

学位論文要旨

氏名: 赤木 靖典

題目: トマトアルターナリア茎枯病菌における病原性の進化と多様性形成の分子機構に関する研究

(Molecular mechanisms of the evolution and differentiation of pathogenicity in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*)

自然界において広範に分布する*Alternaria alternata*菌の大多数は腐生菌であるが、宿主特異的毒素(host-specific toxin, HST)を生産する*A. alternata*系統は、それぞれの宿主植物に病気を引き起こす。これまでに異なるHSTを生産する少なくとも7つの*A. alternata*病原型が存在することが報告されている。これら*A. alternata*病原菌群は、HST生産能を獲得し、病原菌への進化を遂げた植物病原系状菌であると考えられている。*A. alternata* tomato pathotype (トマトアルターナリア茎枯病菌; 以下、茎枯病菌) は、HSTであるAAL毒素を生産する。本研究では、茎枯病菌とそのAAL毒素を例として、HST依存植物病原菌における病原性の進化と多様性形成の分子機構に関して検討した。

1. 染色体水平移動—植物病原系状菌における病原性の進化と分化の分子機構

宿主特異的AAL毒素を生産する茎枯病菌株は、非病原性*A. alternata*菌株には見出されない付加的で余分な小型染色体を保有しており、AAL毒素合成遺伝子 (*ALT*) クラスターは本小型染色体上に座乗していた。本染色体の病理学的意義を明らかにするとともに、茎枯病菌の病原性の進化および分化における本染色体の関わりについて検討した。

本染色体を人為的に欠損させた場合、毒素生産能および病原性は失われるが、菌の成長などには影響が全く認められなかった。この結果は、本小型染色体がconditionally dispensable chromosome (CDC)であることを示唆する。世界各国で分離された茎枯病菌 (AAL毒素生産菌) は、全て同サイズのCDCを保有していた。さらに、AAL毒素合成遺伝子*ALT1*を含むCDC上の遺伝子と、その他の染色体に座乗する遺伝子それぞれにおいて、菌株間での配列を比較した。その結果、CDC以外の染色体では各種遺伝子配列に多様性がみられるのに対し、CDC上の遺伝子配列は菌株間で一致していた。また、テロメア配列や反復配列を用いたフィンガープリンティング解析により、これら茎枯病菌菌株の遺伝的バックグラウンドが異なることが示唆された。さらに、rare-cutting enzyme (*NotI*) を使用したRFLP解析により、*ALT1*を含む少なくとも130 kb領域が、菌株間で一致している可能性が示された。これらの結果は、各分離菌株において、CDCの由来が他のゲノム領域と異なる可能性を示唆する。これらの結果に加え、プロトプラスト融合により茎枯病菌とイチゴ黒斑病菌間におけるハイブリッド菌株を作成した結果、イチゴ菌の遺伝的バックグラウンドを持ちながら、茎枯病菌のCDCを保持する菌株が見出された。茎枯病菌CDCは、細胞融合を通して菌株間で移動保持され、新たな遺伝的バックグラウンドを有する菌系統中で安定に維持されると考えられた。これら一連の研究成果を踏まえ、茎枯病菌の病原性の進化と分化の分子機構において、病原性染色体 (CDC) の水平移動が関与しているとする“染色体水平移動説”を新たに提唱した。

2. 細胞融合法により作出した*A. alternata*病原型間におけるハイブリッド株の染色体構成

有性世代が見出されていない*A. alternata*菌群の遺伝学的研究においては、細胞融合法に基づく parasexual analysis の適用が有効である。これまでに、*A. alternata* 菌株間において、プロトプラストの電気融合に基づくハイブリッド菌株の作出に成功しているが、融合株の染色体構成や遺伝的バックグラウンドについては明らかとなっていない。そこで本研究では、*A. alternata* トマト病原型とイチゴ病原型菌株間において融合株を作出し、その染色体構成、病原性などを検討した。

両病原型菌株間でのプロトプラスト融合の結果、8つの融合株の作出に成功した。これらのうち5株を以降の実験に用いた。融合株のうち2つがトマト、イチゴ両宿主植物に病原性を示すとともに、AAL毒素およびAF毒素を生産した。残りの3株はトマトにのみ病原性を示し、AAL毒素のみを生産した。融合株におけるこの結果は、PCRおよびサザン解析による両毒素生合成遺伝子の保有の有無に関する結果と一致した。さらに融合株の病原性および毒素生産能は、融合株が保有する各親株由来のCD染色体の有無と一致した。

融合株の遺伝的バックグラウンドをシーケンス解析およびパルスフィールドゲル電気泳動法により調査した。異なる染色体に座乗する遺伝子のシーケンス解析の結果、融合株は両方の病原型由来の遺伝子を同時に保有していなかった。このことから、各親株由来の染色体はランダムに1つずつ融合株に受け継がれることが示唆された。発芽管破裂法を用いた染色体の細胞学的観察により、融合株の染色体数は2倍にならず親株と同程度であることが明らかとなった。すなわち、融合株の染色体構成は、両親株からランダムに由来する常染色体にCD染色体が付加されたものであることが示唆された。また融合株におけるCD染色体の安定性を継代培養により検討したところ、本染色体が欠失することはなかった。以上の結果より、CD染色体は、細胞融合を通して菌株間で移動保持され、新たな遺伝的バックグラウンドを有する菌系統中で安定に維持される可能性が示された。

3. 茎枯病菌が保有するAAL毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスターの構造および機能解析

茎枯病菌のCDC上に座乗するAAL毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスターを含むBACクローンを選抜し、全シーケンス解析を完了した。その結果、毒素生合成に関与する可能性が認められる少なくとも13のORFを見出した。これら遺伝子は、AAL毒素の構造類縁体である、*Fusarium* 属菌由来マイコトキシン フモノシンの生合成遺伝子 *FUM* と高い相同性が認められた。*ALT* クラスター遺伝子の機能解析を迅速かつ簡便に行うため、新規の遺伝子ターゲティングベクター作成法を含む遺伝子破壊法を開発した。本法を用いることにより、従来法と比較して遺伝子機能解析を容易に行うことが可能となり、これまでに *ALT2*、*ALT3*、*ALT8~10* および *ALT13* の6遺伝子の機能解析が終了した。