

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

Comparative genomics of the conditionally dispensable chromosomes controlling plant infection in *Alternaria alternata* pathogens

柘植 尚志 (TSUGE TAKASHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授



研究の概要

糸状菌 *Alternaria alternata* には宿主特異的毒素を生産し、毒素感受性の作物に病害を引き起こす7つの病原性系統が存在する。これら病原菌の毒素生成遺伝子は、生存には必要でない **conditionally dispensable (CD)** 染色体にコードされている。本研究では、3病原菌の CD 染色体の構造と機能を比較解析し、植物寄生性を決定する CD 染色体の実体解明を目指す。

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. 研究開始当初の背景

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。先に、5つの病原型から毒素生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、生存には必要でないが、植物寄生など特定の生活環境にのみ不可欠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、エンドウ根腐病菌であり、*A. alternata* は2例目である。

2. 研究の目的

本研究では、基本構造が異なる毒素を生産する3つの病原型の 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ユニークな遺伝因子、CD 染色体の実体解明を目指す。

3. 研究の方法

アルタナリア病原菌のうち、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) について、毒素生成遺伝子をコードするそれぞれ 1.05 Mb、

1.4 Mb、1.0 Mb の CD 染色体を対象としている。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明する。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。

4. これまでの成果

先に、イチゴ菌の AF 毒素生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、両腕に対応する2つのコンテイングを同定した。本研究では、リンゴ菌の AM 毒素生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だ。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ドラフト配列解析、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イングを同定した。さらに、それらの構造比較、CD 染色体遺伝子の発現解析、毒素生成遺伝子領域 (*TOX* 領域) の同定などによって、以下の CD 染色体の特徴が明らかとなった。

(1) 3病原菌の CD 染色体にコードされる遺伝子のデータベース相同性解析、各種培地における発現解析、7つの病原型と非病原性

菌株における分布調査、*TOX*以外の遺伝子の機能解析などから、*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分布し、培養条件下だけでなく、宿主植物が存在しない自然条件下でも、*A. alternata* にとって *dispensable* であることがさらに示唆された。

(2) イチゴ菌とリンゴ菌の *TOX* が存在しない *CD* 染色体左腕(それぞれ 449 kb と 493 kb) の構造が全長にわたり類似しており、さらにこの領域の一部(約 220 kb) がトマト菌の *CD* 染色体にも保存されていることを見出した。このような特徴は、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。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。なお、リンゴ菌の *CD* 染色体の左腕と右腕のセントロメア側、イチゴ菌の *CD* 染色体の左腕と右腕の両末端にも短いながらも共通配列が左右対称に存在する。両菌の *CD* 染色体の起源染色体も左右対称構造であり、その右腕に *TOX* 領域が置換挿入された可能性が考えられる。

(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。他の *A. alternata* 病原菌の毒素生合成遺伝子もゲノム中に複数コピー存在する。リンゴ菌の毒素生合成遺伝子の機能解析から、安定した病原性を発揮するために必要な毒素量を生産するためには、複数コピーの遺伝子が必要であることが明らかとなった。イチゴ菌とタンゼリン菌でも、同様な結果が報告されている。このような特徴は、*A. alternata* における毒素生産性、さらに植物寄生性の進化には、*TOX* 領域の *CD* 染色体への組み込み、さらにその重複が重要であったことを示している。

(5) 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 毒素のダブル毒素生産株、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。さらに、ダブル毒素生産株が 2 倍体ではなく、主要染色体のパターンはどちらかの親株に類似しており、さらに両親株由来の 2 本の *CD* 染色体が共存していることを見出した。以上の結果は、*CD* 染色体が宿主特異的な植物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。

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(寄生性進化)”のメカニズム、糸状菌の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。

5. 今後の計画

(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遺伝子領域の全貌を解明する。

(3) プロトプラスト融合による他種菌への *CD* 染色体の導入を試みる。

6. これまでの発表論文等

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

Akagi, Y., Taga, M., Yamamoto, M., Tsuge, T., Fukumasa-Nakai, Y., Otani, H., and Kodama, M. Chromosome constitution of hybrid strains constructed by protoplast fusion between the tomato and strawberry pathotypes of *Alternaria alternata*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75, 101-109, 2009

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

Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T. L., and Akimitsu, K. Functional analysis of a multi-copy host-selective ACT-toxin biosynthesis gene in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* using RNA silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 1591-1599, 2008

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

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 (Spotlight paper)