

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	赤木 靖典
審査委員	主査 児玉基一朗 (印) 副査 尾谷 浩 (印) 副査 前川二太郎 (印) 副査 伊藤 真一 (印) 副査 澤 嘉弘 (印)
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
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>自然界において広範に分布する <i>Alternaria alternata</i> 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 <i>A. alternata</i> 系統は、それぞれの宿主植物に病気を引き起こす。これら系統は、HST 生産能を獲得し、病原菌への進化を遂げた植物病原糸状菌であると考えられている。<i>A. alternata</i> 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。</p> <p><b>1. 染色体水平移動—植物病原糸状菌における病原性の進化と分化の分子機構</b></p> <p>宿主特異的 AAL 毒素を生産する茎枯病菌株は、非病原性 <i>A. alternata</i> 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 毒素生合成遺伝子 (<i>ALT</i>) クラスターは本小型染色体上に座乗していた。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 <b>conditionally dispensable chromosome (CDC)</b> 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 毒素生合成遺伝子 <i>ALT1</i> 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、DNA 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。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。さらに、プロトプラスト融合実験の結果より、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株中で安定に維持されると考えられた。</p> <p>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。</p> <p><b>2. 細胞融合法により作出した <i>A. alternata</i> 病原型間におけるハイブリッド株の染色体構成</b></p> <p>有性世代が見出されていない <i>A. alternata</i> 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。本研究では、<i>A. alternata</i> トマト病原型とイチゴ病原型菌</p>	

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。

プロトプラスト融合により作出した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 PFGE により調査した結果、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株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* 属菌由来マイコキシン フモニ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*、および *ALT8~13* の 8 遺伝子の機能解析が終了した。

本研究により得られた成果は、植物病原菌における病原性発現機構の理解に大きく貢献し、さらに、病原性の進化と多様性形成の分子機構に関して新規の概念を提案・証明した点は高く評価できる。以上の点から、学位論文として十分な価値を有すると判定した。