

(様式第3号)

## 学 位 論 文 要 旨

氏名: 山岸 大輔

題目: 植物病原菌 *Alternaria alternata* における病原性関連因子の分子解析  
( Molecular analysis of pathogenicity factors in the fungal plant pathogen  
*Alternaria alternata* )

---

植物病原菌が宿主植物上において感染成立に至る過程には、菌が植物との共進化の過程で獲得した様々な発病因子、すなわち病原性関連因子が関与している。このような植物病原糸状菌の病原性発現機構に関しては、化学的実体の明らかとなった病原性因子として、菌の生産する宿主特異的毒素 (host-specific toxin, HST) が知られている。HSTは特定の宿主植物の認識に関わる特異的病原性 (specific pathogenicity) 関連因子であると考えられている。一方、感染器官形成、酵素生産など菌が広く具備する一般的病原性 (力) (general pathogenicity /virulence) あるいは侵略力 (aggressiveness) が関係する発病力も、植物病原菌の病原性において重要な要因である。そこで本研究では、植物病原菌の感染戦略を包括的・総合的に理解することを目的として、necrotroph植物病原菌として世界的に大きな被害をもたらしている *Alternaria alternata* を題材に、HST生産に依存する特異的病原性、また、シグナル伝達系が関与する一般的病原性 (力) の両者に関して、分子レベルの解析を試みた。

トマトアルターナリア茎枯病菌 (*A. alternata* tomato pathotype) は、宿主特異的AAL毒素を生産し、ファーストなど特定のトマト品種に対してのみ茎枯病を引き起こす。茎枯病菌が示す高度の品種特異的病原性には、AAL毒素が重要な役割を果たしていると考えられている。一方、本菌には、主に *Gibberella* 属菌が生産するマイコトキシンであり家畜などに重大な被害をもたらしているフモニシン (fumonisin) をも生産する系統が存在することが報告されている。AAL毒素とフモニシンは、互いに化学構造および生物活性が類似していることから、これら両化合物はスフィンガニンアナログマイコトキシン (SAM) と呼称されている。そこで、世界各地から分離された茎枯病菌株を用いて、培養時におけるSAM生産能、毒素生合成遺伝子であるALT1およびFUM1保有の有無、およびそれらと病原性との関連を調査した。フモニシンを感受性トマト葉に処理した結果、AAL毒素より活性は低いものの壊死を誘起した。さらに非病原性 *Alternaria* 菌株の胞子とSAMを混合し、切り取り葉に接種したところ、フモニシンにおいても、AAL毒素混合区と同様の感染誘導活性を有していた。SAMの定量は、蛍光誘導体化によるHPLC分析と抗AAL毒素ポリクローナル抗体を用いたELISA法を組み合わせで行った。その結果、供試したすべての茎枯病菌はAAL毒素生合成遺伝子ALT1を保有し、AAL毒素を生産していた。一方、すべての茎枯病菌においてフモニシン

は検出されず、また、フモニシン生合成遺伝子FUM1も保有していなかった。以上の結果より、SAMは一般的に感受性トマト葉に対して毒性および感染誘導能を有するが、茎枯病菌株においてはAAL毒素のみが病原性発現に関与していることが示唆された。

また、茎枯病菌におけるHSTの病理学的意義を明確にするためにも、毒素生産能を特異的に欠失させた形質転換体の利用が有効である。そこで、AAL毒素生合成遺伝子をジーンターゲット法によって破壊したAAL毒素生産能欠損株と、AAL毒素と構造類縁体であるフモニシンの解毒酵素フモニシンエステラーゼ遺伝子(ESP1)を発現させた茎枯病菌の形質転換体を用いて、野生株との比較により病原性に対する影響を検討した。その結果、遺伝子破壊株およびESP1遺伝子導入株では、宿主トマトに対して病斑形成の減少が認められた。さらに、形質転換体の培養液中からAAL毒素が検出されなかったことから、AAL毒素生産の欠損により宿主組織への侵入が妨げられ病原性欠失が導かれることが証明された。以上の結果より、本菌においては、AAL毒素生産能のみが一義的に特異的病原性発現を担っていることが明らかとなり、将来、感受性トマトへの毒素分解能の付与により抵抗性育種が可能であることが示唆された。

他方、一般に病原菌による植物への感染には、特異的病原性以外にも一般的病原性因子として、生物が普遍的に保有するヘテロ三量体GTP結合蛋白質(G蛋白質)などシグナル伝達系が関与している例が知られている。そこで、宿主特異的AM毒素を生産するリンゴ斑点落葉病菌(*A. alternata* apple pathotype、落葉病菌)を題材として、G蛋白質 $\alpha$ サブユニット( $G\alpha$ )遺伝子のクローニングと機能解析を試みた。糸状菌 $G\alpha$ 遺伝子の保存領域からデザインしたプライマーによるPCR法を用いて、落葉病菌から $G\alpha$ 遺伝子断片をクローニングし、ゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより $G\alpha$ 遺伝子全長を単離した(AGA1と命名)。AGA1は $G\alpha i$ ファミリーに属していた。サザンおよびPCR解析の結果、AGA1は病原性および非病原性*A. alternata*各菌株に広く分布していることが明らかとなった。さらに、遺伝子ターゲット法によりAGA1破壊株を作出しその性状を解析した結果、破壊株ではコロニー形態、孢子形成能および形態が野生株と異なっていた。また、感染器官形成に関して、野生株では孢子周縁からランダムに形成される発芽管が、孢子両端から1~2本形成されたのみであった。また、野生株と比較して発芽管の分枝は著しく減少し、直線的に伸長した。AGA1破壊株のAM毒素生産能は野生株と同等であったが、宿主リンゴ葉上における形成病斑数は減少した。また、AGA1破壊株においては、細胞内cAMP濃度が野生株と比較して増加していたことから、アデニル酸シクラーゼを負に制御することが示唆された。以上の結果より、AGA1は本菌の形態形成過程に関与し、病原性にも影響を及ぼすことが明らかとなった。