

(様式第 1 3 号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 佐々木 一紀

題目: *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*)

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- α (EF1- α) 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- α 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 以外の分化型では *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- α 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* (Fol*SIX3*) および *SIX5* (Fol*SIX5*) 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* (Fol*SIX7*) 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。