

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450057

研究課題名(和文)タマネギ乾腐病菌のエフェクター

研究課題名(英文)Effectors of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*

研究代表者

伊藤 真一 (Ito, Shin-ichi)

山口大学・創成科学研究科・教授

研究者番号：30243629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タマネギ乾腐病菌(FOC)のエフェクター遺伝子ホモログ(FocSIX3)がFOCの病原性遺伝子であることを明らかにした。FocSIX3遺伝子の特異的に増幅するリアルタイムPCR法を確立し、宿主体内のFOCの検出・定量に利用できることを示した。FocSIX3タンパク質が宿主の盤茎組織でプロセッシングされることを見出し、FocSIX3タンパク質のホモダイマー形成にプロセッシング産物が関与する可能性を示した。FOC分離株におけるエフェクター候補遺伝子の保持と病原性との間に関連性があることを見出した。FOCの4 Mb染色体に病原性遺伝子およびエフェクター候補遺伝子が多数座乗していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that an effector gene homolog (FocSIX3) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) is a pathogenicity gene. FocSIX3-specific primers were used for quantitation of FOC in a host plant. FocSIX3 protein is likely processed by a FOC protease in the basal plate tissue of the host; the processed product may participate in a homodimer formation of FocSIX3 protein. A relationship between presence of candidate effector genes and pathogenicity of FOC isolates was observed. Several pathogenicity genes and candidate effector genes are located on the 4 Mb chromosome of FOC.

研究分野：植物病理学

キーワード：Fusarium oxysporum エフェクター 病原性 染色体 タマネギ乾腐病

1. 研究開始当初の背景

(1) タマネギ乾腐病は、タマネギの重要病害のひとつで、近年の夏季高温化に伴い全国的に被害が目立つようになった。本病の原因菌は *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) であるが、FOC の病原性については不明な点が多く、遺伝子レベルでの解明もほとんど行われていない。著者は、研究開始時までに日本国内の FOC が 8 菌群 (クレード A~H) から成り (図 1)、病原力の強い菌はすべてクレード H に属することを見出していた。

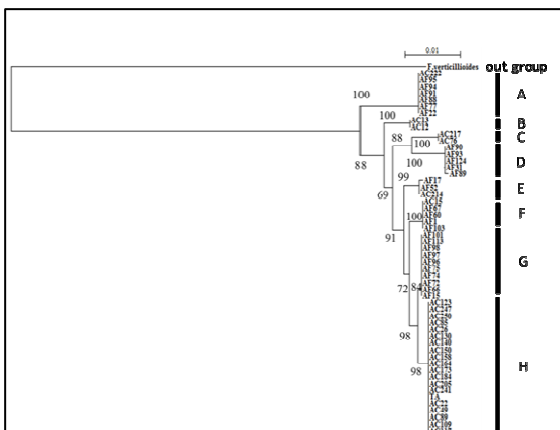


図 1 IGS 領域の塩基配列にもとづくタマネギ乾腐病菌の系統樹

(2) FOC 染色体のパルスフィールド電気泳動解析の結果、クレード H の FOC は、4 Mb の染色体上に他のクレードの FOC には見られない DNA 配列を持つことがわかった。この DNA 配列は、トマト萎ちょう病菌 (FOL) のエフェクター (病原微生物が分泌する病原性タンパク質) をコードしている *SIX* 遺伝子 (*SIX3*、*SIX5*、および *SIX7*) と高い相同性を示した。FOL では、*SIX3* と *SIX5* は、プロモーター領域を挟んで互いに逆向きに隣接しているが (①)、FOC においても *SIX3* と *SIX5* ホモログは互いに逆向きに隣接し、FOL のプロモーターの特徴である TCGGCA モチーフが存在した (図 2)。

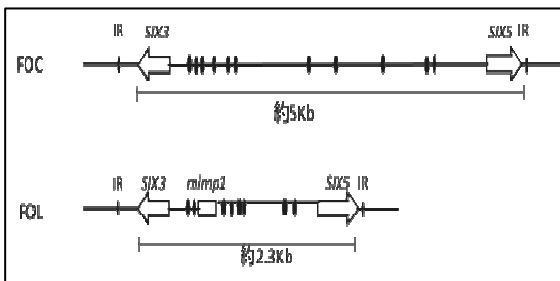


図 2 タマネギ乾腐病菌 (FOC) およびトマト萎ちょう病菌 (FOL) の *SIX3*~*SIX5* 遺伝子領域
■: TCGGCA モチーフ

2. 研究の目的

(1) 強病原性 FOC 菌群 (クレード H の FOC) のみが持っている *SIX* 遺伝子ホモログ

(*FocSIX3*) に着目し、*FocSIX3* が FOC の病原性因子であることを検証するとともに、その作用機構を明らかにする。

(2) FOC のドラフトゲノム解析を行ってエフェクター候補遺伝子を探索するとともに、それらと FOC の病原性との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *FocSIX3* 遺伝子と病原性との関係

スプリットマーカー法によって *FocSIX3* 遺伝子破壊株を作製した。また、*FocSIX3* 遺伝子破壊株に *FocSIX3* 遺伝子を導入した相補株、および過剰発現株を作製し、それぞれのタマネギ幼苗に対する病原性を調査した。

(2) *FocSIX3* 遺伝子特異的塩基配列を標的にした定量 PCR 法

FocSIX3 遺伝子の塩基配列を決定し、既知の *SIX3* 遺伝子ホモログと比較した。*FocSIX3* に特異的な塩基配列をもとにして PCR プライマーを設計した。設計したプライマーを用いたリアルタイム PCR により、FOC 汚染圃場で栽培したタマネギ (乾腐病感受性品種、中度抵抗性品種、および高度抵抗性品種) 植物体中の FOC の定量を行った。

(3) *FocSIX3* タンパク質のプロセッシング

FOC を接種したタマネギ幼苗の根、盤茎、および葉組織からタンパク質を抽出し、抗 *FocSIX3* タンパク質抗体を用いて免疫ブロット解析を行った。盤茎組織において *FocSIX3* タンパク質のプロセッシングが示唆されたため、大腸菌で発現させた *FocSIX3* タンパク質を基質にして、プロセッシングに関わるプロテアーゼの由来を検討した。プロセッシング部位を明らかにするために、11 kDa のプロセッシング産物を精製し、アミノ酸シーケンサーを用いて N 末端配列を決定した。

(4) *FocSIX3* タンパク質と相互作用するタマネギタンパク質の探索

FocSIX3 タンパク質の抗原決定領域を推定して合成したペプチドでウサギを免疫し、抗 *FocSIX3* タンパク質抗体を得た。FOC に感染したタマネギ植物体のタンパク質を調製し、抗 *FocSIX3* タンパク質抗体を用いて免疫沈降を行った。SDS-PAGE および 2 次元電気泳動により *FocSIX3* タンパク質に結合しているタマネギタンパク質を解析した。また、別法として *FocSIX3* タンパク質を bait にした酵母ツーハイブリッド法によって *FocSIX3* タンパク質と相互作用するタンパク質を探索した。

(5) FOC のドラフトゲノム解析

次世代シーケンサーを用いて FOC のドラフトゲノム配列を決定し、リファレンスゲノム (FOL) にマッピングした。FOL のコア染色体にマッピングされなかったリード (病原性遺伝子候補) を回収し、de novo アセンブ

リーを行ってコンティグを作製した。各種のソフトを用いてコンティグ配列の解析を行い、エフェクターの特徴（シグナル配列を持ち、2個以上のシステインを含む300アミノ酸以下のタンパク質）を持つ遺伝子を選抜した。

(6) FOCのエフェクター候補遺伝子の保持パターン

エフェクター候補遺伝子の塩基配列（全41配列）に基づいてプライマーを作製し、病原性の異なるFOC（全48菌株）のDNAを鋳型にしてPCRを行った。各菌株における増幅バンド（41本）のパターンに基づいて系統樹を作成した。

(7) タマネギ FOC の 4.0 Mb 染色体の解析

FOCのプロトプラストを調製し、パルスフィールド電気泳動によって FOC の染色体を分離した。エフェクター候補遺伝子をプローブにしてサザンブロット解析を行い、エフェクター候補遺伝子が座乗する染色体を調べた。パルスフィールド電気泳動後のゲルから、エフェクター候補遺伝子が座乗する4 Mbの染色体を回収し、次世代シーケンサーを用いて本染色体のドラフトゲノム解析を行った。

4. 研究成果

(1) *FocSIX3* と病原性との関係

FocSIX3 遺伝子破壊株では野生株に比べて病原性が低下したが、*FocSIX3* 遺伝子相補株および過剰発現株では野生株と同等であった。この結果から、*FocSIX3* 遺伝子が FOC の病原性関連遺伝子であることが示唆された。これまで、FOC の病原性関連遺伝子に関する報告はなく、本研究によって初めて明らかになった。

(2) *FocSIX3* 遺伝子特異的塩基配列を標的にした定量 PCR 法

FocSIX3 に特異的な塩基配列をもとにして設計したプライマーを用いたリアルタイムPCRによって、FOCに感染したタマネギ植物体中の菌数を定量することができた。また、タマネギ根中の FOC の菌数は、供試した3品種の乾腐病抵抗性の強さに対応していたことから、本プライマーを用いたリアルタイムPCRは、タマネギ品種の乾腐病抵抗性の判定に利用できる可能性がある。

(3) *FocSIX3* タンパク質のプロセッシング

抗 *FocSIX3* タンパク質抗体を用いて、FOCを接種したタマネギ植物体組織の免疫蛍光顕微鏡観察を行ったところ、盤茎で増殖中の FOC が *FocSIX3* タンパク質を発現していることが示唆された（図3）。宿主体内における *FocSIX3* タンパク質の発現を確認するために、FOC を接種したタマネギ植物体からタンパク質を抽出して免疫ブロット解析を行った。

その結果、根および盤茎において *FocSIX3* タンパク質の発現が確認された。興味深いことに、盤茎では成熟 *FocSIX3* タンパク質（14 kDa、143 アミノ酸）に加えて約 11 kDa のタンパク質が検出された（図4）。*FocSIX3* タンパク質の一部がプロセッシングされていることが示唆されたため、これに関わるプロテアーゼの由来を検討した。その結果、FOC が *FocSIX3* タンパク質を約 11 kDa のタンパク質にプロセッシングするプロテアーゼを分泌することがわかった。一方、タマネギ盤茎のタンパク質にはこのような酵素活性はみられなかったことから、FOC は盤茎において自身が分泌するプロテアーゼによって *FocSIX3* タンパク質をプロセッシングしていると考えられた。

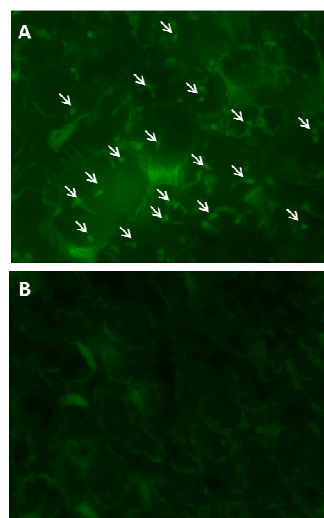


図3 タマネギ乾腐病菌(FOC)を接種したタマネギ植物体盤茎組織の抗 *FocSIX3* タンパク質抗体による免疫蛍光顕微鏡観察

(A) FOC 野生株を接種したタマネギ盤茎組織、(B) 非接種盤茎組織
矢印：抗 *FocSIX3* タンパク質抗体が結合した FOC 菌体

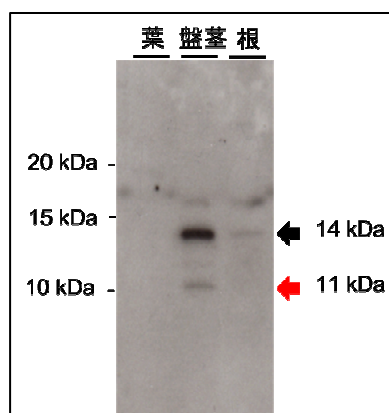


図4 タマネギ乾腐病菌(FOC)を接種したタマネギ植物体盤茎組織タンパク質の抗 *FocSIX3* タンパク質抗体による免疫ブロット解析

プロセッシングされた約 11 kDa のタンパク

質 N 末端配列をアミノ酸シーケンサーで解析した結果、本タンパク質は、FocSIX3 タンパク質 (163 アミノ酸) からシグナルペプチド (20 アミノ酸) が除去された 143 アミノ酸の成熟 FocSIX3 タンパク質 (分泌型 FocSIX3 タンパク質) が 47 番目のフェニルアラニンと 48 番目のセリンの間で切断を受け、C 末端を含む 96 アミノ酸にプロセシングされた産物であることがわかった (図 5)。

FOL では、エフェクターの SIX1 タンパク質が感染したトマトの導管液中でプロセシングされることが報告されているが (2)、その意義についてまったくわかっていない。FOC の場合、盤茎は増殖が最も顕著な組織であることから、プロセシング産物が FOC の増殖において何らかの役割を果たしている可能性も考えられる。

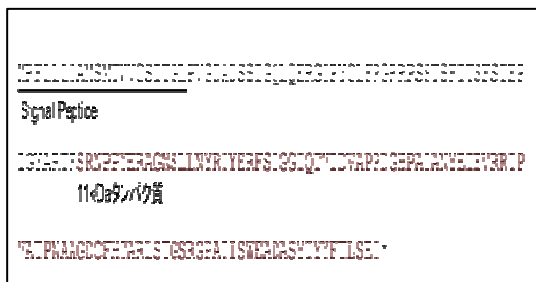


図 5 FocSIX3 タンパク質のプロセシング着色背景で示した部分がプロセシング産物 (11 kDa タンパク質)

(4) FocSIX3 タンパク質と相互作用するタマネギタンパク質の探索

抗 FocSIX3 タンパク質抗体を用いて免疫沈降を行ったが、FocSIX3 タンパク質と相互作用するタマネギタンパク質を特定することはできなかった。また、FocSIX3 タンパク質を bait にした酵母ツーハイブリッド法によって FocSIX3 タンパク質と相互作用するタンパク質を探索したが、prey (タマネギの cDNA ライブラリー) のサイズが十分でなかったこともあり、相互作用する cDNA クローンを得ることができなかった。

そこで、FOL で報告されている SIX3 タンパク質のホモダイマーあるいは SIX5 タンパク質とのヘテロダイマー形成 (3) の可能性について酵母ツーハイブリッド法で解析した。その結果、酵母の細胞内では成熟 FocSIX3 タンパク質 (14 kDa) とプロセシング産物 (11kDa) がダイマーを形成することが明らかになった。この結果から、FocSIX3 タンパク質同士のホモダイマー形成には、C 末端を含む 96 アミノ酸が関与し、N 末端側 47 アミノ酸は関与しないことが示唆された。

これまで、SIX3 のホモダイマー形成のメカニズムについてはまったくわかっていなかったが、本研究によって、その一端が初めて明らかになった。今後は、FOC が感染したタマネギの茎盤における FocSIX3 タンパク質の

ダイマー形成の実態を検証するとともに、ダイマーの役割についても解析を進めたい。

(5) FOC のドラフトゲノム解析

FOL のコア染色体にマッピングされなかったリード (病原性遺伝子候補) を回収して作製したコンティグ配列を解析し、41 個のエフェクター候補遺伝子を選抜した。FOC 菌株の各エフェクター候補遺伝子の有無に基づいて系統樹を作成した結果、FOC 菌株はタマネギに対して強い病原性を示す菌株のクラスター (クラスター-I) と、ネギおよび非病原性 FOC (クラスター-II-1 および II-2) のクラスターに大別され、エフェクター候補遺伝子はすべてクラスター-I の FOC が保持していた (図 6)。また、クラスター-I の菌株は、IGS に基づいた系統樹のクラスター-H (強病原性 FOC クラスター) (4) の FOC 菌株と完全に一致した。これらの結果から、FOC のタマネギに対する病原性とエフェクター候補遺伝子保持との関連性が示唆された。

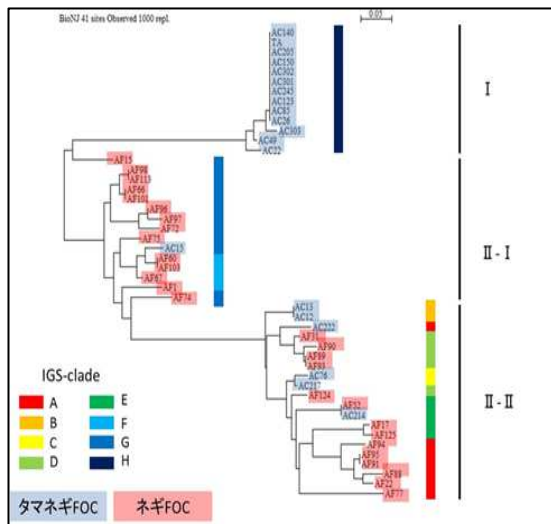


図 6 エフェクター候補遺伝子の有無に基づいて作成した FOC 菌株の系統樹

(6) タマネギ FOC の 4 Mb 染色体の解析

エフェクター候補遺伝子をプローブにして FOC 染色体のサザンブロット解析を行ったところ、エフェクター候補遺伝子の多くが強病原性 FOC の 4 Mb の染色体に座乗していることがわかった。そこで、パルスフィールドゲル電気泳動後のゲルから 4 Mb の染色体を回収し、次世代シーケンサーを用いて 4 Mb 染色体のドラフトゲノム解析を行った。

シーケンシングによって得られたリードからコンティグを構築し、AUGUSTUS を用いて推定タンパク質を予測した。推定タンパク質と pathogen-host interaction database に保存されているタンパク質の相同性を比較し、機能別のアノテーション付けを行った。その結果、822 個の推定タンパク質が pathogen-host interaction database に保存されているタンパク質と相同性があり、この内 268 個のタンパ

ク質が植物病原菌の病原性に関連しているタンパク質との高い相同性を示した (図 7)。

エフェクター候補遺伝子 (8 個) を選抜し、RT-PCR で FOC に感染したタマネギ植物体内での発現を調べたところ、いずれも発現がみとめられた。これらの候補遺伝子をプローブにしたサザンブロット分析の結果、これらはすべて 4 Mb 染色体に座乗する単コピー遺伝子であることがわかった。

以上の結果から、FOC の 4 Mb 染色体には FOC の病原性に関与すると考えられる遺伝子およびエフェクター候補遺伝子が多数座乗していることが明らかになった。すなわち、本染色体は FOC の "pathogenicity chromosome" である可能性が示唆された。今後は、本染色体に座乗する遺伝子のノックアウトあるいはノックダウン株を作製して病原性との関連を明らかにするとともに、本染色体の構造についてさらに詳細な解析を行う予定である。

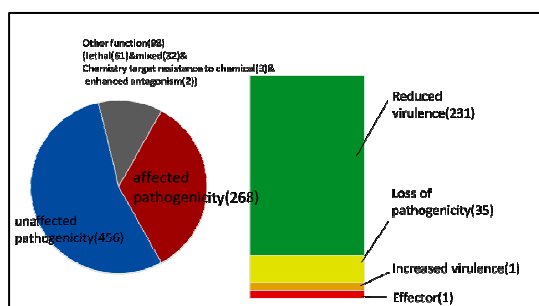


図 7 FOC の 4 Mb 染色体上の推定タンパク質

<引用文献>

①Schmidt, S. M., Houterman, P. M., Schreiver, I. Ma, L., Amyotte, S., Chellappan, B., Boeren, S., Takken, F. L., and Rep, M. (2013) MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. BMC Genomics 14:119. doi: 10.1186/1471-2164-14-119.

②Rep, M., Van Der Does, H. C., Meijer, M., Van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L. and Cornelissen, B. J. (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. Mol. Microbial. 53:1373-1383.

③de Sain, M. and Rep, M. (2015) The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. Int. J. Mol. Sci. 16: 23970-23993.

④Sasaki, K., Nakahara, K., Tanaka, S., Shigyo, M. and Ito, S. (2015) Genetic and pathogenic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolated from onion and Welsh onion in Japan. Phytopathology 105: 525-532.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

①Abdelrahman' M., Abdel-Motaal, F., El-Sayed, M., Jogaiah, S., Shigyo, M., Ito, S., and Tran, L-S, P. (2016) Dissection of *Trichoderma longibrachiatum*-induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* by target metabolite profiling. Plant Science 246: 128-138. 査読有

②Sasaki, K., Nakahara, K., Shigyo, M., Tanaka, S., and Ito, S. (2015) Detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* in onion plant. Journal of General Plant Pathology 81: 232-236. 査読有

③ Sasaki, K., Nakahara, K., Tanaka, S., Shigyo, M. and Ito, S. (2015) Genetic and pathogenic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolated from onion and Welsh onion in Japan. Phytopathology 105: 525-532. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

①佐々木一紀・児玉光里・坂根光星・伊藤真二: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* のエフェクター候補遺伝子の解析. 日本植物病理学会関西部会. 2016年9月30日. 静岡コンベンションアーツセンター (静岡県静岡市).

②Sasaki, K. and Ito, S.: Putative pathogenicity chromosomes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. International Joint Seminar of New Core to Core Program A. Advanced Research Networks on "Plant-Microbe Interaction: Friendship and worship". August 18, 2016. Centara Grand & Bangkok Convention Centre, Central World, (Bangkok, Thailand).

③ Kodama, M. Sasaki, K. and Ito, S.: Exploration of candidate genes encoding effector proteins in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. 2nd satellite seminar, International Symposium on Microbial Research and Biotechnology for Biomass Utilization, November 12-13, 2015. JR HAKATA CITY (Fukuoka, Fukuoka, Japan).

④佐々木一紀・田中秀平・伊藤真二: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* が分泌する萎凋誘導タンパク質の同定. 日本植物病理学会大会. 2015年3月31日. 明治大学 (東京都千代田区).

⑤児玉光里・佐々木一紀・田中秀平・伊藤真二: ドラフトゲノム解析による *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* のエフェクター候補遺伝子の選抜. 日本植物病理学会大会. 2015年3月31日. 明治大学 (東京都千代田区).

⑥Ito, S., Sasaki, K., and Tanaka, S.: Genetic and pathogenic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolated from *Allium* vegetables in Japan. The 1st Joint Seminar. New Core to Core Program A. Advanced Research Networks on "Establishment of an International Research Core for New Bio-Research Fields with Microbes from Tropical Areas". August 11, 2014. Centara Grand & Bangkok Convention Centre, Central World, Bangkok, Thailand.

⑦佐々木一紀・田中秀平・伊藤真一：タマネギ乾腐病菌における *SIX* 遺伝子ホモログの解析. 日本植物病理学会大会. 2014年6月2日. 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 真一 (ITO Shin-ichi)
山口大学・大学院創成科学研究科・教授
研究者番号：30243629

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()