cloned and introduced into the mutant by transformation. Introduction of the FGSG02810 gene restored pathogenicity of the mutant. These results indicate that FGSG02810 is an essential gene for Fusarium head blight fungus to spread in the host plant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：菌類，遺伝子，マイコトキシン，ムギ類赤かび病，*Fusarium*

1. 研究開始当初の背景

近年、汚染米の不正転売など食の安全にかかわる事件が人々に大きな不安を与えている。食料がカビ毒で汚染された場合、カビが見える部分を除けばカビ毒も除けるというのではなく、実質上カビ毒を除去することは困難である。特に、植物病原菌がカビ毒を

産生する場合、収穫前に菌が感染してカビ毒の蓄積が始まるのが問題となっている。ムギ類赤かび病菌は、ムギなど主要穀物の穂に感染して世界中の収穫物にトリコテセンと呼ばれるカビ毒の汚染を起こしている植物病原菌である。この菌が産生するカビ毒は熱に安定で、通常の加熱で毒性は除去されな

い。現在、このカビ毒の対策として、ムギ類赤かび病の防除が求められている。

これまで本菌では、標的遺伝子破壊法によってシグナル伝達、アミノ酸合成を担う遺伝子が感染に関わることが示されてきた。しかし、カビ毒蓄積量に直結する宿主内進展に関わる遺伝子については未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本課題では、世界中の主要穀物にカビ毒汚染被害を与えているムギ類赤かび病菌の宿主内進展を支配する遺伝子の解明を目的とする。ここで遺伝子を解明できれば、その機能を阻害することで菌の宿主内進展を抑制し、カビ毒汚染を防ぐことができるようになる。更に、植物病原菌の約7割は糸状菌であり、本遺伝子の解明は植物病害防除の観点からも重要である。

3. 研究の方法

通常、ムギ類赤かび病菌はコムギの穂に接種すると、接種部から宿主内を進展してカビ毒を蓄積する。しかし、我々が全国から分離されてきたムギ類赤かび病菌の性状を調べてきた中で、宿主内を進展できない株が発見された。そこで、この株を利用して以下のような方法で宿主内進展を支配する遺伝子を解明することにした。

(1) 宿主内進展能欠損株と野生株の交配

連鎖解析で宿主内進展能欠損株で異常となっているゲノム上の位置を特定するために宿主内進展能欠損株と野生株の交配子孫株を取得する。交配にあたっては自家受精や分生孢子由来の株と他家受精由来の子孫株を培地上で識別できるようにしておくため、まずは宿主内進展能欠損株と野生株で異なるタイプの硝酸利用欠損変異体を作成する。それらを同時培養後、ノックダウンと呼ばれる交配誘導処理を行い、交配子孫株を取得する。得られた交配子孫株については、コムギの穂への接種試験により、宿主内進展能を調べる。

(2) 宿主内進展能に連鎖する DNA マーカーの探索

連鎖解析で宿主内進展能欠損株で異常となっているゲノム上の位置を特定するための DNA マーカーを準備する。これまで本菌の連鎖地図作成を通じて作成されてきたマイクロサテライトマーカー及び PCR-RFLP マーカーなどのシーケンスタグ化(塩基配列が分かっている)DNA マーカーの中から、親株とした宿主内進展能欠損株と野生株で多型を示すマーカーを選抜する。まず 20 子孫株についてこれらの DNA マーカーによる連鎖解

析を行い、宿主内進展能に連鎖する DNA マーカーを探し出す。更に、ここで検出された DNA マーカーについて、残り 80 子孫株のゲノムを分析することで、宿主内進展能と強い連鎖関係にあることを確認する。

(3) ゲノムデータベース探索と候補遺伝子の導入試験

(2)で宿主内進展能と強い連鎖関係にある DNA マーカーから特定したゲノム領域について、更に絞り込みを行う。本菌の場合、ゲノムデータベースによって全遺伝子の塩基配列が公開されていることから、それを利用して特定したゲノム領域内の遺伝子に PCR 用のプライマーをデザインする。野生株には宿主内進展能欠損株と交配可能ながら若干遺伝的に離れた株を使用していることで比較的容易に PCR-RFLP マーカーが設定できる。設定した PCR-RFLP マーカーで子孫株を分析し、宿主内進展能に完全連鎖を示す遺伝子を探し出す。この絞り込みによって、候補となる遺伝子の数はかなり少なくなってくるものの、100 子孫株程度の連鎖解析では、おそらく複数の遺伝子が候補になると予想される。そこで最終的に野生株から候補遺伝子それぞれをクローニングして、宿主内進展能欠損株に導入し、宿主内進展能を回復させる遺伝子を見つける。また、ここで見出された遺伝子について野生株と宿主内進展能欠損株で構造を調べて、その違いを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 宿主内進展能欠損株と野生株の交配

宿主内進展能欠損株と野生株を交配させ、子孫株を 100 株得た。これらをコムギの穂に接種した結果、宿主内進展能を持つものが 64 株、持たないものが 36 株であった。

(2) 宿主内進展能に連鎖する DNA マーカーの探索

本菌の連鎖地図作成を通じて開発してきたシーケンスタグ化マーカーから、ゲノム全体に散在しており、かつ、交配に用いた宿主内進展能欠損株と野生株で識別が可能な 33 個のマーカーを選抜した。これらのマーカーを使って 20 子孫株のゲノムを分析した結果、第 2 染色体上に位置する VNTR995 マーカーと VNTR1049 マーカーが宿主内進展能とそれぞれ LOD スコア 3.71 と 3.55 を示し、強い連鎖関係にあることが分かった。また、これらの DNA マーカー間に位置している Mating Type Ideomorph (MAT) 遺伝子を DNA マーカー化して同様に 20 子孫株を調べたところ、VNTR995 マーカーと VNTR1049 マーカーより更に高い LOD スコア 5.98 を示した。これら 3 つの DNA マーカーについて、残り 80 子孫株のゲノムを分析し、MAT 遺伝子マーカーが宿主内進展

能と最も強い連鎖関係にあることを確認した。

(3) ゲノムデータベース探索と候補遺伝子の導入試験

ゲノムデータベースで第2染色体上のVNTR995マーカーとVNTR1049マーカーの間を探索し、MATのマーカーに加えて新たに18個のPCR-RFLPマーカーを設定した。子孫株でこれらのマーカーのデータを取得した結果、100子孫株において宿主内進展能と完全連鎖を示すマーカーが見出され、宿主内進展遺伝子がHS369/HhaIマーカーからHS367/AvaIマーカーまでの約54Kb中に存在することが明らかとなった。ゲノムデータベースによればこの領域には16個の遺伝子が存在している(図1)。

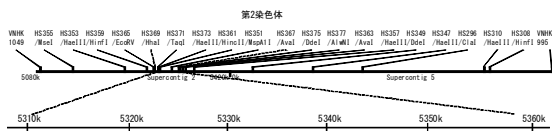


図1. 宿主内進展能と強い連鎖関係が認められたゲノム領域(100子孫株において宿主内進展能と完全連鎖を示したHS369/HhaIマーカーからHS367/AvaIマーカーまでの約54Kb中については、全ゲノムデータベースで検出されている遺伝子の位置と読取り枠の方向を矢印で示した。)

そこで上流域と下流域を含むように各遺伝子をPCRで増幅して宿主内進展能欠損株への導入用プラスミドベクターを作製することにした。このPCRの過程で、野生株と宿主内進展能欠損株を比較したところ、野生株では全領域でDNAの増幅が認められたのに対し、宿主内進展能欠損株では増幅が認められない領域が見つかった。その領域を更に詳しく調べた結果、宿主内進展能欠損株に約3Kbの欠失があることが判明した。ゲノムデータベースによれば、この欠失でFGSG02810遺伝子の全体、及びFGSG02809遺伝子の上流域とFGSG02811遺伝子の一部が失われることになる。従って、宿主内進展遺伝子は、これら3個の遺伝子のいずれかであると推定した(図2)。



図2. 宿主内進展能欠損株のゲノムの欠損領域(各遺伝子を上流域と下流域を含むように野生株からPCRで増幅してプラスミドベクターに挿入し、宿主内進展能欠損株に導入したところ、FGSG02810遺伝子のみで宿主内進展能の回復が見られた)

これら3つの遺伝子それぞれについて、上流域と下流域を含むように野生株からPCRで増幅してプラスミドベクターに挿入し、宿主内進展能欠損株に導入した。遺伝子導入株をコムギ穂に接種した結果、FGSG02809遺伝子とFGSG02811遺伝子の導入株では宿主内進展能が回復していなかったのに対し、FGSG02810遺伝子の導入株では宿主内進展能が回復していた。従って、FGSG02810がムギ類赤かび病菌で宿主内進展能を支配しているのが遺伝子と判明した。更に、野生株をコムギ穂に接種した試料からmRNAを抽出してRT-PCRを行った結果、予想サイズのDNAの増幅が認められ、少なくともムギ類赤かび病菌の感染時にFGSG02810遺伝子が発現していることが確認された。

5. 主な発表論文等

(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8件)

- ① Suga H, Nakajima T, Kageyama K, Hyakumachi M, The genetic profile and molecular diagnosis of thiophanate-methyl resistant strains of *Fusarium asiaticum* in Japan. Fungal Biology, 査読有, 115, 2011, 1244 ~ 1250.
- ② Li M, Asano T, Suga H, Kageyama K, A multiplex PCR for the detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and a survey of their occurrence in strawberry production areas of Japan. Plant Disease, 査読有, 95, 2011, 1270 ~ 1278.
- ③ Pu Y, Kikuchi A, Moriyasu Y, Tomaru M, Jin Y, Suga H, Hagiwara K, Akita F, Shimizu T, Netsu O, Suzuki N, Uehara-Ichiki T, Sasaya T, Wei T, Li Yi, Omura T, Rice dwarf viruses with

dysfunctional genomes generated in plants are filtered out in vector insects: implications for the origin of the virus. *Journal of Virology*, 査読有, 85, 2011, 2975~2979.

- ④ Asano T, Senda M, Suga H, Kageyama K, Development of multiplex PCR to detect five *Pythium* species related to turfgrass diseases. *Journal of Phytopathology*, 査読有, 158, 2010, 609~615.
- ⑤ Li M, Senda M, Komatsu T, Suga H, Kageyama K, Development of realtime PCR technique for the estimation of population density of *Pythium intermedium* in forest soils. *Microbiological Research*, 査読有, 165, 2010, 695~705.
- ⑥ 外側正之, 須賀晴久, 静岡県西部地域のススキから分離された *Fusarium graminearum*. *関西病虫研報*, 査読有, 51, 2009, 55~56.
- ⑦ Karugia GW, Suga H, Gale LR, Nakajima T, Tomimura K, Hyakumachi M, Population structure of the *Fusarium graminearum* species complex from a single Japanese wheat field sampled in two consecutive years, *Plant Disease*, 査読有, 93, 2009, 170~174.
- ⑧ Karugia GW, Suga H, Gale LR, Nakajima T, Ueda A, Hyakumachi M, Population structure of *Fusarium asiaticum* from two Japanese regions and eastern China. *Journal of General Plant Pathology*. 査読有, 75, 2009, 110~118.

[学会発表] (計10件)

- ① 須賀晴久, 月星隆雄, 上垣隆一, 中島隆, 景山幸二, 百町満朗, *Fusarium fujikuroi* の2系統分化を支持する一塩基多型の検出. 日本植物病理学会, 2012年3月28日, 福岡国際会議場(福岡県)
- ② 須賀晴久, 月星隆雄, 上垣隆一, 中島隆, 景山幸二, 百町満朗, *Fusarium fujikuroi* のフモニシン産生能の有無を識別する DNA マーカーの開発. 日本マイコトキシン学会, 2012年1月6日, タワーホール船堀(東京都)
- ③ Suga H, Scott T, Hirata Y, Nakajima T, Kageyama K, Hyakumachi M, Natural deletion of FGSG02810 gene lost both of pathogenicity and perithecium development in *Fusarium graminearum* species complex. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress, 2011年9月6日, 札幌コンベンションセンター(北海道)

- ④ 須賀晴久, PCR によるイチゴ萎黄病菌の同定. 第8回フザリウム研究, 2011年8月25日, 福山市鞆公民館(広島県)
- ⑤ 須賀晴久, スコット暁子, 平田有紀, 中島隆, 景山幸二, 百町満朗, FGSG02810 遺伝子はムギ類赤かび病菌の病原性と子のう殻形成能の両方に関与する. 日本植物病理学会, 2011年3月27日, 東京農工大学府中キャンパス(東京都)
- ⑥ 北嶋美葉, スコット暁子, 久城真代, 中島隆, 景山幸二, 百町満朗, 須賀晴久, *Fusarium fujikuroi* のフモニシン産生クラスターの構造解明. 日本マイコトキシン学会, 2011年1月7日, タワーホール船堀(東京都)
- ⑦ 南雲陸, 深澤恵海, 北嶋美葉, 月星隆雄, 上垣隆一, 中島隆, 景山幸二, 百町満朗, 須賀晴久, 日本産 *Fusarium fujikuroi* 内に検出された分子系統とフモニシン産生能の関係. 日本植物病理学会関西部会, 2010年9月30日, AOSSA(福井県)
- ⑧ 南雲陸, 深澤恵海, 北嶋美葉, 月星隆雄, 上垣隆一, 中島隆, 景山幸二, 百町満朗, 須賀晴久, 日本産 *Fusarium fujikuroi* 内に検出された分子系統とフモニシン産生能の関係. 日本マイコトキシン学会, 2010年9月10日, 文部科学省研究交流センター(茨城県)
- ⑨ 須賀晴久, ムギ類赤かび病菌におけるチオファネートメチル耐性化と伝播機構の分子遺伝学的研究. 第20回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム, 2010年4月21日, 京都テルサ(京都府)
- ⑩ 南雲陸, 山本裕子, 北嶋美葉, 中島隆, 景山幸二, 百町満朗, 須賀晴久, PCR-RFLP による *Gibberella fujikuroi* 種複合体の種同定とフモニシン産生能. 日本植物病理学会関西部会, 2009年10月17日, 神戸大学(兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須賀 晴久 (SUGA HARUHISA)
岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・准教授
研究者番号: 20283319

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: