

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780046

研究課題名（和文）トマト葉かび病菌の新たなエフェクター因子の探索

研究課題名（英文）Search for new effector proteins in *Cladosporium fulvum*

研究代表者

飯田 祐一郎 (IIDA YUICHIRO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所・野菜病害虫・品質研究領域・研究員

研究者番号：00456609

研究成果の概要（和文）：トマト葉かび病菌はエフェクター遺伝子を変異することで、宿主トマトが持つ Cf 抵抗性遺伝子による抵抗性を回避する。日本で分離された 123 菌株についてエフェクター遺伝子配列を決定した結果、変異様式は(i) フレームシフト変異、(ii) Avr2 へのトランスポゾンの挿入、(iii) Avr4 と Avr4E の点突然変異、(iv) Avr4E と Avr9 の遺伝子の欠落、のたった 4 パターンであることが明らかとなった。さらに、新規エフェクター遺伝子の単離を目指し、感染葉アポプラスト液のプロテオミクス解析と RNAseq による発現解析によりエフェクター候補を選抜した。これら候補タンパク質の中から、抵抗性遺伝子 Cf-5 をもつトマト品種への抵抗性反応により Avr5 遺伝子が同定され、本遺伝子が 1.8 Mb の小型染色体に座乗していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Leaf mold of tomato is caused by the biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* which complies with the gene-for-gene system. We sequenced avirulence (Avr) genes in 123 strains collected in Japan to get information about the molecular basis of adaptation to the different Cf genes. The Avr genes of these strains contain unique mutations causing adaptation to Cf genes including (i) frameshift mutations, (ii) transposon insertions in Avr2, (iii) point mutations in Avr4 and Avr4E, and (iv) deletions of Avr4E or Avr9. Proteomics analysis of the apoplastic fluid and RNAseq data were employed to collect the candidates of new effector gene. Among them we identified Avr5 that is conferred by the tomato resistance gene Cf-5 and is located on 1.8 Mb small chromosome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：植物病原糸状菌、トマト葉かび病、エフェクター、Avr

1. 研究開始当初の背景

植物病原菌は宿主体内に侵入後、アポプラスト領域にエフェクターと呼ばれる複数の低分子タンパク質を分泌する。エフェクタータンパク質は宿主の抵抗性誘導に干渉し、感染の拡大を有利に進める。トマト葉かび病菌 *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*) からはこれまでに 10 種類のエフェクター遺伝

子が単離されている。宿主であるトマトは Cf 抵抗性遺伝子を介して、対応したそれぞれのエフェクタータンパク質を認識することで病原菌の侵入を感知し、抵抗性を誘導する。一方、病原菌はエフェクター遺伝子を突然変異することによって機能を喪失させ、新たな寄生性系統（レース）へと分化し、宿主の抵抗性を回避する。そのためレース分化を決定

するエフェクター遺伝子の変異を検出することで、抵抗性品種の選択に有益な情報を提供することができる。しかしながら、既に同定された *Cf* 遺伝子に対応するエフェクター遺伝子でさえ、未だすべては同定されていない。

化学農薬が常用されていたかつての生産現場においては、トマト葉かび病は潜在的に防除されていたが、近年、トマト栽培施設の大型化と周年化により病原の伝染環が遮断しにくくなったこと、減農薬・無農薬栽培や特定の病原菌に効果を示す微生物農薬が普及し、防除対策として抵抗性品種への依存度が高まってしまったことなどから、本病害が顕在化してきた。国内では 1960 年代に *Cf-2* 抵抗性遺伝子が試験的に国内品種に導入され、また 1996 年に *Cf-4* (*Cf-4E*) が、2003 年には *Cf-9* 抵抗性遺伝子の導入品種が市販され、複数の抵抗性品種が選択可能となった。しかしながら、上述したような栽培体系において、抵抗性を打破するレースはその品種が栽培されてから数年以内に出現することが示唆されている。これら *Cf* 抵抗性遺伝子は、それぞれエフェクター遺伝子 *Avr2*、*Avr4*、*Avr4E* および *Avr9* に対応している。現在、日本国内で市販されている葉かび病抵抗性品種はすべて打破され、10 種のレースの発生が確認されている。申請者らはこれらのうち、レース 4.9、4.9.11、2.9 および 9 について、海外での発生事例のない日本特有のレースであることを報告した。一方、エフェクター遺伝子 *ECP* に対応した抵抗性遺伝子 *Cf-ECP* をもつ品種は未だ市販されておらず、今後の国内品種への導入が期待されている。

2. 研究の目的

日本国内で分離したトマト葉かび病菌には日本特有のレースが見いだされ、国内で独自の進化を遂げた可能性が示された。またレース分化はエフェクター遺伝子の変異に起因する。そこで本研究では、レースが判明している日本分離のトマト葉かび病菌 123 株について、既に *Cf* 抵抗性が打破するレースが出現しているため、変異していることが明らかである *Avr* 遺伝子 (*Avr2*、*Avr4*、*Avr4E* および *Avr9*) の変異部位とその変異様式を一塩基多型 (SNPs) 解析により明らかにした。また将来的に市販トマト品種に導入が期待される *Cf-ECP* 抵抗性遺伝子に対応するエフェクター遺伝子 (*Ecp1*、*Ecp2*、*Ecp4*、*Ecp5*、*Ecp6* および *Ecp7*) も同様に解析し、本菌における寄生性分化の遺伝的背景の解明を目指した。

トマトの *Cf* 抵抗性遺伝子が認識する本菌の全てのエフェクター遺伝子は同定されていない。そこでエフェクター遺伝子の SNPs 解析に基づいて、変異の蓄積の少ない菌株を選抜し、トマト葉かび病菌が感染したトマト

葉におけるプロトプラスト液のプロテオミクス解析と、RNAseq による発現解析情報から未知のエフェクター遺伝子を探索した。

3. 研究の方法

(1) 日本分離株におけるエフェクター遺伝子の SNPs 解析

トマト葉かび病菌から抽出したゲノム DNA を鋳型にエフェクター遺伝子を PCR 増幅し、それら産物のダイレクトシーケンスを行った。ドラフトゲノムが明らかにされた標準菌株 (レース 0) の塩基配列を指標に、国内分離株から得られた塩基配列とのアライメントを行った。また Wageningen 大学の de Wit 教授らは世界各地で分離された菌株におけるエフェクター遺伝子群の塩基配列を既に決定しており、海外分離株と国内分離株の配列データの比較解析を行なった。さらに新たに見いだされた変異遺伝子について、*Agrobacterium tumefaciens* を介した一過的発現系を用いて *Cf* 抵抗性品種の応答を解析した。

(2) アポプラスト液のプロテオミクス解析

Cf 抵抗性遺伝子をもつどの品種にも感染することができないレース 0 に属す菌株を用いてプロテオミクス解析を行った。感染後 7 日目のトマト葉を減圧処理した後、遠心分離によりアポプラスト液を大量に回収し、限外濾過によって濃縮した。SDS-PAGE で、未感染葉と感染葉のタンパク質サンプルを分離、感染葉に特異的なバンドを切り出し、トリプシンで消化後、質量分析によるスペクトルからアミノ酸配列情報を取得した。ペプチドマスフィンガープリンティングと本菌のドラフトゲノム情報との相同性からタンパク質を同定した。

(3) 新規エフェクター遺伝子の探索と染色体分布

既知のエフェクター遺伝子は、宿主植物へ侵入後に発現が誘導されることが知られている。Wageningen 大学で行われたドラフトゲノム解析と RNAseq による発現解析情報を用いて、エフェクター候補が選抜され、*A. tumefaciens* を介した一過的発現系により宿主トマトの応答解析を行った。また候補遺伝子の染色体分布を明らかにするため、パルスフィールドゲル電気泳動によってトマト葉かび病菌の染色体を分離し、候補遺伝子の染色体の分布を DNA ゲルブロット解析によって調査した。同時に、ドラフトゲノム情報から明らかになった本菌の二次代謝産物の生合成遺伝子についても解析した。

4. 研究成果

(1) 国内で分離されたトマト葉かび病菌の

エフェクター遺伝子の変異様式

国内で分離されたトマト葉かび病菌株ライブラリーの中から、分離年度・分離地域・レースが異なる 123 菌株について、10 種のエフェクター遺伝子の配列比較を行った。その結果、6 つの *Ecp* 遺伝子では、海外分離株と同様にタンパク質機能に関わる変異部位は見出されず、これらエフェクターに対応する *Cf* 抵抗性遺伝子がわが国でトマト葉かび病防除に有効であることが明らかとなった。また、*Avr* 遺伝子には塩基配列の欠失や塩基置換、あるいは遺伝子全体の欠失など多くの変異が蓄積していることが明らかになり、これまでに海外分離菌株には認められなかった新たな変異部位も多数見いだされた。そのため、日本の多様なレースは海外から持ち込まれたものではなく、国内で独自の寄生性分化を遂げ、日本特有のレースが生じたものと考えられた。同じレースでも菌株によって変異様式が異なることが明らかになり、新レースは各地域においてそれぞれに発生したと推察された。

次に *Avr2* と *Avr4* 遺伝子に見いだされた 9 つの新たな変異のうち、機能喪失が明らかな開始コドンの変異、大幅なフレームシフトが起こる変異、シグナル配列部分のサイレント変異以外の変異遺伝子について、PVX ベクターと *A. tumefaciens* を介して、それぞれ *Cf2* と *Cf4* をもつ品種に一過的に発現させた。その結果、日本分離株から見いだされた新たな変異部位をもつエフェクター遺伝子は宿主植物への HR 誘導能を完全に失っており、これら変異がレース分化の原因であることが明らかとなった。

このように日本分離菌株において新たな変異部位が多数見いだされたにも関わらず、その変異パターンは海外分離菌株と同様に

(i) *Avr2* のフレームシフト変異、(ii) *Avr2* へのレトロトランスポゾンの挿入、(iii) *Avr4* と *Avr4E* の点突然変異、(iv) *Avr4E* と *Avr9* の遺伝子の欠失、の 4 つであることが明らかになった。多数の変異部位が見出されたにも関わらず、なぜたった 4 パターンに集約されるのかは明らかではないが、*Avr* 遺伝子の本来の機能や、あるいは染色体上の位置に関係すると推測している。

(2) エフェクター遺伝子の探索

トマト葉かび病菌の感染葉と未感染葉から抽出したアポプラスト液を濃縮し、プロテオミクス解析を行った。感染葉からのみ検出された 23 バンドについて質量分析によるタンパク質の同定を行った結果、多くは既知のエフェクター遺伝子あるいはその断片があったが、3 つの機能未知なタンパク質が見いだされた。さらに、ドラフトゲノム情報と RNAseq による発現解析から、これまでに単

離されたエフェクター遺伝子の特徴である、宿主侵入後に高発現し、システイン残基が多く、分泌シグナル配列を含む低分子量のタンパク質が選抜された。これら候補遺伝子について、これまでに単離されていない *Avr1*、*Avr5*、*Avr11* および *Ecp3* の探索を行った。この中でエフェクター遺伝子の機能が喪失したレース菌株が分離されているのは、*Avr5* のみであり、レース 5、2.4.5、2.5.9 が欧州で分離されている。エフェクター遺伝子の変異パターンの解析結果から、*Avr4E* と *Avr9* は遺伝子自体が欠失する場合があります、特に *Avr9* では遺伝子の欠失以外の変異は見いだされなかった。そこで、これらレース菌株のゲノム DNA を鋳型に候補遺伝子の PCR 増幅を試みたところ、他のレース菌株では予想されるサイズの増幅産物が確認されたが、レース 5、2.4.5、2.5.9 の菌株でのみ増幅されない遺伝子が見いだされた。さらに PVX ベクターと *A. tumefaciens* によって分泌シグナル配列を除いた遺伝子をトマトに一過的に発現させた結果、他の *Cf* 抵抗性品種では反応せず、*Cf-5* 抵抗性遺伝子をもつ品種では明瞭な HR が確認され、本遺伝子が *Avr5* であることが明らかになった。

(3) *Avr5* 遺伝子と dothistromin 生合成遺伝子クラスターの染色体分布

Avr5 は DNA データベース上に相同な遺伝子がなく、機能を推定できるようなドメインも持たない、トマト葉かび病菌に特徴的な遺伝子である。申請者はトマト葉かび病菌の染色体における分布を明らかにするため、パルスフィールドゲル電気泳動によって染色体を分離し、*Avr5* 遺伝子について DNA ゲルブロット解析を行った。またトマト葉かび病菌のドラフトゲノム解析の結果から、マツ赤斑葉枯病菌 *Dothistroma septosporum* が分泌するカビ毒 dothistromin の生合成遺伝子クラスターが見いだされた (de Wit *et al.*, *PLOS Genetics*, 2012)。それぞれのクラスターから代表的な遺伝子である *DotC*、*AflR*、*PksA*、*Est1*、*OrdB* および *Nor1* を選定し、またカビ毒 cercosporin の生合成遺伝子と高い相同性を示す *Pks7* についても、同様に DNA ゲルブロット解析を行った。

その結果、*Avr5*、*Est1*、*OrdB*、*Nor1*、*Pks7* は 1.8 Mb、また *DotC*、*AflR*、*PksA* は 0.8 Mb の小型染色体にそれぞれ座乗していることが明らかとなった。*D. septosporum* では、dothistromin 生合成遺伝子クラスターがひとつの小型染色体に座乗しているが、系統学的に近縁なトマト葉かび病菌では、2 つの染色体に分断されており、さらにいずれの条件下においても dothistromin が検出されなかった。以上の結果から、腐生菌である *D. septosporum* において感染時に重要な役割を

担う *dothistromin* は、半寄生菌であるトマト葉かび病菌の宿主感染には関与しないことが示唆された。また *D. septosporum* では宿主感染時に高発現する生合成遺伝子群が、トマト葉かび病菌では感染時や *in vitro* など検証したすべての条件において極めて低い発現レベルであったことも、本菌の宿主感染において *dothistromin* の重要性が低いことを示している。

毒素生合成遺伝子である *Pks7*、*Est1*、*OrdB*、*Nor1* は、新規エフェクター *Avr5* と同じ 1.8 Mb の小型染色体に座乗していた。近年、複数の植物病原糸状菌において、小型の染色体に多くの毒素生合成遺伝子や病原性遺伝子が含まれ、それらの病原性を決定することが報告されている。菌の生存などには関与しないこれらの小型染色体には、トランスポゾン様因子が多く含まれ、水平移動によって獲得されたと考えられている。トマト葉かび病菌では *dothistromin* と同様に *cercosporin* も検証したいずれの条件においても検出されなかったことから、これらの生合成遺伝子は本菌の病原性遺伝子ではなく、菌の生存に必須でない遺伝子と考えられる。また、病原力遺伝子としても機能する場合は報告されているエフェクター遺伝子であるが、*Avr5* の病原力因子としての機能は明らかにされていない。しかしながら、*Avr5* 遺伝子領域の近傍には、多くのトランスポゾン様因子が見いだされていることから、今後、*Avr5* の機能解析とともに、座乗する小型染色体の病原性における役割が明らかにされることを期待する。

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 1 件)

- ① 池田健太郎, 飯田祐一郎, 窪田昌春. (2012) 群馬県で確認されたトマト葉かび病菌のレース. 関東東山病害虫研究会報, 59, pp51-52. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 飯田祐一郎, 窪田昌春. トマト葉かび病抵抗性を打破する国内レースの *Avr* 遺伝子の変異. 日本植物病理学会, 岐阜市, 3.29.2013.
- ② Iida Y and de Wit P.J.G.M. Distribution and genetic diversity of *Cladosporium fulvum* races occurred in Japan. Phytopathology Meeting 2012, Wageningen, The Netherlands, 11.16.2012.
- ③ Iida Y., van't Hof P., Stergiopoulos I., Mehrabi R., Beenen H., Notsu A., Kubota

M., Bahkali A., Abd-Elsalam K., Terami F., Collemare J. and de Wit P.J.G.M. New races with unique mutations in avirulence genes overcoming tomato *Cf* resistance genes in a Japanese population of *Cladosporium fulvum*. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, 7.31.2012.

- ④ Iida Y., van't Hof P., Stergiopoulos I., Mehrabi R., Beenen H., Notsu A., Kubota M., Bahkali A., Abd-Elsalam K., Terami F., Collemare J. and de Wit P.J.G.M. Unique mutations in effector genes of a *Cladosporium fulvum* population in Japan have caused adaptation to different tomato *Cf* genes. XIII International Congress of Mycology, Sapporo, 9.8.2011 .

[図書] (計 1 件)

- ① 飯田祐一郎, 窪田昌春, 雨川公洋 (2011) トマト葉かび病菌の寄生性分化機構. 植物防疫, 日本植物防疫協会, 東京, 65(12), pp 48-51.

[その他]

ホームページ

<http://www.wageningenur.nl/en/Persons/prof.dr.ir.-PJGM-Pierre-de-Wit.htm>

<http://www.naro.affrc.go.jp/vegetea/introduction/chart/domain05/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 祐一郎 (IIDA YUICHIRO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所・野菜病害虫・品質研究領域・研究員

研究者番号：00456609

研究協力者

Pierre J. G. M. de Wit (Wageningen 大学・教授)