

学位論文審査の結果の要旨

氏名	佐々木 一紀
審査委員	主査 伊藤 真一 (印)
	副査 田中 秀平 (印)
	副査 児玉 基一朗 (印)
	副査 上野 誠 (印)
	副査 執行 正義 (印)
題目	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> の遺伝系統および病原性遺伝子
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>近年、<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> (FOC)によるタマネギ乾腐病およびネギ萎凋病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が、タマネギ乾腐病を引き起こすFOC(タマネギ分離FOC)の遺伝系統や病原性分化についてはほとんど調べられておらず、ネギ分離FOCとの遺伝的類縁関係もわかっていない。本研究では、日本国内で分離したタマネギ分離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明らかにするとともに、ゲノムおよび分泌タンパク質を解析することによって、FOCの病原性に関与する遺伝子の同定を試みた。</p> <p>1. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> の系統および病原性</p> <p>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(<i>EF1-α</i>)領域の塩基配列を決定し系統樹を作成した。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、病原性の強いタマネギ分離FOCはすべてクレードHに属した。IGS系統樹クレードHの菌株は、<i>EF1-α</i>による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<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>(FOL)のエフェクター遺伝子である<i>SIX3</i>、<i>SIX5</i>、および<i>SIX7</i>のホモログを有していた。これらの結果から、</p>	

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。

2. タマネギ分離 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC)における SIX3 の機能および FOC の特異的検出

タマネギ分離 FOC の *SIX3*、*SIX5*、および *SIX7* ホモログの塩基配列解析から推定されたアミノ酸配列は、FOL の *SIX3* および *SIX5* とそれぞれ 85.9%、69.7% の相同性を示した。FOC の *SIX3*、*SIX5*、および *SIX7* ホモログはすべて 4 Mb の染色体上に座乗し、FOL と同様、*SIX3* と *SIX5* は隣接して存在した。*SIX3* 遺伝子を破壊した FOC は、タマネギ幼苗および鱗茎に対して病原性が低下したことから、FOC の *SIX3* 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。

FOC および FOL の *SIX3* ホモログの塩基配列の差異に基づいて、FOC の *SIX3* を特異的にするプライマーペア (P1) を設計した。P1 を用いたリアルタイム qPCR によって、タマネギ植物体内における FOC の定量が可能であることを明らかにした。

3. タマネギ分離 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* が分泌する萎凋誘導性タンパク質の同定

FOC をネギの盤茎と共培養すると、ネギ幼苗に萎凋を引き起こすタンパク質 wilt-inducing protein 1 (WIP1) を分泌することを見出した。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大腸菌を用いて組換え WIP1 を生産した。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 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。

本研究は、わが国におけるタマネギ病原性 FOC の遺伝系統および病原性分化の実態を初めて明らかにしただけでなく、世界で初めて本菌の病原性遺伝子を報告したものである。また、本研究で確立したタマネギ病原性 FOC の定量法は、今後タマネギ乾腐病抵抗性品種の選抜などに利用される可能性が高い。このように、本研究は独創性、新規性、および応用性において高く評価できることから、学位論文として十分な価値を有すると判定した