

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* の  
遺伝系統および病原性遺伝子

(Genetic lineage and pathogenicity genes in  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*)

佐々木 一紀

2015

## 目次

第1章 総合序論.....	1
第2章 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> の系統解析および病原性試験.....	5
I. 序論.....	5
II. 材料および方法.....	7
III. 結果.....	17
IV. 考察.....	30
第3章 タマネギ分離 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> における SIX3 の機能および FOC 特異的検出.....	33
I. 序論.....	33
II. 材料および方法.....	35
III. 結果.....	46
IV. 考察.....	71
第4章 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> が分泌する萎凋誘導性タンパク質の同定.....	75
I. 序論.....	75
II. 材料および方法.....	77
III. 結果.....	83
IV. 考察.....	93
第5章 総合考察.....	95
謝辞.....	99
引用文献.....	100
摘要.....	111
Summary.....	114
公表論文目録.....	116

## 第 1 章 総合序論

*Fusarium oxysporum* 種複合体は、世界中の広範囲の土壌中に生息するアナモルフ菌で、様々な種類の作物に感染し病害を引き起こすことから、農業上重要な土壌伝染性病原菌である。また、*F. oxysporum* の中には植物に病害を起さないものやエンドファイトとしてふるまう菌株も存在する。*F. oxysporum* は 120 種以上の植物に病害を引き起こすにもかかわらず、それぞれの菌株の宿主範囲は狭く、1 つの植物種またはその近縁種しか侵すことができない (Armstrong and Armstrong 1981)。それらの菌株はその宿主特異性に基づいて分化型 (forma specialis) に分類される。それゆえ、*F. oxysporum* の分化型を形態のみで分類することはできない。さらに、ある分化型において、宿主植物の品種に対する病原性が異なる菌群が存在する場合には、それらはレース (race) として細分化される。この品種特異性は遺伝子対遺伝子説に基づくもので、植物品種の抵抗性 (*R*) 遺伝子と菌株レースの非病原力遺伝子 (*avr*) 遺伝子が対応した場合に抵抗性反応が起こり、対応しない場合はすべて感受性反応となる (Joosten and De Wit 1999)。

タマネギ (*Allium cepa* L.) は、世界中で栽培され、経済的に重要な野菜の一つである。2012 年には世界で 8200 万 t 生産されており、日本でも 110 万 t 生産されている (FAOSTAT 2012)。ネギ (*A. fistulosum* L.) もタマネギと同様 *Allium* 属に属する野菜で、主に日本や中国などの東アジアで栽培されている (Inden and Asahira 1990)。日本では、ネギは薬味などに利用され日本料理には欠かせない野菜で、年間に 42 万 t 生産されている (FAOSTAT 2012)。ネギは、年間を通して需要があることから、全国各地で周年栽培が行われている (Dissanayake et al. 2009b)。わが国におけるタマネギの作付面積は 24,900 ha、ネギの作付面積は 23,000 ha で、それぞれ主要野菜の作付順位の 6 位と 7 位を占める (FAOSTAT 2012)。

タマネギおよびネギの栽培においては、他の野菜と同様にさまざまな病原菌の攻撃を受ける。その中で最も重大な損失をもたらす病害の一つとして、タマネギ乾腐病とネギ萎凋病が挙げられる (児玉 1977, 1983; Dissanayake et al. 2009b)。タマネギ乾腐病とネギ萎凋病はともに *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) によって引き起こされる (児玉 1977; 高桑ら 1977; Dissanayake et al. 2009b)。タマネギ乾腐病の発生は、苗床または本畑での栽培中、および収穫後の貯蔵中のいずれの期間においても見られる (Schwartz and Mohan 1995)。タマネギ乾腐病の症状は、地上部においてはまず下葉

から湾曲、黄化しはじめ、最終的には萎凋し枯死する。また、地下部においては盤茎部の褐変に加えて根が枯死し、症状の激しいものでは盤茎部が消失する。このような植物体は出荷することが困難であり、大きな経済的損失を引き起こす。また、栽培中に発病しなくても、栽培中に本菌を保有したタマネギ鱗茎は貯蔵中に発病する場合がある。ネギ萎凋病の症状もタマネギ乾腐病と同様に、まず下葉から黄化しはじめ、葉の壊死、萎凋を経て最終的には枯死に至る。FOC は土壌から根または盤茎部を介して植物体内へ侵入する（児玉 1983）。タマネギ乾腐病およびネギ萎凋病の防除法としては抵抗性品種の利用、輪作、太陽熱または殺菌剤を用いた土壌消毒、生物農薬などが挙げられる（Cramer 2000）。

近年、わが国では夏期の高温および豪雨が全国各地で起こるようになってきているが、このような気象変化はネギおよびタマネギの病害発生にも大きな影響を及ぼしている。ネギ萎凋病に関しては、夏期の高温が特に顕著になった 2006 年以降、全国各地で被害が目立ちはじめた（Dissanayake et al. 2009b）。また、タマネギ乾腐病は 2010 年頃から主要産地である北海道で夏期に大発生するようになり、甚大な被害をもたらしている。このようなことから、ネギ萎凋病およびタマネギ乾腐病に対する抵抗性品種の育成・普及が緊急の課題となっている。

ネギ萎凋病およびタマネギ乾腐病に対する抵抗性品種を育成するためには、圃場に存在する FOC の菌群分化（遺伝的多様性）や、レース分化を含む病原性分化の実態を把握しておくことが必須となる。Dissanayake ら（2009b）は、ネギ萎凋病罹病個体から FOC を分離し、我が国に分布している FOC が遺伝的に多様で、4 つのグループに大別されることを初めて明らかにした。これらの分離菌の病原性については、菌株によって大きな差があるものの、レースの分化はみられなかった。一方、タマネギ乾腐病菌については、Widodo ら（2008）が、北海道のタマネギ乾腐病菌が 4 つの vegetative compatibility group (VCG) を含むことを報告している。しかしながら、タマネギ乾腐病菌の病原性分化については調べられていない。さらに、ネギ萎凋病菌とタマネギ乾腐病菌は、分類学的にはいずれも *f. sp. cepae* とされているが（児玉 1983）、両者の遺伝的關係や病原性の差異について詳細に検討した報告は見当たらない。

FOC も、他の *F. oxysporum* の各分化型と同様、宿主の導管内で増殖して萎凋症状を引き起こす。*F. oxysporum* の病原性に関連する遺伝子として、これまで *FTF1* や *CTF1* などの転写因子（de Vega-Bartol et al. 2011; Rocha et al. 2008）、*PG5*（エンドポリガラクトナーゼ）や *PL1*（ペクチンリアーゼ）などの細胞壁分解酵素

(García-Maceira et al. 2001; Huertas-González et al. 1999)、あるいは *SIX1* (secreted in xylem 1) などのエフェクター遺伝子 (Rep et al. 2004) が報告されている。しかしながら、重要野菜の病原菌であるにもかかわらず、FOC の病原性関連遺伝子についてはまったく報告されていない。

エフェクターは、植物の防御応答を変化させ、植物組織への定着を可能にさせる分泌タンパク質または低分子化合物で、病原菌が宿主に感染する際に重要な役割を果たす (Hogenhout et al. 2009)。SIX タンパク質は、トマト萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) が感染したトマトの導管液プロテオーム解析によって発見されたエフェクターで、現在までに 14 の SIX タンパク質をコードする遺伝子が同定されている (Rep et al. 2004; Houterman et al. 2007; Lievens et al. 2009; Ma et al. 2010; Rep and Kisler 2010; Schmidt et al. 2013)。これらのうち *SIX1*、*SIX3*、および *SIX4* は、エフェクター遺伝子または非病原性遺伝子として機能することが報告されている。*SIX1* (*AVR3*) はトマト抵抗性遺伝子 *I* (immunity) -3 によって認識される非病原性遺伝子で、*SIX3* (*AVR2*) は *I-2* によって認識される非病原性遺伝子である。また、*SIX4* (*AVR1*) はトマト抵抗性遺伝子 *I-1* によって認識される非病原性遺伝子として働く (Houterman et al. 2008; Houterman et al. 2009; Rep et al. 2004)。このように、FOL では遺伝子対遺伝子説に基づくレース分化が明確に解明されている。しかしながら、FOC ではレース分化は認められていない。また、タマネギに乾腐病耐性を冠する品種は存在するが、完全な乾腐病抵抗性を持つ品種は今のところ存在しない。

*F. oxysporum* の全ゲノム配列は、FOL 4287 株において初めて決定された (Ma et al. 2010)。FOL 4287 株は 15 本の染色体を有し、その塩基配列は近縁種である *F. verticillioides* のゲノム塩基配列と高い相同性を有していた。しかし、FOL の 3、6、14、および 15 番染色体は *F. verticillioides* のゲノム配列とほとんど相同性がなく、lineage-specific (LS) 染色体と名付けられ FOL に特徴的な染色体であるとされた (Ma et al. 2010)。興味深いことに、FOL の 14 番染色体にはほとんどの *SIX* 遺伝子が座乗しており、トランスポゾンも豊富に含まれていた。さらに、この 14 番染色体は容易に非病原性 *F. oxysporum* に水平移動し、14 番染色体を受容した非病原性 *F. oxysporum* はトマトに対して萎凋を引き起こすことができるようになった。この結果は、*F. oxysporum* には “病原性染色体” が存在することを示唆している。このような Horizontal gene transfer (HGT) または horizontal chromosomal transfer (HCT) は、植物病原真菌において非病原性菌が病原性を獲得する機構として重要であり、

*Stagonospora nodorum* / *Pyrenophora tritici-repentis* や *Alternaria alternata* でもこの現象が起こることが示唆されている (Friesen et al. 2006; Akagi et al. 2009)。

上述のように、*F. oxysporum* の遺伝系統の分化および病原性遺伝子に関しては、*f. sp. lycopersici* など一部の分化型において知見が得られている。しかしながら、FOC においてはこれらに関する知見は極めて少ない。そこで本研究では、FOC の遺伝系統の分化および病原性遺伝子に関する知見を得ることを目的として、タマネギおよびネギから分離された FOC の遺伝的多様性を解析するとともに (第 2 章)、エフェクター遺伝子ホモログの探索とその応用について検討した (第 3 章)。また、FOC が分泌する萎凋誘導性タンパク質に着目してその性質を明らかにした (第 4 章)。

## 第2章 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* の

### 系統解析および病原性試験

#### I. 序論

タマネギ乾腐病は *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) によって引き起こされる。また本病原菌はネギに感染し、ネギ萎凋病を引き起こすことも知られている。同一の分化型 (f. sp. *cepae*) が異なる宿主 (タマネギおよびネギ) を侵すにもかかわらず、タマネギ分離 FOC とネギ分離 FOC 両者の遺伝的多様性について解析・比較した研究事例は見当たらない。*F. oxysporum* の分化型内における遺伝的多様性および病原性を解析することは、宿主の抵抗性を打破してきた病原菌の進化的適応を明らかにできる可能性がある。また、日本に分布するタマネギおよびネギから分離した FOC の遺伝系統を解析することは、タマネギおよびネギ栽培における効率的な病害管理において有益な知見となる。

これまで、*F. oxysporum* の遺伝的多様性を調べるために、さまざまな手法が用いられてきた。*F. oxysporum* は有性生殖が未知のアナモルフ菌であるが、それぞれの菌株は2つの交配遺伝子座 (*MAT1-1* および *MAT1-2*) のいずれかを保持している (Arie et al. 2000)。有性生殖を行わないために、この種内における進化には Vegetative compatibility groups (VCGs) が大きく関わっている。VCGs はヘテロカリオン不親和性遺伝子 (*vic*) 座によって支配されている (Leslie 1993)。同一の *vic* 座を保持している菌株同士はヘテロカリオンを形成するため、遺伝的に単一系統であるといえる。このため、Vegetative compatibility は FOC の分化型内における遺伝的多様性を調べるための有用な方法として用いられてきた (Southwood et al. 2012a; Swift et al. 2002; Widodo et al. 1993; Bayraktar et al., 2010)。

また、リボソーム RNA をコードしている遺伝子 (rDNA) 領域における intergenic spacer (IGS) と translation elongation factor-1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) 遺伝子は、進化における変異が大きく、分子系統解析に広く用いられてきた。O'Donnell ら (2009) はこの2つの DNA 領域を用いて、様々な分化型に属する 850 株の *F. oxysporum* の系統解析を行った。その結果、*EF-1 $\alpha$*  遺伝子領域は 101、IGS 領域は 203 のタイプに分かれ、2つの領域を組み合わせた場合には、256 のシークエンスタイプに分かれることを明らかに

した。さらに、その 256 タイプの 3 分の 2 は一つの宿主植物と関連があることが示唆された。IGS および *EF-1α* 遺伝子は FOC の遺伝的多様性解析にも利用されている (Southwood et al. 2012b; Bayraker et al. 2010; Dissanayake et al. 2009a)。Dissanayake ら (2009a) は、日本においてネギ分離 FOC は多系統から成ること、またネギに対する病原性の程度と系統発生との間に関連性が示唆されたことを述べている。しかしながら、これまで日本においてタマネギから分離した FOC の遺伝的解析や病原性に関する知見はほとんど得られていない。

FOC とは対照的に、トマト萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) の遺伝系統や病原性進化は詳細に研究されている。最近の研究によって、FOL はトマト感染時に導管液中へ Secreted in xylem (SIX) という低分子のエフェクタータンパク質を分泌することが明らかになった。現在までに 14 の SIX 遺伝子が同定されている (Rep et al. 2004; Houterman et al. 2007; Lievens et al. 2009; Ma et al. 2010; Rep and Kisler 2010; Schmidt et al. 2013)。FOL で同定された当初は、*SIX* 遺伝子は FOL に特徴的なものとされていたが、それらのいくつかのホモログが他の分化型で同定されている。しかし、*SIX3* および *SIX5* 遺伝子は FOL 以外の分化型では見つかっていない。

本章では、日本のタマネギおよびネギから分離した FOC の遺伝的多様性および病原性を明らかとするために、IGS 領域および *EF-1α* 遺伝子の塩基配列を用いて系統解析を行った。さらに、*SIX* 遺伝子の保持の有無について調べ、他の分化型との比較も行った。



## II. 材料および方法

### 1. 供試菌株

系統解析および病原性試験には本研究室保存菌株であるタマネギ分離 *Fusarium oxysporum* を 27 株およびネギ分離 *Fusarium oxysporum* を 28 株、計 55 株を使用した (Table 4)。

### 2. DNA 抽出

各菌株を、PDB 液体培地中で 3 日間、25°C で 120 rpm の振とう培養した。菌糸をろ紙上で吸引濾過して回収し、得られた菌体ペレットを -80°C で凍結保存した。各菌株のゲノム DNA は GenTLE from Yeast (Takara) を用いて、添付のマニュアルに従って抽出した。すなわち、菌体を乾熱滅菌した乳鉢と乳棒を用いて液体窒素内で摩砕し、200  $\mu$ l の GenTLE Yeast Solution A を加えさらに摩砕した。摩砕液を 1.5 ml チューブに移し、37°C で 1 時間インキュベートした。これに 40  $\mu$ l の GenTLE Yeast Solution B を加えて混和し、70°C で 10 分間インキュベートした。さらに 80  $\mu$ l の GenTLE Yeast Solution C を加えて混和し、氷中で 5 分間静置した。4°C、13,000  $\times$ g で 5 分間遠心し、上清を回収した。上清に 100  $\mu$ l のイソプロパノールを加えて転倒混和し、4°C、13,000  $\times$ g で 5 分間遠心した。上清を捨て、200  $\mu$ l の 80%エタノールを加えて混和し、4°C、13,000  $\times$ g で 5 分間遠心した。上清を捨て風乾し、抽出した DNA は TE buffer に溶解し、-20°C で凍結保存した。

### 3. PCR

すべての PCR は Quick Taq HS Dye Mix (Toyobo) を使用して行った。反応溶液は 10  $\mu$ l の Quick Taq HS Dye Mix、0.2  $\mu$ M の各プライマー、20 ng のゲノミック DNA を混合し、dH<sub>2</sub>O を加え最終容量を 20  $\mu$ l とした。反応は 94°C 2 分の後に 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 kb/1 分を 35 サイクル行った。使用したプライマーは Table 1 に示した。サーマルサイクラーは T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) を使用した。PCR 産物は 1.2%または 2%アガロースゲルで電気泳動を行い、臭化エチジウム (1  $\mu$ g/ml) で染色し、UV イルミネーター下で可視化した。

**Table 1 Oligonucleotide primers used in this study**

Primer name	Sequence (5'-3')	Target	Reference
PNFo	CCCGCCTGGCTGCGTCCGACTC	IGS	Edel et al. (1995)
PN22	CAAGCATATGACTACTGGC	IGS	Edel et al. (1995)
IGS2	GCCGGATTTGCTCCCTTCT	IGS	Fourie et al. (2009)
EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	<i>EF-1a</i>	O'Donnell et al. (1998)
EF2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	<i>EF-1a</i>	O'Donnell et al. (1998)
fusALPHAfor	CGCCCTCTKAAYGSCTTCATG	<i>MAT1-1</i>	Kerényi et al. (2004)
fusALPHArev	GGARTARACYTTAGCAATYAGGGC	<i>MAT1-1</i>	Kerényi et al. (2004)
fusHMGfor	CGACCTCCCAAY GCYTACAT	<i>MAT1-2</i>	Kerényi et al. (2004)
fusHMGrev	TGGGCGGTACTGGTARTCRGG	<i>MAT1-2</i>	Kerényi et al. (2004)
Hansec-1F	TTATTGCCCTCATCGGAAAG	IR-SACR (392 bp)	Southwood et al. (2012a)
Hansec-2R	ACCAGCATGCAGCAACAGTC	IR-SACR (392 bp)	Southwood et al. (2012a)
HTH-1F	CATCGGAAGTGACATGGTTG	IR-SACR (244 bp)	Southwood et al. (2012a)
HTH-2R	AGGCTTTTCCAGCATTTGAA	IR-SACR (244 bp)	Southwood et al. (2012a)
P12-F1	CCCCGAATTGAGGTGAAG	<i>SIX1</i>	Rep et al. (2004)
P12-R1	AATAGAGCCTGCAAAGCATG	<i>SIX1</i>	Rep et al. (2004)
SIX2-F2	CAACGCCGTTTGAATAAGCA	<i>SIX2</i>	Van der Does et al. (2008b)
SIX2-R2	TCTATCCGCTTCTTCTCTC	<i>SIX2</i>	Van der Does et al. (2008b)
SIX3-F1	CCAGCCAGAAGGCCAGTTT	<i>SIX3</i>	Van der Does et al. (2008b)
SIX3-R2	GGCAATTAACCACTCTGCC	<i>SIX3</i>	Van der Does et al. (2008b)
SIX4-F1	TCAGGCTTCACTTAGCATACT	<i>SIX4</i>	Lievens et al. (2009)
SIX4-R1	GCCGACCGAAAAACCCTAA	<i>SIX4</i>	Lievens et al. (2009)
SIX5-F1	ACACGCTCTACTACTCTTCA	<i>SIX5</i>	Lievens et al. (2009)
SIX5-R1	GAAAACCTCAACGCGGCAAA	<i>SIX5</i>	Lievens et al. (2009)
SIX6-F1	CTCTCCTGAACCATCAACTT	<i>SIX6</i>	Lievens et al. (2009)
SIX6-R1	CAAGACCAGGTGTAGGCATT	<i>SIX6</i>	Lievens et al. (2009)
SIX7-F1	CATCTTTTTCGCCGACTTGGT	<i>SIX7</i>	Lievens et al. (2009)
SIX7-R1	CTTAGCACCCCTTGAGTAACT	<i>SIX7</i>	Lievens et al. (2009)

#### 4. 系統解析

系統樹は、rDNA IGS 領域および *EF-1 $\alpha$*  遺伝子領域の塩基配列に基づいて作成した。

##### 4-1. PCR

IGS 領域の増幅にはプライマーペア PNFo/PN22 (Edel et al. 1995) を、*EF-1 $\alpha$*  遺伝子領域の増幅にはプライマーペア EF1/EF2 (O'Donnell et al. 1998) を用いて PCR を行った (Table 1)。PCR 産物は Ethachinmate (ニッポンジーン) を使用して精製した。すなわち、PCR 産物に 1/100 量の Ethachinmate と 1/30 量の 3 M Sodium Acetate を加えてボルテックスをした。2.5 倍量の 100%エタノールを加え再度ボルテックスをして、4°C、13,000 xg で 5 分間遠心した。上清を捨て、100  $\mu$ l の 80%エタノールを加え混和し、4°C、13,000 xg で 5 分間遠心した。上清を捨て風乾して、20  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O に溶解した。

##### 4-2. シークエンシング

シークエンシングは BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて行った。シークエンシングプライマーにはそれぞれ PCR に用いたプライマーを使用し、IGS 領域に関しては、中央領域の塩基配列を決定するプライマー IGS2 (Fourie et al. 2009) も使用した。反応溶液には 0.95  $\mu$ l のシークエンシングバッファー、1  $\mu$ l のプライマー (5 pmol/ $\mu$ l)、20 ng のテンプレート DNA、0.4  $\mu$ l の BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix を用い、最終容量が 10.35 ml となるように dH<sub>2</sub>O を加えた。反応条件は 96°C1 分の後に、96°C30 秒、55°C15 秒、60°C4 分を 30 サイクル行った。シークエンシング反応産物に 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウムと 2 倍量の 100% エタノールを加えて -80°C で 30 分静置し、4°C、13,000 rpm で 10 分間遠心して上清を捨てた。80%エタノールを 100  $\mu$ l 加え、4°C、13,000 rpm で 5 分間遠心して上清を捨て、風乾した。精製したシークエンシング反応産物の塩基配列の決定は、山口大学遺伝子実験施設に委託し、ABI310 DNA シーケンサー (Applied Biosystems) を使用して行った。

##### 4-3. 系統樹の作成

各菌株の IGS および *EF-1 $\alpha$*  のそれぞれの塩基配列を、ClustalW (Thompson et al. 1994) を使用してアライメントした。系統樹作成には MEGA v.4.0 (Tamura et al. 2007)

を使用した。進化的距離推定法には Kimura's two-parameter model (Kimura 1980) を適用し、近隣接合法 (Saitou and Nei 1987) によって系統樹を作成した。ブートストラップ検定は 1,000 反復で行った。アウトグループには、IGS 領域の系統樹においては *F. verticillioides* (NCBI accession No. AY249379) の配列を、*EF-1 $\alpha$*  領域においては *Fusarium* spp. NRRL28387 (NCBI accession No. AF246832) および NRRL25184 (NCBI accession No. AF008514) を使用した。また、他の分化型との関係を示す系統樹には、Table 2 に示した塩基配列を使用した。アウトグループとして、*F. proliferatum* (NCBI accession No. AJ879946) および *F. sacchari* FGSC7610 (NCBI accession No. AB106061) を使用した。

## 5. VCG (vegetative compatibility group) 試験

VCG 試験は Correll ら (1987) の方法に従って行った。

### 5-1. *nit* 変異株の作出

まず、*nit* 変異株作出のために各菌株を 40 g/l KClO<sub>3</sub> および 1.6 g/l L-asparagine を含む MM 培地 (30 g Sucrose, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.5 g KCl, 10 mg FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 20 g Agar, および 0.2 ml trace element (5 g Citric acid, 5 g ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1 g Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.25 g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 50 mg MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 50 mg H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, および 50 mg NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O in 100 ml dH<sub>2</sub>O) in 1 l dH<sub>2</sub>O) 上で生育させた。生育してきた菌株の菌糸の先端を 2 g/l NaNO<sub>3</sub> を含む MM 培地に移し、3~4 日後に気中菌糸がなく薄い菌叢を形成したものを *nit* 変異株とした。

### 5-2. *nit* 変異株の表現型の類別

得られた各変異株は硝酸塩、亜硝酸塩、ヒポキサンチン、またはアンモニウム塩の各窒素源の利用能の違いによって 3 種の表現型 (*nit1*、*nit3*、または NitM) に類別した。すなわち、各変異株を 2 g/l NaNO<sub>3</sub>、0.5 g/l NaNO<sub>2</sub>、0.2 g/l Hypoxanthine、および 1 g/l Ammonium tartrate をそれぞれ唯一の窒素源として含む MM 培地上で生育させた。生育 4 日後に気中菌糸を有したものはその窒素源を利用できると判断し Table 3 の判断基準によって類別した。

### 5-3. VCG 試験

VCG 試験は上記の方法で得た *nit1* 変異体と NitM 変異体がヘテロカリオンを形成するかどうか観察することで行った。まず自家不和合性を確認するために、同一親株の *nit1* と NitM 変異株を MM 培地上で 2 cm 離れた位置にそれぞれ植菌し、1 週間培養してヘテロカリオンを形成するかどうかを確かめた。その後、自家和合性を示した各変異株と他の菌株の変異株を MM 培地上で 2 cm 離れた位置にそれぞれ植菌し、1 週間培養してヘテロカリオンを形成するかどうかを確かめた。

### 6. IR-SCAR marker による識別

Inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region (IR-SCAR) マーカーによる VCG の識別は Southwood ら (2012a) の方法を参考に行った。プライマーペア HTH-1F/HTH-2R (244 bp) および Hansec-1F/Hansec-2R (392 bp) を用いて Multiplex PCR を行った。

### 7. MAT (Mating type) の同定

Mating type の同定は *MAT1-1* を増幅するプライマーペア fusALPHAfor/fusALPHArev、*MAT1-2* を増幅するプライマーペア fusHMGfor/fusHMGrev (Kerényi et al. 2004) を用いて Multiplex PCR を行った。

### 8. *SIX* 遺伝子の検出

供試菌が *SIX* 遺伝子ホモログを保持しているか否かを明らかにするために、*SIX* 遺伝子特異的プライマーを用いて、Livens ら (2009) の方法に従って *SIX1*~*SIX7* の増幅を行った。

**Table 2** Isolates of *Fusarium oxysporum* formae speciales used in this study

Isolate	Forma specialis	Host	GenBank accession
MAFF103036	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 1)	tomato	AB106020
MAFF305121	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 1)	tomato	AB106021
MAFF727501	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 1)	tomato	AB106022
MAFF744006	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 1)	tomato	AB106023
NRRL26034	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 1)	tomato	AB106025
NBRC6531	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 1)	tomato	AB106018
MAFF103038	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 2)	tomato	AB106031
MAFF103043	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 2)	tomato	AB106032
SUF1330	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 2)	tomato	AB106035
Chz1-A	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 3)	tomato	AB373819
Tomino1-c	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 3)	tomato	AB106044
F-1-1	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 3)	tomato	AB106037
MAFF103051	f. sp. <i>melongenae</i>	eggplant	AB106055
MAFF103070	f. sp. <i>batatas</i>	sweet potato	AB106049
Cong:1-1	f. sp. <i>conglutinans</i>	cabbage	AB106051
MAFF240329	f. sp. <i>conglutinans</i>	cabbage	AB306796
SUF1017	f. sp. <i>apii</i>	celery	AB106049
Rif-1	f. sp. <i>cucumerinum</i>	cucumber	AB106052
NRRL26406	f. sp. <i>melonis</i>	melon	AB106055
MAFF305608	f. sp. <i>niveum</i>	watermelon	AB106057
MAFF240328	f. sp. <i>raphani</i>	Japanese radish	AB306835
Ta-2	f. sp. <i>rapae</i>	turnip	AB306830

**Table 3** Identification of nitrate nonutilizing (*nit*) mutants from *Fusarium oxysporum* by growth on different nitrogen sources

	Growth on nitrogen sources			
	NaNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>2</sub>	Hypoxanthine	Ammonium tartrate
<i>nit1</i>	–	+	+	+
<i>nit3</i>	–	–	+	+
NitM	–	+	–	+

+; typical wild-type growth, –; thin growth with no aerial mycelium

## 9. CHEF サザン解析

### 9-1. プロトプラストの作製

供試菌を PD 液体培地 100 ml 内で 25°C、120 rpm で 3 日間振とう培養し、培養液を 3 重ガーゼでろ過し、3,000 rpm、10 分間遠心し、胞子を回収した。1 x 10<sup>8</sup> 胞子/ml とした胞子懸濁液を 50 ml の PDB に移し、25°C で 12 時間培養した。吸引濾過で発芽菌糸を回収し OM buffer (1.2 M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH5.8)) で洗浄した。回収した発芽菌糸をアシストチューブに移し、5ml の酵素液 (10 mg/ml Lysing enzyme (Sigma)、4 mg/ml Yatalase (Takara)、in OM buffer) を加え、30°C で 2~3 時間振とうし、30 分毎にプロトプラスト化の状態を顕微鏡で観察した。90%以上の細胞がプロトプラスト化していることを確認し、1 ml の ST buffer (0.6 M Sorbitol、100 mM Tris-HCl (pH8.0)) を重層し 2,000 rpm で遠心した。中間層 (プロトプラスト層) を回収し、5 ml の STC buffer (1 M Sorbitol、50 mM CaCl<sub>2</sub>、50 mM Tris-HCl (pH8.0)) を加え混和し、750 rpm で遠心した。上清を回収し 3,000 rpm で遠心し、プロトプラストを沈殿させた。STC buffer で 2 度洗浄し、トーマ氏血球計算盤でプロトプラストの数を計測した。

### 9-2. ゲルプラグの作製

単離したプロトプラスト懸濁液を STE buffer (1 M Sorbitol、25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM EDTA) で 2 x 10<sup>8</sup> 個/ml とした。この懸濁液に 45°C に保温した等量のアガロース (1.2% Agarose L (ニッポンジーン) in STE buffer) を加えよく攪拌した。これを Plug Mold (Bio-Rad) へ分注し、4°C で 20 分間静置した。ゲルプラグを 2 mg/ml ProteaseK を含む NDS buffer (100 mM Tris-HCl (pH 9.5)、0.5 M EDTA、1% N-lauroyl sarcosine sodium salt) に入れ、50°C で 16 時間処理した。処理後、ゲルプラグを 50 mM EDTA で 3 回洗浄し、50 mM EDTA 中で 4°C で保存した。

### 9-3. パルスフィールド電気泳動

泳動装置は contour-clamped homogeneous electric field dynamically regulated II (CHEF-DRII) system (Bio-Rad) を使用した。泳動ゲルは Certified Megabase Agarose (Bio-Rad) in 0.5 x TBE buffer を使用し、泳動 buffer には 0.5 x TBE buffer を使用した。泳動条件は電圧 1.5 V/cm、スイッチタイム 1200 s-4800 s で 4°C 下、260 時間行った。染色体 DNA マーカーとして *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad) お



よび *Schizosaccharomyces pombe* (Bio-Rad) を用いた。電気泳動終了後、臭化エチジウム (1 µg/ml) で 30 分間染色し、脱イオン水で 30 分間脱色した後、UV トランスイルミネーターで泳動像を確認した。

#### 9-4. ブロットティング

泳動後のゲルを 0.25 M HCl で 10 分間振とうし脱プリン化を行った後、Denaturation buffer (0.4 M NaOH、3 M NaCl) で 30 分間処理した。次いで Neutralization buffer (0.5 M Tris-HCl (pH 7.0)、1.5 M NaCl) で 30 分間平衡化した後、20 x SSC (0.3 M Tri-sodium citrate、3 M NaCl) を用いて Hybond-N+ナイロンメンブレン (GE Healthcare) へ染色体 DNA のブロットティングを行った。一晚ブロットティングを行った後、メンブレンを 10 分風乾させ、80°C で 2 時間バイクし、DNA を固定した。

#### 9-5. プローブの作製

プローブの作製には DIG DNA Labeling Kit (Roche) を用いて DNA プローブのラベリングを行った。反応溶液は 2 µl の 10 x ExTaq Buffer、2 µl の DIG Labeling Mixture、1 µl のテンプレート DNA、1 µl の各プライマー、0.2 µl の ExTaq (Takara)、12.8 µl の dH<sub>2</sub>O を混合した。反応条件は 94°C 3 分の後に、94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 1 分を 35 サイクル行い、72°C 5 分を行った。

#### 9-6. サザンハイブリダイゼーション

メンブレンを DNA ボトル (Kurabo) に入れ、High SDS Buffer (50% formamide、7% SDS、50 mM sodium phosphate、2% Blocking Reagent、5 x SSC、0.1% sodium N-lauroyl sarcosinate) を 20ml 加えて、50°C、16 rpm で最低 1 時間振とうしてプレハイブリダイゼーションを行った。プローブを 10 分間ボイルして変性させた後、氷中に 5 分間放置してリニアライゼーションを行った。DNA ボトル内の High SDS Buffer を除き、新しい High SDS Buffer 10 ml とリニアライゼーションしたプローブを 25 ng/ml となるように加え、50°C、16 rpm で一晚振とうすることによりハイブリダイゼーションを行った。

## 9-7. シグナルの検出

シグナルの検出には DIG Luminescent Detection Kit (Roche) を使用した。ハイブリダイゼーションを終えたメンブレンを洗浄液 1 (2x SSC、0.1% SDS) で 5 分間室温で振とうする操作を 2 回、さらに洗浄液 2 (0.1x SSC、0.1% SDS) で 30 分間室 68°C で振とうする操作を 2 回行った。洗浄を終えたメンブレンを Dig Washing Buffer (150 mM NaCl、100 mM maleic acid (pH 7.5)、0.3% Tween 20) で 5 分間振とうして洗浄し、Dig Buffer 2 (150 mM NaCl、100 mM maleic acid (pH 7.5)、1% Blocking Reagent) で 30 分間室温で振とうし、さらに Anti-digoxigenin-AP を Dig Buffer 2 で 10,000 倍希釈したもので 30 分間振とうした。その後 Dig Washing Buffer で 15 分間振とうする操作を 2 回行い、Dig Buffer 3 (100 mM Tris-HCl (pH9.5)、100 mM NaCl) で 5 分間振とうした。メンブレンをポリエチレンバックに入れ、CSPD を Dig Buffer 3 で 100 倍希釈したものを加えシーリングし、37°C で 15 分間インキュベートした。暗室内でメンブレンを X 線フィルムにのせ、フィルムカセットにセットし、30 分～一晩感光させた。感光後、RENDOL (FUJIFILM) に浸して現像を行い、RENFIX (FUJIFILM) に浸して定着を行った後、バンドの確認を行った。

## 10. 接種試験

各菌株を PD 液体培地で 3 日間、25°C、120 rpm で振とう培養し、培養液を滅菌 3 重ガーゼでろ過し、3,500 xg で 5 分間遠心し上清を捨てた。洗浄のために dH<sub>2</sub>O を加えてボルテックスをし、3,500 xg で 5 分間遠心し上清を捨てた。得られた胞子を dH<sub>2</sub>O に懸濁した。胞子濃度はトーマ氏血球計算盤を使用し計測した。タマネギ品種にはヒグマ (タキイ種苗) および北もみじ 2000 (七宝) を供試した。0.5% 次亜塩素酸ナトリウムに 10 分間浸漬後、滅菌水で十分に洗浄したタマネギの種子を滅菌シャーレに播種して発芽させ、滅菌培土 (川砂 : タキイ育苗培土 = 4 : 1) に移植した。25°C の人工気象器 (明期 16 時間、暗期 8 時間、約 3500Lux) で草丈が 5~6 cm になるまで生育させた。この幼苗の根を胞子懸濁液 (1 x10<sup>6</sup> 個/ml) に 1 時間浸漬し、再び人工培土に移植して 25°C の人工気象器で 21 日間生育させ、枯死株率を調査した。なおコントロール植物は滅菌水に 1 時間浸漬した後、同様に人工培土に移植した。実験はそれぞれの菌株に対して幼苗を 10 株ずつ用い、それぞれ 2 反復で行った。

### III. 結果

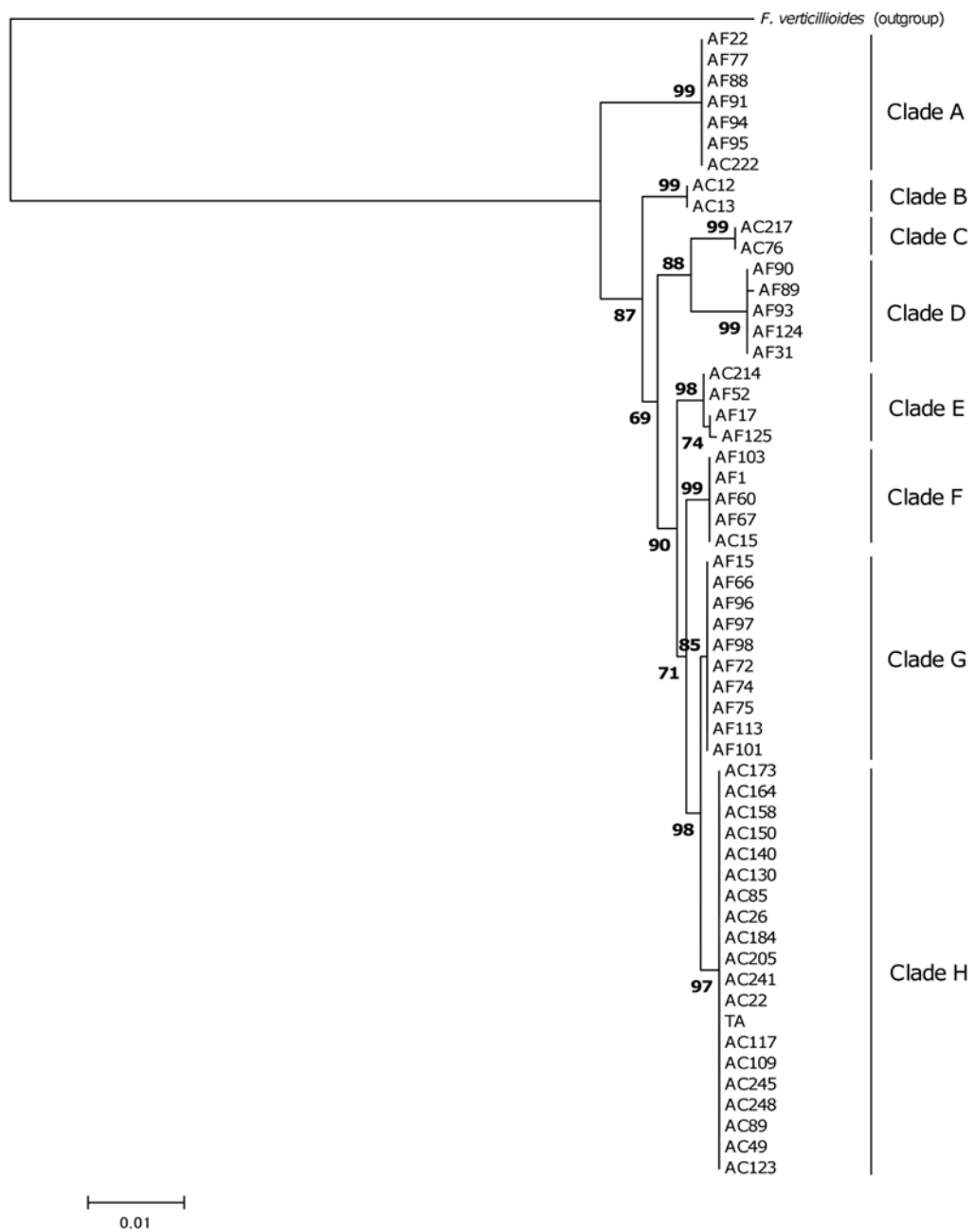
#### 1. 系統解析

系統解析には日本国内 12 道県のタマネギおよびネギから分離した 55 菌株の *F. oxysporum* を使用した。55 菌株の内わけは、タマネギ分離 *F. oxysporum* が 27 株、ネギ分離 *F. oxysporum* が 28 株である (Table 4)。これらの菌株において、ribosomal DNA inter-genic spacer (IGS) 領域および translation elongation factor-1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) 遺伝子領域の塩基配列をもとに系統樹を作成した。IGS 領域をもとに作成した系統樹は A~H の 8 つのクレードに分岐した (Fig. 1)。各クレードとそのクレードに属する菌株の地理的起源に関連性は認められなかった。北海道および佐賀のタマネギから分離した菌株の大部分は Clade H に属し、Clade H の菌株間の IGS 塩基配列は 100% の相同性を示した。一方、*EF-1 $\alpha$*  遺伝子に基づく系統樹は大きく分けて 2 つのクレードに分岐した (Fig. 2)。*EF-1 $\alpha$*  系統樹において、IGS 系統樹で Clade H に属した菌株はすべて subclade B1 に分岐した。一方で、IGS 系統樹における Clade H 以外のクレードと *EF-1 $\alpha$*  のクレードとの関連性は見いだせなかった。両系統樹の結果から、ネギ分離菌における高度の遺伝的多様性が観察された。

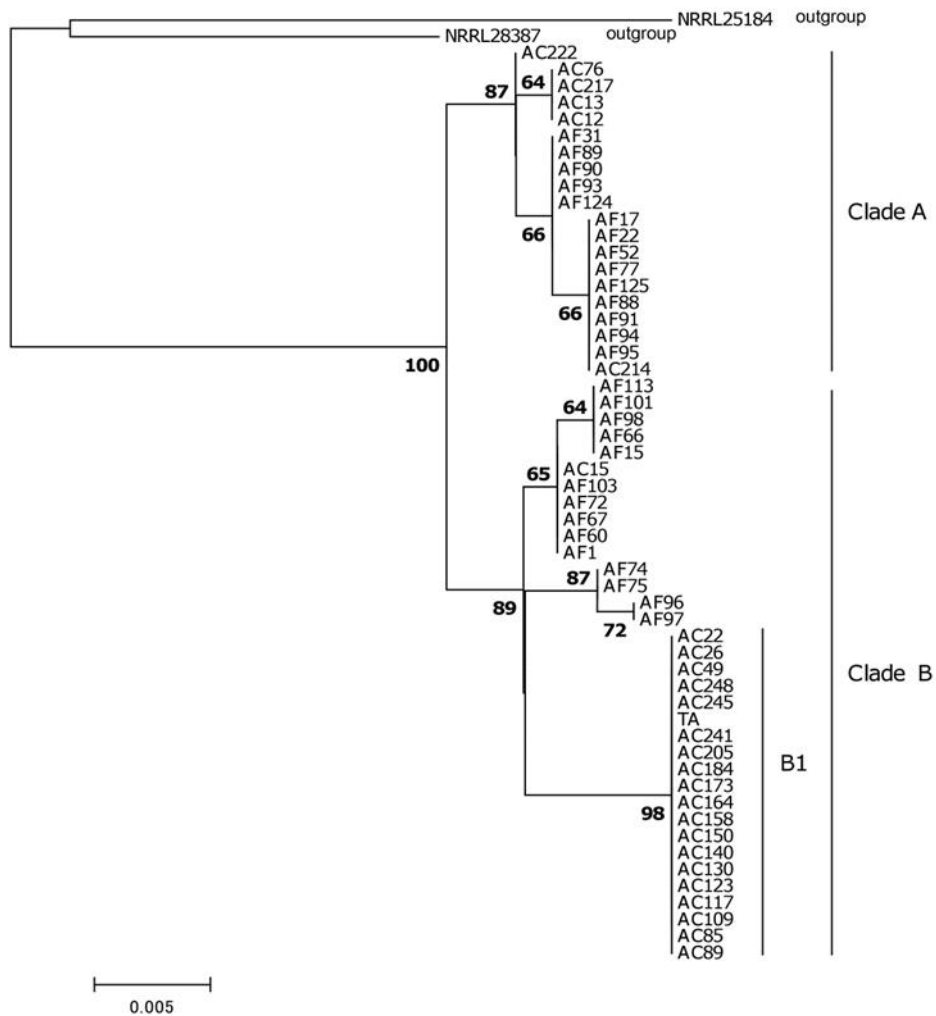
次に、IGS 領域の塩基配列をもとに、他の分化型に属する菌株を含めた系統樹も作成した。その結果、大きく分けて 3 つのクレードに分岐した (Fig. 3)。Clade 1 には供試したすべての FOL 菌株が属し、さらに FOC のみで作成した系統樹 (Fig. 1) の Clade E、Clade F、Clade G および Clade H に属した菌株も分岐した。特に Clade F に属した菌株と FOL のレース 3 は同一のサブクレードに属した。Clade 2 には FOC のみで作成した系統樹の Clade A、Clade B、Clade C および Clade D に属した菌株と FOL 以外の分化型に属する菌株が分岐した。Clade 3 には *f. sp. rapae* のみが分岐した。

#### 2. コロニー性状

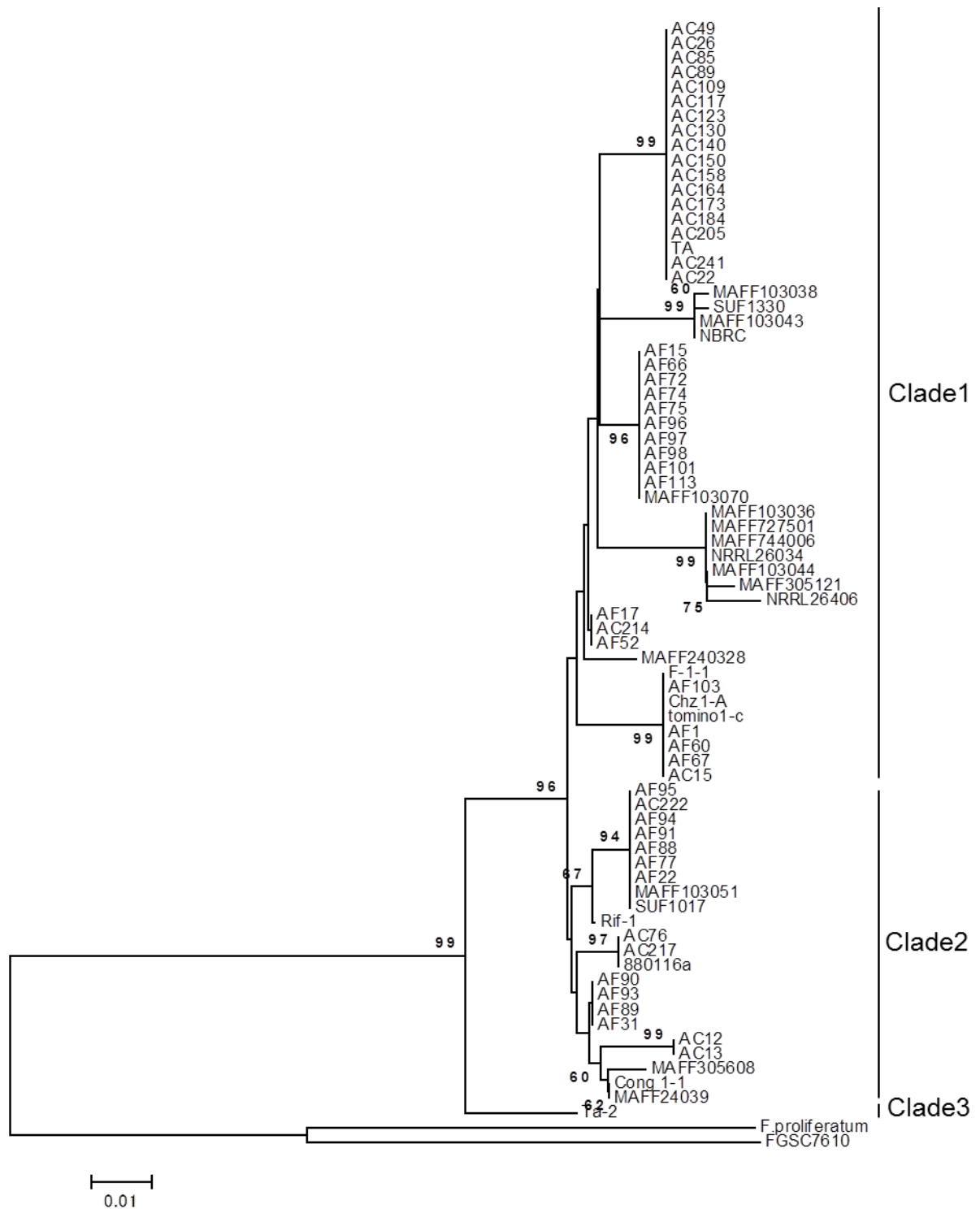
各菌株の PDA 培地上でのコロニー性状を観察したところ、IGS 系統樹の Clade A~G に属する菌株はすべて赤~赤紫色の色素を生産したのに対して、Clade H に属する菌株は色素を生産せず白色のコロニーを形成した (Fig. 4)。



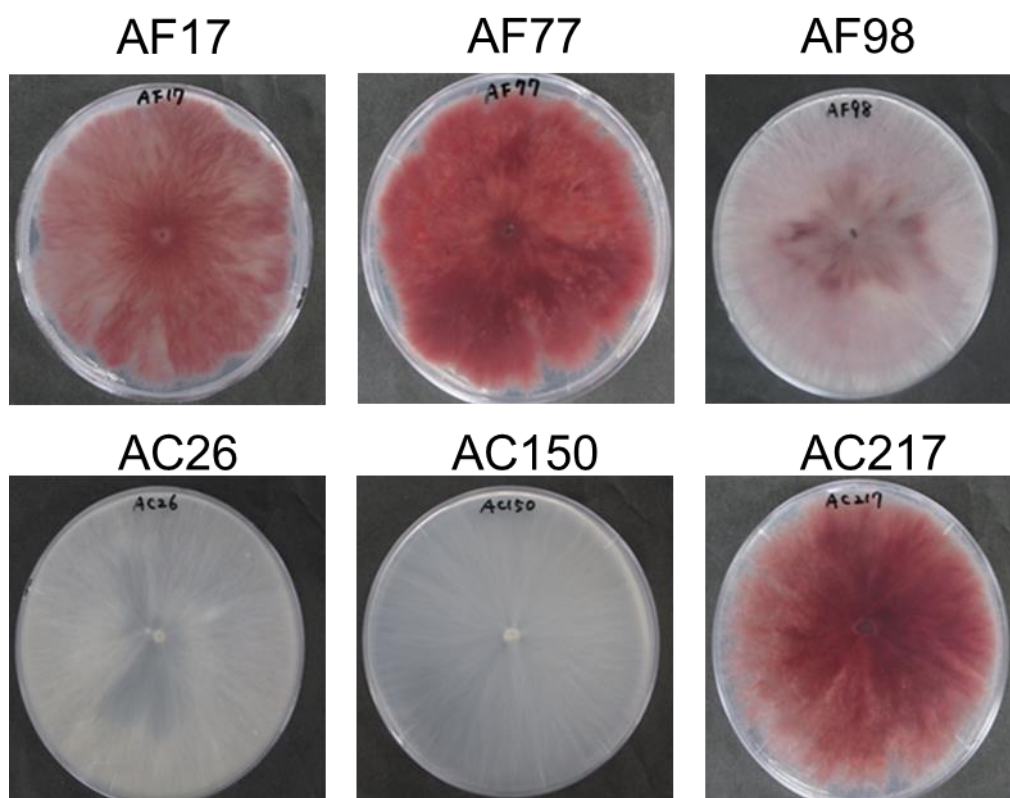
**Fig. 1.** Phylogenetic tree generated using neighbor-joining methods based on intergenic spacer (IGS) region sequences of *Fusarium oxysporum* isolated from onion and Welsh onion. The numbers beside branches represent the percentages of congruent clusters in 1,000 bootstrap trials, with values greater than 60%. Scale bar indicates 1% sequencedissimilarity.



**Fig. 2** Phylogenetic tree generated using neighbor-joining method based on translation elongation factor (*EF-1a*) sequences of *Fusarium oxysporum* isolated from onion and Welsh onion. The numbers beside branches represent the percentages of congruent clusters in 1,000 bootstrap trials, with values greater than 60%. Scale bar indicates 0.5% sequence dissimilarity.



**Fig. 3** Phylogenetic tree generated using neighbor-joining methods based on intergenic spacer (IGS) region sequences of forma specialis of *Fusarium oxysporum*. The numbers beside branches represent the percentages of congruent clusters in 1,000 bootstrap trials, with values greater than 60%. Scale bar indicates 1% sequencedissimilarity.



**Fig. 4** Colony pigment of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* grown on PDA medium.

### 3. Vegetative compatibility group 試験

Vegetative compatibility group (VCG) を分類するために、系統解析に用いた各菌株を  $\text{KClO}_3$  添加培地上で培養した。得られた各変異株を窒素源利用能の違いによって、*nit1*、*nit3*、および NitM の表現型に類別した。55 株の内 5 株 (AF1、AF103、AF124、AF125、および AC214) は *nit1* または NitM のどちらかの変異株を作製することができなかつたため、VCG 試験には用いながつた。また、3 株 (AF77、AF91、AC12) は heterokaryon self-incompatible (HSI) の表現型を示したため、VCG 試験に用いながつた。VCG 試験に用いた 47 株から、5 つの VCGs と 18 つの single member of VCG (SMV) が得られた (Table 4)。IGS 系統樹で Clade H に属した各菌株同士は、それぞれヘテロカリオンを形成し、VCG4 (G4) に分類された (Table 4)。

### 4. IR-SCAR マーカー

本研究では、IR-SCAR マーカーを用いて VCG の同定を行った。この IR-SCAR マーカーは、FOC の VCG 0421 と VCG 0425 を同定することのできるマーカーとして Southwood ら (2012a) が報告したもので、Hansec プライマーペアと HTH プライマーペアを用いた multiplexPCR によって、それぞれ 392 bp と 244 bp の DNA 断片が増幅される。本研究の結果、IGS 系統樹 Clade H に属する 20 菌株のみで増幅産物が得られ、その他のクレードに属する菌株では増幅は起こらなかつた。しかしながら、増幅が確認できた 20 株の内 4 株 (AC140、AC150、AC205、TA) は 244 bp の断片は増幅されず、392 bp の断片のみが増幅された (Table 4)。

### 5. Mating type の同定

交配遺伝子座 HMG ボックスおよび  $\alpha$  ボックスそれぞれを増幅するプライマーペアを用いて、Mating type の同定を行った。IGS 系統樹の Clade D および G に属する菌株はすべて *MAT1-1* であり、Clade B、C、および H に属する菌株はすべて *MAT1-2* であった。Clade A、E、および F には *MAT1-1* と *MAT1-2* の菌株が混在していた (Table 4)。

### 6. *SIX* 遺伝子の検出

*SIX1*~*SIX7* を増幅するプライマーペアを用いて、系統解析に使用した各菌株の *SIX* 遺伝子の保持を確認した。IGS 系統樹 Clade H に属する菌株すべてで *SIX3*、*SIX5*、



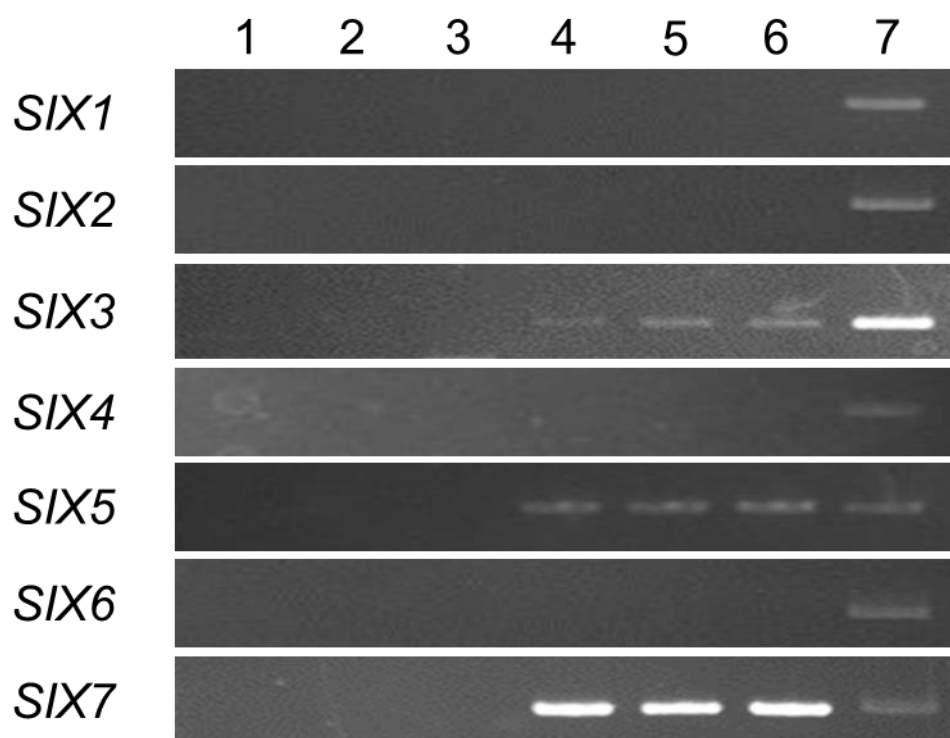
および *SIX7* の DNA 断片が増幅された。その他の菌株では *SIX* 遺伝子を増幅するいずれのプライマーペアにおいても増幅産物の確認はできなかった (Fig. 5 and Table 4)。

#### 7. *SIX3* ホモログおよび IR-SCAR マーカー増幅産物の座乗染色体

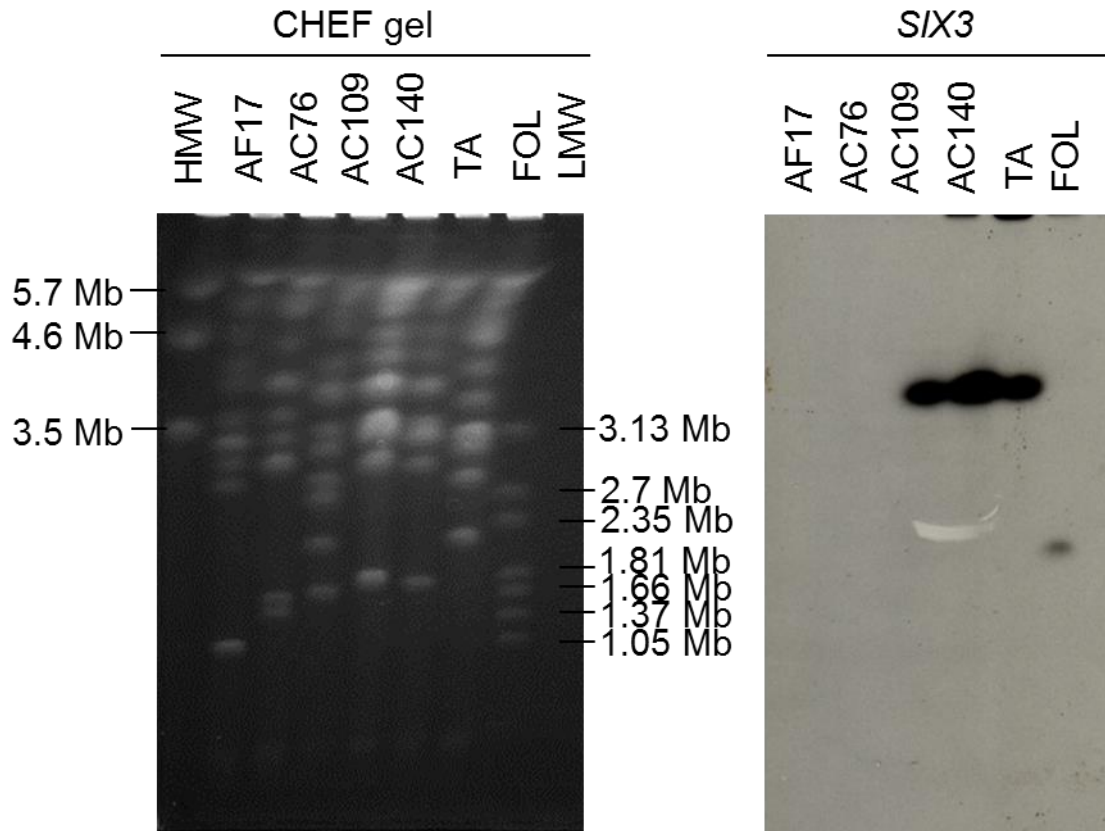
*SIX3* ホモログおよび IR-SCAR マーカー増幅産物の座乗染色体を決定するために、菌株の染色体を CHEF ゲルによって分離しサザンハイブリダイゼーションを行った。*SIX3* ホモログは FOL においては約 2 Mb の染色体上に座乗しているが、IGS Clade H に属するタマネギ分離 FOC においては約 4 Mb の染色体上に座乗していた (Fig. 6)。Hansec 断片 (392 bp) は AC109 株と TA 株の約 4 Mb の染色体上に座乗していた (Fig. 7)。しかし、HTH 断片 (244 bp) は AC109 株の約 4 Mb の染色体上のみハイブリダイズし、TA 株ではシグナルが検出できなかった (Fig. 7)。これは IR-SCAR マーカーを用いた PCR の結果と一致する (Table 4)。これらの結果から IGS Clade H に属する菌株において、*SIX3* ホモログと IR-SCAR マーカーの標的配列は同一の約 4 Mb の染色体に座乗することがわかった。

#### 8. 接種試験

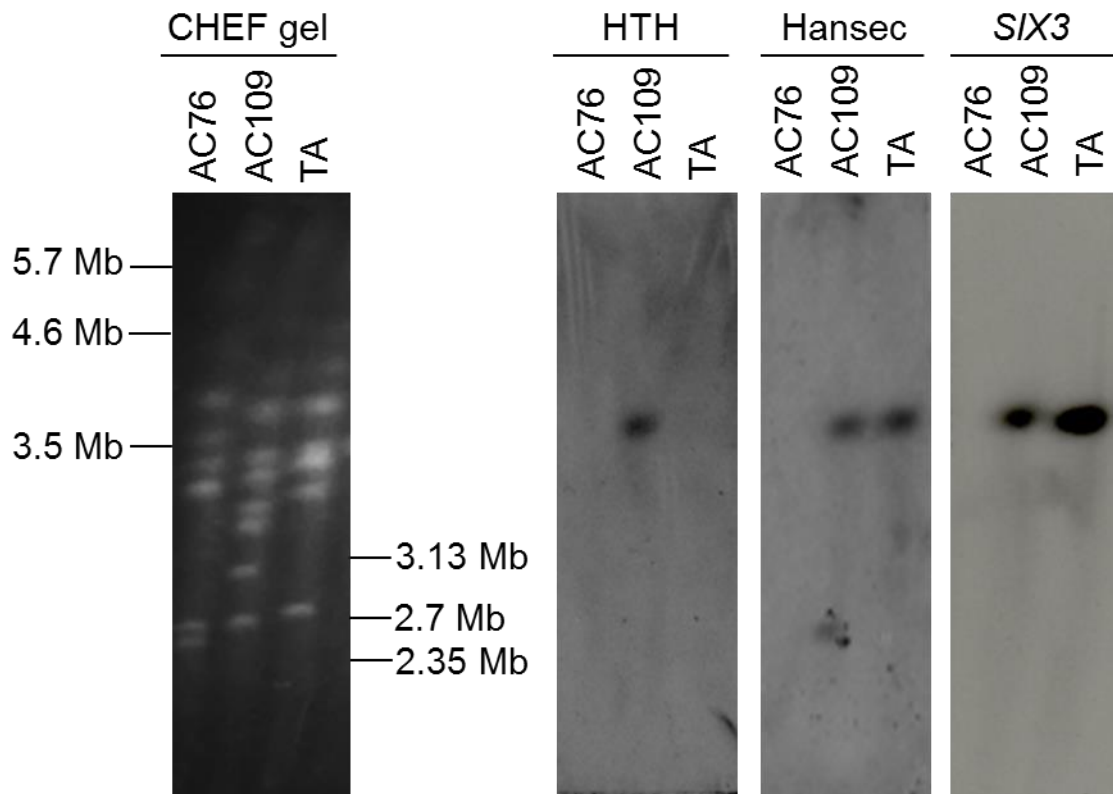
各菌株の接種試験はタマネギ幼苗を用いて行った。タマネギ品種として ‘ヒグマ’ および ‘北もみじ 2000’ を使用した。接種はタマネギ幼苗の根を孢子懸濁液に 1 時間浸漬した後に人工培土を詰めたポットに移植することによって行った。植物体の枯死株率は接種 3 週間後に算出した。IGS 系統樹 Clade H に属する菌株の大部分は両品種に対して中程度または強い病原性を示した (Table 4)。特に AC150、AC205、および TA 株は両品種に対して 90%以上の植物体で萎凋症状を引き起こし、非常に強い病原性を保持していた。IGS 系統樹において Clade H 以外に属したタマネギ分離菌株は、弱い病原性を示すか、または萎凋を引き起こさなかった。ネギ分離菌の大部分はタマネギ幼苗に対して弱くまたは中程度の病原性を示した。しなしながら、AF88 株は品種 ‘ヒグマ’ に対して、AF91 株および AF94 株は品種 ‘北もみじ 2000’ に対して強い病原性を示した (Table 4)。



**Fig. 5** Amplification of *SIX* genes from *F. oxysporum* isolated from onion and Welsh onion. 1: AF17, 2: AF91, 3: AC76, 4: AC85, 5: AC245, 6: TA, 7: FOL CK3-1(race2)



**Fig. 6** Chromosomal localization of *SIX3* homolog in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Karyotype profiles of *F. oxysporum* f. sp. *cepae* by contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) electrophoresis (left panel) and Southern blot analysis of the CHEF gel using *SIX3* as a probe (right panel). LMW: low molecular weight marker (*Saccharomyces cerevisiae*); HMW: high molecular weight marker (*Schizosaccharomyces pombe*); FOL: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (race 2).



**Fig. 7** Chromosomal localization of transposable elements in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Karyotype profiles of *F. oxysporum* f. sp. *cepae* by contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) electrophoresis (left panel) and Southern blot analysis of the CHEF gel probed with 244 bp fragment (HTH), 392 bp (Hansec), and *SIX3* homolog (*SIX3*)(right panel).

**Table 4** Characteristics (pathogenicity, vegetative compatibility groups (VCGs), mating type, and *SIX* genes) of *Fusarium oxysporum* isolated from onion and Welsh onion in Japan

Isolate	Host	Regional origin	Year	Percentage of wilted plants <sup>a</sup>		VCG <sup>b</sup>	IR-SCAR marker <sup>c</sup>	Mating type	<i>SIX</i> genes <sup>d</sup>	Accession No. <sup>e</sup>	
				cv.	cv.					IGS	EF 1- $\alpha$
				Higuma	Kitamomiji						
AC12	onion	Aichi	2010	5	15	HIS	—	<i>MAT 1-1</i>	—	AB936592	AB938050
AC13	onion	Aichi	2010	0	0	SMV16	—	<i>MAT 1-1</i>	—	AB936593	AB938051
AC15	onion	Aichi	2010	5	5	SMV17	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936594	AB938052
AC22	onion	Hokkaido	2011	45	20	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936595	AB938053
AC26	onion	Hokkaido	2011	45	45	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936596	AB938054
AC49	onion	Hokkaido	2011	35	70	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936597	AB938055
AC76	onion	Hokkaido	2011	15	0	G5	—	<i>MAT 1-1</i>	—	AB936598	AB938056
AC85	onion	Hokkaido	2011	60	70	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936599	AB938057
AC89	onion	Hokkaido	2011	65	80	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936600	AB938058
AC109	onion	Hokkaido	2011	25	70	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936601	AB938059
AC117	onion	Hokkaido	2011	55	65	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936602	AB938060
AC123	onion	Hokkaido	2011	55	85	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936603	AB938061
AC130	onion	Hokkaido	2011	80	85	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936604	AB938062
AC140	onion	Hokkaido	2011	85	65	G4	+*	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936605	AB938063
AC150	onion	Hokkaido	2011	100	95	G4	+*	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936606	AB938064
AC158	onion	Hokkaido	2011	50	65	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936607	AB938065
AC164	onion	Hokkaido	2011	55	55	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936608	AB938066

AC173	onion	Hokkaido	2011	35	35	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936609	AB938067
AC184	onion	Hokkaido	2011	40	30	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936610	AB938068
AC205	onion	Hokkaido	2011	100	90	G4	+*	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936611	AB938069
AC214	onion	Hokkaido	2011	20	2	n.g.	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936612	AB938070
AC217	onion	Hokkaido	2011	25	30	G5	—	<i>MAT 1-1</i>	—	AB936613	AB938071
AC222	onion	Hokkaido	2011	10	25	SMV18	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936614	AB938072
AC241	onion	Hokkaido	2011	45	55	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936615	AB938073
AC245	onion	Saga	2012	n.t.	n.t.	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936616	AB938074
AC248	onion	Saga	2012	n.t.	n.t.	G4	+	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936617	AB938075
TA	onion	Hokkaido	—	95	100	G4	+*	<i>MAT 1-2</i>	+	AB936618	AB938076
AF1	Welsh onion	Saitama	2006	45	15	n.g.	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936564	AB938022
AF15	Welsh onion	Kyoto	2006	10	15	SMV1	—	<i>MAT 1-1</i>	—	AB936565	AB938023
AF17	Welsh onion	Kagoshima	2006	25	30	SMV2	—	<i>MAT 1-1</i>	—	AB936566	AB938024
AF22	Welsh onion	Kagoshima	2006	55	55	SMV3	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936567	AB938025
AF31	Welsh onion	Hyogo	2006	20	20	G1	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936568	AB938026
AF52	Welsh onion	Tokushima	2007	20	35	SMV4	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936569	AB938027
AF60	Welsh onion	Kochi	2007	35	25	SMV5	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936570	AB938028
AF66	Welsh onion	Kyoto	2008	5	5	SMV6	—	<i>MAT 1-1</i>	—	AB936571	AB938029
AF67	Welsh onion	Kyoto	2008	0	25	SMV7	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936572	AB938030
AF72	Welsh onion	Kyoto	2008	10	10	SMV8	—	<i>MAT 1-1</i>	—	AB936573	AB938031
AF74	Welsh onion	Fukushima	2009	0	0	G2	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936574	AB938032
AF75	Welsh onion	Fukushima	2009	5	5	G2	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936575	AB938033
AF77	Welsh onion	Fukushima	2009	30	35	HIS	—	<i>MAT 1-2</i>	—	AB936576	AB938034

AF88	Welsh onion	Shizuoka	2010	90	35	SMV9	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936577	AB938035
AF89	Welsh onion	Shizuoka	2010	15	45	G1	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936578	AB938036
AF90	Welsh onion	Shizuoka	2010	40	60	SMV10	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936579	AB938037
AF91	Welsh onion	Shizuoka	2010	35	95	HIS	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936580	AB938038
AF93	Welsh onion	Shizuoka	2010	25	15	G1	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936581	AB938039
AF94	Welsh onion	Shizuoka	2010	40	90	SMV11	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936582	AB938040
AF95	Welsh onion	Shizuoka	2010	40	35	SMV12	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936583	AB938041
AF96	Welsh onion	Tokushima	2010	15	25	SMV13	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936584	AB938042
AF97	Welsh onion	Tokushima	2010	25	0	SMV14	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936585	AB938043
AF98	Welsh onion	Tokushima	2010	5	0	G3	—	<i>MAT I-1</i>	—	AB936586	AB938044
AF101	Welsh onion	Tokushima	2010	15	30	G3	—	<i>MAT I-1</i>	—	AB936587	AB938045
AF103	Welsh onion	Mie	2010	5	25	n.g.	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936588	AB938046
AF113	Welsh onion	Saitama	2010	0	15	SMV15	—	<i>MAT I-1</i>	—	AB936589	AB938047
AF124	Welsh onion	Hokkaido	2011	n.t.	n.t.	n.g.	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936590	AB938048
AF125	Welsh onion	Hokkaido	2011	n.t.	n.t.	n.g.	—	<i>MAT I-2</i>	—	AB936591	AB938049

<sup>a</sup>For determining the percentage of wilted plants, two onion cultivars (Higuma and Kitamomiji 2000) were inoculated with *Fusarium oxysporum* using root-dip method. Ten seedlings were used in each experiment in duplicate. n.t.; not tested.

<sup>b</sup> HIS; heterokaryon self-incompatible, n.g; generated either *nit1* or *NitM* mutant, SMV; single member of VCG

<sup>c</sup>+; two PCR products (392 bp, 244 bp) were obtained using IR-SCAR marker primers. +\* ; only 392 bp product was obtained. —; no PCR products were obtained.

<sup>d</sup>+ ;PCR products were obtained with specific primers of *SIX3*, *SIX5*, and *SIX7*; —; no PCR products were obtained.

<sup>e</sup> GenBank/DDBJ accession number of partial rDNA IGS and *EF-1a* sequences determined in this study.

#### IV. 考察

本研究により、日本各地のタマネギとネギから分離した *F. oxysporum* 菌株間の系統関係が初めて明らかにされた。IGS 領域の塩基配列に基づいて作成した系統樹においてネギ分離株は多系統を示し、それらのクレードと地理的起源との関連性は見出すことができなかった。この結果は Dissanayake ら (2009b) の結果を支持するものとなった。ネギ分離株とは対照的に、タマネギ分離株の大部分は IGS 系統樹で Clade H に属し、単系統であることがわかった。IGS 系統樹の Clade H に属さなかった 7 株のタマネギ分離菌 (AC12, AC13, AC15, AC76, AC214, AC217) はタマネギ幼苗に対する病原性がほとんどなく、タマネギに内生していた非病原性の *F. oxysporum* だと考えられる。このような非病原性の *F. oxysporum* は病徴を示したビートからも多数分離されたことが報告されている (Webb et al. 2013)。タマネギ分離株と比較して、ネギ分離株が高度な遺伝的多様性を示した原因は明らかでないが、日本におけるネギの栽培史と関係があるのかもしれない。日本におけるネギの栽培は、8 世紀またはそれ以前に始まったとされ、その後日本各地の風土にあった品種や系統が多数育成されてきた。おそらくそれに付随してネギに寄生する *F. oxysporum* も多様化していった可能性が考えられる。一方、タマネギは栽培の歴史が短く、1871 年にアメリカから持ち込まれた種子が北海道において栽培されたのが最初である。

本研究では、IGS 領域の塩基配列に基づいて FOC 以外の分化型を含めた系統樹も作成した。興味深いことに、FOC の系統樹で Clade H に属したタマネギ分離菌および Clade F に属するネギ分離菌は FOL のレース 1、レース 2 と非常に近縁であった。特に Clade H に属した菌株は *SIX* ホモログを保持しており、FOL と共通の祖先から進化したことが示唆される。また、Clade F に属する菌株は FOL のレース 3 と同一のクレードに分岐し、菌株間の塩基配列には 100% の相同性があった。また、Clade F に属する AF1、AF60、および AF103 はトマチナーゼ遺伝子を保持していた (データ未記載、今回解析した 55 菌株でこの遺伝子を保持しているのは 7 株のネギ分離菌のみ、タマネギ分離菌はいずれの菌株も保持していなかった)。トマチナーゼは、トマトの抗菌性化合物である  $\alpha$ -トマチンを分解する酵素であり、FOL 以外の分化型もこの遺伝子を保持し、これらの菌はトマトに病原性を示さないものの侵入・定着できることが知られている (Ito et al. 2005)。しかしながら、AF1、AF60、および AF103 は *SIX* ホモログを保持していない。このように、本研究によって FOL と FOC の一部が遺伝的に近縁で、かつ共通の遺伝子を有していることが初めて明らかになった。今後、これらの菌株の遺



伝子について詳細なゲノム解析を行うことにより、FOC と FOL の宿主特異性決定機構の進化についての新たな知見が得られる可能性がある。

VCG 試験において、ヘテロカリオンを形成する菌株は限られており、5 つの VCG と 18 の SMV が得られた。このような VCG の多様性と多くの SMV の検出については同様の報告がある。例えば、スペインのインゲンマメから分離された菌株は 128 株中 96 の VCG が検出されており (Alves-Santos et al. 1999)、またトルコのタマネギから分離された *F. oxysporum* f. sp. *cepae* は 75 株中 48 つの SMV が検出されている (Bayraktar et al. 2010)。また、同一 Clade 内において異なる VCG が検出されたが、IGS 系統樹の Clade H に属するタマネギ分離株はすべて同一の G4 に分類されたことから、これらの菌株が非常に近縁であることが示唆される。

IR-SCAR マーカーはトランスポゾンの long terminal repeat (LTR) 部位を標的とする inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) -PCR によって *F. oxysporum* f. sp. *cepae* の VCG0421 と VCG0425 に特異的に増幅された DNA 断片をもとに設計されている (Southwood et al. 2012a)。このマーカーによって VCG0421 と VCG0425 では 392 bp と 244 bp の DNA 断片が増幅され、他の分化型では増幅されない。DNA 断片は IGS 系統樹の Clade H に属する菌株でのみ増幅されたが、その内の 4 株 (AC140、AC150、AC205、TA) は 392 bp の DNA 断片しか増幅されなかった。この結果は、IGS 系統樹の Clade H に属する菌株は遺伝的に近縁であるが、モノクローナルではないことを示している。レトロトランスポゾンなどの転移因子はゲノム内で転移し、挿入や欠損などの変異を引き起こす (Kang et al. 2001)。このメカニズムは遺伝的多様性や新たな表現型の出現を提供する (Schmidt et al. 2013)。例えば、Inami ら (2012) は FOL において、トランスポゾンである *Hormin* が *AVR1* (*SIX4*) 遺伝子配列へ挿入したことにより、レース 3 が出現した初めての事例を報告している。今回、IR-SCAR マーカーによって 244 bp の断片が増幅されなかった 4 株が他の株と比較して強い病原性を保持していたことは非常に興味深い。前述したように IR-SCAR マーカーの標的配列はレトロトランスポゾンを含んでおり、244 bp の断片を含む領域が病原性に関わる遺伝子領域を分断しているのかもしれない。それゆえ、その領域が破壊されていない 4 株は強い病原性を保持しているのかもしれない。

IR-SCAR マーカーで増幅された Hansec 断片 (392 bp) と HTH 断片 (244 bp) は *SIX3* 遺伝子と同一の約 4 Mb の染色体上に座乗していた。FOL においては *SIX* 遺伝子のほとんどは小型の病原性染色体である 14 番染色体に座乗しており、さらにその染色

体はトランスポゾンを豊富に含んでいる。それゆえ、この約 4 Mb の染色体は FOL と比較してサイズは大きい、タマネギ FOC に特異的な病原性染色体である可能性も考えられる。この点については、今後の検討課題である。

本研究では、FOC における *SIX* ホモログの保持を明らかにした。すなわち、IGS Clade H に属する菌株のみが *SIX3*、*SIX5*、および *SIX7* を保持していた。この結果は、*SIX3* および *SIX5* ホモログが FOL 以外の分化型で存在することを証明した初めての事例である。この結果はまた、タマネギから分離した FOC がネギから分離した FOC と遺伝的に異なるという系統樹の結果を強く支持している。さらに、*SIX* ホモログはいずれもネギ分離 FOC および非病原性 FOC からは増幅されなかったことから、*SIX* ホモログがタマネギに対する病原性に関与している可能性も示唆している。

接種試験において、IGS Clade H に属さない菌株の大部分はタマネギ幼苗に対して低い病原性または非病原性を示した。しかしながら、ネギ分離 FOC である AF88 はタマネギ品種 ‘ヒグマ’ に対して、AF91 および AF94 はタマネギ品種 ‘北もみじ 2000’ に対して非常に強い病原性を有していた。今のところ、世界的にみても FOC のレース分化は確認されていないが、これらの菌株の病原性が品種によって大きく異なったことは、レース分化が起こりつつあることを示唆しているのかもしれない。

## 第3章 タマネギ分離 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* における

### SIX3 の機能および FOC 特異的検出

#### I. 序論

植物は病原体に対して2段階の防御応答を備えている(Jones and Dangl 2006)。まず、植物病原真菌の細胞壁構成成分であるキチンやグルカンなどの pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識することによって、すべての植物病原真菌に対して防御応答を引き起こす。これは PAMP-triggered immunity (PTI) と呼ばれる。これに対して病原菌は、エフェクターと呼ばれる分子を用いて PTI を抑制し、感染を優位に進める。さらに植物がこのエフェクターを認識することができる抵抗性 (*R*) 遺伝子を保持していれば、再び防御応答が引き起こされる。これは Effector-triggered immunity (ETI) と呼ばれる。この場合エフェクター遺伝子は非病原力 (*avr*) 遺伝子と呼ばれる。

エフェクターは、植物の防御応答を変化させ、植物組織への定着を可能にさせる分泌タンパク質または低分子化合物と定義されている (Hogenhout et al. 2009)。エフェクタータンパク質である SIX タンパク質は、トマト萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) が感染したトマトの導管液プロテオームによって発見された。現在までに14つの SIX タンパク質をコードする遺伝子が同定されている (Rep et al. 2004; Houterman et al. 2007; Lievens et al. 2009; Ma et al. 2010; Rep and Kisler 2010; Schmidt et al. 2013)。これらのうち *SIX1*、*SIX3*、および *SIX4* はエフェクターまたは非病原力遺伝子として機能することが報告されている。*SIX1* (*AVR3*) はトマト抵抗性遺伝子 *I* (immunity) -3 によって認識される非病原力遺伝子であり、*SIX3* (*AVR2*) は *I-2* によって認識される非病原力遺伝子である。しかし、*SIX1* と *SIX3* はそれぞれに対応する抵抗性遺伝子を持たない品種に対しては病原性遺伝子として働く。*SIX4* (*AVR1*) はトマト抵抗性遺伝子 *I-1* によって認識される非病原力遺伝子であるが、*I-1* を持たない品種に対しては *I-2* と *I-3* によって引き起こされる防御応答を抑制する機能を持つ (Houterman et al. 2008; Houterman et al. 2009; Rep et al. 2004)。

*SIX* 遺伝子が同定された当初は、これらの遺伝子が FOL に特異的なものであるとされていた。しかし、次世代シーケンサーの普及によって容易にドラフトゲノム解析が行

われるようになり、FOL 以外のいくつかの分化型が *SIX* ホモログを保持していることが明らかとなってきた。*SIX1* は *conglutinans*、*cubense*、*fragariae*、*melonis*、*vasinfectum*、アラビドプシス感染型 *F. oxysporum* Fo5176 株などで、*SIX4* は *conglutinans*、*cubense*、Fo5176、*niveum*、*vasinfectum* で検出されている。*SIX2* は *cubense* で、*SIX6* は *cubense*、*melonis*、*niveum*、*passiflorae*、*radicis-cucumerinum*、*vasinfectum* で、*SIX7* は *cubense*、*lilii* と多くの分化型で検出されている (Kashiwa et al. 2013; Lievens et al., 2009, Fraser-Smith et al 2014; Chakrabarti et al 2011; Thatcher et al 2012)。*SIX8-14* に関しても多くの分化型においてそのホモログの存在が確認されている。これらのなかで Fo5176 と *conglutinans* の *SIX4* ホモログはそれぞれアラビドプシスとキャベツに対する病原性遺伝子であると証明されているが、その作用メカニズムはわかっていない (Thatcher et al. 2012; Kashiwa et al. 2013)。このように *SIX* 遺伝子を保持している分化型は存在するが、FOL 以外でそのすべてを持つものはいない。さらに、現在までに *SIX3* および *SIX5* は FOL 以外の分化型ではその保持が確認されていない。

*F. oxysporum* は 120 以上の分化型が存在しているが、その形態は全く同じであるため、分化型の同定には接種試験を様々な植物に行い宿主範囲を決定する必要がある。しかしながら、接種試験には時間がかかるため、近年ではさまざまな分子マーカーを用いた分化型の同定法が開発されている。これらの分子マーカーはある分化型やレースに特異的な DNA 配列をもとに設計されている。前述のように FOL では *SIX1* (*AVR3*)、*SIX3* (*AVR2*)、および *SIX4* (*AVR1*) が非病原力遺伝子であるため、*SIX3* と *SIX4* を標的とした PCR 法は FOL のレースを正確に識別できる (Lievens et al. 2009)。

本論文第 2 章において、タマネギから分離した FOC は *SIX3*、*SIX5*、および *SIX7* のホモログを有することを PCR によって確認した。そこで本章ではそれらの塩基配列を決定し、遺伝子破壊によってそれらの遺伝子の病原性への関与を調べた。また、*SIX3* 遺伝子は FOL 以外では明確なホモログが存在しないため、この遺伝子配列をもとにしたマーカーを設計し FOC の特異的検出、さらにはその応用性を検討した。

## II. 材料および方法

### 1. *SIX* ホモログの塩基配列の決定

第2章でTA株から増幅された *SIX3*、*SIX5*、および *SIX7* ホモログを用いて、前述の方法でシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。

### 2. *SIX3-SIX5* 領域の塩基配列の決定

#### 2-1. PCR

*SIX3* と *SIX5* が隣接していることを確認するために、プライマー *SIX3-R/SIX5-R* を用いて PCR を行った (Table 5)。PCR 反応には Quick Taq HS Dye Mix を使用し、前述の方法で行った。反応条件は 94°C 2 分の後に、94°C 30 秒、50°C 30 秒、68°C 4 分を 35 サイクル行った。ポジティブコントロールとして FOL の CK3-1 株を使用した。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム (1 µg/ ml) で染色した。UV トランスイルミネーター上でバンドを確認した後、目的のバンドをゲルから切り出し、MonoFas DNA 精製キット I (GL science) を用いて精製を行った。すなわち、切り出したゲルの重さを測り、ゲルと等量の Buffer A を加え 60°C で 5 分間保温した。スピнкаラムに溶解したゲル溶液を入れ、9,000 xg、30 秒で遠心した。500 µl の Buffer B を加え、9,000 xg、30 秒遠心した。スピнкаラムを 1.5 ml チューブに付け替え、50 µl の Buffer C を加えて、9,000 xg、1 min で遠心し溶出した。

#### 2-2. クローニング

TA クローニングに用いるベクターは pGEM-T Easy Vector (Promega) を用いた。ライゲーション反応には Ligation Convenience Kit (ニッポンジーン) を使用した。まず、インサート DNA とベクターをモル比 1:1 で混合し、2 x Ligation Mix を加えて 20 µl にし、16°C で 10 分間処理した。このライゲーション反応液 2 µl と *Escherichia coli* JM109 株のコンピテントセル 20 µl を混合し、氷中で 30 分間静置した。42°C で正確に 45 秒間ヒートショックを与え、すぐに氷中に移し 2 分間静置した。SOC 培地を 180 µl 加え混合し、37°C で 1 時間半振とう培養した。事前に 20 µl の 100 mM IPTG と 16 µl の 25 mg/ ml X-gal を塗布した 40 µg/ml アンピシリンを含む LB 寒天培地に培養液を塗布し、37°C で 16 時間培養した。生じた白色のシングルコロニーを滅菌爪楊枝で掻きとり、上記同様 IPTG および X-gal を塗布したアンピシリン 40 µg/ ml 添加 LB 寒天培地に穿

刺し、37°Cで16時間培養した。

### 2-3. コロニーPCR およびプラスミド DNA の抽出

コロニーPCR を行ってインサート DNA の挿入を確認した。確認したコロニーから High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) を使用してプラスミドを抽出した。インサートが確認されたシングルコロニーをアンピシリン 40 µg/ml 添加 LB 液体培地 2 ml で 37°C、16 時間振とう培養した。3,000 rpm、10 分間遠心分離し、大腸菌ペレットを得た後、250 µl の Suspension Buffer を加えペレットを再懸濁し、250 µl の Lysis Buffer を加え 3~6 回転倒混和し、室温で 5 分間インキュベートした。350 µl の Binding Buffer を加え 3~6 回転倒混和し、氷中で 5 分間インキュベートした。15,000 xg で 10 分間遠心分離を行い、上清を High Pure Filter Tube にアプライし、15,000 xg で 1 分間遠心し、プラスミドをカラムに吸着させた。500 µl の Wash Buffer1 を添加し 15,000 xg で 1 分間遠心操作をしてフロースルーを除去し、さらに 700 µl の Wash Buffer 2 を添加し 15,000 xg で 1 分間の遠心操作によってカラムの洗浄を行った。残留している洗浄バッファーを除去するため、15,000xg で 1 分間遠心操作を行った後、100 µl の Elution Buffer を添加し、15,000 xg で 1 分間遠心操作を行うことによってプラスミド DNA を溶出した。

### 2-4. プライマーウォーキングによる塩基配列の決定

プライマーウォーキング法を行い、FOC の *SIX3-SIX5* 間領域の塩基配列を決定した。*SIX3* 側は *SIX3-walk-1*、*SIX3-walk-2*、*SIX3-walk-3*、*SIX5* 側は *SIX5-walk-1*、*SIX5-walk-2*、*SIX5-walk-3* とプライマーを順次設計し、シーケンシングを行った (Table 5)。得られた約 5 kbp の塩基配列は BLAST 検索および AUGUSTUS (Hoff and Stanke 2013) によって推定タンパク質の有無を確認した。

## 3. *SIX* 遺伝子の発現

### 3-1. B5 培地での培養

菌体を B5 培地 (Gamborg and Wetter 1975) で 25°C、3 日間振とう培養し、菌体を回収した。回収した菌体は再び、B5 培地、KNO<sub>3</sub> と (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含まない B5 培地 (-N)、Sucrose を含まない B5 培地 (-C)、および KNO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、Sucrose を含まない B5 培地 (-NC) に加え、25°C で 24 時間振とう培養した。培養後、菌体を

回収し-80°Cで保存した。

### 3-2. 接種試験

接種は、第2章の接種実験と同様の方法で行った。接種試験にはタマネギ品種‘北もみじ2000’を用いた。植物体は接種4日および8日後に回収し、根を-80°Cで凍結保存した。

### 3-3. トータル RNA 抽出

RNA抽出にはセパゾール RNA I Super (ナカライ) を使用した。乾熱滅菌した乳鉢・乳棒を使用し、菌体または植物サンプル 100 mg に液体窒素を加えて磨砕した。これにセパゾール 1 ml を加えた後、さらに磨砕しサンプルチューブに移した。室温で5分間放置した後、クロロホルム 200  $\mu$ l を加えて転倒混和し、室温で3分間放置した。12,000 xg、15分間遠心し、下層(フェノール相)をとらないように上層(水相)を回収して別のチューブに移した。別のチューブに移した水相にイソプロパノール 500  $\mu$ l を加えて転倒混和し10分間放置した。12,000 xg、10分間遠心し上清を除き、80%エタノール 1 ml を加えた。12,000 xg、5分間遠心し、上清を除き沈澱物を風乾した後、DEPC処理水 50  $\mu$ l に溶解した。

### 3-4. DNase 処理

抽出したトータル RNA 溶液に 50 units の RNAase inhibitor (Takara) と 2 units の DNase I (Takara) を加え、さらに DEPC 処理水を加えて全量を 100  $\mu$ l とし、37°C で 30 分間インキュベートした。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1) を 100  $\mu$ l 加え穏やかに攪拌し、12,000 xg で 10 分間遠心した。上清(水層)を新しいチューブに移し、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH5.2) と 2.5 倍量の 100%エタノールを加え、-20°C で 30 分間放置し、12,000 xg で 10 分間遠心し上清を捨てた。80%エタノールを 1 ml 加えて沈澱物を懸濁し、12,000 xg で 5 分間遠心した。上清をすてた後、沈澱物を風乾し、RNase free water に再懸濁した。

### 3-5. RT-PCR

抽出した RNA を鋳型にして、Prime Script One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Takara) を使用して RT-PCR を行った。反応溶液は 0.8  $\mu$ l の PrimeScript 1step Enzyme Mix、

10  $\mu$ l の 2x 1step Buffer (Dye Plus)、0.4  $\mu$ l 各プライマー (20 pmol/  $\mu$ l)、1  $\mu$ l の Template RNA (50 ng/  $\mu$ l)、7.4  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O を混合した。*FocSIX3* の検出には SIX3-C-F/SIX3-C-R、*FocSIX5* の検出には SIX5-C-F/SIX5-C-R を用いて PCR を行った (Table 5)。反応条件は 50°C 30 分、94°C 3 分を行った後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 40 秒を 35 サイクル行った。PCR 産物を Mupid 電気泳動装置 (コスモバイオ) を用いて、1.2% アガロースゲルで 100V で電気泳動し、ゲルを臭化エチジウム (1  $\mu$ g/ ml) に 15 分浸漬した後、UV トランスイルミネーター上で泳動像を確認した。

#### 4. TAIL-PCR

*FocSIX3* および *FocSIX5* 遺伝子の 3' 下流領域の塩基配列を決定するために TAIL-PCR 法を行った。方法は Liu and Whittier (1995) の方法に従って行った。

##### 4-1. 1st PCR

1stPCR の反応溶液は 2  $\mu$ l の 10x Ex *Taq* Buffer、1.6  $\mu$ l の dNTP (2 mM)、40 ng の template DNA、0.4  $\mu$ l の GSP1 primer (10 pmol/  $\mu$ l)、1  $\mu$ l の Degenerate Primer (100 pmol/  $\mu$ l)、0.2  $\mu$ l の EX *Taq*、および dH<sub>2</sub>O を混合し、最終容量 20  $\mu$ l とした。GSP1 primer は *FocSIX3* においては SIX3-Tail-1、*FocSIX5* においては SIX5-Tail-1 を使用した (Table 5)。Degenerate primer は AD1、AD2、AD3 を使用した (Table 5)。反応条件は 94°C 2 分の後に、(94°C 1 分、65°C 1 分、72°C 1 分) を 5 サイクル、次に 94°C 1 分、30°C 1 分の後に 3 分かけて 72°C まで上昇させさらに 3 分、(94°C 30 秒、68°C 1 分、72°C 3 分、94°C 30 秒、68°C 1 分、72°C 3 分、94°C 30 秒、44°C 1 分、72°C 3 分) を 13 サイクル行い、72°C 5 分で行った。

##### 4-2. 2nd PCR

1stPCR 産物を 50 倍希釈し 2nd PCR のテンプレートとして使用した。2ndPCR の反応溶液は 2  $\mu$ l の 10x Ex *Taq* Buffer、1.6  $\mu$ l の dNTP (2 mM)、1  $\mu$ l の template DNA、0.4  $\mu$ l の GSP2 primer (10 pmol/  $\mu$ l)、0.8  $\mu$ l の Degenerate Primer (100 pmol/  $\mu$ l)、0.16  $\mu$ l の EX *Taq*、および 14.04  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O を混合した。GSP2 primer は *FocSIX3* においては SIX3-Tail-2、*FocSIX5* においては SIX5-Tail-2 を使用した (Table 5)。Degenerate primer は 1stPCR と同様のプライマーを使用した。反応条件は 94°C 2 分の後に、(94°C 30 秒、64°C 1 分、72°C 3 分、94°C 30 秒、64°C 1 分、72°C 3 分、94°C 30



秒、44°C1分、72°C3分)を13サイクル行い、72°C5分で行った。

#### 4-3. 3rd PCR

2ndPCR産物を50倍希釈し3rdPCRのテンプレートとして使用した。3rdPCRの反応溶液は2µlの10x Ex Taq Buffer、1.6µlのdNTP(2mM)、1µlのtemplate DNA、0.6µlのGSP3 primer(10pmol/µl)、0.6µlのDegenerate Primer(100pmol/µl)、0.1µlのEX Taq、および14.1µlのdH<sub>2</sub>Oを混合した。GSP3 primerは*FocSIX3*においてはSIX3-Tail-3、*FocSIX5*においてはSIX5-Tail-3を使用した(Table 5)。Degenerate primerは1stPCRと同様のプライマーを使用した。反応条件は94°C2分の後に、(94°C30秒、64°C1分、72°C3分、94°C30秒、64°C1分、72°C3分、94°C30秒、44°C1分、72°C3分)を9サイクル行い、72°C5分で行った。3rdPCR産物は1.2%アガロースゲルで電気泳動を行い、2ndPCRと比較して50bp短くなった断片をゲルから切り出し、MonoFas DNA精製キットIを用いて精製した。精製した断片はpGenT-easy vectorにTAクローニングし、シーケンシングを行った。

### 5. *FocSIX3*および*FocSIX5*遺伝子破壊株の作出

*FocSIX3*および*FocSIX5*遺伝子の病原性への関連を解析するために、FOC TA株の*SIX3*および*SIX5*遺伝子破壊株の作出を試みた。遺伝子破壊は、Split-marker recombination法(Catlett et al. 2003)によって行った。

#### 5-1. 遺伝子破壊コンストラクトの作製

第1ステップPCRとして、*FocSIX3*および*FocSIX5*遺伝子の5'flanking領域(SIX3-split-F1/SIX3-split-F2およびSIX5-split-F1/SIX5-split-F2)と3'flanking領域(SIX3-split-F3/SIX3-split-F4およびSIX5-split-F3/SIX5-split-F4)を増幅するプライマーペアをそれぞれ設計し(Table 5)、TA株のゲノミックDNAをテンプレートとしてPCRを行った。また選抜マーカーであるハイグロマイシン耐性遺伝子(*hph*)を中央部で配列が重なるように設計したプライマーペアHY/M13RとYG/M13F(Table 5)でpHRCをテンプレートとしてPCRを行い、HY断片とYG断片をそれぞれ得た。次に第2ステップPCRとして、第1ステップで得た3'flanking領域とHY断片を鋳型として、プライマーペアHY/SIX3-split-F4またはSIX5-split-F4を用いてPCRを行った。同様に5'flanking領域とYG断片を鋳型として、プライマーペアYG/

SIX3-split-F1 または SIX5-split-F1 を用いて PCR を行った。得られたそれぞれの断片を HY-3'flanking フラグメントおよび 5'flanking-YG フラグメントとし、形質転換に使用した。

## 5-2. 形質転換

形質転換はプロトプラスト PEG 法で行った。プロトプラストの作製は前述と同様の方法で行った。得られたプロトプラストは STC バッファーで  $2 \times 10^8$  個/ml とした。上記で作製した HY-3'flanking フラグメントおよび 5'flanking-YG フラグメントをそれぞれ 5  $\mu$ g (10  $\mu$ l)、80  $\mu$ l のプロトプラスト溶液、および 20  $\mu$ l の PEG 溶液 (60% PEG 4000、10 mM Tris-HCl (pH7.4)、50 mM CaCl<sub>2</sub>) と混合し、氷中に 20 分間静置した。900  $\mu$ l の PEG 溶液をゆっくりと加え、十分に混合した後、室温で 30 分間静置した。その後 2,000 xg で 5 分間遠心分離を行い、プロトプラストを沈殿として回収した。これを 600  $\mu$ l の STC buffer に懸濁した後、100  $\mu$ l ずつ YPSA 培地 (750 mM Sucrose、0.1% Yeast extract、0.1% tryptone、1.5% agar) に塗布した。25°C で 24 時間培養した後、100  $\mu$ g/ml ハイグロマイシン B 添加 PDA 培地を重層し 25°C で 2~3 日間培養した。出現したコロニーを 100  $\mu$ g/ml ハイグロマイシン B 添加 PDA 培地に単離し、25°C で培養し、ハイグロマイシン耐性形質転換体を得た。

## 5-3. PCR による遺伝子破壊の確認

得られたハイグロマイシン耐性形質転換体からゲノミック DNA を簡易抽出法 (Saitoh et al. 2006) によって抽出した。すなわち、PDA 平板培地上から 7-15 mm 角の菌コロニーを切り取り、1.5 ml のエッペンドルフチューブにいれた。500  $\mu$ l の lysis buffer (200 mM Tris-HCl (pH8.0)、50 mM EDTA、200 mM NaCl、1% n-ラウリルサルコシン) を加え、ホモジナイザーで菌体を潰し、10 分間室温で静置した。15,000 xg で 5 分間遠心分離し、上清 300  $\mu$ l を新しいチューブに移した。750  $\mu$ l のエタノールを加え転倒混和し、15,000 xg で 2 分間遠心分離し、上清を捨てた。750  $\mu$ l の 80% エタノールを加え、15,000 xg で 5 分間遠心分離し、上清を捨て風乾し、50  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O に溶解した。*FocSIX3* 遺伝子破壊株にはプライマー SIX3-C-F/SIX3-C-R、*FocSIX5* 遺伝子破壊株には SIX5-C-F/SIX5-C-R を用いて PCR を行った。

#### 5-4. サザンハイブリダイゼーションによる遺伝子破壊の確認

サザンハイブリダイゼーションによって遺伝子破壊の確認を行った。10 µg のゲノミック DNA を 10 unit の制限酵素 *EcoRV* (NEB) で 37°C、16 時間処理し、0.8%アガロースゲルで電気泳動をした。このゲルをメンブレンにブロットし、ハイブリダイゼーションを行った。ブロッティングおよび検出は前述の方法と同様に行った。*FocSIX3* 遺伝子破壊株にはプライマー SIX3-split-F3 /SIX3-split-F4、*FocSIX5* 遺伝子破壊株には SIX5-split-F3 /SIX5-split-F4 を用いて作製したプローブを使用した。

### 6. 遺伝子破壊株の病原性

#### 6-1. タマネギ幼苗への接種試験

TA 株、*FocSIX3* 遺伝子破壊株、および *FocSIX5* 遺伝子破壊株を第 2 章と同様の方法でタマネギ品種 ‘ヒグマ’ の幼苗に接種し、接種 3 週間後の枯死株率を調べた。

#### 6-2. タマネギ鱗茎を用いた接種試験

菌株を PDA 平板培地で 7 日間培養し、5 mm のコルクボーラーで培地ごと打ち抜いた。タマネギの鱗茎の外皮を剥ぎ、根を切り落として、0.5%NaClO<sub>3</sub> に 3 分浸漬した後、滅菌水で水洗し、風乾した。5 mm のコルクボーラーでタマネギの盤茎を深さ 1 cm までくりぬき、そこにコルクボーラーで打ち抜いた菌を置いた。接種した鱗茎をポリエチレンバックにいれ 25°C で 21 日間インキュベートした。コントロールの鱗茎には PDA 培地を接種した。

### 7. *FocSIX3* 特異的プライマーの設計

TA 株の *FocSIX3* 遺伝子と *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* の *FolSIX3* 遺伝子 (GenBank AM234063) の塩基配列を比較し、4 つの *FocSIX3* 特異的プライマーペア P1~P4 および両遺伝子を領域を増幅するプライマーペア P5 を設計した (Table 5, Table 7)。

### 8. *FocSIX3* 特異的プライマーの特異性の検証

プライマーの特異性を調べるために、設計した 5 組のプライマーペア P1~P5 を用いて PCR を行った。PCR は Quick Taq HS Dye Mix を使用して行った。テンプレート DNA にはタマネギ分離 FOC を 23 株、ネギ分離 FOC を 15 株、非病原性 *F. oxysporum*

を7株 (Table 4)、および *F. oxysporum* の13分化型18菌株 (Table 6) を用いてPCRを行った。

## 9. 定量PCRへの応用

### 9-1. 標準曲線の作成

定量PCRには7300 real-time PCR system (Applied Biosystems) を使用した。定量PCR反応にはTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を使用した。反応溶液20 µl中に0.3 µMのプライマーと1 µlのテンプレートDNAを加え、95°C1分処理後、95°C15秒、60°C1分の処理を40サイクル行った。さらに60°Cから95°Cまで温度を上昇させることによってPCR産物の融解曲線温度を求めた。標準曲線は *FocSIX3*断片を含むプラスミド (使用前に制限酵素 *PstI* によって線状化したもの) を $10^1 \sim 10^8$  copies / µlとなるように調節してテンプレートとして使用した。

### 9-2. 植物サンプル

植物材料としてタマネギ品種ヒグマ (感受性品種、タキイ種苗)、カムイ (中程度の抵抗性品種、タキイ種苗)、および北もみじ2000 (抵抗性品種、七宝) を使用した。各品種の苗を *F. oxysporum* f. sp. *cepae* 汚染圃場 (北海道、長沼市) に移植し生育させ、移植60日後および77日後に植物体を回収した。それぞれの植物体は根の下部、根の上部、および盤茎に分けて-80°Cで保存した。

### 9-3. 植物体からのDNA抽出

DNeasy Plant mini kit (Qiagen) を使用して各部位の組織サンプルからDNAを抽出した。まず、サンプル100 mgを乾熱滅菌した乳鉢と乳棒を用いて液体窒素内で摩砕し、400 µlのBuffer AP1を加え、2 mlチューブへ移した。4 µlのRNaseAを加えボルテックスし、65°Cで10分間インキュベートした。130 µlのBuffer P3を加え、混和し氷中で5分間静置した後、20,000 xgで5分間遠心した。上清をOIA shredder spin columnに入れ、20,000 xgで2分間遠心した。フロースルーを2 mlチューブに移し、1.5倍量のBuffer AW1を加えピペッティングにより混和した後、DNeasy mini spin columnに移し10,000 xgで1分間遠心した。500 µlのBuffer AW2を加え、10,000 xgで1分間遠心し、さらに500 µlのBuffer AW2を加え、20,000 xgで2分間遠心した。スピncラムを1.5 mlチューブに移し、100 µlのBuffer AEを加え5分間室温でイン

キュベートした後、10,000 xg で1 分間遠心した。

#### 9-4. 定量 PCR

抽出した植物 DNA 1  $\mu$ l をテンプレートとして前述の方法で qPCR を行った。統計解析は KaleidaGraph version 4.1software を使い、Tukey-HSD tests によって有意水準  $p < 0.05$  で行った。

**Table 5** Primer sequence used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
SIX3-walk-1	GCAAACCCATGTCATGGACATG
SIX3-walk-2	GCAGCCCCTGTATTACCTTTC
SIX3-walk-3	TCTGGAATACGCTCTATCCACG
SIX5-walk-1	TACTCGAAGCGCATGATGGATTG
SIX5-walk-2	TTCCATCTTATCCGCACGATGC
SIX5-walk-3	CTGCTTGCTTACCTATCCCTATC
SIX3-C-F	CATGTCCATGACATGGGTTTGC
SIX3-C-R	GATCTCGTAGTTGGCGATGGC
SIX5-C-F	GCGCTTCGAGTACATCTCTG
SIX5-C-R	CTAGGATGCATCACAATAGA
SIX3-Tail-1	GGACACCCAGCCATCGCCAACTAC
SIX3-Tail-2	CACCTAATGCGGCTGGAGACTGC
SIX3-Tail-3	GGGAAGCCGACGCTAGTTATAC
SIX5-Tail-1	GCTGCAAATGGCGACATTGACGGCG
SIX5-Tail-2	GCCATCAGAATGGAGGAGCAGAC
SIX5-Tail-3	GCATCCTAGAGGTATCTCGACAC
AD1	NGTCGASWGANAWGAA
AD2	GTNCGASWCANAWGTT
AD3	WGTGNAGWANCANAGA
SIX3-split-F1	AGCTACTAGCCGAGCTAAAGAC
SIX3-split-F2	GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTCAACCTCCCGGTTTCAGTC
SIX3-split-F3	TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTGTATGTCTGGAATCGCAAG
SIX3-split-F4	AGCTCGATTGATGTCTAGTCGC
SIX5-split-F1	TCTTAAGGAGTGGGCGTAGAAC
SIX5-split-F2	GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGGTGATGAAGAGTAGTAGAG
SIX5-split-F3	TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTTCTGTCAATTGTGACCAGTG
SIX5-split-F4	ATGTCAAGAGCGCGCGAAGCTC
HY	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA
YG	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA
M13F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA
FocSIX3-F2	GGTTATGCTAGAACATTCTCCC
FocSIX3-R2	CAGTTTGTATGCCTCCAATGGAG
FocSIX3-R3	TACGGAGGGTTTTCGGGAGAATG

**Table 6** Isolates of *Fusarium oxysporum* formae speciales used in this study

Isolate	Forma specialis and race
MAFF305556	f. sp. <i>asparagi</i>
MAFF103070	f. sp. <i>batatas</i>
MAFF744001	f. sp. <i>conglutinans</i>
MAFF305116	f. sp. <i>cucumerinum</i>
MAFF305557	f. sp. <i>fragariae</i>
MAFF103008	f. sp. <i>lagenariae</i>
MAFF103051	f. sp. <i>melongenae</i>
MAFF305544	f. sp. <i>melonis</i>
MAFF305608	f. sp. <i>niveum</i>
MAFF103058	f. sp. <i>raphani</i>
MAFF103060	f. sp. <i>spinaciae</i>
MAFF103007	f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>
MAFF103044	f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>
MAFF103036	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 1)
MAFF103038	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 2)
CK3-1	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 2)
YU-1	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 3)
YU-2	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 3)

### III. 結果

#### 1. *F. oxysporum* f. sp. *cepae* の *SIX* 遺伝子の塩基配列

第2章で述べたように、IGS系統樹のClade Hに属するタマネギ分離FOCは *SIX3*、*SIX5*、および *SIX7* ホモログを保持している。そこで、これらのホモログの塩基配列を明らかにした。FOCの *SIX3* ホモログは492 bpで、FOLの *SIX3* 遺伝子 (*FolSIX3*) と91.4%の相同性があった (Fig. 8)。FOCの *SIX5* ホモログは534 bp、*SIX7* ホモログは666 bpで、FOLの *SIX5* 遺伝子 (*FolSIX5*) および *SIX7* 遺伝子 (*FolSIX7*) とそれぞれ82.9%、86.7%の相同性があった (Fig. 9 and Fig. 10)。FOCの *SIX3*、*SIX5*、および *SIX7* ホモログはいずれもFOLのそれと相同性を有していたため、*FocSIX3*、*FocSIX5*、および *FocSIX7* とそれぞれを命名した。

#### 2. *FocSIX3*、*FocSIX5*、および *FocSIX7* タンパク質のアミノ酸配列

*FocSIX3*、*FocSIX5*、および *FocSIX7* 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を、*FolSIX3*、*FolSIX5*、および *FolSIX7* のアミノ酸配列と比較した。*FocSIX3* タンパク質はアミノ酸レベルで *FolSIX3* と85.9%の相同性があった (Fig. 11)。*FocSIX3* は3つのシステインを含んでおり、それらは *FolSIX3* と同じ位置にあった。また、*SIX3* が宿主細胞内に取り込まれるために必要な RxLR-like モチーフ (RIYER) も保存されていた (Fig. 11)。*FocSIX5* タンパク質は122アミノ酸であり、*FolSIX5* の119アミノ酸より3残基長く、69.7%の相同性があった (Fig. 12)。相同性はあまり高くないにもかかわらず、*FolSIX5* に見られる7つのシステイン残基はすべて保存されていた。また、*FolSIX5* と同様に3つのイントロンが存在していた。*FocSIX7* タンパク質は途中でストップコドンがあり、165アミノ酸のタンパク質に翻訳されると予想された。*FolSIX7* は220アミノ酸であることから、*FocSIX7* はそれよりも55アミノ酸も小さいことがわかった (Fig. 13)。



```

FocSIX3      ATGCGTTTCCTTCTGCTTATCGCCATGTCCATGACATGGGTTTGCTCTATTACTGGGCTA 60
FolSIX3      ATGCGTTTCCTTCTGCTTATAGCCATGTCCATGACATGGGTTTGCTCTATTGCTGGGCTA 60
*****
FocSIX3      CCTGTGGGCGATGCCGATTTCATCTATCGGTCAGCTCCAAGAACGGGAATCCCATATTGC 120
FolSIX3      CCTGTGGAAGATGCCGATTTCATCTGTTCGGTCAGCTCCAAGGACGGGGTAACCCATATTGC 120
*****
FocSIX3      CTGTTTCCGCGCCGCGCCGCTTCTACTTCATTTACTACGAGCTTCAGCACCGAACCT 180
FolSIX3      GTGTTTCCGCGCCGCGCAGCTTCTACTTCATTTACTACGAGCTTCAGCACCGAACCT 180
*****
FocSIX3      CTAGGTTATGCTAGAACATTCTCCCGAAACCTCCGTATGAGCGGGCTGGCAATTCGCTA 240
FolSIX3      CTGGGTTATGCTAGAAATGTTACACAGAGACCCTCCATATGAGCGGGCTGGCAATTCGGGA 240
** ***** ** * ** ***** *****
FocSIX3      CTGAATTACCGCATTTATGAACGATTCTCCATTGGAGGCATACAACTGTCATTGATGTC 300
FolSIX3      CTGAATCACCGCATTTACGAACGAAGTCGCGTTGGAGGCCCTCCGCACTGTCATTGATGTC 300
*****
FocSIX3      GCACCTCCGATGGACACCCAGCCATCGCCAACTACGAGATCGAAGTCCGCCGTATTTCCT 360
FolSIX3      GCCCCCCGACGGACACCAAGCCATCGCCAACTACGAGATCGAAGTCCGTCGTATTTCCT 360
** ** ***** *****
FocSIX3      GTTGCAACACCTAATGCGGCTGGAGACTGCTTTCACACCGCACGCCTTAGTACCGGCTCT 420
FolSIX3      GTTGCAACACCTAATGCGGCTGGAGATTGCTTTCACACTGCACGCCTTAGTACCGGCTCT 420
*****
FocSIX3      CGAGGTCCAGCCACAATCAGTTGGGAAGCCGACGCTAGTTATACCTACTATTTTACTCTC 480
FolSIX3      CGAGGTCCAGCCACAATCAGTTGGGATGCCGACGCTAGTTATACCTACTATCTTACTATC 480
*****
FocSIX3      TCAGAGATTTGA 492
FolSIX3      TCAGAGGATTGA 492
*****

```

**Fig. 8** Alignment of nucleotide sequences of *FocSIX3* and *FolSIX3* (AM234063).

```

FocSIX5      ATGCGCTTCGAGTACATCTCTGTTGTTCTAGCCCTTTGCGGCACGAGGTAATCTTGGCCC 60
FolSIX5      ATGCGCTTCGAGTACATCTCTGTT--CTAGCCCTTTGCGGCACGAGGTAATCTTAGCCC 57
*****
FocSIX5      TTTGTTATCCACACGCCTGTGTAGTT--TGTGTTTGCTAATATGGTCTTAGTCTCGCAA 118
FolSIX5      TTTGTTATCCTACACGCCTGTGTAGTTCGTGTGTTTGCTAACATGGTCTTAGTCTCGCAA 117
*****
FocSIX5      GGCATCATCAGTACTGTGCTTGCCAGTCCGGTGATGATGACAGCATTAAATATAGATGCCA 178
FolSIX5      GGGATCATCAGTACTGTGCTTGCCAGTCCGGTCTGGTGACAGCATTGATATAGATGCCA 177
** *****
FocSIX5      CCACTCAGCTTCAGAACAATCATCTCAGATTATGTGTGGGGTATGTATACCTCAGTAC 238
FolSIX5      CCACTCAGCTTCAGAACGATAATAGTAAATCATATTTGTGGGGTATGTATACCTCA-TAG 236
***** ** * * *** *****
FocSIX5      TAATTGACCAATCAGGCAAGCTTATAAATCTATAGCTCAGAAAAGTCCAGCATATTGGTA 298
FolSIX5      TGATTGGGCAATTGGGCAAGCTTACAATCTATAGCTCAGACCTCTCCAGCATATTGGT- 295
* **** * * * *****
FocSIX5      TTCGTCTGGTGAACATAGAGCACTTGGTCCACATTTCACTGGAATTTATGTAAGTCTACA 358
FolSIX5      -TTG-CTGACCGTCATAAA---CCTGGTCCACGATTCGCTGGCATTATGTAAGTCTACA 350
* * * * * * * * * *
FocSIX5      GCTTAGGATGATTAAGTGCCTGAACCTTGACTAGCTGAAAGCTGCAAATGGCGACA 418
FolSIX5      GCTTAGGATGATTAAGTGCCTGAACCTTGACTAGCTGAAAGCTGCAAATGGCAAAA 410
***** * *
FocSIX5      TTGACGGCGAAACATTCTATGACCTTGGCATCAGAATGGAGGAGCAGACTCAACATGCT 478
FolSIX5      TTGATGGCGATACATTCTATAATCTTGCATTAATAATGGAGGAGCAGACTCAACATGCT 470
**** * * * * * * * * * *
FocSIX5      TTGACTGCTCTAAATCTCACCAGGTTGAGACATTATCTATTGTGATGCATCCTAG 534
FolSIX5      TTGACTGCTCTAAATCTCACCAGGTTAGAAACGTTATCTATTGTGATGCGGCCTAG 526
***** ** * * *****

```

**Fig. 9** Alignment of nucleotide sequences of *FocSIX5* and *FolSIX5* (KM047035). shaded text; intron sequences.

```

FocSIX7      ATGCAGGTTATGAAGTACCTTTACCTCCTTTTCCATTTTCGCCCTGTTTGCAGTGCTATA 60
FolSIX7      ATGCAGGTTATGAAGTACCTTTACCTCCTTTTCCATTTTCGCCCTGTTTGCAGTGCTATA 60
*****
FocSIX7      CCTATACTCGATCTCTTTCCAAGACAAGGGCAATGCTTTAGCACC---GGCTCAACACCA 117
FolSIX7      CCTATGCTCGACCTATTTCCAAGACAAGGGCAATGCTTTAGCACCACCGGCTCAACACCA 120
*****
FocSIX7      CCACCACCACCACCCGCGCTACAGAGGTGACATTTGACATCACCGAAAATGTCAACTCG 177
FolSIX7      CCACGACCACCACCCGCGGTAGAGAGGTGACATTTGACATCACCCAAAATGTCAACACG 180
****
FocSIX7      TTCACCAACGCCGCGTCCACACCATGGACTCAGGGTGTAGGACTCTCGAATATTAGATAC 237
FolSIX7      TTCACTAGCGCCGCGTCCACACCATGGACTGAGGGTGTAGGACTCTCGAATATTAGATAC 240
*****
FocSIX7      CAATGGCGCGCATACTACAGTACCAGGCGTCAAACGTATTCGTTGAGGTTTCAGGTTTTTC 297
FolSIX7      CAATGGCGCGCATACTACAGTACCAGGCAACGAACGTTCGTTGAGGTTTCGGGTTTTTC 300
*****
FocSIX7      GGTACTGCCGCGGTGCAAGCAGTCTTGCTTCCGGATGCTCCCGCAACAGGTCGATGGCGC 357
FolSIX7      GGTACTGCCGAGGCGCAAGTAGTCTTGCTTCCGGATGCTCCCGGAACAAGTCGATATCGC 360
*****
FocSIX7      GCTATCAATAGCGACTCCTTTTCGGCCCAACGAAAGGGTCGCTGGCGGTGGTTTTAGCGGGC 417
FolSIX7      GCTATCGATAGCAACGTCTTTAGGCCCAACGAAGAGGTCACAGCGGTGGTTTTAGCGGGC 420
*****
FocSIX7      TGGGGTCAGGTGATTCCGGTCTGCCTTCAAACCTTTTGGTCGG---AGAGATATTATGTAT 474
FolSIX7      TGGGGTCAGGTGACTACGGTCTGCCTTCAAACCTTGGGGTCGGCGAGGAGATATTACCTAT 480
*****
FocSIX7      CGGCTCCGGATTCAACGAACGTAAGCCCAAGCACTCCTACCCCTTGAAGTCATTCCTGA 534
FolSIX7      CGGCTCCGGATTCAA---AGTAAGCCCAAGCACTCCTACCCCTTGAAGTCATTCCTGA 536
*****
FocSIX7      GAGGCAATACGCCAACCGCTTAATGAATGCCCGTCGCTACGCCAAAACCCCTCAGATGAT 594
FolSIX7      GAGGCAATACGCCAACCGCTTAATGAATGCCCGTTGCTACGCCAAAACCCATCAGATGAT 596
*****
FocSIX7      TTATAAGCCTAGGGCCTTGCTGATTTTCGTTTTCAGAGTTTAAACACAGCAGAGTTAGTA 654
FolSIX7      TTATAAGCCCAGGGCCTTGCTGACTTTTCGTTTTCATAGGTTAAACACAG-----TCAGTA 651
*****
FocSIX7      GTAGATCTGTAG 666
FolSIX7      GTAAATCTGTAG 663
***

```

**Fig. 10** Alignment of nucleotide sequences of *FocSIX7* and *FolSIX7* (KM04703)

```

FocSIX3      MRFLLLIAMSMTWVCSITGLPVGADADSSIGQLQERGIPLYCLFPGRRPSSTSFTTSFSTEP 60
FolSIX3      MRFLLLIAMSMTWVCSIAGLPVEDADSSVGLQGRGNPYCVFPGRRTSSTSFTTSFSTEP 60
*****:**** *:*:*:*:* * *:*:*:* *****
FocSIX3      LGYARTFSRNPPYERAGNSLLNYRYIERFSIGGIQTVIDVAPPDGHPAIANYEIEVRRIP 120
FolSIX3      LGYARMLHRDPPYERAGNSGLNHRYIERSRVGGRLRTVIDVAPPDGHQAIANYEIEVRRIP 120
***** : *:*:*:*:* *:*:*:* *:*:*:*:* *****
FocSIX3      VATPNAAGDCFHTARLSTGSRGPATISWEADASYTYFTLSEI 163
FolSIX3      VATPNAAGDCFHTARLSTGSRGPATISWDADASYTYLTISED 163
*****:**** *:*:*:*:*

```

**Fig. 11** Alignment of amino acid sequences of FocSIX3 and FolSIX3 (CAJ83999). shaded text; cysteine residue, boxed text; RxLR-like motif.

```

FocSIX5      MRFEYISVVLALCGTSLARHHQYCACQSGDDDSINIDATTQLQNNHPHDYVWAQKSPAYW 60
FolSIX5      MRFEYIS-VLALCGASLARDHQYCACQSGSGDSIDIDATTQLQNDNSKSYLWAQTSPAYW 59
***** *:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:*
FocSIX5      YSSGEHRALGPHFTGIYLKAANGDIDGETFYDLCHQNGGADSTCFDCSSKSHQVGDIIYCD 120
FolSIX5      FADR-HKP-GPRFAGIYLKAANGKIDGDTFYNLCINNGGADSTCFDCSSKSHQVRNVIYCD 117
*:* *:* *:*:*:*:* *:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:*
FocSIX5      AS 122
FolSIX5      AA 119
*:*

```

**Fig. 12** Alignment of amino acid sequences of FocSIX5 and FolSIX5 (ACY39285). shaded text; cysteine residue

```

FocSIX7      MQVMKYLYLLFHFALFASAIPILDLFPQQGQCFSTGSTPPPPPPAPTEVTFDITENVNS 59
FolSIX7      MQVMKYLYLLFHFALFASAIPLDLFPQQGQCFSTGSTPPRPPPAAREVTFDITQNVNT 60
*****:***** ***** ****. *****:***:
FocSIX7      FTNAASTPWTQGVGLSNIRYQWRAYSTRQTVFVEVQVFGTAAVQAVLLPDAPATGRWR 119
FolSIX7      FTSAASTPWTEGVGLSNIRYQWRAYSTRQRTTFVEVRVFGTAEAQVLLPDAPGTSRYR 120
**.*:*****:*****:***:*.****.*:***** .*.*****.*.*:*
FocSIX7      AINSDSFRPNERNVAGGGLAGWGQVIPVCLQTFGRR-DIMYRLRIQRT----- 165
FolSIX7      AIDSNVFRPNNEEVTGGGLAGWGQVTVCLQTWGRRGDITYRLRIQSKPKHSYPLEVIPER 180
**:*: *****.*:***** .*****:*** ** ***** .
FocSIX7      -----
FolSIX7      QYANRLMNARCYAKTHQMIYKPRGLADFRFHRLTQSVVNL 220

```

**Fig. 13** Alignment of amino acid sequences of FocSIX7 and FolSIX7 (ACN69117). shaded text: cysteine residue

### 3. *FocSIX3-Foc5* 領域

FOL 4287 株において、*FolSIX3* と *FolSIX5* は隣接し、1,365 bp のプロモーター領域を共有していることが知られている (Schmidt et al. 2013)。そこで、FOC においても *FocSIX3* と *FocSIX5* が隣接しているのではないかと考え、SIX3-R/SIX5-R プライマーペアを用いて PCR を行った。FOL CK3-1 (race2) 株からは、約 2,300 bp の DNA 断片を増幅されたことから、この領域が FOL 株間で保存されていることが示唆された。一方、FOC の TA 株、AC85 株、AC245 株の 3 株すべてから約 5,000 bp の DNA 断片が増幅された (Fig. 14)。

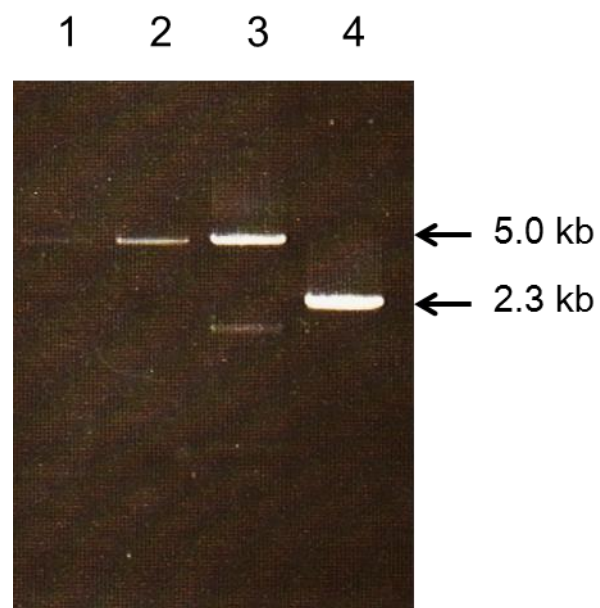
プライマーウォーキング法により *FocSIX3-FocSIX5* 領域の塩基配列を決定した。その結果、この領域には遺伝子と予想される配列 (ORF) は存在しなかったが、Helitron などのトランスポゾン配列の断片が存在していた。FOL の *SIX1~SIX7* 遺伝子の上流には miniature Impala (mimp) と呼ばれる DNA トランスポゾンが存在している。

*FolSIX3-FolSIX5* 遺伝子領域においては、*FolSIX3* 遺伝子の 232 bp 上流に mimp1 が存在しているが、*FocSIX3* 遺伝子の上流には mimp1 様の配列は存在していなかった

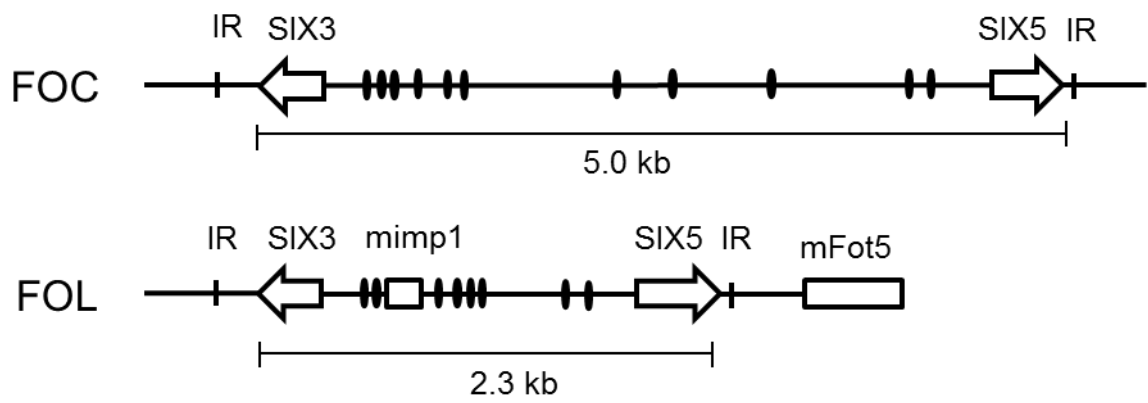
(Fig. 15)。また、*SIX* 遺伝子のプロモーター配列にある TCGGCA モチーフが転写に関わっていることがわかっているため、このモチーフを検索した。*FolSIX3-FolSIX5* 遺伝子領域においては、このモチーフが 8 個あり、*FocSIX3-FocSIX5* 遺伝子領域にはこのモチーフが 11 個存在していた (開始コドンから 1,000 bp 上流だと 9 個)。さらに *FolSIX3-FolSIX5* 遺伝子領域の両サイドには inverted repeat (IR) があるが、*FocSIX3-FocSIX5* 遺伝子領域にも存在していた。

### 4. *SIX* 遺伝子の座乗染色体の特定

第 2 章において、*FocSIX3* 遺伝子は約 4 Mb の染色体上に座乗していることを CHEF サザン解析によって明らかにした。*FocSIX5* は *FocSIX3* と隣接していることから、*FocSIX5* もこの染色体上に座乗していると予想される。一方、FOC が有するもうひとつの *SIX* ホモログである *FocSIX7* の座乗染色体については明らかになっていない。そこで、*FocSIX7* の PCR 断片をプローブにして CHEF サザン解析を行った。その結果、*FocSIX7* も *FocSIX3* と同様の約 4 Mb の染色体上に座乗していることがわかった (Fig. 16)。

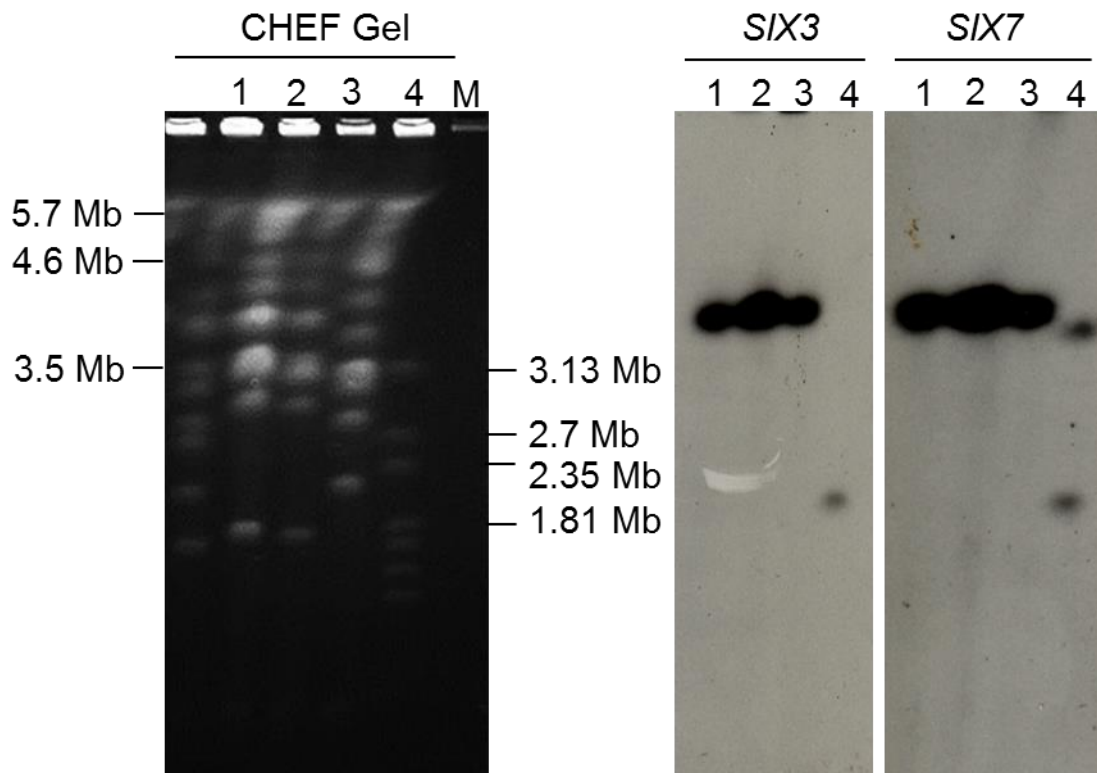


**Fig. 14** Amplification of *SIX3-SIX5* region using primer pair SIX3-R2/SIX5-R1.  
1, FOC AC85 isolate; 2, FOC AC245 isolate 3, FOC TA isolate; 4, FOL CK3-1 isolate



**Fig. 15** Schematic representation of *SIX3-SIX5* locus in FOC and FOL. arrow: *SIX* gene, allipse: TCGGCA motif.





**Fig. 16** Chromosomal localization of *FocSIX7* gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Karyotype profiles of *F. oxysporum* f. sp. *cepae* by contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) electrophoresis (left panel) and Southern blot analysis of the CHEF gel using *FocSIX3* and *FocSIX7* as a probe (right panel). 1: AC109; 2: AC140; 3: TA; 4: CK3-1

## 5. *FocSIX3* 遺伝子および *FocSIX5* 遺伝子の発現

合成培地上で生育中の FOC における *FocSIX3* 遺伝子および *FocSIX5* 遺伝子の発現を調べた。FOC を B5 培地および窒素源 (-N)、炭素源 (-C) またはその両方を含まない B5 培地上 (-NC) で培養し、その菌体から RNA を抽出した。その RNA を用いて RT-PCR を行ったところ、*FocSIX3* および *FocSIX5* はいずれの培地においても共に発現していた (Fig. 17)。

タマネギへの感染時における *FocSIX3* 遺伝子および *FocSIX5* 遺伝子を調べるために、FOC をタマネギの幼苗に接種し、接種 4 日後および 8 日後に根を回収し RNA を抽出した。その RNA を用いて RT-PCR を行ったところ、*FocSIX3* および *FocSIX5* は共に植物体内で発現していた (Fig. 18)。

## 6. *FocSIX3* および *FocSIX5* 遺伝子破壊株の作製

*FocSIX3* および *FocSIX5* 遺伝子破壊コンストラクトを作製するために、両遺伝子の 3'flanking 領域の塩基配列を Thermal asymmetric interlaced (TAIL) -PCR によって決定した。決定した塩基配列を用いて BLAST 検索をおこなったところ、*FocSIX3* の 3'flanking 領域にはレトロトランスポゾンの LTR とトランスポゾンである hornet1 のフラグメントが存在していた。*FocSIX5* の 3'flanking 領域には *F. oxysporum* f. sp. *melonis* の EST 配列が存在しており、何らかの遺伝子が存在していると考えられる。

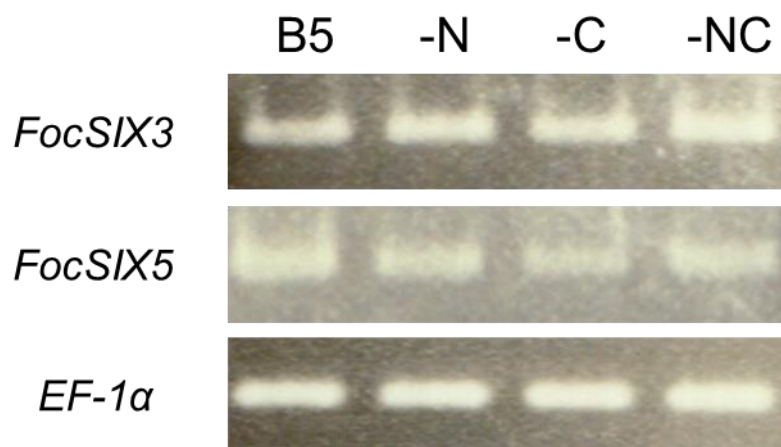
遺伝子破壊は Split-marker recombination 法 (Catlett et al. 2003) に従って行った。この方法は選択マーカーであるハイグロマイシン耐性カセットとターゲティング部位の配列を結合させ、さらに選抜マーカーの中央の配列を重なるように 2 つのコンストラクトを作製することによって、選抜マーカー内でも相同組み換えを起し、ectpic 挿入を起しにくくする方法である (Fig. 19)。*FocSIX3* および *FocSIX5* 遺伝子破壊コンストラクトはプロトプラスト-PEG 法によって菌株へ導入した。その結果、遺伝子破壊株をそれぞれ 2 株ずつ得た。遺伝子内に結合するプライマーを用いて、両遺伝子が破壊されていることを確認した (Fig. 20)。さらにサザンブロットによっても両遺伝子が破壊されていることを確認した (Fig. 21)。

## 7. *FocSIX3* および *FocSIX5* 遺伝子破壊株の病原性

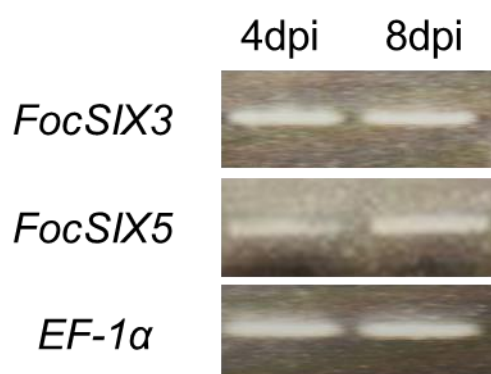
タマネギの幼苗と鱗茎を用いて、*FocSIX3* および *FocSIX5* 遺伝子破壊株の病原性を試験した。タマネギの幼苗を用いた病原性試験では、幼苗の根を孢子懸濁液に浸漬した

後に移植し枯死株率を測定した。接種 3 週間後において、野生株および *FocSIX5* 遺伝子破壊株はタマネギに対して 80%近い枯死株率を引き起こしたが、*FocSIX3* 遺伝子破壊株は枯死株率が 60%であり、野生株と比較しわずかに減少していた (Fig. 22)。

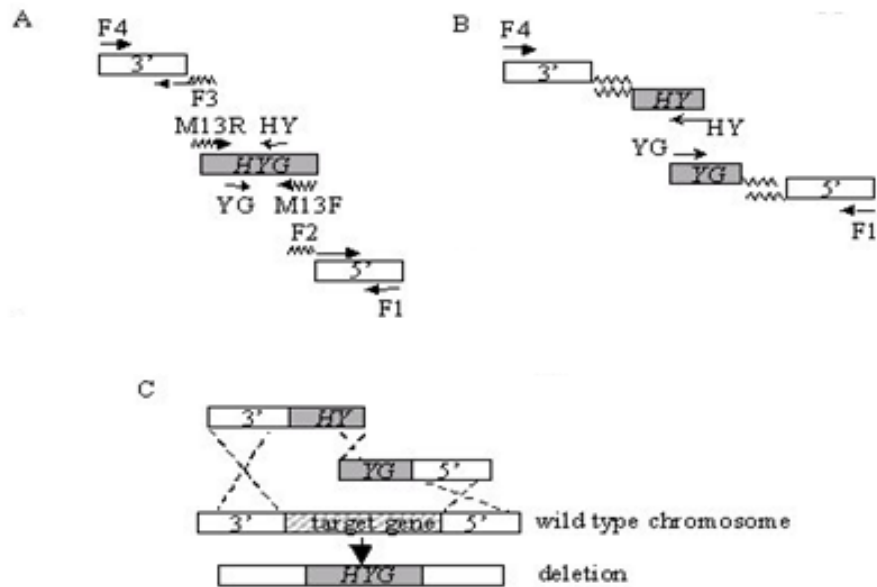
タマネギの鱗茎を用いた病原性試験では、遺伝子破壊株の菌プラグをタマネギの盤茎部に接種した。接種 1 か月後において *FocSIX5* 遺伝子破壊株は野生株と同様に病徴を示したが、*FocSIX3* 遺伝子破壊株は野生株と比べて病徴の発展が遅く、菌糸が鱗茎部へと広がっていなかった (Fig. 23)。



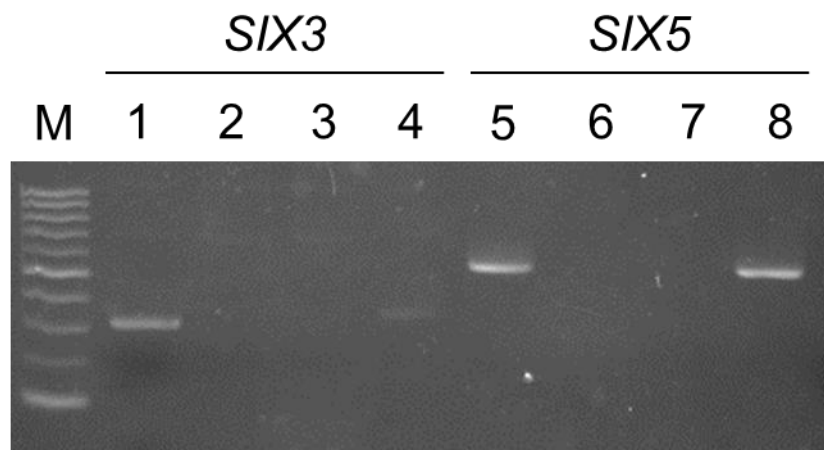
**Fig. 17** Expression of *FocSIX3* and *FocSIX5* in FOC grown on synthetic medium. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis using RNA isolated from mycelia grown on B5 media (B5), B5 media without nitrogen source (-N), B5 media without carbon source (-C), and B5 media without nitrogen and carbon source (-NC).



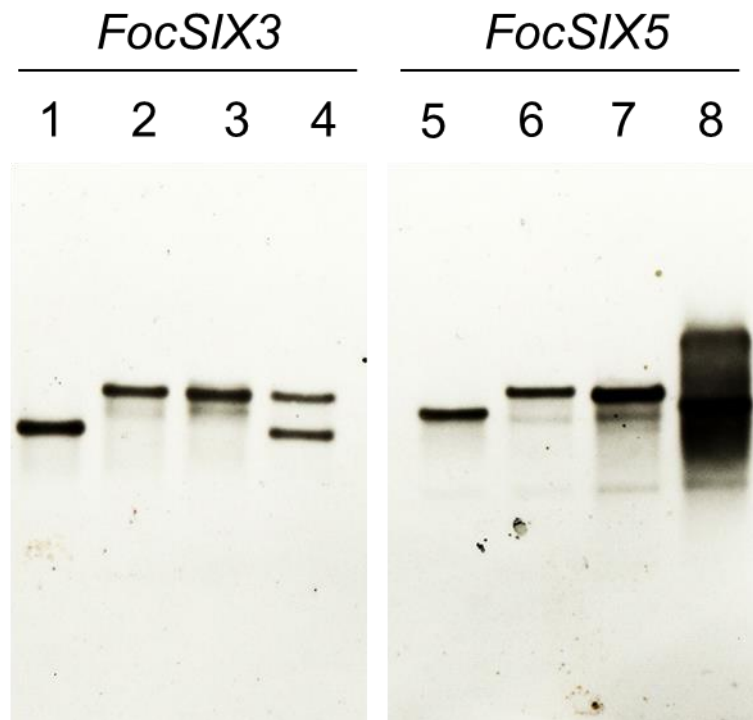
**Fig. 18** Expression of *FocSIX3* and *FocSIX5* in FOC-infected onion roots. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis using RNA isolated from roots at 4, and 8 days post inoculation (dpi).



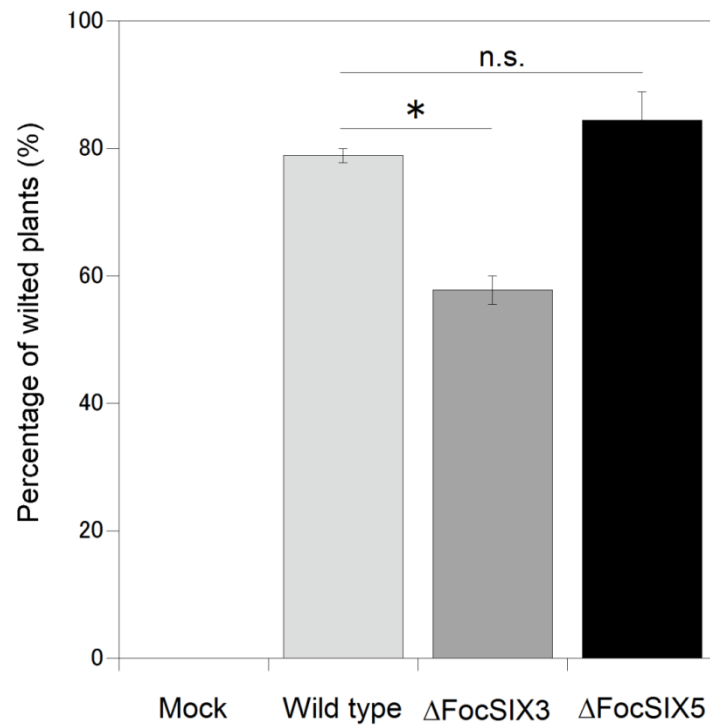
**Fig. 19** Split-marker strategy for gene deletion. (A) Primers F1/F2 and F3/F4 amplify target gene flanking sequences. Primers M13R/HY and M13F/YG amplify "HY" and "YG" marker fragments, respectively. Note that primers F2 and F3 are hybrid, the 5' ends are complementary to the M13F and M13R sequences, respectively, and the 3' ends are gene specific. (B) Two separate PCR reactions (F1/YG) and (HY/F4) fuse the flank sequences to the 5' (HY) or 3' (YG) portions of HYG. (C) Homologous recombination and gene deletion. The two fusion PCR fragments are used directly for transformation. Homologous recombination between the overlapping regions of the selectable marker (HYG), and between the flank regions and chromosomal DNA results in a directed deletion. (Catlett et al. 2003)



**Fig. 20** Amplification of *FocSIX3* and *FocSIX5* in deletion mutant. M: molecular weight marker, 1,5: Wild type, 2:  $\Delta$ FocSIX3-1, 3:  $\Delta$ FocSIX3-2, 4: ectopic mutant of FocSIX3, 5:  $\Delta$ FocSIX5-1, 6:  $\Delta$ FocSIX5-2, 7: ectopic mutant of FocSIX5

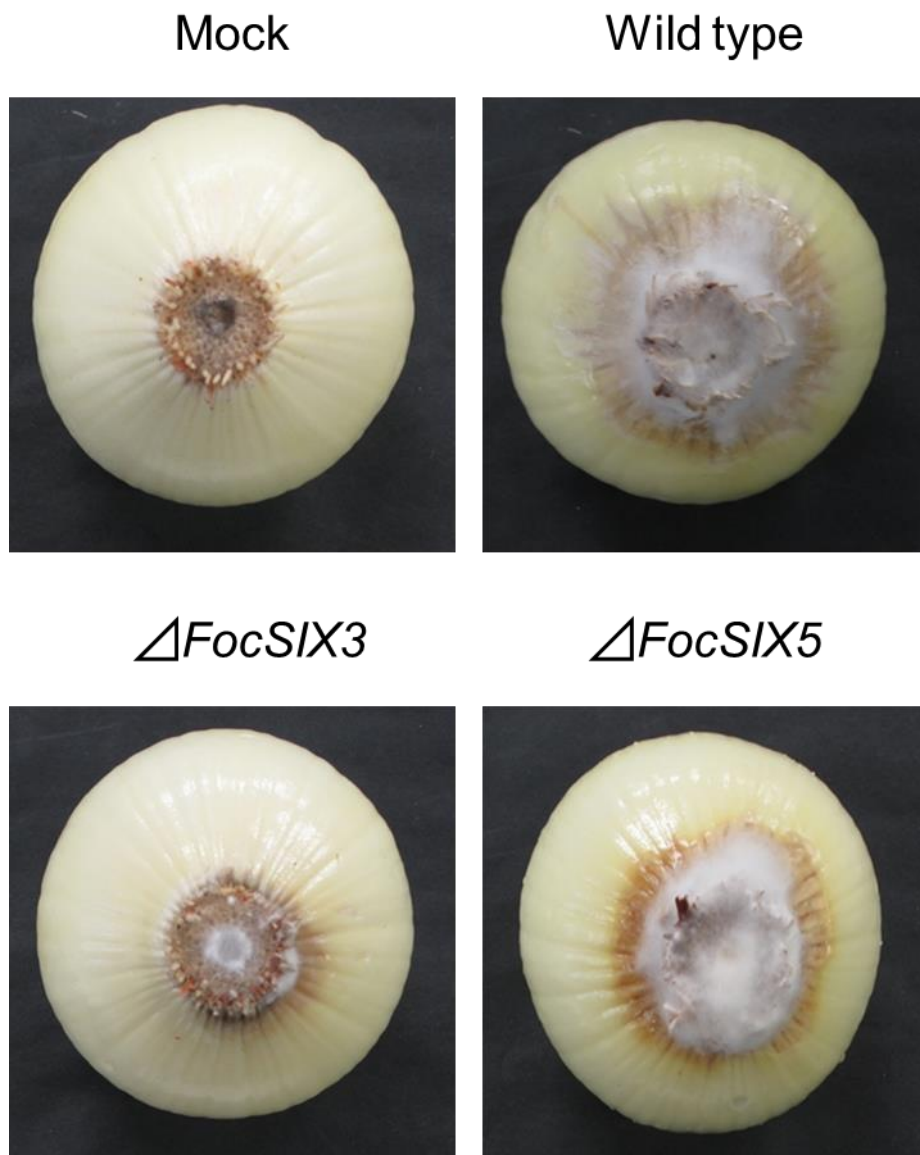


**Fig. 21** Genomic southern blot analysis of *FocSIX3* and *FocSIX5* deletion mutants using *FocSIX3* (left panel) and *FocSIX5* (right panel) as probes. 1,5: Wild type, 2:  $\Delta$ *FocSIX3*-1, 3:  $\Delta$ *FocSIX3*-2, 4: ectopic mutant of *FocSIX3*, 5:  $\Delta$ *FocSIX5*-1, 6:  $\Delta$ *FocSIX5*-2, 7: ectopic mutant of *FocSIX5*



**Fig 22** Percentage of wilted onion plants inoculated with *FocSIX3* and *FocSIX5* deletion mutants. Onion seedlings were inoculated with fungal spores using root-dip methods and grown at 25°C for three weeks. Error bars are the standard error of the mean. Asterisk (\*) indicate significant ( $p < 0.05$ ) differences according to Student's *t* test. n.s.= not significant.





**Fig. 23** Pathogenicity of *FocSIX3* and *FocSIX5* deletion mutants to onion bulb. Basal plates of onion were inoculated with fungal myceria plugs and incubated for one month.

## 8. *FocSIX3* 特異的プライマーの設計

*FocSIX3* の塩基配列はタマネギ分離 FOC 株間で高度に保存されているが、*FolSIX3* の塩基配列とは大きく異なる領域が含まれている。*FocSIX3* に存在し *FolSIX3* に存在しない配列に基づいてプライマーを設計すれば、FOC を特異的に検出できる可能性がある。そこで、5 つのプライマーセット (P1~P5) を作製し、FOC に対する特異性を試験した。タマネギ分離 FOC3 株、ネギ分離 FOC3 株、および FOL3 株を用いて PCR を行った。その結果、P1、P3、および P4 によって、タマネギ分離 FOC のみで PCR 産物が増幅された (Table 7)。FOC と FOL の両分化型で増幅できるように設計したプライマーペア P5 では、予想通り両方で増幅産物が確認された。P2 は FOL において非特異産物を増幅した (Table 7)。以下の実験では、最も特異性が高く、増幅産物の短いプライマーペア P1 を使用した。

## 9. *FocSIX3* 特異的プライマーの特異性の検証

*FocSIX3* 特異的プライマー P1 の特異性を調べるために、タマネギ分離 FOC を 23 株、ネギ分離 FOC を 15 株、さらに非病原性 *F. oxysporum* を 7 株用いて PCR を行った (Table 4)。その結果、タマネギ分離 FOC でのみ 106 bp の増幅産物が得られた (Fig. 24)。次に FOL を含む *F. oxysporum* の 13 分化型 18 菌株の DNA を用いてプライマーペア P1 の特異性を検証した (Table 6)。その結果、106 bp の PCR 産物はタマネギ分離 FOC の TA 株のみで増幅され、他の分化型では増幅されなかった (Fig. 25)。

## 10. 感染植物体からの検出および定量

本研究で設計した FOC 特異的プライマーが植物体内での FOC の定量に利用できるかどうかを調べるために、P1 を用いてリアルタイム qPCR を行った。まず、P1 の定量 PCR へ適用性を調べるために、*FocSIX3* 断片を含んだプラスミドをテンプレートとして標準曲線を作成した。その結果、Ct 値と *FocSIX3* のコピー数の間に相関関係のある標準曲線を作成することができ、 $R^2$  は 0.99902 であった (Fig. 26)。今後の実験では、この標準曲線をもとに FOC のコピー数を算出した。

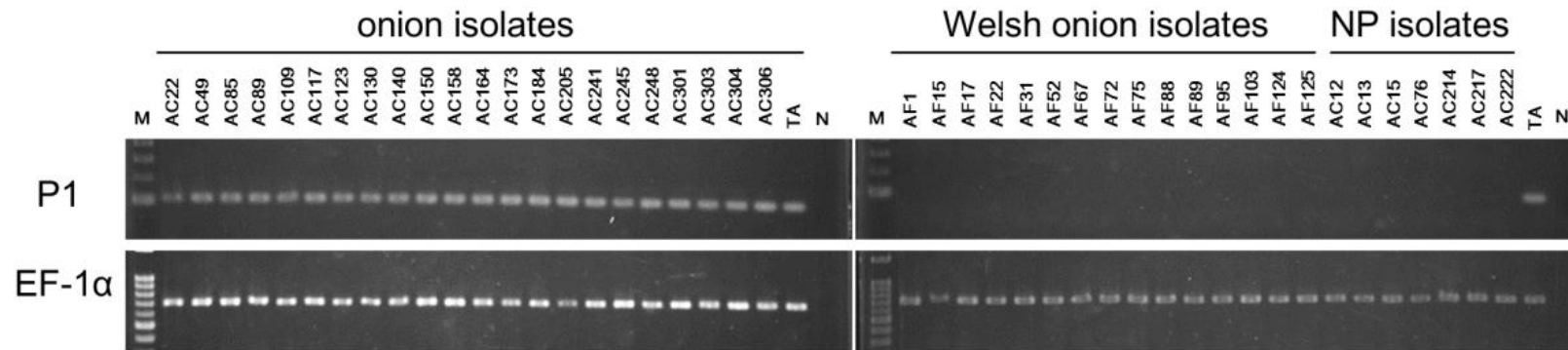
タマネギの品種間、さらには組織部位間で FOC の感染に差があるかを調べた。タマネギ品種はヒグマ (感受性品種)、カムイ (中程度の抵抗性)、および北もみじ 2000 (抵抗性) を使用し、FOC 汚染圃場に移植し、移植 60 日後および 77 日後に回収した。各サンプルは根の下部、根の上部、および盤茎に分け、DNA を抽出した。根から抽出し

た DNA を用いた場合、すべての品種で FOC を検出できたが、盤茎からは検出できなかった (Fig. 27)。移植 60 日後において、感受性品種 ‘ヒグマ’ の根の下部でもっとも多くの FOC が定着していたが、他の品種では少なかった。移植後 77 日後においては、感受性品種 ‘ヒグマ’ は根の下部よりも上部により多くの数の FOC が定着しており、すべてのサンプル内で最も多くの FOC が検出された。中程度の抵抗性品種 ‘カムイ’ は移植 60 日後と比較して移植 77 日後ではより多くの FOC が検出された。移植 77 日後の抵抗性品種 ‘北もみじ 2000’ において、根の下部では ‘カムイ’ と同程度の FOC が検出されたが、根の上部ではほとんど検出されなかった (Fig. 27)。

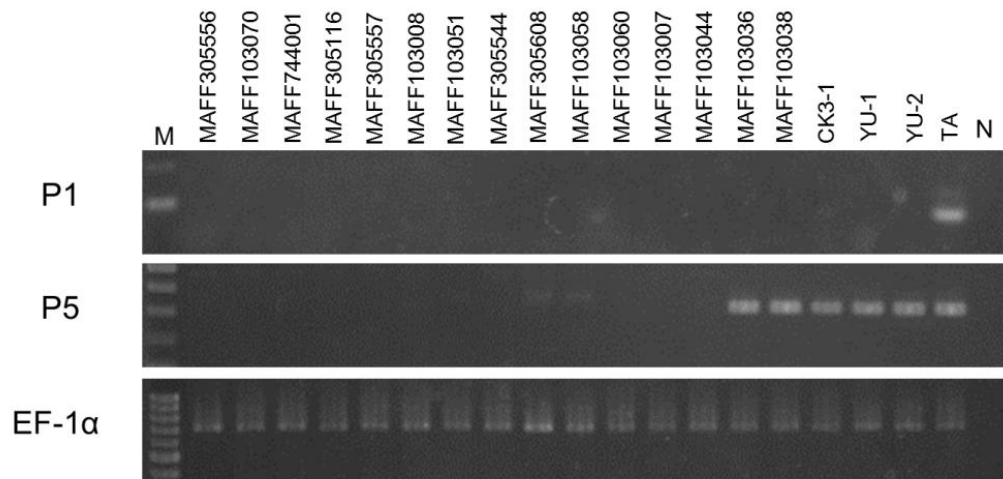
**Table 7** Primer pairs for specific detection of onion FOC

Primer	Primer pair	Amplicon	Detection		
			onion FOC	Welsh onion FOC	FOL
P1	FocSIX3-F2/ FocSIX3-R2	106 bp	+	—	—
P2	FocSIX3-F2/ SIX3-C-R	160 bp	+	—	—*
P3	SIX3-C-F/ FocSIX3-R2	266 bp	+	—	—
P4	SIX3-C-F/ FocSIX3-R3	195 bp	+	—	—
P1	SIX3-C-F/ SIX3-C-R	320 bp	+	—	+

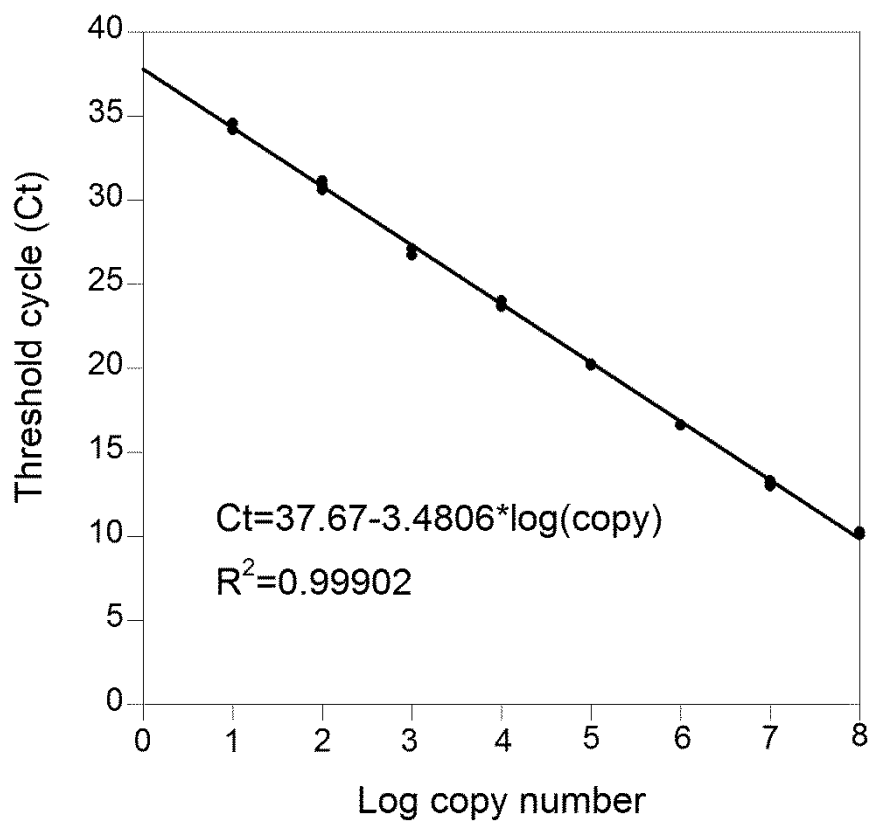
+, amplification, -; no amplification, \*; generated nonspecific band.



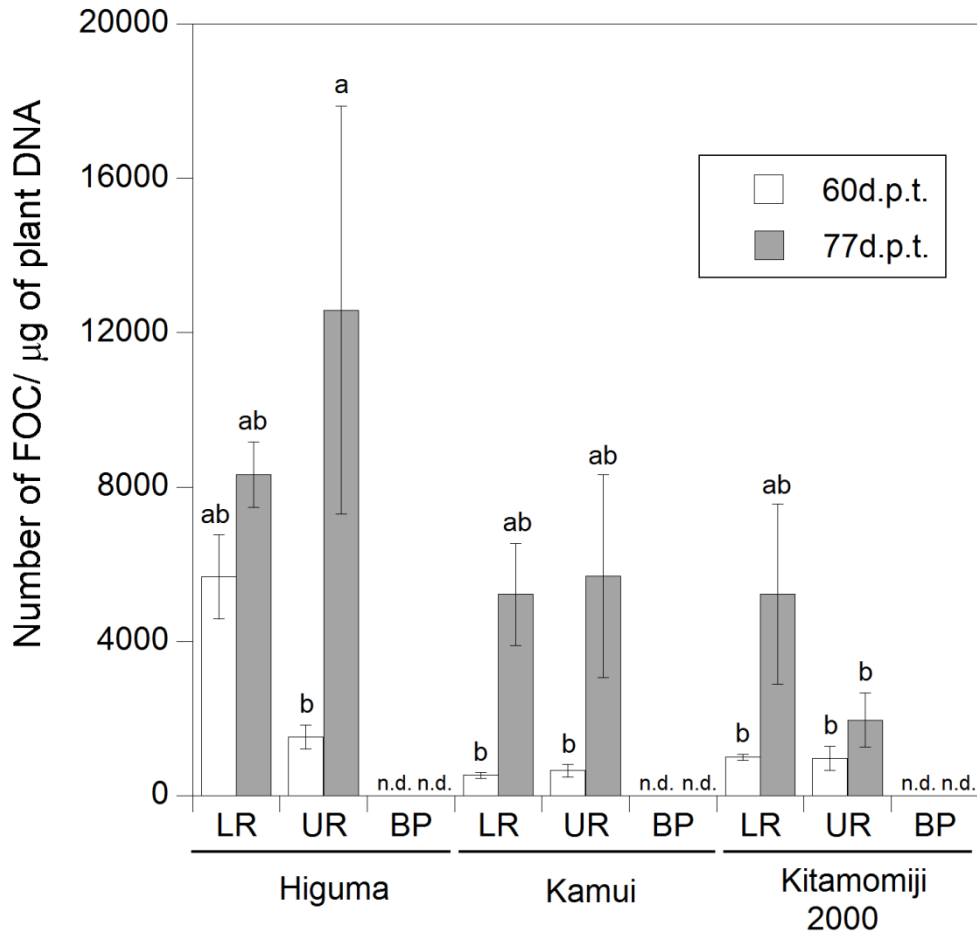
**Fig. 24** Agarose gel electrophoresis of the PCR products from *FocSIX3* generated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* onion isolates, Welsh onion isolates, and non-pathogenic (NP) isolates with a *FocSIX3*-specific primer pair P1 (*FocSIX3*-F2/*FocSIX3*-R2). M: 100 bp ladder, N: negative control.



**Fig. 25** Agarose gel electrophoresis of PCR products from *FocSIX3* generated from formae speciales of *Fusarium oxysporum* shown in Table 6 using a *FocSIX3*-specific primer pair P1 (*FocSIX3*-F2/*FocSIX3*-R2) and a *SIX3*-specific primer pair P5 (*SIX3*-C-F/*SIX3*-C-R). M: 100 bp ladder, N: negative control.



**Fig. 26** Standard regression line of an eight-point 10-fold serial dilution of plasmid DNA containing one copy of the *FocSIX3* fragment. Threshold cycles (Ct) were plotted against the log of plasmid DNA standard curves of known copy numbers.



**Fig. 27** Quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) in onion plants. Three onion cultivars, 'Higuma', 'Kamui', and 'Kitamomiji 2000', which are susceptible, moderately resistant, and highly resistant to *Fusarium* basal rot, respectively, were used. The amount of FOC was estimated by a quantitative polymerase chain reaction using a primer pair P1 (FocSIX3-F2/FocSIX3-R2). Plants grown in a naturally-contaminated field were harvested at 60 and 77 days post transplantation (d.p.t.). DNA was extracted from the lower half (LR) and upper half (UR) of the root, and the basal plate (BP) and subjected to quantitative PCR. Error bars are the standard error of the mean. Bars with the different letters indicate significant ( $p < 0.05$ ) differences according to Tukey's HSD test. n.d.; not detected.



#### IV. 考察

FocSIX3 および FocSIX5 は、FoclSIX3 および FolSIX5 とアミノ酸配列が大きく異なっているにもかかわらず、システイン残基は保存されていた。システインはジスルフィド結合に必要であり、タンパク質の三次構造に大きくかかわっている。特にエフェクタータンパク質は多くのシステインを含んでいることが特徴である (Rep 2005)。

*Cladosporium fulvum* のエフェクタータンパク質である AVR4 のシステイン置換変異タンパク質はプロテアーゼによって分解されてしまう (Joosten et al. 1997; van den Burg et al. 2003)。また、*Pyrenophora tritici-repentis* の宿主特異的毒素タンパク質である Ptr ToxA はシステイン残基が生物活性に重要な役割を果たすことが確認されている (Tuori et al. 2000)。エフェクタータンパク質が生物活性を発揮するうえで、分子内のジスルフィド結合によって形成される三次構造が重要であることが示唆される。

FolSIX3 タンパク質は RxLR-like モチーフを有している。このモチーフは卵菌のエフェクタータンパク質内で共通に保存されており、(Rehmany et al. 2005; Tyler et al. 2006)、宿主細胞内に取り込まれるために必要である (Whisson et al., 2007; Dou et al., 2008)。FolSIX3 においても、このモチーフがアポプラストから細胞膜のホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) を介して宿主細胞内へと取り込まれるために必要であると示唆されている (Kale et al. 2010)。細胞内に取り込まれた FolSIX3 は核へ局在し、抵抗性品種においては *R* 遺伝子である *I-2* に認識される (Ma et al. 2013)。しかし、感受性品種の細胞内での FolSIX3 の局在や機能はまだわかっていない。FocSIX3 も RxLR-like モチーフを保持しており、PI3P を介して宿主細胞内に取り込まれる可能性がある。

*FolSIX3* と *FolSIX5* は隣接しておりプロモーター領域を共有している (Schmidt et al. 2013)。FOC でも *FocSIX3* と *FocSIX5* は隣接していたが、FOL と比較して約 2.7 kbp も長かった。そこでこの領域の塩基配列を決定し、FOL との比較を行った。この領域の両末端には inverted repeat (IR) が存在しており、FOC においても存在していた。IR は DNA トランスポゾンの両側に普遍的に存在していることから (Wicker et al. 2007; Schmidt et al. 2013)、この領域が転移できることを示唆している (Schmidt et al. 2013)。また、FOL においては、多くの *SIX* 遺伝子 (*SIX1*, *SIX2*, *SIX3*, *SIX5*, *SIX6*, および *SIX7*) のプロモーター領域に miniature Impala (mimp) 配列が存在していることから、mimp 配列はエフェクター候補遺伝子を同定するための標識になる可能性が

ある (Schmidt et al. 2013)。しかし、*FocSIX3*のプロモーター領域は *mimp* 配列が欠損していた。このため、*mimp* をターゲットとするエフェクター候補遺伝子の同定は、FOL 以外では困難と思われる。

*mimp* はプロモーター領域に存在しているため、*SIX1*、*SIX3*および *SIX5*の転写との関係に興味を持たれ、*mimp* 配列の欠損変異株が作製された。しかしながら、*mimp* は *SIX* 遺伝子の転写に関わっていなかった (Schmidt et al. 2013)。本研究でも、プロモーター領域に *mimp* 配列を持たない *FocSIX3*において、*SIX3*および *SIX5*は培地上およびタマネギ感染時に発現していた。これらのことから、プロモーター領域の *mimp* 配列は *SIX* 遺伝子の転写制御に関わっていないものと思われる。

FOL においては、*SIX1* と *SIX2*は合成培地上ではほとんど発現せず、トマト細胞培養の存在下またはトマト感染時に高く発現する (van der Does et al.2008a; Michielse et al. 2009)。一方、*SIX3* と *SIX5*は培地上およびトマト細胞培養存在下の両方で発現する (Michielse et al. 2009)。本研究においても、*FocSIX3* と *FocSIX5*の発現は合成培地上およびタマネギ感染時の両方で確認された。*SIX* 遺伝子の転写制御には TCGGCA モチーフが関わっていることが示唆されているが、*FocSIX3*および *FocSIX5*のプロモーター領域においてもこのモチーフは保存されていた。また、転写因子である *Sge1* (SIX gene expression 1) が直接もしくは間接的に関わっていることが示されており (Michielse et al. 2009)、FOC の TA 株のゲノム内にも *Sge1* 遺伝子が保持されていた (データ未記載)。これらの結果は、FOL および FOC の *SIX3* と *SIX5* 遺伝子が類似した機構によって転写が制御されていることを示唆している。とくに、*FocSIX3*、*FocSIX5*、および *FocSIX7*はすべて約 4 Mb の染色体に座乗していたことから、この染色体またはこの染色体の一部に座上する遺伝子は FOL と FOC との間で共通性が高い可能性が推察される。

*FocSIX3* の遺伝子破壊株はタマネギに対する病原性が低下しており、*FocSIX3* は FOC の病原性遺伝子であることが示唆された。一方 *FolSIX3* (*AVR2*) はトマトの抵抗性遺伝子 *I-2* に認識される非病原力遺伝子であり、*I-2* を持たないトマト品種に対しては病原性遺伝子として働く。*I-2* はトマトの *R* 遺伝子において唯一クローニングされており、N 末端に coiled-coil (CC)、中央に nucleotide-binding (NB)、C に末端 leucine-rich repeat (LRR) を持つ CC-NB-LRR クラス *R* 遺伝子に属する (Simons et al. 1998)。FOC に完全な抵抗性を持つタマネギ品種はなく、抵抗性遺伝子も発見されていない。しかしながら、シャロット (*A. cepa* Aggregatum group) が FOC に対して抵抗性を有

するという報告がある (Vu et al. 2012)。シャロットなどの FOC に抵抗性を有する近縁種が *FocSIX3* を認識する CC-NB-LRR クラス *R* 遺伝子を保持していれば、*FocSIX3* は非病原力遺伝子として働くかもしれない。今後、タマネギおよびその近縁種における CC-NB-LRR クラス *R* 遺伝子が見つければ、それをタマネギに導入することによって乾腐病抵抗性品種を得られる可能性がある。

本章では *FocSIX3* と *FolSIX3* の塩基配列の違いに基づいて、*FocSIX3* 特異的プライマーを設計した。このプライマー P1 はタマネギ分離 FOC の特異的検出を可能にした。現在までに、*F. oxysporum* の分化型を検出するために様々な分子マーカーが開発されている。それらの分子マーカーはリボソーム DNA internal transcribed spacer (ITS) 領域 (Zhang et al. 2005; Abd-El salam et al. 2006)、random amplification polymorphic DNA (RAPD) (Alves-Santos et al. 2002; Scarlett et al. 2013)、inter-retrotransposon amplified polymorphisms (IRAP) -PCR (Pasquali et al. 2007; Suga et al. 2013)、または既知遺伝子 (Hirano and Arie 2006; Sousa et al. 2014) などの多型をもとに設計されている。多型をもとにした分子マーカーは PCR 条件や標的配列の変異などによって交差反応が出やすい傾向にある (Hirano and Arie 2006)。前述のように、*SIX3* は FOL と FOC 以外では見つかっておらず、さらに *FocSIX3* は病原性に関わっていることから、この FOC 特異的マーカーは信頼性のおけるものであると考えられる。

本章ではまた、FOC 特異的プライマー P1 の定量的 PCR への応用を検討した。タマネギ分離 FOC はゲノム内に *FocSIX3* 遺伝子を 1 コピー保持しているため、*FocSIX3* の数は FOC の細胞数となる。*FocSIX3* を挿入したプラスミドで標準曲線を作成したところ、Ct 値と *FocSIX3* の数の間に相関があった。さらに 1 反応あたり  $10^1$  コピーでも検出することができ、プライマー P1 は定量 PCR に応用できることがわかった。そこで、タマネギ分離 FOC の植物体内での定量を試みたところ、*FocSIX3* は植物 DNA 存在下でも増幅され、植物内の FOC を定量できることがわかった。興味深いことに、植物への FOC の感染は抵抗性品種と比較して感受性品種で多いという傾向にあった。同様の結果はヒヨコマメにおける *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Jiménez-Fernández et al. 2011)、メロンにおける *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Haegi et al. 2013)、ジャガイモにおける *Verticillium dahlia* (Dan et al. 2001) で観察されている。このことは、FOC 特異的プライマー P1 のを用いて定量的 PCR を行えば、乾腐病抵抗性品種と感受性品種を判別できる可能性を示唆している。

盤茎部においてはいずれの品種からも FOC を検出できなかったが、今回使用したサンプルは無病徴であったため、試料採取時に FOC が盤茎部に到達していないか、もしくはほんのわずかな数しか定着していなかったためと思われる。児玉 (1983) はタマネギ圃場において不顕性感染 (symptomless infection) を示す植物体が存在し、それらでは盤茎部およびその付近に FOC が存在していることを報告している。盤茎および盤茎付近への不顕性感染は、夏の高温や長雨のような厳しい環境条件下に宿主植物がさらされた場合の発病リスクを増大させる。今回の結果においても、感受性品種‘ヒグマ’の盤茎部に近い根の上部で多くの FOC が検出されており、抵抗性品種と比べて発病のリスクが高いと推測される。本研究で開発した FOC 定量法は、タマネギ植物内の FOC を定量することができるので、不顕性感染個体の判別への応用が期待される。また、タマネギ種子や移植前の苗における FOC の感染の検出にも利用できると思われる。さらに、タマネギ乾腐病は、圃場での栽培中のみならず、収穫後の貯蔵中にも発病するため、貯蔵前に FOC 感染タマネギを除去することが重要である。本研究で開発した FOC 定量法は、貯蔵前のタマネギにおける FOC 感染の判定にも有用と思われる。

## 第4章 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* が分泌する

### 萎凋誘導性タンパク質の同定

#### I. 序論

植物病原菌は植物体に感染するために、細胞壁分解酵素、植物ホルモン、エフェクター、および植物毒素など、様々な戦略物質を生産する。このうち、植物毒素はその生物活性によって宿主特異的毒素 (HST) と非特異的毒素に分類される (Berestetskiy 2008)。植物毒素の多くは二次代謝産物で (Berestetsky 2008; Stergiopoulos et al. 2013)、*F. oxysporum* もフザリン酸やフモニシンなどの様々な二次代謝化合物性毒素を生産することが知られている (Bacon et al. 1996; Sewram et al. 2005)。しかしながら、これらの毒素が *F. oxysporum* の病原性に直接的に関連しているかどうかは未だにはつきりしていない。

植物毒素には二次代謝化合物性毒素に加えて、タンパク質性毒素も存在する。植物病原菌は培養条件を変えることにより、植物毒素タンパク質を培地中へと分泌する (Ballance et al. 1989; Wevelsiep et al. 1991; Strelkov et al. 1999)。*F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli* は、Nep1 と呼ばれるタンパク質を培地中に分泌し、このタンパク質は *Erythroxyllum coca* の葉にネクロシスとエチレン生産を誘導する (Bailey 1995)。ダイズに sudden death syndrome を引き起こす *F. virguliforme* は培地中に数種のタンパク質性毒素を分泌するが、そのなかの FvTox1 タンパク質はダイズの実生に対して壊死を引き起こす (Jin et al. 1996; Li et al. 1999; Brar et al. 2011)。

ネギ萎凋病は、まず下葉から黄化しはじめ、葉の壊死、萎凋を経て最終的には枯死に至る。FOC は、土壌から根または盤茎部を介してネギ体内へ侵入し (児玉 1977)、盤茎組織内に褐変を引き起こす。盤茎組織内の褐変は本病害の最も特徴的な病徴である。このことから FOC の病原性因子はこの盤茎部に作用している可能性が高い。

ネギから分離した *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) をネギの盤茎部とともに液体培地中で培養すると、新たにタンパク質を分泌するようになり、それらの中にはネギ幼苗を萎凋させる作用を示す推定分子量 8 kDa の低分子タンパク質 (wilt-inducing protein 1: WIP1) が含まれている (佐々木ら 2011)。WIP1 を処理したネギの幼苗は、ネギ萎凋病の病徴に類似した応答を示す。すなわち、葉先から枯れはじめ、次第に葉が黄化し、

萎凋・枯死する。WIP1 は、ネギ以外の植物体に対しては萎凋誘導活性を有しておらず、宿主特異的毒素（HST）である可能性が示唆されている（鹿島 2009）。また、WIP1 はネギ盤茎部のブタノール抽出物およびいくつかの硫黄化合物によっても分泌が誘導されることがわかっている（佐々木ら 2011; 佐々木 2010）。しかしながら、WIP1 のアミノ酸配列およびその遺伝子は明らかとなっていない。そこで、本章ではこのネギに萎凋を誘導する WIP1 のアミノ酸配列を決定し、その遺伝子を同定した。

## II. 材料および方法

### 1. 分泌タンパク質の抽出

FOC#17 を PD 液体培地で 3 日間振とう培養 (25°C、120 rpm) し、菌体を孔径 0.8  $\mu\text{m}$  のフィルターで吸引濾過した。回収した菌体 2.0 g を誘導物質として 20 mM スファニル酸を含む MS 培地 (Murashige and Skoog 1962) 100 ml に加えて振とうした。24 時間後の培養液を孔径 0.8  $\mu\text{m}$  のフィルターで吸引濾過し、さらに孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで吸引濾過した。培養ろ液に 4 倍量の 100%アセトンを加え 20 分攪拌した。その後、 $-20^{\circ}\text{C}$ に一晩置き、10,000  $\times\text{g}$  で 10 分間遠心分離し、上清を捨てた。氷中で風乾させたペレットを 20 mM のリン酸バッファー (pH7.0) に溶解した。

### 2. タンパク質の濃度測定

タンパク質濃度は Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) また OD280 値によって測定した。Bio-Rad protein assay は添付のプロトコールに従って行った。スタンダードタンパク質には BSA を用いた。分光光度計 U2001 (日立) を用いて 595nm の吸光度を測定してスタンダードタンパク質の検量線を作成し、これをもとに目的タンパク質の濃度を求めた。

### 3. トリシン-SDS-PAGE

トリシン-SDS-PAGE は Schagger and Von Jagow (1987) の方法に従って行った。ガラスプレートはイソプロパノールで拭き、ゲル作製装置に設置した。まず分離ゲル溶液 (16.5% T、3% C) (10 ml のアクリルアミド溶液 (48% Acrylamide、1.5% Bisacrylamide)、10 ml のゲル緩衝液 (3 M Tris-HCl (pH8.45)、0.3% SDS)、4 g のグリセロールを混合し milliQ 水で 30 ml に fill up した後、アスピレーターで 30 分脱気し、150  $\mu\text{l}$  の 10% APS、15  $\mu\text{l}$  の TEMED を加えた) を作製し、ガラスプレートの 7 分目まで流し込んだ。次に、スパーサーゲル溶液 (10% T、3% C) (6.1 ml のアクリルアミド溶液、10 ml のゲル緩衝液、13.9 ml の milliQ 水を混合後、アスピレーターで 30 分脱気し、100  $\mu\text{l}$  の 10% APS、10  $\mu\text{l}$  の TEMED を加えた) を作製し、分離ゲルの上に約 2 cm 重層し、 $\text{dH}_2\text{O}$  を 1 cm 重層して 2 時間静置いた。最後に濃縮ゲル溶液 (4% T、3% C) (1 ml のアクリルアミド溶液 (3% C)、3.1 ml のゲル緩衝液、8.4 ml の milliQ 水を混合後、アスピレーターで 30 分脱気し、100  $\mu\text{l}$  の 10% APS、10  $\mu\text{l}$  の

TEMED を加えた) を作製し、スぺーサーゲルの上に重層して、気泡が生じないようにコームをさして一晩置いた。泳動バッファーは上槽に陰極側電極液 (100 mM Tris、100 mM Tricine、0.1% SDS、pH 8.2)、下槽に陽極側電極液 (200 mM Tris-HCl (pH 8.9)) をそれぞれ使用した。サンプルに 1/5 量のサンプルバッファー (40% Glycerol、50 mM Tris-HCl (pH6.8)、10% SDS、10% 2-mercaptoethanol、0.04% CBB G-250) を加え、100°C で 3 分間煮沸した後、3,500 xg で 5 分間遠心分離した。上清をゲルにアプライし、サンプルが濃縮ゲルに入るまで定電圧 30 V で約 1 時間泳動し、その後定電圧 100 V でゲルの下から 1 cm の所になるまで 7~8 時間泳動した。

#### 4. N 末端アミノ酸配列解析

トリシン-SDS-PAGE を行ったゲルを、ブロットイング溶液 (100 mM CAPS (pH 11) 150 ml、メタノール 150 ml、milliQ 水 1300 ml) を用いて、PVDF 膜 (ミリポア社) に定電圧 63 V で 2 時間転写した。ブロットイングした後 PVDF 膜を、ポンソー S 染色液 (0.1% ポンソー S、2% 酢酸) で 5 分間染色した後、脱色液 (1% 酢酸) でバンドが確認できるようになるまで脱色した。そして milliQ 水で洗浄し、風乾した。目的のバンドをエタノールで洗浄したカッターで切りとり、チューブに回収した。以上の作業を数回繰り返したバンドをプロテインシーケンサー PPSQ-21A (島津製作所) を用いて N 末端アミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列について、BLAST を用いて相同性の高いタンパク質を検索した。

#### 5. LC-MS/MS 解析

LC-MS/MS 解析を行うためにトリシン SDS-PAGE でタンパク質を分離し、CBB でゲルを染色した後、タンパク質バンドを清潔なナイフで切り出した。LC-MS/MS 解析は genomine に委託して行った。得られたイオンスペクトルは Mascot データベースにて検索を行い、タンパク質を同定した。

#### 6. WIP1 の cDNA 配列の決定

WIP1 遺伝子の全長 cDNA 配列の決定には、5'/3' RACE Kit (Roche) を用いて 5'RACE および 3'RACE 法を行った。プライマーは hypothetical protein FOXB\_07839 (GenBank Accession No. EGU81642) の塩基配列をもとにを設計した (Table 8)。



### 6-1.cDNA 合成

RNA はスルファニル酸を含む MS 培地で 24 時間培養した菌体から前述した方法で抽出した。この RNA をもとに cDNA 合成を行った。反応溶液は 4  $\mu$ l の cDNA synthesis buffer、2  $\mu$ l の dNTP mixture、1  $\mu$ l の oligo dT-anchor primer、0.2  $\mu$ g の RNA、1  $\mu$ l Transcriptor Reverse transcriptase に dH<sub>2</sub>O を加え 20  $\mu$ l とした。55°C で 60 分間インキュベートした後、85°C で 5 分間インキュベートし逆転写酵素を失活させた。この cDNA 合成産物を MonoFas DNA 精製キット I を用いて精製した。

### 6-2. 5' RACE

cDNA 精製産物の 3'末端に poly (A) -tail を付加するために、19  $\mu$ l の cDNA 精製産物、2.5  $\mu$ l の Reaction buffer、2.5  $\mu$ l の dATP (2 mM) を混合し、94°C、3 分間インキュベートし、氷中に置いた。1  $\mu$ l の Terminal Transferase (80 U/  $\mu$ l) を加え、37°C で分間インキュベートした後、70°C で 10 分間インキュベートし、Terminal Transferase を失活させた。この dA-tailed cDNA をテンプレートとして PCR を行った。反応溶液は 2.5  $\mu$ l の dA-tailed cDNA、0.5  $\mu$ l の PCR anchor primer (12.5  $\mu$ M)、0.5  $\mu$ l の P8 5'-1 (12.5  $\mu$ M)、0.5  $\mu$ l の dNTP mixture、0.25  $\mu$ l の Taq、18.25  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O を混合した。反応条件は 94°C 2 分の後に、94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 40 秒を 10 サイクル行い、さらに 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 40 秒+1 サイクルごとに 20 秒追加を 25 サイクル行った。次にこの PCR 産物をテンプレートとして、PCR anchor primer と P8 5'-2 プライマーを用いて、nestedPCR をおこなった。得られた PCR 産物は 1.2%アガロースゲルで電気泳動を行い、バンドをゲルから切り出し、MonoFas DNA 精製キット I を用いて精製した。精製した断片は pGen T-easy vector に TA クローニングし、シークエンシングを行った。

### 6-3. 3'RACE

3'RACE は cDNA 精製産物をテンプレートとして、PCR anchor primer と P8-1F プライマーを用いて PCR を行った。次にこの PCR 産物をテンプレートとして、PCR anchor primer と P8-2F プライマーを用いて、nestedPCR をおこなった。得られた PCR 産物は 1.2%アガロースゲルで電気泳動を行い、バンドをゲルから切り出し、MonoFas DNA 精製キット I を用いて精製した。精製した断片は pGen T-easy vector に TA クローニングし、シークエンシングを行った。

## 7. 組み換えタンパク質の作製

### 7-1. 組換え WIP1 発現株の作製

組換え WIP1 発現ベクター構築のために、成熟 WIP1 の N 末端から終止コドンを増幅するためのプライマー DEF-exp-F/DEF-exp-R を設計した (Table 8)。DEF-exp-F にはエンテロキナーゼ認識配列を付加した。さらに DEF-exp-F の 5'末端には *EcoRI* 切断配列を、DEF-exp-R の 5'末端には *KpnI* 切断配列を付加した。FOC の AF17 株のゲノミック DNA をテンプレートとして QuickTaq を使用して PCR を行った。得られた PCR 産物を MonoFas DNA 精製キット I を用いて精製した。この PCR 産物およびタンパク質発現用ベクター pET30a (+) (Novagen) をそれぞれ制限酵素 *KpnI* を用いて、37°C、2 時間処理し MonoFas DNA 精製キット I を用いて精製した後、さらに制限酵素 *EcoRI* で 37°C、2 時間処理した。制限酵素処理をした PCR 産物およびベクターは電気泳動をし、MonoFas DNA 精製キット I を用いてゲルから抽出した。ライゲーション反応を行い、*E. coli* JM109 株にクローニングした。インサート DNA が正しくベクターに連結されているかを確かめるために、コロニー PCR、シーケンシングを行った。インサートが正しく連結されているコロニーから Plasmid isolation kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、SHuffle T7 Express competent *E. coli* (NEB) へ形質転換した。

### 7-2. 組換え WIP1 の発現誘導

組換え WIP1 の発現を誘導するために形質転換体を 5 ml の 30 µg/ml のカナマイシンを含む LB または Terrific Broth (TB) 培地で 30°C、150 rpm で一晩振とう培養した。この培養液を 30 µg/ml のカナマイシンを含む新たな 100 ml の LB または TB 培地に移し、OD 値が 0.6 になるまで 30°C、150 rpm で培養した。OD 値が 0.6 に達したら、IPTG を最終濃度 1 mM になるように添加し、さらに培養した。IPTG を添加してから 4、8、24 時間後に培養液を 25 µl 回収し、トリシン-SDS-PAGE によってタンパク質発現の確認を行った。

### 7-3. ニッケルカラムによる組み換え WIP1 の精製

IPTG を添加してから 4 時間培養した培養液を 16,000 xg で 10 分間遠心し分離した。細胞ペレット 1 g を 20 ml の xTractor buffer (Clontech) に懸濁し、氷中で 15 分間インキュベートして細胞を溶解させた。10,000 xg で 20 分間遠心し、上清を回収しタンパク質溶液とした。このタンパク質溶液 20 ml を 2 ml の HIGH density NICKEL

resin (ABT) と混合し、ローテーターで混和しながら 4°C 下で 1 時間インキュベートした。この溶液を PD-10 empty カラム (GE Healthcare) に移し、フロースルーを回収した。20 ml の洗浄バッファー (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300 mM NaCl、20 mM imidazole、pH 8.0) でカラムを洗浄する操作を 3 回行った。そして、2 ml の溶出バッファー (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300 mM NaCl、500 mM imidazole、pH 8.0) でレジンに結合したタンパク質を溶出した。溶出は 4 回行った。溶出したタンパク質溶液は限外ろ過カラム VivaSpin2 (Sartorius) を用いて脱塩を行った。組換え WIP1 タンパク質の 6x ヒスチジンタグを除去するために、Recombinant Enterokinase kits (Novagen) を使用した。タンパク質 10 µg あたり 0.1 U のエンテロキナーゼを加え、20°C で 16 時間インキュベートした。トリシン SDS-PAGE によってタグが切断されたことを確認した後、rEK Capture (Novagen) を用いてエンテロキナーゼを除去した。

## 8. バイオアッセイ

バイオアッセイにはネギ品種 ‘NSS 葱 14 号’ を使用して行った。種子は 0.5% NaClO で 10 分間表面消毒を行い、培土 (川砂と育苗培土 (タキイ種苗) を 4:1 で混合したもの) に播種した。植物体は人工気象器内 (25°C、16 時間明期/8 時間暗期) で 1 週間生育させた。幼苗をポットから抜き取り、根をタンパク質溶液 (20 µg/ml) を含む 2 ml チューブに浸漬し、観察した。

## 9. WIP1 の植物体内での遺伝子発現

ネギ感染時における WIP1 遺伝子発現を調べるために RT-PCR を行った。ネギ品種 ‘NSS 葱 14 号’ の幼苗に対して第 2 章で述べた方法で接種し、接種 0、4、および 8 日後に根を回収した。RNA 抽出はセパゾール RNA I Super を使用し、前述の方法で行った。RT-PCR は PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Takara) を使用し、前述の方法で行った。プライマーは P8-1F/P8-1R を用いて行った。

**Table 8** Primer sequence used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
P8 5'-1	TTGCCGCAGTGGTGAAGGATG
P8 5'-2	CTGTGCCCATGGCGAGAAGAG
P8-1F	TGCTTCTCAACAAGGCTTTCCTC
P8-2F	CTGCGGCAAGCACGCTTCTTG
P8-1R	CTTCTCAATGTGGTGCCACTTC
DEF-exp-F	CCGGTACCGACGACGACGACAAGAGCATCCTTCACCAC
DEF-exp-R	CCGGAATTCGCCTATTATTTCTTGCACTTCTTCTC

### III. 結果

#### 1. WIP1 の N 末端アミノ酸配列解析

FOC をスルファニル酸添加培地で 24 時間培養し、その培養ろ液から抽出した分泌タンパク質をトリシン SDS-PAGE で泳動した (Fig. 28)。分子量約 8 kDa のタンパク質 (WIP1) を切り出し、N 末端アミノ酸解析を行ったところ、‘H2N-Ser-Ile-Leu-His-His-Thr-Gly-Lys-\*Ala-OH’ (\*:検出不可)となった。BlastP においてこのアミノ酸配列の相同性検索を行ったが、相同性の高いタンパク質は見当たらなかった。さらに、このアミノ酸配列をもとに縮重プライマーを設計し、PCR を行ったが WIP1 をコードするような塩基配列は得られなかった。

#### 2. LC-MS/MS 解析

N 末端アミノ酸解析では WIP1 をコードする塩基配列を決定できなかったため、さらなる情報を得るために LC-MS/MS 解析を試みた。その結果、2 つのイオンスペクトルが *F. oxysporum* Fo5176 株の hypothetical protein FOXB\_07839 (GenBank Accession No. EGU81642) と一致した (Fig. 29、太字)。さらに、この推定タンパク質は N 末端アミノ酸配列解析で決定したアミノ酸配列も含んでいた (Fig. 29、下線部)。

#### 3. WIP1 塩基配列の決定

hypothetical protein FOXB\_07839 の塩基配列をもとにプライマーを設計し、WIP1 遺伝子の全長 cDNA 配列を 5'RACE および 3'RACE 法を用いて決定した。WIP1 の全長 cDNA 配列は 642 bp であった (Fig. 29)。またゲノミック DNA を用いて PCR を行いイントロンは含んでいないことがわかった。この cDNA 配列から推定される WIP1 タンパク質の全長は 85 アミノ酸長であった。SignalP4.1 (Petersen et al. 2011) によって予想されるシグナル配列は 19 アミノ酸であり、66 アミノ酸長のタンパク質となる (Fig. 29、矢印)。しかしながら、プロテインシーケンサーによって決定した N 末端はそれよりも 14 アミノ酸下流に位置しており、結果的に WIP1 は 52 アミノ酸長の成熟タンパク質になることが示唆された。この 52 アミノ酸長の成熟 WIP1 は 6 つのシステイン残基を含んでおり、3 つのジスルフィド結合を有していると予想される。さらに成熟 WIP1 は非常に多くの塩基性アミノ酸を含んでおり (9 つのヒスチジン残基と 13 のリジン残基)、推定等電点 pI=9.39 の塩基性タンパク質であった。

WIP1 アミノ酸配列を Blast において検索した結果、*F. oxysporum* 種内で非常に高度に保存されており、さらに *F. verticillioides* の hypothetical protein (GenBank Accession No. EWG53961)) と 100%の相同性があった。加えて、*F. tricinctum* の defensin-like タンパク質である Trtesin (GenBank Accession No. AGS58421) とアミノ酸レベルで 77%の相同性があった。しかしながら、*Fusarium* 属のタンパク質以外に WIP1 と相同性のあるタンパク質はなかった。また、*F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli* が生産する necrosis-inducing protein (Nep1) との相同性もなかった。

#### 4. 組換え WIP1 発現株の作製および発現誘導

成熟 WIP1 (52 アミノ酸) をコードする cDNA 配列の N 末端に 6x ヒスチジンタグを付加するようにタンパク質発現ベクター pET30a(+)へ挿入した。さらにタグを切断できるように、成熟 WIP1 とタグの間にはエンテロキナーゼ認識配列を挿入した。このプラスミドを細胞質内でジスルフィド結合を持つタンパク質を生産できる *E. coli* SHuffle T7 株に形質転換した。形質転換体の組換え WIP1 発現を確認するために、LB 培地および TB 培地で培養し、IPTG によって誘導した。LB 培地で培養した場合、IPTG 添加 4、8、24 時間後にいずれにおいても組換え WIP1 の発現は確認できなかった (Fig. 30A)。しかし、TB 培地で培養した場合には、IPTG 添加 4、8、24 時間後にいずれにおいても組換え WIP1 の発現は確認でき、特に IPTG 添加 4 時間後に最も多くのタンパク質を生産していた (Fig. 30B)。

#### 5. 組換え WIP1 タンパク質の精製

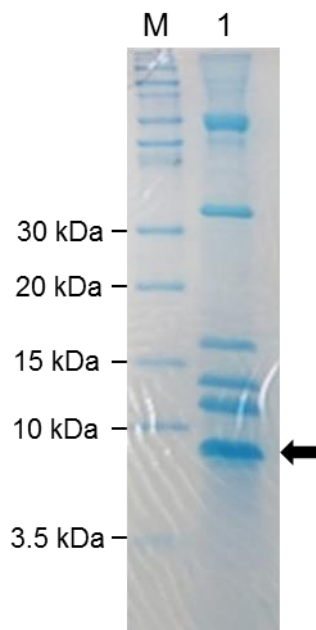
組換え WIP1 発現株は TB 培地内で培養し、IPTG 添加 4 時間後に回収した。抽出した細胞内タンパク質は 6x ヒスチジンタグと結合するニッケルレジンカラムで精製した。カラムに結合したタンパク質は 500 mM イミダゾールで溶出し、トリシン-SDS-PAGE によって確認した。その結果、溶出画分には組換え WIP1 の分子量に相当する 14 kDa のタンパク質のみが存在していた (Fig. 31)。組換え WIP1 から 6x ヒスチジンタグを除去するためにエンテロキナーゼ処理を行い、トリシン-SDS-PAGE によって泳動した。分子量 8 kDa のタンパク質バンドを確認でき、組換え WIP1 を作製できたことを確認した (Fig. 32)。

## 6. 組換え WIP1 の萎凋誘導活性

精製した組み換え WIP1 タンパク質溶液をネギの幼苗に処理した。処理 7 日後、WIP1 を処理したネギは葉先が枯れ、組換え WIP1 が萎凋誘導活性を有することを確認した (Fig. 33)。

## 7. *In planta* での WIP1 の発現

FOC が WIP1 をネギへの感染時に発現しているかどうかを調べるために、ネギの幼苗に FOC を感染させ、感染 4 日後および 8 日後に植物体を回収し RNA を抽出した。その結果、WIP1 はネギの根で感染初期から発現していることを確認した (Fig. 34)



**Fig. 28** Tricine-sodium dodecyl sulfate acrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE) of secreted protein of FOC grown on MS medium containing 20mM Sulfanilic acid. Arrow indicates WIP1 band.

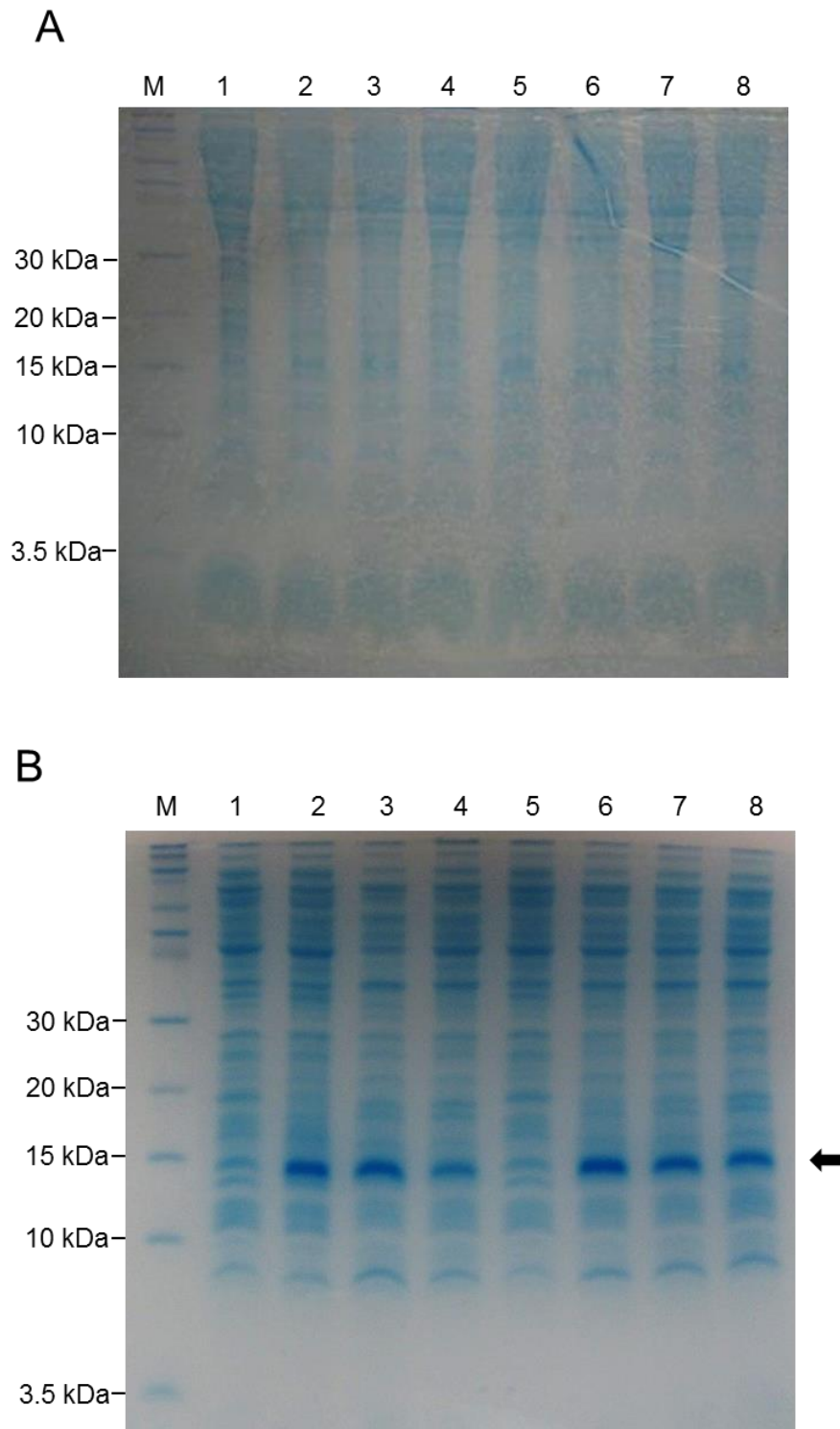


```

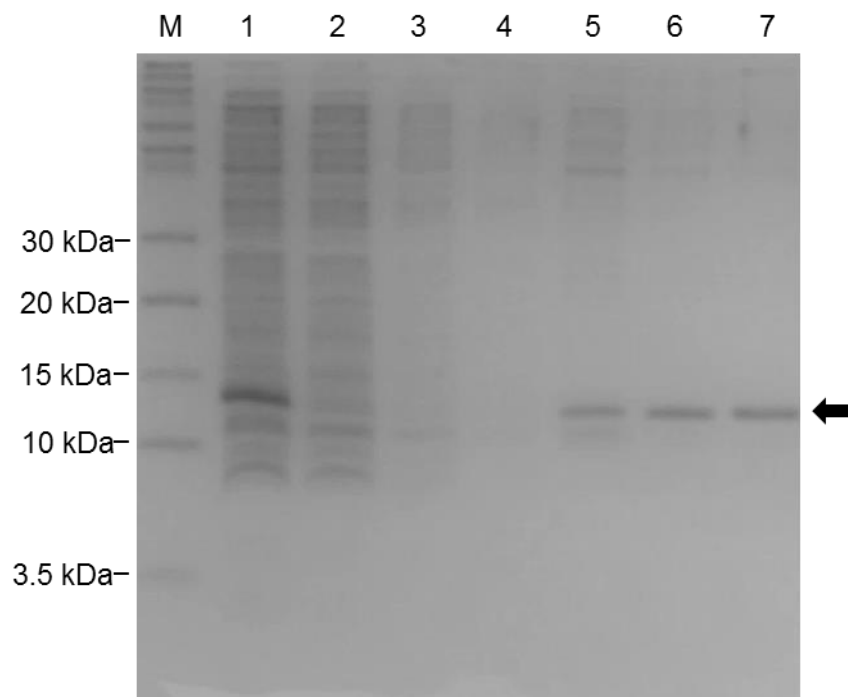
cacaacaccactctctcatctttcctttcaacataaactaattacaacctctcaactacc 60
aactcaaaccctcatcatgcttctcaacaaggctttcctcggcgctcttctcgccatggg 120
      ↓   M L L N K A F L G A L L A M G 15
cacagtcaccgacctcccccaaccccgacgctgagcccgctgatctcgaggatcgcagcat 180
  T V T A L P N P D A E P A D L E D R S I 35
ccttcaccactgctggcaagcacgcttcttgggatcacgccaagagcgagtgcgtgtgcca 240
L H H C G K H A S W D H A K S E C V C H 55
cgactccggcaagggtctacaccaagaagcaccacaagtgcaagtgcccccaagggcgagaa 300
  D S G K V Y T K K H H K C C P K G E K 75
gtggcaccacattgagaagaagtgcaagaataaaccgctgcactagacatccctttgaa 360
W H H I E K K C C K K * 85
cgatcacaacaaggccgctcgctcgacattcaccacaaagccttcatatatactcgcc 420
Gaaactatatcgatgggctgacaactggatcattggctttaaggattggcgatgcgccat 480
gGttggcagaaggatccttgaaagggcattatcttatgtaacttttagtgtttatgtatcg 540
tGtcaagaaacatatgccttaaatacaaggctgattgagcttctgcgtcttatttctttat 600
ttgctttgtcttcaggctgaatagcaattatttctcatcctc 642

```

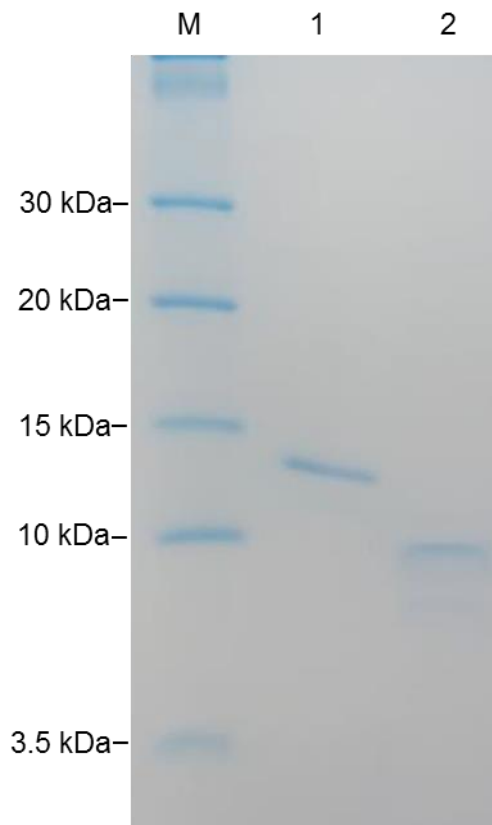
**Fig. 29** Nucleotide and Amino acid sequences of WIP1. The N-terminal amino acid sequences of mature protein (52 aa in length) determined by the protein sequencer are underlined. The cysteine residues are marked with asterisks (\*). Two mass-spectra matched sequences are indicated in bold. The signal peptide cleavage site predicted by SignalP is shown as an arrow.



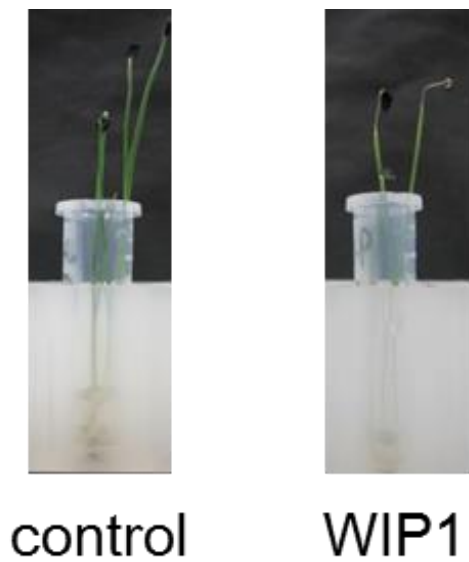
**Fig. 30** Tricine-sodium dodecyl sulfate acrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE) of lysate of *E. coli* cultured in LB medium (A), and TB medium (B). Arrow indicates the recombinant WIP1. Lane 1,5: 0 h, 2,6: 4 h, 3,7: 8 h, 4,8: 4 h after adding IPTG.



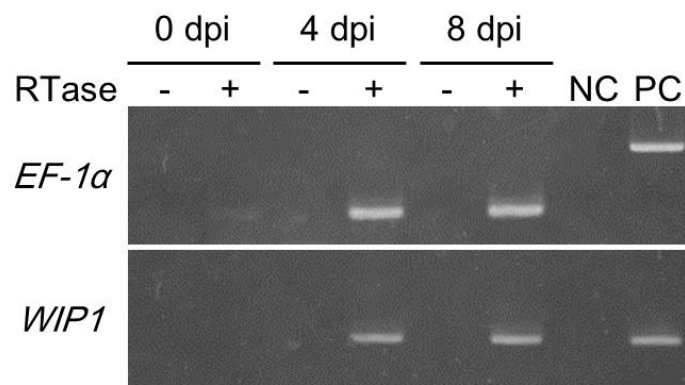
**Fig. 31** Tricine-sodium dodecyl sulfate acrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE) of purified lysate of *E. coli* using nickel column. Total proteins were extracted from *E. coli* strain grown on TB medium for 4 h after adding IPTG. Arrow indicates the recombinant WIP1. M: molecular size marker. 1: Total extract, 2: Flow-through, 3,4: wash fraction, 5,6,7: elution fraction.



**Fig. 32** Tricine-sodium dodecyl sulfate acrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE) of recombinant WIP1 produced by *E. coli*. The recombinant WIP1 fused N-terminal 6 x histidine tag were purified by nickel column (lane 1) and enterokinase-digested WIP1 (lane 2).



**Fig. 33** Wilt-inducing activity of purified recombinant WIP1 (right) and control Welsh onion seedlings (left).



**Fig. 34** Expression of *WIP1* in FOC-infected Welsh onion roots. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of *WIP1* and *EF-1α* using RNA isolated from roots at 0, 4, and 8 days post inoculation (dpi). Water was used as a negative control (NC) while genomic DNA of AF17 isolate was used as positive control (PC).

#### IV. 考察

本章では FOC が分泌する萎凋誘導性タンパク質 WIP1 を同定した。このタンパク質はシステインリッチな低分子塩基性タンパク質であった。WIP1 ホモログは *Fusarium* 属内にのみ存在しており、他の植物病原菌には明確なホモログは存在していなかった。成熟 WIP1 は植物内生菌である *F. tricinctum* が生産するディフェンシン様タンパク質である Trtesin と 77% の相同性があった。Trtesin は *Staphylococcus carnosus*、*Candida albicans*、*C. utilis*、および *F. oxysporum* に対して抗菌活性を有する (Tejesvi et al. 2013)。ディフェンシンまたはディフェンシン様タンパク質は低分子 (2~6 kDa)、塩基性、システインリッチ (6-8 残基) な抗菌性ペプチドファミリーであり、真核生物に広く保存されている (Silva et al. 2014)。植物においてディフェンシンは植物病原菌への防御応答に関与するタンパク質として機能する。真菌においては plectasin、eurocin、micasin などのディフェンシン様タンパク質を生産することが知られている (Mygind et al. 2005; Oeemig et al. 2012; Zhu et al. 2012)。しかしながら、真菌のディフェンシン様タンパク質が植物に対して生理活性を有するという報告はない。興味深いことに、いくつかの植物が生産するディフェンシンが植物毒性を有することが報告されている。例えば、*Nicotiana glauca* のディフェンシン NaD1 を C 末端プロペプチドドメインを欠損させた状態でワタ植物体で異種発現させた場合、NaD1 は植物毒性を持つことが報告されている (Lay et al. 2014)。また、植物ディフェンシン MsDef1、MtDef2、および RsAFP2 をシロイヌナズナに処理にすると、根の生育を阻害する (Allen et al. 2008)。これらの結果および本章での結果は、ディフェンシン構造を有するタンパク質が植物毒素活性を有することを示唆している。

SignalP 解析から、WIP1 タンパク質はシグナルペプチドが切断された後に 66 アミノ酸長のタンパク質として分泌されることが推定される。しかしながら、N 末端アミノ酸配列解析の結果から、培地中に分泌される成熟タンパク質は 52 アミノ酸長であることが推定され、分泌後にさらなるプロセッシングを受けていると思われる。植物病原菌によって分泌されるいくつかの病原性タンパク質は、N 末端シグナル配列が除去された後に、さらなるプロセッシングを受けることがわかっている (van den Ackerveken et al. 1993a, 1993b; Joosten et al. 1994; Rep et al. 2004.)。Tuori ら (2000) は、*Pyrenophora tritici-repentis* の宿主特異的毒素タンパク質である Ptr ToxA の N 末端プロドメインは成熟タンパク質の正確なフォールディングに重要であり、さらにジスルフィド結合が完

全な活性に必要であると報告している。

FOC はネギの盤茎部または硫黄化合物と共に培養することで萎凋を誘導するタンパク質 *WIP1* を分泌する (佐々木ら 2011)。また、本研究で述べたように、*WIP1* 遺伝子は宿主感染時に発現している。*Allium* 属植物には、*S*-Alk(en)yl cysteine sulfoxide と呼ばれる硫黄化合物が豊富に含まれていることから (Rose et al. 2005)、FOC はネギへの感染過程で根や盤茎部の硫黄化合物に応答してタンパク質を分泌している可能性がある。しかしながら、本研究では *WIP1* を誘導する化合物の同定には至っておらず、今後 *WIP1* の誘導機構について詳細な解析が望まれる。さらに、*WIP1* がどのようにして宿主細胞内に取り込まれ、どのようにして萎凋を誘導するかというメカニズムについても不明のままである。植物ディフェンシンである NaD1 は、陽イオントランスポーターである Agp2p を介して細胞内に取り込まれる (Bleackley et al. 2014)。コムギの HST である Ptr ToxA は感受性コムギ品種において、葉緑体タンパク質である ToxABP または PR1-5 と相互作用することでネクロシスを誘導することが示唆されている (Manning et al. 2007; Lu et al. 2014)。今後、*WIP1* の細胞内取り込み萎凋や誘導メカニズムを明らかにするためには、*WIP1* と相互作用する宿主タンパク質の単離・同定など、細胞レベルでの解析が必要である。そのためにはネギの培養細胞を用いた実験系の確立が望まれる。

葉部を可食部とするネギにおいて、葉先の枯れや黄化は商品価値を著しく損なう。しかしながら、葉先の枯れや黄化のメカニズムはほとんどあきらかになっていない。本研究で示したように、*WIP1* を処理したネギの幼苗は、まず葉先が枯れ、次第に葉が黄化する。*WIP1* の作用メカニズムを明らかとすることによって、ネギの葉先の枯れや黄化を防ぐ方法が見つかるかもしれない。



## 第5章 総合考察

児玉 (1983) は、北海道で発生したタマネギ乾腐病およびネギ萎凋病の原因菌を分離し、両病害の原因菌が同一の分化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) によって引き起こされることを初めて報告した。その後、Dissanayake ら (2009b) は、日本各地の圃場の萎凋したネギから分離した FOC について IGS 領域の塩基配列に基づいて系統関係を調べ、日本国内には遺伝的に多様な FOC が存在していることを明らかにした。しかしながら、これまでタマネギ乾腐病菌 (タマネギ分離 FOC) とネギ萎凋病菌 (ネギ分離 FOC) の両方を用いて、分子遺伝学手法によって類縁関係を解析した研究は行われていなかった。また、タマネギ乾腐病あるいはネギ萎凋病罹病個体から分離した FOC について、エフェクターやタンパク質毒素などの病原性関連因子を調査した研究は世界的にみても前例がない。そこで、本研究では、まずタマネギおよびネギから分離した FOC の遺伝的多様性を調べるとともに (第2章)、FOC のエフェクターやタンパク質毒素などの病原性関連因子を明らかにするために、FOL のエフェクターをコードしている *SIX* 遺伝子のホモログ (第3章)、およびネギに萎凋を引き起こすタンパク質性毒素 (第4章) について解析を行った。

第2章において、タマネギおよびネギから分離した FOC を用いて IGS および *EF-1 $\alpha$*  遺伝子領域を用いた系統樹を作成したところ、タマネギ分離 FOC とネギ分離 FOC は異なるクレードに属し、遺伝系統が異なることがわかった。タマネギ分離 FOC の大部分は1つのクレードに属し、遺伝的に単系統であったのに対し、ネギ分離 FOC は高度な遺伝的多様性を有していた。また、VCG、IR-SCAR マーカーおよび *Mathing type* の解析結果も、タマネギ分離 FOC とネギ分離 FOC は遺伝的に異なるという結果を支持した。さらに、タマネギ分離 FOC は *SIX3*、*SIX5*、および *SIX7* ホモログを有しており、それらの株はネギ分離 FOC と比較してタマネギ幼苗に対して高い病原性を示した。これらの結果は、タマネギ分離 FOC がネギ分離 FOC と遺伝的に大きく異なることを強く支持するとともに、*SIX* ホモログがタマネギに対する病原性に関わっていることが示唆された。

第3章において、タマネギ分離 FOC の *SIX* ホモログの塩基配列を決定し、それらの病原性との関連性を調べた。FOC の *SIX* ホモログは FOL の *SIX* とはアミノ酸レベルで大きく異なっていた。さらに *FocSIX3*、*FocSIX5*、および *FocSIX7* はすべてトランスポゾン豊富に含んでいる同一の約 4 Mb の染色体に座乗することが示された。

FOL4287 株においても、*SIX* 遺伝子のほとんどは同一の小型染色体上に座乗し、トランスポゾン豊富に含んでいる。さらに、この小型染色体は容易に水平移動し、導入された非病原性 *F. oxysporum* はトマトに対する病原性を有する (Ma et al. 2010)。また、アラビドプシス病原性 Fo5176 株と *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* は *SIX4* ホモログを保持しているが、それらの塩基配列は *FolSIX4* と 99% 以上の相同性を示す (Thatcher et al. 2012)。この高い相同性は、近年 *SIX4* 遺伝子を horizontal gene transfer (HGT) または horizontal chromosomal transfer (HCT) によって獲得したことを強く示唆している。しかしながら、本研究において明らかにしたように、FOC の 3 つの *SIX* ホモログはいずれも FOL に対する相同性があまり高くなく、*FocSIX3-FocSIX5* 領域も FOL とは大きく異なっていた。これらの結果は、FOC においては近年 HCT または HGT によってこの領域を獲得したのではないことを示唆している。ではいつどのように FOC または FOL は *SIX* を獲得したのであろうか。以下の 2 つが考えられる；1) FOL から FOC へ（もしくは FOC から FOL へ）過去に水平移動し、その後タマネギ（もしくはトマト）に適応した独自の進化をしてきた；2) *SIX* 遺伝子をもつ共通の祖先がありタマネギ、トマトに感染するためにそれぞれ進化をしてきた。興味深いことに、IGS 領域を用いた系統解析によって、一部のタマネギ分離 FOC は FOL に非常に近縁であることが明らかになった。今後、FOC と FOL の全ゲノム塩基配列の比較や、FOC と FOL の共培養による HGT または HCT の確認を行うことによって、両分化型の進化関係や宿主へ適応機構に関する知見が得られるかもしれない。また、*F. oxysporum* の特徴である宿主特異性を解明する手がかりになることが期待される。

第 3 章ではまた、*FocSIX3* が病原性遺伝子であることを明らかにした。FOL において *SIX3* 遺伝子はトマトの *I-2* 遺伝子に認識される非病原性遺伝子であるとともに、感受性品種に対しては病原性遺伝子として働くことがわかっている。しかし、どのようなメカニズムで病原性に寄与するかは明らかになっていない。今後、この点について解明が望まれる。また、*FocSIX3* に隣接する *FocSIX5* 遺伝子については、病原性に関係していないことがわかったが、感染時に発現していたことから感染過程において何らかの機能を有していることが予想される。この点についても今後詳細な解析を行う必要がある。

さらに第 3 章では、FOC と FOL の *SIX3* 遺伝子の塩基多型を基にしたタマネギ分離 FOC の特異的検出法を確立した。*SIX3* 遺伝子は、FOL 以外の分化型では同定されていないことから、この検出法はタマネギ分離 FOC を同定する有益な方法となること

が期待される。さらにこの技術はタマネギの組織内の FOC の定量を可能にした。この定量法を用いて FOC 汚染圃場で生育したタマネギ組織内の FOC を定量した結果、乾腐病抵抗性品種よりも感受性品種の根に多くの FOC が感染していることが明らかになった。この結果は、FOC の根組織内感染個体数がタマネギ乾腐病抵抗性品種の選抜において一つの指標となりうることを示唆しており、今後この点について詳細な検証が望まれる。また、本研究では土壌サンプルを用いた FOC 検出・定量は試みなかったが、タマネギ乾腐病は連作による圃場の菌密度の増加が主な原因の一つとなっていることから、圃場土壌中のタマネギ FOC の定量に応用可能かどうか今後検討するべきである。

第 4 章において、ネギ分離 FOC の萎凋誘導性タンパク質である WIP1 を同定した。このタンパク質はシステインを多き含む塩基性低分子タンパク質であった。WIP1 ホモログは *Fusarium* 属菌で広く保存されているが、これまでその機能は分かっていなかった。現在様々な植物病原菌でそのゲノム配列が明らかとなっているが、その配列データから遺伝子およびタンパク質の機能および構造を推定することは困難な場合がある。それゆえ、タンパク質から病原性因子を明らかにするというアプローチは、ポストゲノムにおいて有益な情報をもたらすことが期待されている。実際、本研究においても成熟 WIP1 は推定シグナル配列部位よりさらに下流で切断され、機能的なタンパク質になることが示唆された。

WIP1 は、短い日数でネギ幼苗に萎凋を誘導する。このため、ネギ萎凋病抵抗性品種の育種において、WIP1 を用いればネギ萎凋病抵抗性系統の迅速スクリーニングが可能になるかもしれない。このような手法は、すでに *P. nodorum* の宿主特異的毒素である Tox1 は抵抗性コムギ品種選抜のための簡易検定に用いられている (Vleeshouwers and Oliver 2014)。

今回同定したエフェクター候補タンパク質である *FocSIX3*、*FocSIX5*、*FocSIX7*、および *WIP1* はいずれも低分子でシステインを多く含むタンパク質であった。エフェクタータンパク質の多くはシステインを多く含んでおり、それらがジスルフィド結合をすることによって 3 次構造を形成している (Rep et al. 2005)。特定のモチーフが見られないエフェクタータンパク質においては、3 次構造が生物活性に重要な働きをしていることが示唆される。

次世代ゲノムシーケンサーの普及に伴い、多くの植物病原菌においてそのドラフトゲノムが解析され、多くのエフェクター候補遺伝子が同定され始めている。今後、タマネギ分離 FOC およびネギ分離 FOC においてドラフトゲノム解析を行い、上記のよう

な特徴をもつタンパク質を検索すれば、さらなるエフェクター候補遺伝子および病原性関連遺伝子の同定が可能になることが予想される。また、ドラフトゲノム解析によって、タマネギ、ネギそれぞれに対する FOC の病原性関連遺伝子や病原性染色体に関する新たな情報が得られることも期待される。さらに、ドラフトゲノム解析と共に遺伝子破壊解析やプロテオーム解析を複合的に行うことで、FOC の病原性発現機構に関する理解が急速に進むものと思われる。

## 謝辞

本研究を遂行しまとめるにあたり、終始暖かい御指導と御支援を賜りました山口大学農学部 伊藤真一教授に心より感謝の意を表します。また本研究を遂行するにあたり、御指導と御鞭撻を賜りました山口大学農学部 田中秀平教授、ならびに鳥取大学農学部 児玉基一郎教授に厚く御礼申し上げます。さらに、論文作成に際して有益なご助言を頂いた山口大学農学部 執行正義教授、ならびに島根大学生物資源科学部 上野誠准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を達成するにあたり、罹病植物材料を御提供頂いたタキイ種苗株式会社 須江淳起氏、同社 吉田拓司氏、株式会社日産種苗 舟橋正隆氏に感謝致します。また、本研究を行うにあたり、協力と助言を頂いた鹿島瑠美氏、中原勝也氏、ならびに分子植物病理学研究室諸氏に感謝致します。

## 引用文献

- Abd-Elsalam KA, Asran-Amal A, Schnieder F, Migheli Q, Verreet JA (2006) Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton roots by PCR and real-time PCR assay. *J Plant Dis Protect* 113:14
- Akagi Y, Taga, M, Yamamoto M, Tsuge T, Fukumasa-Nakai Y, Otani H, Kodama M (2009) 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
- Allen A, Snyder AK, Preuss M, Nielsen EE, Shah DM, Smith TJ (2008) Plant defensins and virally encoded fungal toxin KP4 inhibit plant root growth. *Planta* 227:331-339
- Alves-Santos FM, Benito EP, Eslava AP, Díaz-Mínguez J (1999) Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl Environ Microbiol* 65:3335-3340
- Alves-Santos FM, Ramos B, García-Sánchez MA, Eslava AP, Díaz-Mínguez JM (2002) A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* 92:237-244
- Arie T, Kaneko I, Yoshida T, Noguchi M, Nomura Y, Yamaguchi I (2000) Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1330-1339
- Armstrong GM, Armstrong JK (1981) Formae speciales and race of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ (eds) *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park, pp 391-399
- Bacon CW, Porter JK, Norred WP, Leslie JF (1996) Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 62:4039-4043
- Bailey BA (1995) Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* 85:1250-1255
- Ballance GM, Lamari L, Bernier CC (1989) Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 35:203-213

- Bayraktar H, Türkkan M, Dolar FS (2010) Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from onion in Turkey based on vegetative compatibility and rDNA RFLP analysis. *J Phytopathol* 158:691-697
- Berestetskiy AO (2008) A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. *Appl Biochem Microbiol* 44:453-465
- Bleackley MR, Wiltshire JL, Perrine-Walker F, Vasa S, Burns RL, van der Weerden NL, Anderson MA (2014) Agp2p, the Plasma Membrane Transregulator of Polyamine Uptake, Regulates the Antifungal Activities of the Plant Defensin NaD1 and Other Cationic Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2688-2698
- Brar HK, Swaminathan S, Bhattacharyya MK (2011) The *Fusarium virguliforme* toxin FvTox1 causes foliar sudden death syndrome-like symptoms in soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 24:1179-1188
- Catlett NL, Lee BN, Yoder OC, Turgeon BG (2003) Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genet Newsl* 50:9-11
- Chakrabarti A, Rep M, Wang B, Ashton A, Dodds P, Ellis J (2011) Variation in potential effector genes distinguishing Australian and non-Australian isolates of the cotton wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Plant Pathol* 60:232-243
- Correll JC, Klittich CJR, Leslie JF (1987) Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77: 1640–1646
- Cramer CS (2000) Breeding and genetics of *Fusarium* basal rot resistance in onion. *Euphytica* 115:159-166
- Dan H, Ali-Khan ST, Robb J (2001) Use of quantitative PCR diagnostics to identify tolerance and resistance to *Verticillium dahliae* in potato. *Plant Dis* 85:700-705
- de Vega-Bartol JJ, Martín-Dominguez R, Ramos B, García-Sánchez MA, Díaz-Mínguez JM (2011) New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: the expression of the gene coding for the transcription factor *ftf1* correlates with virulence. *Phytopathology* 101:470-479
- Dissanayake MLMC, Kashima R, Tanaka S, Ito S (2009a) Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* isolated from wilted Welsh onion in Japan. *J Gen Plant Pathol* 75:125-130

- Dissanayake MLMC, Kashima R, Tanaka S, Ito S (2009b) Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. *J Gen Plant Pathol* 75:37-45
- Dou D, Kale SD, Wang X, Jiang RH, Bruce NA, Arredondo FD et al (2008) RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell* 20:1930-1947
- Edel V, Steinberg C, Avelange I, Laguerre G, Alabouvette C (1995) Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85: 579-585
- FAOSTAT. 2012. Food and agricultural organization of the united nations.  
<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>
- Fourie G, Steenkamp ET, Gordon TR, Viljoen A (2009) Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* vegetative compatibility groups. *Appl Environ Microbiol* 75: 4770-4781
- Fraser-Smith S, Czislowski E, Meldrum RA, Zander M, O'Neill W, Balali GR, Aitken EAB (2014) Sequence variation in the putative effector gene *SIX8* facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *Plant Pathol* doi: 10.1111/ppa.12184
- Friesen TL, Stukenbrock EH, Liu Z, Meinhardt S, Ling H, Faris J. D et al (2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nat Genet* 38:953-956
- Gamborg OL, Wetter LR (1975) *Plant tissue culture methods*. Nat. Res. Coun. Saskatoon, Canada.: Canada, Prairie Regional Lab.
- García-Maceira FI, Di Pietro A, Huertas-González MD, Ruiz-Roldán MC, Roncero MIG (2001) Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. *Appl Environ Microbiol* 67:2191-2196
- Haegi A, Catalano V, Luongo L, Vitale S, Scotton M, Ficcadenti N, Belisario A (2013) A newly developed real-time PCR assay for detection and quantification of *Fusarium oxysporum* and its use in compatible and incompatible interactions with grafted melon genotypes. *Phytopathology* 103:802-810
- Hirano Y, Arie T (2006) PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J Gen Plant Pathol* 72:273-283



- Hoff KJ, Stanke M (2013) WebAUGUSTUS - a web service for training AUGUSTUS and predicting genes in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 41:123-128
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, Kamoun S (2009) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact* 22:115-122
- Houterman PM, Cornelissen BJ, Rep M (2008) Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathog* 4:e1000061
- Houterman PM, Ma L, Van Ooijen G, De Vroomen MJ, Cornelissen BJ, Takken FL, Rep M (2009) The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J* 58:970-978
- Houterman PM, Speijer D, Dekker HL, de Koster CG, Cornelissen BJC, Rep M (2007) The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol Plant Pathol* 8:215-221
- Huertas-González MD, Ruiz-Roldán MC, Maceira FIG, Roncero MIG, Di Pietro A (1999) Cloning and characterization of p11 encoding an in planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. *Curr Genet* 35:36-40
- Inami K, Yoshioka-Akiyama C, Morita Y, Yamasaki M, Teraoka T, Arie T (2012) A genetic mechanism for emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: inactivation of avirulence gene *AVR1* by transposon insertion. *PLoS one*, 7:e44101
- Inden H, Asahira T (1990) Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.). In: Rabinowitch HD, Brewster JL (eds). *Onions and allied crops*. CRC pres. 159-178
- Ito S, Nagata A, Kai T, Takahara H, Tanaka S (2005) Symptomless infection of tomato plants by tomatinase producing *Fusarium oxysporum* formae speciales nonpathogenic on tomato plants. *Physiol Mol Plant Pathol* 66:183-191
- Jiménez-Fernández D, Montes-Borrego M, Jiménez-Díaz RM, Navas-Cortés JA, Landa BB (2011) *In planta* and soil quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and evaluation of *Fusarium* wilt resistance in chickpea with a newly developed quantitative polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 101:250-262
- Jin H, Hartman GL, Nickell CD, Widholm JM (1996) Characterization and purification of a phytotoxin produced by *Fusarium solani*, the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Phytopathology* 86:277-282
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329

- Joosten MH, Cozijnsen TJ, De Wit PJ (1994) Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* 367:384-386
- Joosten MHAJ, De Wit PJGM (1999) The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. *Ann Rev Phytopathol* 37:335-367
- Joosten MHAJ, Vogelsang R, Cozijnsen TJ, Verberne MC, De Wit PJGM (1997) The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. *Plant Cell* 9:367-379
- Kale SD, Gu B, Capelluto DG, Dou D, Feldman E, Rumore, A et al (2010) External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* 142:284-295
- Kang S, Lebrun MH, Farrall L, Valent B (2001) Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. *Mol Plant Microbe Interact* 14:671-674
- 鹿島瑠美 (2009) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* が生産する植物毒素タンパク質. 山口大学大学院農学研究科 修士論文
- Kashiwa T, Inami K, Fujinaga M, Ogiso H, Yoshida T, Teraoka T, Arie T (2013) An avirulence gene homolog in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 functions as a virulence gene in the cabbage yellows fungus *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *J Gen Plant Pathol* 79:412-421
- Kerényi Z, Moretti A, Waalwijk C, Oláh B, Hornok L (2004) Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 70:4419-4423
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120
- 児玉不二雄 (1977) *Fusarium oxysporum*によるネギ萎ちょう病 (新称). *日植病報* 43:340
- 児玉不二雄 (1983) タマネギ乾腐病とその防除に関する研究. *北海道立農業試験場報告* 39:1-65
- Lay FT, Poon S, McKenna JA, Connelly AA, Barbeta BL, McGinness BS et al. (2014) The C-terminal propeptide of a plant defensin confers cytoprotective and subcellular targeting functions. *BMC Plant Biol* 14:41
- Leslie JF (1993) Vegetative compatibility in fungi. *Ann Rev Phytopathol* 31:127-151

- Li S, Hartman GL, Widholm JM (1999) Viability staining of soybean suspension-cultured cells and a seedling stem cutting assay to evaluate phytotoxicity of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* culture filtrates. *Plant Cell Rep* 18:375-380
- Lievens B, Houterman PM, Rep M (2009) Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. *FEMS Microbiol Lett* 300:201-215
- Liu YG, Whittier RF (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25:674-681
- Lu S, Faris JD, Sherwood R, Friesen TL, Edwards MC (2014) A dimeric PR-1-type pathogenesis-related protein interacts with ToxA and potentially mediates ToxA-induced necrosis in sensitive wheat. *Mol Plant Pathol* <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12122>
- Ma L, Cornelissen BJ, Takken FL (2013) A nuclear localization for Avr2 from *Fusarium oxysporum* is required to activate the tomato resistance protein I-2. *Front Plant Sci* 4:94
- Ma L-J van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi M.-J, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M et al (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464:367-373
- Manning VA, Hardison LK, Ciuffetti LM (2007) Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein. *Mol Plant Microbe Interact* 20:168 -177
- Michielse CB, van Wijk R, Reijnen L, Manders EM, Boas S, Olivain C et al (2009) The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS pathog* 5:e1000637
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:473-497
- Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, Hansen MT, Sönksen CP, Ludvigsen S et al. (2005) Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437:975-980
- Oeemig JS, Lynggaard C, Knudsen DH Hansen FT, Nørgaard KD, Schneider T et al. (2012) Eurocin, a new fungal defensin structure, lipid binding, and its mode of action. *J Biol Chem* 287:42361-42372
- O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, Riley R, Zitomer NC,

- Colyer P, Waalwijk C, van der Lee T et al. (2009) A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet Biol* 46:936-948
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2044-2049
- Pasquali M, Dematheis F, Gullino ML, Garibaldi A (2007) Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. *Phytopathology* 97:987-996
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785-786
- Rehmany AP, Gordon A, Rose LE, Allen RL, Armstrong MR, Whisson SC, Kamoun S, Tyler BM, Birch PR, Beynon JL (2005) Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two Arabidopsis lines. *Plant Cell* 17:1839-1850
- Rep M (2005) Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiol Lett* 253:19-27
- Rep M, Kistler HC (2010) The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Curr Opin Plant Biol* 13:420-426
- Rep M, Van Der Does HC, Meijer M, Van Wijk R, Houterman PM, Dekker H, Cornelissen BJ (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 Microbiol* 53:1373-1383
- Rocha AL, Di Pietro A, Ruiz-Roldan CARMEN, Roncero MIG (2008) *Ctf1*, a transcriptional activator of cutinase and lipase genes in *Fusarium oxysporum* is dispensable for virulence. *Mol plant pathol* 9:293-304
- Rose R, Whiteman M, Moore PK, Zhu YZ (2005) Bioactive *S*-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Nat Prod Rep* 22:351-368
- Saitoh KI, Togashi K, Arie T, Teraoka T (2006) A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *J Gen Plant Pathol* 72:348-350

- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425
- 佐々木一紀 (2010) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* と *Allium* 属植物の相互作用に関する研究. 山口大学農学部 卒業論文
- 佐々木一紀, 田中秀平, 伊藤真一 (2011) ネギ幼苗に萎ちょうをひき起こすネギ萎ちょう病菌タンパク質. *日植病報* 77:61
- Scarlett K, Tesoriero L, Daniel R, Guest D (2013) Detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in environmental samples using a specific quantitative PCR assay. *Eur J Plant Pathol* 137:315-324
- Schmidt SM, Houterman PM, Schreiver I, Ma L, Amyotte S, Chellappan B et al (2013) MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *BMC Genomics* 14: 119
- Schwartz HF, Mohan SK, eds. (1995) *Compendium of Onion and Garlic Diseases*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Schägger H, Von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379
- Sewram V, Mshicileli N, Shephard GS, Vismar HF, Rheeder JP, Lee YW et al (2005) Production of fumonisin B and C analogues by several *Fusarium* species. *J Agric Food Chem* 53:4861-4866
- Silva PM, Gonçalves S, Santos NC (2014) Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Front Microbiol* 5:97
- Simons G, Groenendijk J, Wijbrandi J, Reijans M, Groenen J, Diergaarde, P et al (1998) Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell* 10:1055-1068
- Sousa MV, da C Machado J, Simmons HE, Munkvold GP (2014) Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. *Plant Pathol* DOI:10.1111/ppa.12257
- Southwood MJ, Viljoen A, Mostert G, McLeod A (2012a) Molecular identification of two vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytopathology* 102: 204-213

- Southwood MJ, Viljoen A, Mostert L, Rose LJ, McLeod A (2012b) Phylogenetic and biological characterization of *Fusarium oxysporum* isolates associated with onion in South Africa. *Plant Dis* 96:1250-1261
- Stergiopoulos I, Collemare J, Mehrabi R, Wit PJ (2013) Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic *Dothideomycete* fungi. *FEMS Microbiol Rev* 37:67-93
- Strelkov SE, Lamari L, Ballance GM (1999) Characterization of a host-specific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mol Plant Microbe Interact* 12:728-732
- Suga H, Hirayama Y, Morishima M, Suzuki T, Kageyama K, Hyakumachi M (2013) Development of PCR Primers to Identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Plant Dis* 97:619-625
- Swift CE, Wickliffe ER, Schwartz HF (2002) Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from onion in Colorado. *Plant Dis* 86:606-610
- 高桑亮, 石坂信之, 児玉不二雄, 斉藤泉 (1977) タマネギ乾腐病の寄生範囲. *日植病報* 45:479-481
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599
- Tejesvi MV, Segura DR, Schnorr KM, Sandvang D, Mattila S, Olsen PB, Neve S, Kruse T, Kristensen HH, Pirttilla AM (2013) An antimicrobial peptide from endophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Divers* 60:153-159
- Thatcher LF, Gardiner DM, Kazan K, Manners JM (2012) A highly conserved effector in *Fusarium oxysporum* is required for full virulence on Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* 25:180-190
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
- Tuori RP, Wolpert TJ, Ciuffetti LM (2000) Heterologous expression of functional Ptr ToxA. *Mol Plant Microbe Interact* 13:456-464
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RH, Aerts A et al (2006) *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313:1261-1266

- van der Does HC, Duyvesteijn RG, Goltstein PM, van Schie CC, Manders, EM, Cornelissen, BJ, Rep M (2008a) Expression of effector gene *SIX1* of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genet Biol* 45:1257-1264
- van der Does HC, Lievens B, Claes L, Houterman PM, Cornelissen BJ, Rep M (2008b) The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environ Microbiol* 10:1475-1485
- Van den Ackerveken GF, Vossen PJMJ, De Wit JGMP (1993a) The AVR9 race-specific elicitor of *Cladosporium fulvum* is processed by endogenous and plant proteases. *Plant Physiol* 103:91-96
- Van den Ackerveken GFJM, Van Kan JA, Joosten MHAJ, Muisers JM, Verbakel HM, De Wit PJGM (1993b) Characterization of two putative pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant Microbe Interact* 6:210-215
- van den Burg HA, Westerink N, Francoijs KJ, Roth R, Woestenenk E, Boeren S, De Wit PJ, Joosten MH, Vervoort J (2003) Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *J Biol Chem* 278:27340-27346
- Vleeshouwers VG, Oliver RP (2014) Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 27:196-206
- Vu HQ, El-Sayed MA, Ito S, Yamauchi N, Shigyo M (2012) Discovery of a new source of resistance to *Fusarium oxysporum*, cause of Fusarium wilt in *Allium fistulosum*, located on chromosome 2 of *Allium cepa* *Aggregatum* group. *Genome* 55:797-807
- Webb KM, Case AJ, Brick MA, Otto K, Schwartz HF (2013) Cross pathogenicity and vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* isolated from sugar beet. *Plant Dis* 97:1200-1206
- Wevelsiep L, Kogel KH, Knogge W (1991) Purification and characterization of peptides from *Rhynchosporium secalis* inducing necrosis in barley. *Physiol Mol Plant Pathol* 39:471-482
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM et al (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450:115-118

- Widodo, Kondo N, Kobayashi K, Ogoshi A (2008) Vegetative compatibility groups within *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* in Hokkaido-Japan. *Microbiol Indonesia* 2:39-43
- Zhang Z, Zhang J, Wang Y, Zheng X (2005) Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. *FEMS Microbiol Lett* 249:39-47
- Zhu S, Gao B, Harvey PJ, Craik DJ (2012) Dermatophytic defensin with antiinfective potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:8495-8500



## 摘要

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) は、土壌伝染性の植物病原菌で、タマネギおよびネギにそれぞれタマネギ乾腐病およびネギ萎凋病を引き起こす。近年、これらの病害が日本各地で発生し、経済的に大きな損失をもたらしている。これまで、わが国に分布する FOC については、ネギ萎凋病罹病個体から分離された FOC (ネギ分離 FOC) の遺伝的多様性と病原性の分化が報告されている。しかしながら、タマネギ乾腐病罹病個体から分離した FOC (タマネギ分離 FOC) については、系統分化や病原性分化の実態がほとんどわかっていない。また、タマネギ分離 FOC とネギ分離 FOC の遺伝的類縁関係に関する解析は行われていない。さらに、エフェクターあるいはタンパク質性毒素など、FOC の病原性に関与するタンパク質に関しては、世界的に見ても報告されていない。そこで、本研究では、まずタマネギ分離 FOC とネギ分離 FOC を用いて、両者の系統・病原性の分化および遺伝的類縁関係を解析した (第 2 章)。次に、FOC のゲノムにおけるトマト萎凋病のエフェクター遺伝子 (*SIX* 遺伝子) ホモログの存在を調べるとともに、得られたホモログの塩基配列を用いてタマネギ分離 FOC を特異的に検出・定量する方法を検討した (第 3 章)。また、ネギに萎凋を引き起こすタンパク質性毒素を単離し、遺伝子解析を行った (第 4 章)。

第 2 章において、55 株の FOC (タマネギ分離 FOC 27 株、ネギ分離 FOC 28 株) の rDNA intergenic spacer (IGS) および translation elongation factor 1- $\alpha$  (*EF1- $\alpha$* ) 領域の塩基配列を決定し、それに基づいた系統樹を作成した。IGS 領域による系統樹では、FOC は A~H の 8 つのクレードに分岐し、クレード H にほとんどのタマネギ分離 FOC が属していた。これらの菌株の IGS 領域の塩基配列は 100% 一致していた。IGS 系統樹クレード H の菌株は、*EF1- $\alpha$*  を基にした系統樹においても同一のクレードに属し、遺伝的にきわめて近縁であることが示唆された。また、vegetative compatibility group (VCG) 解析において、IGS 系統樹クレード H の菌株は互いにヘテロカリオンを形成した。さらに、IGS 系統樹クレード H の菌株は、いずれもトマト萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) のエフェクター遺伝子である *SIX3*、*SIX5*、および *SIX7* のホモログを有していた。これまでに FOL 以外の方ではから *SIX3* および *SIX5* ホモログは見つかっておらず、本研究が初めての報告である。これらの *SIX* ホモログのうち、*SIX3* ホモログは 4Mb の染色体上に座乗していた。タマネギ幼苗に対する接種試験において、IGS クレード H の菌株は他のクレードに属する菌株よりも高い病原性を示した。これ

らの結果から、IGS クレード H のタマネギ分離 FOC は他のクレードに属する FOC と遺伝系統が異なっており、タマネギに高い親和性を持っていることが示唆された。一方、ネギ分離 FOC は、IGS および *EF1- $\alpha$*  の塩基配列に基づいて作成した系統樹のいずれにおいても高度の遺伝的多様性を示した。

第 3 章において、ネギ分離 FOC の *SIX3*、*SIX5*、および *SIX7* ホモログ (*FocSIX3*、*FocSIX5*、および *FocSIX7*) の塩基配列を決定した。推定される *FocSIX3* および *FocSIX5* のアミノ酸配列は、FOL の *SIX3* (*FolSIX3*) および *SIX5* (*FolSIX5*) とそれぞれ 85.9%、69.7% の相同性を示した。*FocSIX7* は、165 アミノ酸長のタンパク質に翻訳され、FOL の *SIX7* (*FolSIX7*) の 220 アミノ酸長と比較して、55 アミノ酸短かった。FOL において *SIX3* と *SIX5* は 2.3kbp の距離を挟んで隣接しプロモーターを共有している。FOC においても、*FocSIX3* と *FocSIX5* は隣接していたが、遺伝子間の距離は 5kbp でその領域には推定される遺伝子は存在せず、多くのトランスポゾン断片を含んでいた。FOC では、*FocSIX3*、*FocSIX5*、および *FocSIX7* がすべて 4Mb の染色体上に座乗していた。*FocSIX3* および *FocSIX5* 遺伝子は、FOC を接種したタマネギ植物体内において発現していた。*FocSIX3* 遺伝子破壊株は、タマネギ幼苗および鱗茎に対する病原性が低下していたことから、*FocSIX3* がタマネギに対する病原性因子であることが示唆された。

*FocSIX3* と *FolSIX3* の塩基配列の差異に基づいて、*FolSIX3* だけを特異的に増幅する PCR プライマーペアを 4 種類 (P1~4) 設計した。このうちプライマーペア P1 は、*FolSIX3* を有する FOC でのみ 106bp 長の塩基配列を増幅し、ネギ分離 FOC、*SIX3* を持たない非病原性 FOC、および他の分化型に属する *F. oxysporum* 株では DNA 断片を全く増幅しなかった。さらに、プライマーペア P1 を用いたリアルタイム qPCR を開発し、タマネギ植物体内における FOC の定量を試みた。タマネギの根における FOC の数は、感受性品種 ‘ヒグマ’ のほうが抵抗性品種 ‘北もみじ 2000’ よりも多かった。これらの結果から、プライマー P1 を用いた qPCR は、タマネギに感染した FOC の定量に有効であり、タマネギ乾腐病抵抗性品種の選抜に利用できる可能性が示唆された。

FOC を、ネギの盤茎やある種の硫黄化合物と共培養すると、ネギ幼苗に萎ちょうを引き起こすタンパク質 wilt-inducing protein 1 (WIP1) を分泌する。第 4 章では、WIP1 タンパク質の N 末端アミノ酸配列および LC-MS/MS 解析を行い、得られた結果に基づいて WIP1 タンパク質をコードしている cDNA およびゲノミック DNA をクローン化し、塩基配列を決定した。遺伝子から推定される WIP1 タンパク質は、85 アミノ酸の

長さであったが、成熟 WIP1 は 52 アミノ酸で、6 つのシステイン残基を持つ塩基性タンパク質であった。ジスルフィド結合を有するタンパク質を生産することのできる *Escherichia coli* 株を用いて組換え WIP1 を得た。精製した組換え成熟 WIP1 タンパク質を処理したネギ幼苗は萎凋症状を示した。また、*WIP1* 遺伝子は接種 4 日後のネギ植物体内で発現していた。これらの結果から、WIP1 タンパク質はネギに萎凋を引き起こす病原性因子の一つであることが示唆された。

## Summary

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) is a soil-borne fungus that causes Fusarium basal rot in common onion (*Allium cepa*) and Fusarium wilt in Welsh onion (also known Japanese bunching onion, *A. fistulosum*). Recently, these diseases have been detected in various parts of Japan, leading to heavy economic losses, but studies on the genetic and pathogenic variability of isolates from onion and Welsh onion are very limited. Furthermore, the factors affecting the pathogenicity of FOC are unknown. In this study, the genetic and pathogenic variability of FOC isolates from onion and Welsh onion were analyzed using nucleotide sequences for the rDNA intergenic spacer (IGS) and translation elongation factor-1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ), vegetative compatibility group testing (VCGs), the presence of homologs of secreted in xylem (*SIX*), and inoculation tests. Furthermore, candidate genes encoding effector proteins of FOC were identified, and methods for detecting and quantifying FOC infections in onion plants were developed.

Chapter 2 reports a total of 55 FOC isolates, including 27 isolates from onion and 28 from Welsh onion, which were used in the molecular phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the IGS and *EF-1 $\alpha$*  regions. Analysis of IGS sequences showed that the isolates fell into 8 clades, A to H, and Clade H included most onion isolates. These isolates formed a clade in the *EF-1 $\alpha$*  phylogenetic tree, indicating that these isolates are closely related. VCG tests showed that all onion isolates belonging to IGS Clade H were able to form heterokaryons. In addition, *SIX3*, *SIX5* and *SIX7*, which are effector genes of the tomato wilt pathogen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), were detected in all isolates belonging to Clade H. This is the first report showing that *SIX3* and *SIX5* homologs are present in a forma specialis other than f. sp. *lycopersici*. The *SIX3* homolog was located on the same 4-Mb chromosome in all FOC isolates of IGS Clade H. Inoculation experiments against onion seedlings showed that the isolates belonging to Clade H had a higher pathogenicity than those belonging to the other clades. These results suggest that FOC isolates belonging to IGS Clade H are genetically and pathogenically distinct from those belonging to other IGS clades.

Chapter 3 reports the nucleotide sequences of the *SIX3*, *SIX5*, and *SIX7* homologs identified in FOC. The amino acid sequences of Foc*SIX3* and Foc*SIX5* showed 85.9% and 69.7% similarity to those of Fol*SIX3* and Fol*SIX5*, respectively. Foc*SIX7* encodes a protein of 165 amino acids (aa), which is 55 aa shorter than that of Fol*SIX7* (220 aa). Although *SIX3* and

*SIX5* were located in a 2.3-kbp region in FOL, *FocSIX3* and *FocSIX5* were located in a 5-kbp region that contained transposable elements but no other genes. In addition, *FocSIX3*, *FocSIX5*, and *FocSIX7* were located on the same 4-Mb chromosome. Expression of *FocSIX3* and *FocSIX5* was detected *in planta* using RT-PCR. A *FocSIX3* deletion mutant showed reduced virulence to onion seedlings and bulbs, suggesting that *FocSIX3* is a pathogenicity factor in onion FOC.

To develop a method for specific detection of FOC isolated from onion, a primer pair for polymerase chain reaction (PCR) was designed based on differences in the nucleotide sequences of *FocSIX3* and *FolSIX3*. The primer pair P1 amplified a 106-bp-long segment of DNA only from FOC isolated from onions, and not from FOC isolated from either Welsh onion or from *F. oxysporum* strains belonging to formae speciales other than *cepae*. A method for real-time quantitative PCR (qPCR) was developed and used to quantify FOC in onion plants. The quantity of FOC detected in the roots of the susceptible cultivar ‘Higuma’ was higher than that detected in the resistant cultivar ‘Kitamomiji 2000.’ These results suggest that qPCR using P1 is useful for the quantification of FOC in plants and could be used to select onion cultivars resistant to Fusarium basal rot.

FOC has been shown to secrete wilt-inducing protein 1 (WIP1) in culture with basal plates of Welsh onion or with various sulfur compounds. Welsh onion seedlings treated with WIP1 showed wilt symptoms similar to those of Fusarium wilt. In Chapter 4, the WIP1 protein was characterized using N-terminal amino acid sequences and LC-MS/MS analyses. Complementary and genomic DNA sequences corresponding to *WIP1* were cloned and determined. WIP1 was 85 amino acid residues in length and the mature form was a basic protein consisting of 52 amino acids with six cysteine residues. Recombinant WIP1 produced by *Escherichia coli* capable of producing proteins with disulfide bonds showed wilt-inducing activity in Welsh onion seedlings. Expression of *WIP1* was detected *in planta* using RT-PCR at 4 days after inoculation. These results suggested that WIP1 can induce wilt in Welsh onion plants and may be a virulence factor of FOC.

## 公表論文目録

Sasaki K, Nakahara K, Tanaka S, Shigyo M, Ito S (2014) Genetic and pathogenic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolated from onion and Welsh onion in Japan. *Phytopathology* <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0164-R> (第2章に記載)

Sasaki K, Nakahara K, Shigyo M, Tanaka S, Ito S (2014) Detection and quantification of onion isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* in onion plant. *Journal of General Plant Pathology* (in press) (第3章に記載)