

Alternaria alternata 植物病原菌における
機能ゲノミクスを基盤とした病原性発現機構の解析

(Studies on molecular mechanisms of pathogenicity of *Alternaria
alternata* plant pathogens based on functional genomics)

高尾 和実
Kazumi Takao
(2016)

目次

第1章 総合序論	2
第2章 材料および方法	4
第3章 茎枯病菌における病原性関連遺伝子の探索	26
第1節 序論	26
第2節 材料および方法	29
第3節 結果	31
第4節 考察	66
第4章 宿主特異的 AAL 毒素生合成遺伝子クラスターの 非病原性 <i>A. alternata</i> 菌への導入	72
第1節 序論	72
第2節 材料および方法	74
第3節 結果	76
第4節 考察	88
第5章 摘要	90
第6章 Summary	92
第7章 引用文献	94
学会誌公表論文リスト	104

第1章 総合序論

世界人口の増加や新興国の食の変化に伴い、食糧の確保は各国の喫緊の課題となりつつある。この問題を解決するため、安定した作物生産が要求されている。一方、寒波や干ばつなどの気候変化や病害虫による被害により、多くの作物は減収を余儀なくされている。これら被害を最小限に食い止めるため、植物に様々な抵抗性が付与されている。しかしながら、これら抵抗性のうち生物に対するものは、対象生物の変異により打破される可能性がある。

植物の病気の80%以上を占める菌類は、現在までに10万種以上が報告されており、そのうちの約7,000種が、植物病原菌として報告されている。このように数多くの病原菌が分離、同定されているが、それらの多くは病原性発現機構について詳細が明らかとなっていない。一方、植物への抵抗性の付与や新規農薬の開発を行う場合、病原性菌と非病原性菌との違いや、病原性の進化、獲得、消失など菌の情報の中でも、とりわけ病原性発現機構に関する情報が必要になることは言うまでもない。

近年、シーケンス技術の著しい発展により、多くの生物種のゲノム情報が蓄積されつつある。ヒトや植物に比べ、ゲノムサイズの小さい菌類は、ドラフト解析を含めると、年間数十のゲノム情報が公開されており、これらを利用した病原性遺伝子の探索なども行われつつある。このように、コンピューター上で大量のゲノム情報から候補となる病原性遺伝子を見出すことが容易になる一方で、実際にその候補遺伝子の機能を同定するためには、遺伝子破壊や遺伝子サイレンシング法により機能解析を行う必要がある。そのため、ゲノミクス研究ベースで多くの病原性候補遺伝子は推定されるものの、実際の機能は不明である場合が多い。

Alternaria alternata は世界中に分布する菌であり、基本的に腐性生活を送っている (Rotem 1994)。その中で、宿主特異的毒素 (host-specific toxin, 以下、HST) 生産能を獲得したもののみが、病原菌となる。これまでに、少なくとも7種の病原型が存在することが明らかとなっている (Kohmoto et al. 1995, Thomma 2003)。近年、これら HST の生合成に関わる遺伝子が見出され、その生合成遺伝子がクラスター化していることも報告されている (Akagi et al. 2005, Akamatsu et al. 2003, Harimoto et al. 2007, Hatta et al. 2002, Johnson et al. 2001, Miyamoto et al. 2009)。さらに病原性に必須であるこれら HST 生合成遺伝子は、少なくともイチゴ、リンゴ、トマト病原型において conditionally dispensable chromosome (CDC) (Covert 1998) と呼ばれる 1.8 Mb 以下の染色体に座乗していることが明らかとなっている (Akagi et al. 2009, Akamatsu et al. 2003, Hatta et al. 2002, Harimoto et al. 2007, Johnson et al. 2001)。

本研究では、HST 生産 *A. alternata* 病原菌を対象として、ネクロトロフ植物病原菌に

おける病原性遺伝子をゲノム情報に基づき機能解析し、その病原性発現機構を包括的に解明することを目指した。病原性関連遺伝子として、毒素生合成遺伝子、シグナリング関連遺伝子およびエピジェネティック制御に関わるグローバルレギュレーター遺伝子を主な解析対象とした。

学位論文提出にあたり、ご指導、ご協力頂きました、主指導教員の鳥取大学大学院連合農学研究科植物病理学研究室 児玉基一郎教授、名古屋大学 柘植尚志教授、岡山大学 山本幹博准教授、鳥取大学植物病理学研究室 赤木靖典博士、赤木真美氏ならびに研究室諸氏、また、鳥取大学 前川二太郎教授、石原 亨教授、山口大学 伊藤真一教授、および島根大学 上野 誠准教授に厚く御礼申し上げます。

第 2 章 材料および方法

この章では、以降の実験で使用される共通の材料と方法を記した。

1. 供試菌および供試植物

供試菌として、使用した菌株のリストは表 2 に示した。菌株はジャガイモ寒天 (PDA) 培地で培養した。菌株の保存はろ紙による保存とグリセロールによる保存の 2 種類の方法で行った。

・ろ紙による保存: 約 1 cm 角に切ったろ紙 (Whatman, 3MM CHR) を数枚、培地の中央から離してのせた後、菌体を培地中央に植菌した。菌体がろ紙上に伸びた段階で培地から引きはがし、クリーンベンチ中で風乾後、5×5 cm の小型封筒に入れ -20°C で保存した。

・グリセロールによる保存: 培地上で成長した菌体を 5 mm 角に切り取り、20%グリセロールの入ったエッペンドルフチューブに移し、-80°C で保存した。

供試植物は茎枯病菌に感受性であるトマト (*Solanum lycopersicum*) 品種、愛知ファーストを用いた。

2. 試薬および培地

本研究で使用した試薬および培地の各組成は表 3 に示した。

3. ゲノム DNA の抽出

各菌からのゲノム DNA の抽出および保存は赤木 (赤木 2010) の方法 3 種 (Yoder ら (Yoder et al. 1994) の Miniprep 法を改変した Miniprep 法、Suzuki ら (Suzuki et al. 2006) の方法を改変した電子レンジ簡易抽出法および液体窒素簡易抽出法、以下、表記をそれぞれ Miniprep 法、電子レンジ法および液体窒素法とする) に従って行った。

4. 全 RNA の抽出

4-1. RNeasy plant kit を用いた RNA の抽出

菌体を PDA に植菌し、3 日程度成長させた後、変法 Richards 液体培地に 5 mm 角片を 20 個程度植菌した。数日間振とう培養 (120 rpm) 後、吸引濾過し、菌体を回収した。この後の操作は RNeasy plant kit (Qiagen) のプロトコルに従って行った。得られた RNA に含まれる DNA は DNase I で処理後、フェノール/クロロホルム抽出で除去および純化した。得られた RNA は PCR により、DNA のコンタミネーションの有無を確認した。その後、GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (Amersham pharmacia biotech、現 GE ヘルスケア) で濃度と純度を測定した。

表 1 *ALT* クラスター遺伝子の AAL 毒素生産と推定機能

遺伝子	推定機能	AAL 毒素生産
<i>ALT1</i>	Polyketide synthase	↓
<i>ALT2</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	↓
<i>ALT3</i>	Dehydrogenase	→
<i>ALT4</i>	Aminotransferase	↓
<i>ALT5</i>	ABC transporter	?
<i>ALT6</i>	Short-chain dehydrogenase/reductase	?
<i>ALT7</i>	Longevity assurance factor	→
<i>ALT8</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	→
<i>ALT9</i>	Mitochondrial tricarboxylate transporter	→
<i>ALT10</i>	Fatty acyl-CoA synthetase	?
<i>ALT11</i>	Phytanoyl-CoA dioxygenase	?
<i>ALT12</i>	Peptide synthetase condensation domain	?
<i>ALT13</i>	Zn(II)2Cys6 DNA binding domain	↓

表 2 本研究でを使用した菌株

菌株	種名	宿主	採集地
As-27	<i>A. alternata</i>	トマト	アメリカ
O-94	<i>A. alternata</i>	未同定	日本、鳥取
O-276	<i>A. alternata</i>	ニホンナシ	日本、鳥取
AC320	<i>A. alternata</i>	タンゼリン	アメリカ
AC325	<i>A. alternata</i>	ラフレモン	アメリカ
NAF8	<i>A. alternata</i>	イチゴ	日本、愛知
M-30	<i>A. alternata</i>	イチゴ	日本、鳥取
M-71	<i>A. alternata</i>	リンゴ	日本、長野
IFO8984	<i>A. alternata</i>	リンゴ	日本、兵庫

表 3 本研究で使用した試薬および培地の組成

LB medium	1 l
Tryptone peptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Agar powder	15 g
Regeneration medium	1 l
1 M Sucrose	342.3 g
0.1 % Casein hydrolysate enzymatic	1 g
0.1 % Yeast extract	1 g
Crossing medium	1 l
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g
CaCO ₃	0.85 g
Agar	20 g
PDA medium	1 l
potato	200 g
glucose	20 g
agar	15 g
PDB medium	1 l
potato	200 g
glucose	20 g
V8 medium	1 l
V8 juice	200 ml
CaCO ₃	3 g
agar	15 g

続き

Buffer1 (pH 7.5)	3 l
0.1 M Maleic acid	29.42 g
0.15 M NaCl	26.3 g
Buffer2	200 ml
Blocking reagent	2 g
Buffer1	200 ml
Buffer3 (pH 9.5)	200 ml
0.1 M Tris-Cl	2.42 g
0.1 M NaCl	1.16 g
50 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.03 g
Buffer4	1 l
10 mM Tris-Cl (pH 8.0)	10 ml (1 M Tris-Cl)
1.0 mM EDTA (pH 8.0)	1 ml (1 M EDTA)
20xSSC (pH 7.0)	1 l
3 M NaCl	175.32 g
0.3 M Na-citrate	88.23 g
Transfer buffer	2 l
0.4 M NaOH	32 g
1.5 M NaCl	174 g
Probe stripping buffer	1 l
0.2 M NaOH	8 g
0.1 % SDS	10 ml (10 % SDS)
Neutralizing buffer (pH 7.2)	1 l
0.5 M Tris-Cl	60.5 g
1.0 M NaCl	58 g

続き

Richards medium (reviced)	1 l
KNO ₃	10 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.5 g
FeCl ₃	0.02 g
glucose	25 g
Yeast extract	1 g
OM buffer (pH 5.8)	1 l
1.2 M MgSO ₄ ·7H ₂ O	296 g
10 mM Na ₂ HPO ₄	100 ml (100 mM Na ₂ HPO ₄)
pH 5.8 with NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	
ST buffer	100 ml
1.0 M Sorbitol	18.2 g
0.1 M Tris-Cl (pH 8.0)	10 ml (1 M Tris-Cl)
STC buffer	500 ml
1.0 M Sorbitol	91 g
50 mM Tris-Cl (pH 8.0)	25 ml
50 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.65 g
0.5xTBE	2, 3 l
0.45 mM Tris-Cl	10.8, 16.2 g
0.45 mM Boric acid	5.5, 8.25 g
1.0 mM EDTA	0.75, 1.125 g
Hybridization buffer	200 ml
5xSSC	50 ml (20×SSC)
1 % Blocking reagent	2 g
0.1 % SLS	2 ml (10 % SLS)
0.02 % SDS	400 μl (10 % SDS)

続き

Solution I	100 ml
50 mM glucose	0.9 g
25 mM Tris-Cl (pH 8.0)	2.5 ml (1 M Tris-Cl)
10 mM EDTA (pH 8.0)	1 ml (1 M EDTA)
Solution II	100 ml
0.2 M NaOH	0.8 g
1 % SDS	10 ml (10 % SDS)
Solution III	100 ml
3 M potassium acetate	29.45 g
acetic acid	11.5 ml (Add after autclaved)
TE buffer	100 ml
10 mM Tris-Cl (pH 7.5)	1 ml (1 M Tris-Cl)
1 mM EDTA (pH 8.0)	0.1 ml (1 M EDTA)
1xBromophenol Blue (BPB)	10 ml
0.25% BPB	25 mg
30% glycerol	3 ml
Yoder's buffer	100 ml
100 mM LiCl	10 ml (1 M LiCl)
10 mM EDTA (pH 8.0)	1 ml (1 M EDTA)
10 mM Tris-Cl (pH 7.4)	1 ml (1 M Tris-Cl)
0.5 % SDS	0.5 g
x % PEG	100 ml
50 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.73 g
50 mM Tris-Cl (pH 8.0)	5 ml (1 M Tris-Cl)
1 M Sorbitol	18.2 g
PEG4000	x g

4-2. 逆転写反応

逆転写反応は、PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio) 添付の説明書に従い行った。上記 4-1 で得た RNA は赤木 (赤木 2010) の方法で反応液を調製した。得られた、cDNA は発現解析のテンプレートとして以降の実験に使用した。

5. 遺伝子の発現解析

5-1. Reverse transcription PCR (RT-PCR)

遺伝子の発現を確認するため、検定する菌株の RNA は前述の方法で抽出および逆転写した。得られた cDNA をテンプレートとし、任意のプライマーを使用し、RT-PCR を行った。PCR 後、電気泳動を行い、目的のバンドを確認することで発現の有無を検討した。

5-2. インターカレート法による Real-time PCR

各遺伝子の発現を定量するために、Real-time PCR (Roche, Light Cycler 480) を行った。PCR の際の mixture は蛍光色素 SYBR Green I (Roche, Light Cycler 480 SYBR Green I Master) の説明書に従い作成した。cDNA は上記 4-2 のとおり反応量を 20 μ l となるようにし、RNA が 0.8 μ g になるよう加え合成した。逆転写後、milliQ を加え 100 μ l にメスアップした。

SYBR Green I のキットに付属している water 4 μ l、PCR primer 2 μ l、master mix 9 μ l をチューブに入れ、ピペッティングにより混合し、Light Cycler 480 Multiwell Plate 96 に 15 μ l ずつ加えた。その後、テンプレートである cDNA を 5 μ l ずつ加えた。反応は説明書のプロトコルに従い、発現量は本体付属のソフトウェアで定量した。プライマーの濃度は 10 μ M とした。プライマーは表 7 に示した。

6. PCR

PCR (タカラバイオ, TP650 および TP350・バイオラッド, 170-9703JA・eppendorf, 95004) による DNA の増幅は、各種 Taq ごとに添付されているプロトコルに従い行った。プライマーの濃度は 10 あるいは 20 μ M に調製した。各種 Taq ごとの PCR 時の組成は表 5 に、PCR に使用された全プライマーは表 4 に示した。

7. 電気泳動

Agarose S および Agarose HS に 0.5xTBE buffer を加え、電子レンジで溶解した (濃度は産物サイズに依存)。溶けたゲルを枠に流し固め、0.5xTBE buffer で満たした泳動槽にゲルを入れ、電気泳動 (Mupid-exu) を行った。

表 4 本研究で用いたプライマー

プライマー	配列	TM 値
ALT10AF	gcgctaaccgcagtgtagt	67.6
ALT10AR-SfiA	cacggcctatatggcccagagccgtccttgacat	69.3
ALT10BR	ctgectctgataccgactca	63.0
ALT10BF-SfiB	gtgggccacgcaggccagtgagatggcaccgac	74.1
Hph-SfiA-1-ra	cacggccatataggccttacactttatgcttccg	77.3
Hph-SfiB-1-ra	gtgggcctgcgtggcccttcgctattacgcca	71.2
hph-F	acgtctgtcgagaagtttc	59.0
hph-F2	gacgtctgtcgagaagtcttg	62.9
hph-R	gtattgaccgattccttgcg	64.2
ALT10inF	tgcacatagcaatcatccg	63.2
ALT10inR	gtggcatggagtctttgggtg	65.5
ALT10homoF	agatcactcgttgctgcttg	63.2
HphA-homoR	cagagattacttcaagtcag	68.3
HphB-homoF	ttacaacgtcgtgactggga	64.2
ALT10-wholeF	atgacggccaacgtaaagtc	67.9
ALT10-wholeR	ctaactgcaacggaacaaggac	64.6
npt-F	gacaatcggctgctctgatg	
npt-R	atgcatggttcgcttggtg	
ALT5AF1	ggcaggcagtagatcagaatctcc	67.6
ALT5FuAR1	atcaggctgatgctagcatcagcaaatctcccacatacg	81.7
ALT5FuBF1	atgcatgctaccagatgctggaaggcgtagctatagtc	80.5
ALT5BR1	gccatggcagtcgaaactctgtatgc	73.7
ALT5inF	tttaggtcctgtgggttcg	67.8
ALT5inR	tgaggcccaaatggtggc	71.5
ALT6FuAF	ggaagactgggttggtgaag	63.5
ALT6FuAR20	atcaggctgatgctagcatcgaacgcaggccctgaatgag	83.4
ALT6FuBF20	atgcatgctaccagatgctattgcttaaggctgaggag	81.5
ALT6FuBR	caagcacggacactctagct	62.2
ALT6inF	aactccctctgccttcgag	62.3
ALT6inR	tctccgggtgacttgccag	71.9
TF1AF	cggcaaacgctcgtcgtgtgtg	79.7
TF1FuAR	atcaggctgatgctagcatcggttaccacatgtctcaga	82.7
TRF1BF1	atgcatgctaccagatgtaccggagacgccaagacgac	85.4
TRF1BR1	gatgcgacgctgcaaccgagaagg	80.7

続き

TF1inF	ccactggtcgagaagggtac	63.5
TF1inR	gacctctgcctgcgatggac	69.5
TF1homoF	gatcgctcacctgggtagac	63.6
TF2AF	gcacgatccctgcacggataaggac	75.5
TF2FuAR	atcaggtcgatgctagcatcgtgcaggccaagttgagct	85.0
TF2FuBF	atcgagtgctaccagatgttaagaggcatccagtccgac	82.6
TF2BR	catgcgacatgatcccttggcctctc	79.2
TF2inF	tatgctcgcagccttcatcg	68.5
TF2inR	acaaggacgcgttatcgtcg	67.1
TF2homoF	gcgtttatcccgaactgtc	65.4
TF3AF	ctcgaacatgtctcgcgatgatcag	73.2
TF3FuAR	atcaggtcgatgctagcatcctagcatccttgaccacgc	84.5
TF3FuBF	atcgagtgctaccagatgttatggctgagcagccattg	82.7
TF3BR	ctactacgtgcagcagatcctagcaac	68.5
TF3inF	tctgtctgttccactgggtgc	64.1
TF3inR	cagatcgtactggaagcagc	63.4
TF3homoF	gacctgcctcctgcagcaac	69.6
TF4AF	caatggcagtcgccttactcgagac	72.3
TF4FuAR	atcaggtcgatgctagcatcccttaacacagcacataacg	80.5
TF4FuBF	atcgagtgctaccagatgtgtagtcaggatctgcacgg	84.2
TF4BR	gatgtcgggaaatacaagcacatgtg	70.7
TF4inF	tctagagatgccggaaggcg	68.6
TF4inR	cgaacgggggttacattcgag	66.3
TF4homoF	gattgcctgctggcgaccag	72.4
Ave1AFL	aaggcgcagactgaggggat	69.3
Ave1ARL	atcaggtcgatgctagcatcccggacatgtctgccatctg	86.2
Ave1BFL	atcaggtcgatgctagcatcgcttgttaccgtcctccagc	81.8
Ave1BRL	tggtaggggcatattgccga	70.9
Ave1inFL	acttcatgcggacacgatgc	67.6
Ave1inRL	ccgtcctccagctccagaag	65.8
Ave1homoF	gcgatgctagaggctttgtc	63.9
LAE1AF	ggtactcgtctcgcgtaagc	63.8
LAE1AR	atcaggtcgatgctagcatcgcagcgcaggccattaacag	86.3
LAE1BF	atcgagtgctaccagatgtgtaccacgcgactacgagag	83.0
LAE1BR	gtgacaggcagactcccttg	64.9

続き

LAE1inF	catgtacccgtgacgagg	70.9
LAE1inR	gagatccaatcccagcacct	65.3
LAE1homoF	gtgctcttacaacgctgcag	63.7
Lae1comR	ctgctgcatgccattgccg	76.1
AGAt1AF	caggctagcactagcagcag	63.0
AGAt1AR	atcaggtcgatgctagcatcgtagtgatgttccgtc	80.9
AGAt1BF	atgcgagtgcaccagatgtctccgagtatgaccagctgc	83.7
AGAt1BR	gttgggtgagttggaaccg	66.5
AGAt1inF	ggagggcaagcagaggaacg	70.4
AGAt1inR	gtgctggctgcatgaagatg	67.0
AGAt1homoF	gtgatgctagtcgtcgcaag	63.6
STE2AF	cgattcgtgacgactgccgc	75.2
STE2AR	atcaggtcgatgctagcatcgattgcttgggatagcggtg	84.7
STE2BF	atgcgagtgcaccagatgtaacggctgatcaggagcgcac	84.4
STE2BR	gcgaagtggttgtagcagag	62.6
STE2inF	ctgtcatggcctgcattgcg	72.2
STE2inR	tggtcgtgacgacgccagc	74.2
STE2homoF	ctggtgagctaaccggtgacg	65.8
STE2homoR	ccagatagaactgagtgacg	57.5
GPCR1-AF-re	gtagtgctacagtagtaccacgaggtag	63.1
GPCR1-AR20	atcaggtcgatgctagcatccctgagctgaacaaaactc	82.1
GPCR1-BF20	atgcgagtgcaccagatgtgagtaggtaaatgcgctgaga	81.4
GPCR1-BR	gacgcgatacggcatagtct	64.0
GPCR1-inF	ggtagccgtaacaatgtag	58.6
GPCR1-inR	cctatgcgagcttcaggac	66.0
GPCR1-homoF	gacatgaaccacagttgg	61.5
GPCR2AF	gtgttgacgggccctctcag	69.0
GRCE2AR	atcaggtcgatgctagcatccaaggatgaaaaccagag	67.9
GRCR2BF	atgcgagtgcaccagatgtaacaagggtcatcagcgcag	68.9
GPCR2BR	gtatgtcgcgctatggcggc	71.6
GPCR2inF	cgcttgcctctttgcctc	69.4
GPCR2inR	gatcgtcgacccttgtgtg	67.9
GPCRhomoF	cgctcttgcctctccccag	68.5
GPCR3AF	ggcctgactcttggccatg	67.0
GPCR3AR	atcaggtcgatgctagcatccagaactgtcaccgcaacgc	70.0

続き

GPCR3BF	atgcgagtgtaccagatgtcaacgagaagagccaaatcg	67.9
GPCR3BR	catacccaacctgtggatc	64.0
GPCR3inF	gtgtgagcttgcctagtgctg	61.0
GPCR3inR	caggagcgatatttcgctcg	66.8
GPCRhomof	acatgtcaaaggagctgcgg	67.5
GPCR3comF	caaacctcccctgattacc	63.1
GPCR3comR	cgcacatcagcagggcgag	73.9
HPHA20-fusion	gatgctagcatcgacctgattacactttatgcttccg	77.6
HPHB20-fusion	acatctggtagcactcgccttcgctattacgcca	80.3
Btub1	tccgtcgtgccttcccccaaggctcgcgac	85.2
Btub2	ggagcgaatccgacctgaagaagtggaga	78.7

表 5 PCR 反応液の組成

KOD FX (TOYOBO)	μl	μl
2x PCR buffer for KOD FX	25	10
2 mM dNTPs	10	4
Primer F (10 μM)	1	0.4
Primer R (10 μM)	1	0.4
KOD plus (1 U/ μl)	1	0.4
Sample DNA	x	x
MilliQ	12-x	4.8-x
Total	50	20
EX Taq (TOYOBO)	μl	μl
10x EX buffer	5	2
2.5 mM dNTPs	4	1.6
Primer F (10 μM)	1	1
Primer R (10 μM)	1	1
EX Taq (5 U/ μl)	0.25	0.1
Sample DNA	x	x
MilliQ	38.75-x	14.3-x
Total	50	20
LA Taq (TAKARA)	μl	μl
10x LA buffer	5	2
2.5 mM dNTPs	8	3.2
25 mM MgCl_2	5	2
Primer F (10 μM)	1	1
Primer R (10 μM)	1	1
LA Taq (5 U/ μl)	0.5	0.2
Sample DNA	x	x
MilliQ	29.5-x	10.6-x
Total	50	20

続き

rTaq (TOYOBO)	μl
10x buffer	2
2 mM dNTPs	2
Primer F (10 μM)	1
Primer R (10 μM)	1
Recombinant Taq (5 U/ μl)	0.1-0.2
Sample DNA	X
MilliQ	13.9 or 13.8-x
Total	20
2x Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)	μl
2x Quick Taq HS DyeMix	25
Primer F (10 μM)	1
Primer R (10 μM)	1
MilliQ	23-x
Sample DNA	x
Total	50

8. ゲル抽出

目的のバンドを電気泳動にて分離後、EtBr で染色、蒸留水で脱色し、UV ランプ (300 nm) 照射下で、目的とするバンドを切り出した。ゲルを 1.5 ml エッペンドルフチューブへ移し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) 添付のマニュアルに示された手順に従いゲルから DNA の抽出を行った。

9. fusion PCR 法を用いた遺伝子ノックアウト (KO) ベクターの構築

ベクターの構築は、中林ら (中林 2010) の方法を改変し、行った。まず、断片Aの3'側プライマーに任意の塩基配列、20 merを付加したプライマーを用い、断片Aを増幅した。次に、断片Bの5'側プライマーに先ほどとは異なる任意の塩基配列、20 merを付加させたプライマーを用い、断片Bを増幅した。また、5'側プライマーに断片Aで用いた任意の20 merの相補配列を付加し、3'側プライマーに断片Bで用いた任意の20 merの相補配列を付加させた。これらのプライマーペアを用いて*hph*カセットを増幅した。断片AおよびBを増幅する際はEX Taqを用いてtotal 20 μ lで行い、*hph*カセットを増幅する際は、KOD FXを用いてtotal 20 μ lで行った。これら3つのPCR産物各1 μ lをテンプレートに断片Aの5'側プライマー、断片Bの3'側プライマーを用いて表6で示した条件でfusion PCRを行い、目的のサイズをゲル抽出後、KOベクターとした。

10. プロトプラストの単離

プロトプラストの単離は、Yeltonらの方法を改変した Akamatsuらの方法に従って行った (Akamatsu et al. 1997, Tsuge et al. 1990, Yelton et al. 1984)。PDA 上で培養した各菌株を 1 mm 角に切り、約 20 断片を 50 ml の PDB に植菌し、25°Cで 36 h、振とう培養 (タイテック, Bio-Shaker BR-300L, 100 strokes/min) した。得られた菌糸を滅菌水、OM buffer の順に洗浄した。5 ml の酵素溶液 [10 mg/ml Lysing enzymes (Sigma), 5 mg/ml Kitalase (和光純薬工業) in OM buffer] に水分を出来るだけ除いた菌体を懸濁し、30°Cで振とう培養 (タイテック, INCUBATOR Personal-10, 80 strokes/min, 4-6 h) した。プロトプラストを酵素液ごとスピッツ管に移したのち、1 ml の ST buffer をその上に穏やかに重層し、遠心分離 (2,000 rpm, 5 min) した。OM buffer と ST buffer の中間層 (菌糸片を含むプロトプラスト) を別の新しいスピッツ管に移した。このスピッツ管の 8 割程まで STC buffer を加えピペッティングし、遠心分離 (700 rpm, 5 min) で未溶解の菌糸片を沈殿させた。上清を新しいスピッツ管にピペットで移し、遠心分離 (2,000 rpm, 5 min) 後、上清を除去した。沈殿したプロトプラストに 5 ml 程度の STC buffer を加え、2 度洗浄 (遠心 2,000 rpm, 5 min) した。得られたプロトプラストの沈殿を 1 ml の STC buffer に再懸濁し、トーマ氏血球計を用いて濃度

表 6 本研究で用いた PCR の条件

	反応	温度 (°C)	時間	
Fusion PCR	変性反応	94	2 分	30 サイクル
	変性反応	94	15 秒	
	アニーリング	60	30 秒	
	伸長反応	72	5 分	
	伸長反応	72	10 分	
Long PCR	変性反応	94	2 分	30 サイクル
	変性反応	98	10 秒	
	アニーリングおよび	68	1 分/kb	
	伸長反応			
	伸長反応	72	10 分	

を測定した。

11. ポリエチレングリコール (PEG) 法による形質転換

形質転換は、Vollmer と Yanofsky (Vollmer et al. 1986) の方法を改変した Itoh ら (Itoh et al. 1994)、Tsuge ら (Tsuge et al. 1990) および赤木 (赤木 2010)の方法に従った。

上述したプロトプラストの単離により調製したプラトプラスト懸濁液 80 μl (1.25×10^8 個/ml) に、20 μl の 40% PEG を含む STC buffer と、1-10 μl の環状プラスミド DNA (100 ng/ μl) あるいは/さらに線状 DNA (10-50 ng/ μl) を加え、氷上で 30 分間静置した。900 μl の 40% PEG を含む STC buffer を加え室温で 10 分間静置した。静置後、全反応液を 50°C に保った 5 ml の 0.8% 再生培地に加え十分に攪拌した。10 ml の 1.5% 再生培地上に被せ、固化させた。約 12 時間後、50°C に保った 5 ml の 1.0% 寒天培地に最終的に全体が 100 ppm になるよう、選抜用の抗生物質を加えた。その後、それぞれのプレートに被せ、固化させ、26°C で培養した。1 週間後、出現したコロニーを 100 ppm の抗生物質含有選抜培地 (PDA + 抗生物質) に植え継いだ。

12. プローブの作製

DIG DNA Labeling Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて、DIG 標識 dUTP を用いた PCR を行うことで、プローブを作製した。手順は添付のマニュアルに従った。DIG でラベルした PCR 反応液を、0.5 \times TBE で調製した 2.0% アガロースゲル上でラベルされていない PCR 反応液とともに電気泳動し、DIG によりラベルされていることを確認した。この DNA をゲル抽出し、プローブとして用いた。

13. サザンブロッティング

サザンブロッティングは赤木 (赤木 2010) の方法に従った。ゲノミック DNA のナイロン膜 (Hybond N⁺, GEヘルスケア) への転写は、アルカリ法により行った。まず、ゲルを UV chamber でニッキングし、Transfer buffer で 30 分、2 度平衡化することによってゲル中の DNA を一本鎖にした。続いて同 buffer を用い、capillary transfer (柘植ら 1993) によってゲル中の DNA をナイロン膜上に 24 時間転写した。転写後、ナイロン膜を Neutralizing buffer 中で 30 分、2 度穏やかに振とう (35 strokes/min) して中和した。次に、室温で 30 分乾燥後、UV chamber で DNA をナイロン膜上に固定した。DNA を転写したナイロン膜をハイブリダイゼーション液で 65°C、約 2-5 時間プレハイブリダイゼーションした後、プローブを含む 15 ml のハイブリダイゼーション液と入れ替え、65°C で約 15 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、ナイロン膜を 65°C

下、0.1% SDS を含む 0.1×SSC buffer で 30 分、2 度洗浄した。ナイロン膜を buffer 1 中で 5 分間平衡化し、その後 buffer 2 中で、45 分以上振とうした。

抗体 [Anti-digoxigenin-AP fragment (Roche)] を buffer 1 で 1 万倍に希釈し、20 ml 中にナイロン膜を入れ 25 分間振とう後、0.3% Tween20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate) を含む buffer 1 で 20 分、2 度洗浄した。その後、ナイロン膜を buffer 3 で 5 分間平衡化した後、10 µl の CSPD (Roche) を含む 1 ml の buffer 3 をプラスチックバックに移したナイロン膜に加え、37°C、暗黒化で 10 分間静置した。最後に、ナイロン膜を X 線フィルム (FUJI MEDICAL X-RAY FILM, Fuji Film) とともに静置、あるいはルミノイメージアナライザー (富士フィルム、LAS4000EPUVmini-TU) でシグナルを検出した。検出後、ナイロン膜を buffer 4 で 20 分、2 度洗浄した。再度ハイブリダイゼーションを行う場合を考え、Probe stripping buffer 中、37°C で 30 分間振とうすることでプローブを除去した。続いてナイロン膜を 2×SSC で 20 分、2 度洗浄し、室温で乾燥させ保存した。

14. 病原性検定

病原性検定に用いる孢子懸濁液の調整および葉への接種は赤木 (赤木 2010) の方法に従って行った。

14-1. 孢子懸濁液の調製

PDA 上に菌を植菌し、2-3 日後 V8 寒天培地に植菌した。アッセイに使用するために 1 菌株当たり 5-10 枚植菌した。シャーレに 8 割程度、菌糸が覆った時に、BLB ライトを一晩、照射した。その後、数日間静置し、培地表面に孢子が見え始めた頃に孢子を回収した。培地に 0.1% tween20 を含む滅菌水を 5 ml 程度かけ、ゴムベラで表面を擦り、孢子を遊離させてビーカーに集めた。ビーカー内でよく攪拌した後、キムワイプで濾過することで余分な菌糸を除去した。数回遠心により洗浄した後、孢子をトーマ氏血球計で計測し、0.1% tween20 を含む滅菌水で 10^6 個/ml に調整した。

14-2. 接種実験

孢子接種は形質転換体などを扱うため、50 ml チューブを使い、行った。サンプル植物は切り取り葉を使用し、良く水で洗浄した後、キムタオルで水分を拭き取った。この切り取り葉を、上記 1 で得られた孢子懸濁液を 5-10 ml 入れた 50 ml チューブの中に浸した。孢子懸濁液が葉の表面に行き渡るように緩やかにチューブを回転させた。その後、葉裏を表にして室温および湿度 100% のチャンバー内で 3-5 日静置後、葉の状態をデジタルカメラで撮影した。

15. AAL 毒素検定

AAL 毒素の抽出、毒素のアッセイおよび HPLC 解析は赤木 (赤木 2010) の方法に従って行った。

15-1. AAL 毒素の抽出

PDA 培地で生育させた菌体をメスで 5 mm 角に細断し、20 の断片を 50 ml の変法リチャーズ培地に接種し、1-2 週間静置培養した。培養ろ液を 10-20 ml コーニングチューブに移し、 -80°C で凍結させた。凍結したチューブを 1-2 日ほど凍結乾燥機にかけた。凍結乾燥後、チューブに 1 ml の 50%アセトニトリルを加えて、1 時間振とうした (タイテック, INCUBATOR Personal-10, 80 strokes/min)。振とう後、13,000 rpm、1 分遠心し、上清を Sep-Pac C18 カラム (Waters) に通して純化した。カラムは最初に、100%アセトニトリルを通し、その後 milliQ を通してカラム内を洗浄した。次にサンプル (上清)、milliQ (2 ml)、15%アセトニトリル (2 ml) を順に入れた。最後に 70%アセトニトリル (2 ml) で抽出した。抽出した AAL 毒素は -4°C で保存した。これを葉へのアッセイおよび HPLC に使用した。

15-2. 葉へのアッセイ

シャーレ内に 5 mm 角程度のろ紙 (Whatman, 3MM CHR) を置き、上記 15-1 で得た抽出物を 25 μl 滴下し、しみ込ませた。クリーンベンチ内で風乾させ、アセトニトリルを蒸発させた。検定用の葉は切り取り葉を使用し、葉の裏にキムワイプを軽く擦りつけることで傷を付けた。傷部分に抽出物をしみ込ませておいたろ紙をのせ、25 μl の水を滴下し、室温、湿度 100%のチャンバー内で静置した。3-5 日後の葉の状態をデジタルカメラで撮影した。

15-3. HPLC

o-phthalaldehyde (OPA) により蛍光誘導体化した培養ろ液中の AAL 毒素の HPLC による検出は、児玉らの方法 (Kodama et al. 1995) を一部改変して行った。OPA 試薬は、1 ml の 100%メタノールに溶かした 40 mg の OPA と 50 μl の 2-mercaptoethanol と 5 ml の 0.1 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) を混合して作成した。試料溶液 25 μl に OPA 試薬 125 μl を混合した後、30 秒間ボルテックスし、2 分 30 秒間、室温で静置した後、直ちに HPLC カラムに注入した。HPLC 分析は、655 LC コントローラー、F-1050 蛍光検出器、D-2500 クロマトインテグレーター (日立) によって行った。カラムは、Develosil ODS-UG-5 (4.6 \times 250 mm、野村化学) および Develosil ODS-UG-5 ガードカートリッジカラム (4.0 \times 10mm、野村化学) を用い、メタノール/0.1 M リン酸二水素ナトリウム緩衝液 (pH 3.35)、75 : 25 (v/v) の溶媒系で、0.7 ml/min の流速で

溶出した。なお、検出は励起波長 335 nm および検出波長 440 nm で行った。

16. KO 株への相補実験、選抜および機能解析

KO 株への遺伝子の相補は、以下の手順で行った。まず、相補する遺伝子の開始コドンの 1 kb 程度上流、終止コドンの 0.5 kb 程度下流にプライマーを設計し、long PCR により、線状の PCR 産物を増幅した。この PCR 産物とジェネティシン耐性遺伝子 (*nptII*) を含むプラスミド、pII99 をコトランスフォーメーションすることで形質転換した。形質転換は線状の PCR 産物を 50 ng 程度加えることと、プラスミド DNA を 100 ng 同時に加える以外は材料および方法の 11、PEG 法による形質転換に従い行った。また、相補株の選抜、病原性、毒素検定および発現解析は上記方法により行った。

17: パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

17-1 染色体 DNA の調製

染色体 DNA の調製は、Brody と Carbon の方法 (Brody et al. 1989) を改変した赤木 (赤木 2010) の方法で行った。上記 2-10 で単離したプロトプラスト懸濁液を GMP buffer で再懸濁し、 2.0×10^8 個/ml になるように調整した。この懸濁液に 55°C で保温しておいた 1.4% 低融点アガロース (Agarose low melt preparative grade (BIO-RAD) in GMP buffer) を等量加え、よく攪拌した。これをプラグ作製用 mold (BIO-RAD) 中に分注し、5 分間 4°C で静置し、固化したのを確認してプラグを型から取り出した。作製したプラグは SE buffer 中で 55°C、24 時間以上処理した。タンパク質除去のため、1% N-Lauroyl sarcosine sodium-salt (SLS) および 2 mg Proteinase K (Merck) を含む 1 ml の 10×ET buffer 中にプラグを移し、50°C で 20 時間以上処理した。プラグは 1×ET buffer で 2 度以上洗浄した後、同 buffer 中に 4°C で保存した。

17-2 パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)

染色体の電気泳動は赤木 (赤木 2010) の方法に従い行った。ゲルは Pulsed Field Certified Agarose または低融点アガロース (BIO-RAD) を、buffer は 0.5×TBE buffer を用いた。また泳動装置は Contour-clamped Homogenous Electric Field Dynamically Regulated II あるいは III (CHEF-DRIII) system (BIO-RAD) を使用した。今回行った泳動条件は表 7 に示した。泳動終了後、アガロースゲルを 0.5 μg/ml 臭化エチジウム (EtBr) で染色、蒸留水で脱色後、UV トランスイルミネーター上で観察した。またサイズマーカーとして、*Saccharomyces cerevisiae*、*Shizosaccharomyces pombe* および *Hansenula wingei* (BIO-RAD) を用いた。

表 7 CHEF の条件

		切替時間	電圧	時間	サイズ	温度	ゲル濃度
A	1	0.5 s	6 V/cm	0.5 h	50-150 kb	10	1.0%
	2	8 s		0.5 h			
	3	1 s		3 h			
	4	2 s		3 h			
	5	4 s		6 h			
	6	8 s		6 h			
B	1	5-25 s	5 V/cm	22 h	100-400 kb	8	1.0%
	2	1-40 s		18 h			
C	1	3600-1800 s	1.5 V/cm	115 h	0.5-5.0 Mb	8	0.8%
	2	1800-1300 s	1.5 V/cm	24 h			
	3	1300-800 s	1.8 V/cm	28 h			
	4	800-600 s	2.4 V/cm	28 h			
D	1	120 s	5.5 V/cm	12 h	0.5-2.0 Mb	8	0.8%
	2	180 s		12 h			
E	1	60 s	6 V/cm	15 h	1.0-2.8 Mb	14	0.8%
	2	90 s		6-8 h			
F	1	1500-3000 s	1.5 V/cm	48 h	1-5 Mb>	10	0.8%
	2	900-1500 s	1.8 V/cm	40 h			
	3	480-900 s	2.4 V/cm	57 h			
G	1	1-6 s	6 V/cm	11 h	5-75 kb	14	1.0%
H	1	120-180 s	6 V/cm	24 h	0.5-1.2 Mb	14	
I	1	120 s	4 V/cm	13 h	0.5-3 Mb	14	0.8%
	2	240 s		13 h			
	3	360 s		13 h			
J	1	50-90 s	6 V/cm	12 h	0.5-1.0 Mb	14	0.8%

全て 0.5xTBE バッファーを用いて行った。

18: 遺伝子ホモログのスクリーニング

萎枯病菌 As-27 および AL12 のドラフトゲノムシーケンス解析を行い、それぞれ 5847 および 2016 のコンティグが得られた。このデータを基に BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) を使い、検索したい遺伝子配列をクエリーにし、Local BLAST 検索を行った。クエリーには *A. nidulans* の遺伝子を用いた。アミノ酸の予測には Softberry FGENESH (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) を用いた。

第3章 茎枯病菌における病原性関連遺伝子の探索

第1節 序論

トマト病原型であるトマトアルターナリア茎枯病菌 (*A. alternata* tomato pathotype、以下、茎枯病菌) は宿主特異的AAL毒素を生産し、感受性トマト品種にのみ著しい壊死を引き起こす。AAL毒素は、遠縁の *Fusarium* 種が生産するマイコトキシン、フモニシンの構造類縁体であり、それぞれの毒素生合成に必須であるポリケチド合成酵素 (PKS) 遺伝子 (茎枯病菌においては *ALT1*、*Fusarium* 種においては *FUM1*) が、ディジェネレートプライマーを使ったクローニングにより単離されている (Akamatsu et al. 2003, Proctor et al. 1999) (図 1)。これら遺伝子はアミノ酸レベルで高い相同性があり、また周辺のシーケンス解析により、互いに相同性の高い遺伝子クラスターが見出された。茎枯病菌では、CDC の全配列解析により、13 遺伝子からなる AAL 毒素生合成遺伝子クラスター (*ALT* クラスター) が、CDC 上に 2 セット座乗していることが示唆されている。また、当研究室では、CDC の全配列の解析とは別に、次世代シーケンサー、ロシュ 454 FLX およびイルミナ HiSeq を使用した茎枯病菌ドラフトゲノム解析を行い、ほぼ全ゲノムのシーケンス情報を得ている。

本研究では、茎枯病菌のゲノム情報を利用した病原性関連性遺伝子の探索および機能解析を試みた。茎枯病菌は、上述のように全ゲノムのドラフトゲノム情報とともに、AAL 毒素生合成に関わる *ALT* クラスターが座乗する CDC の完全な配列情報が利用出来る。また、これまでに蓄積された一連の遺伝子 KO 実験のプロトコルにより、容易に目的遺伝子の機能解析が可能である。

13 遺伝子と推定される *ALT* 遺伝子は、これまでに *ALT1-4*、7-9 および 13 の 8 遺伝子において機能解析が行われており、これらのうち *ALT1-4* および *ALT13* は AAL 毒素生合成に関与していることが示唆されている (赤木 2010, 中林 2010, 中道 2010, 浜 2011)(表 1)。一方、ABC transporter、short chain dehydrogenase/reductase、fatty acyl-CoA、phytanoyl-CoA synthetase および peptide synthetase をそれぞれコードすると推定される *ALT5*、6 および 10-12 の 5 遺伝子は機能未知である。これら *ALT* 遺伝子の機能解析を行うことにより AAL 毒素生合成経路が詳細に説明出来ると考えられる。

茎枯病菌に限らず、病原性 *A. alternata* の多くは、それぞれの HST 生合成遺伝子および遺伝子クラスターを CDC に保持していることが明らかとなっているが、CDC 上の遺伝子のみが病原性を担っているのか、CDC 以外の essential chromosome (EC) 上にも病原性遺伝子を保持しているのかは分かっていない。他の植物病原菌にお

いてその病原性に重要であることが示唆されているメラニン生合成に関わる遺伝子

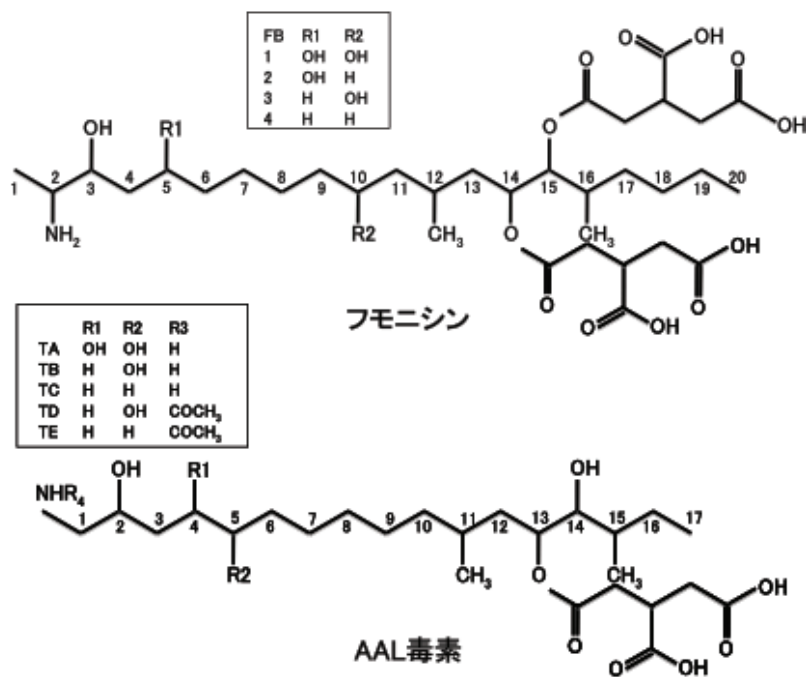


図1 フモニシンとAAL毒素の構造

(Kubo et al. 1982) や G タンパク質 α サブユニット (Wang et al. 2010) の機能解析が *A. alternata* において行われたが、どれも病原性に必須ではないことが示唆されている (Takano et al. 1995, Kheder et al. 2012, Yamagishi et al. 2006, Tsuge et al. 1990)。

ゲノム情報が活用できなかった頃は、ある菌で病原性遺伝子が見出されたとしても、その配列が種を超えて高度に保存されているような場合以外は、クローニングは困難であった。当研究室でも、G タンパク質共役型受容体(GPCR) のクローニングを試みたが、クローニングは出来なかった。一方、予備実験により、茎枯病菌の全ゲノムドラフトデータから、GPCR のホモログを検索したところ、数遺伝子が候補遺伝子として選抜された。このように、以前はクローニングが非常に難しかった遺伝子がゲノム情報を基に検索可能であることから、既知の病原性関連遺伝子に基づき、茎枯病菌における病原性関連遺伝子の探索を試みた。

第2節 材料と方法

1: 供試菌

供試菌には茎枯病菌 As-27 菌株、リンゴ斑点落葉病菌 IFO8984 菌株およびイチゴ黒斑病原型 NAF8 菌株を使用した。菌株の培養および保存は 2-1 に従った。

2: DNA 操作

DNA や RNA の抽出、簡単な操作は第 2 章に従った。

3: KO 用コンストラクトの作成および KO 株の作出

コンストラクトの作製および KO 株の作出は 2-9, 10, 11 に従った。KO 株の確認は PCR により、*hph* の内部領域、各遺伝子の内部領域および任意の位置で組換えが起きたことを確認する *Homo* の領域を増幅した。

4: サザンブロットイング

2-14 に従い、各遺伝子の KO 候補株のサザンブロットイングを行った。

5: 発現解析

これら各遺伝子 KO 株の実際の発現を調べた。2-4 に従い RNA を抽出後、2-5 に従い、cDNA の合成を行った。この cDNA をテンプレートに遺伝子の内部領域を増幅するプライマーで PCR を行い、そのバンドの有無で発現を調べた。

6: 病原性および毒素生産能検定

病原性検定および毒素生産能検定は 2-14, 15 に従った。また、HPLC 解析も同様に 2-15-3 に従った。病斑面積の測定はフリーソフトの Image J を用いた。

7: KO 株の相補実験

相補実験は、野性株と比較し明らかな変化がある KO 株にのみ行った。相補菌株の作出、選抜および機能解析は 2-16 に従った。

8: 菌糸成長および孢子サイズの比較

コロニー比較には PDA, V8, crossing 培地および crossing 培地にそれぞれ+5%の sucrose, glucose および mannitol を添加した培地のプレートを使用した。液体培地での菌糸成長比較には PDB および変法リチャーズ培地を用いた。約 2 週間、静置また

は震とう培養し、野性株と変異株を比較した。

胞子サイズは病原性検定に用いた胞子を観察に用いた。顕微鏡およびカメラは Nikon, Eclipse TE300 Microscope を用いた。

9: Real-time PCR

AaLaeA 遺伝子の KO 株における CD 染色体に座乗する遺伝子の発現解析は 2-5 に従い行った。特に RNA の濃度を野性株と KO 株で揃えることに留意した。

10: 遺伝子の座乗染色体の特定

プロトプラストは形質転換と同様に 2-10 に従い分離した。2-17 に従い、電気泳動を行った後、2-13 に従い、ブロッティングを行った。

第3節 結果

1. CD 染色体に座乗する遺伝子の機能解析

1-1. *ALT* 遺伝子の形質転換と KO 株の選抜

ALT クラスタに存在する 13 の *ALT* 遺伝子のうち、これまでに機能が報告されていない *ALT5*、6、10、11 および 12 の機能解析を行った。これら遺伝子はそれぞれ ABC transporter、short chain dehydrogenase/reductase、fatty acyl-CoA synthetase、phytanoyl-CoA synthetase および peptide synthetase をコードしていると予想されている (表 1)。また、フモニシン生合成に関わる *FUM* 遺伝子、*FUM19*、13、10、3 および 14 とそれぞれ高い相同性が認められている。さらに、これら遺伝子のうち、*ALT5*、6 および 10 は本菌のゲノム中に 2 コピー存在し、*ALT11* および 12 は 4 コピー存在することが CDC の構造解析から見出されている。

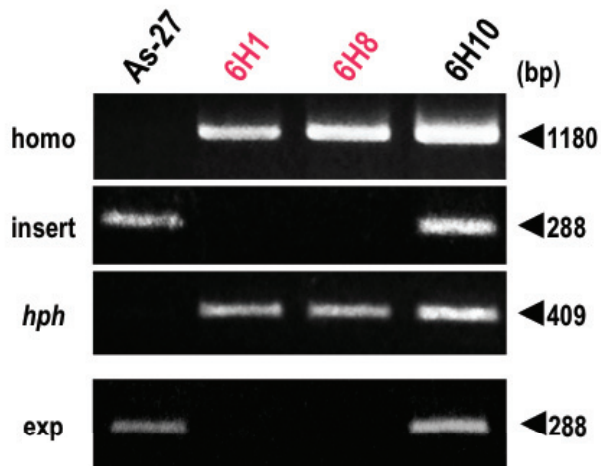
これら遺伝子の KO 実験は、材料と方法で述べたように PEG 法を使った形質転換により行った。形質転換体かどうかの確認は、導入した抗生物質耐性遺伝子に対応する抗生物質が 100 ppm 添加された PDA 培地で 3 度選抜することで行った。選抜した形質転換体は、材料と方法で述べたように PCR とサザン解析を組み合わせた方法で KO 株かどうかの確認をした。

ALT5、11 および 12 では、500 以上の形質転換体を得られたが、PCR による相同組込みの確認で候補株は得られなかった。*ALT6* では 65 の形質転換体を得られ、そのうちの 12 菌株を PCR で確認した結果、2 菌株で標的部分のバンド (insert) が得られず、代わりに相同組込みによって生じるバンド (homo) が検出された (図 2a)。これら 2 菌株のサザン解析では、相同組込みによって置換される配列をプローブとした場合、バンドはみられなかった (図 2b, c)。これらの結果から、これら 2 菌株を KO 株 (2 コピーとも破壊された株)、6H1 および 6H8 とし、以降の実験に用いた。また 1 コピー KO 株 (1 コピーは破壊されているが残りのコピーは無傷な株) と示唆された 6H10 株をコントロール株として以降の実験に用いた。*ALT10* では、90 の形質転換体を得られ、8 菌株が KO 株と示唆された。これら 8 菌株のうち 2 菌株 (10H36 および 10H39) を KO 株とし、また、1 コピー KO 株と示唆された 10H44 および 10H45 をコントロール株として以降の実験に用いた。

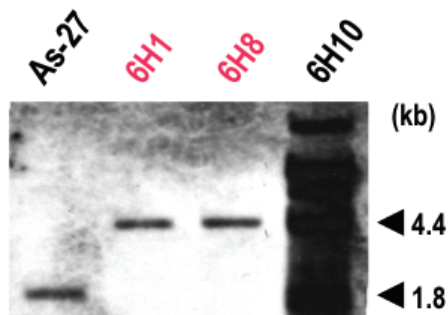
1-2-1. *ALT6* KO 株の病原性および AAL 毒素生産能検定

ALT6 KO 株の病原性を検定するため、材料と方法で述べたように胞子を調整し、感受性トマト品種、愛知ファーストに接種した。KO 株、6H1 および 6H8 ともに野生株でみられた病斑はみられなかった。一方、1 コピー KO 株である 6H10 は野生株と同

a



b



c

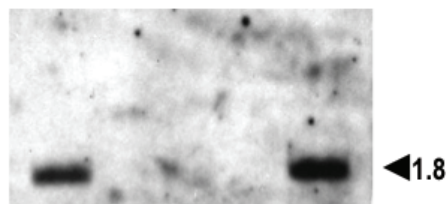


図2 PCR およびサザンブロットリングによる *ALT6*KO 株の選抜

a; PCR による *ALT6*KO 株の選抜

homo; 相同組込みにより生じるバンド

insert; 相同組込みにより *hph* カセットと置換されるバンド

hph; ハイグロマイシン B 耐性遺伝子の内部領域

exp; 培養 5 日目の RNA を抽出し cDNA を合成後、*ALT6* の発現を RT-PCR で確認した。

b; *ALT6*KO 株のサザンブロットリング

プローブ; *ALT6* A

c; *ALT6*KO 株のサザンブロットリング

プローブ; *ALT6* insert

As-27; 野性株、6H1, 6H8; *ALT6*KO 株、6H10; 1 コピーKO 株

等の病斑がみられた (図 3a)。材料と方法の 15-1-1 および 15-2 に従い、毒素抽出および毒素生産能検定を行った。その結果、野生株および 1 コピー KO 株、6H10 では壊死がみられた。一方、*ALT6*KO 株、6H1 および 6H8 では、全く壊死は見られなかった (図 3b)。AAL 毒素の定量のため HPLC 解析を行った。野生株および 1 コピー KO 株では、AAL-TA を示すピークが検出された。一方、KO 株、6H1 および 6H8 では、AAL-TA を示すピークは検出されなかった (図 3c)。毒素量の定量により、野生株では 71.5 $\mu\text{g/ml}$ 、KO 株、6H1 および 6H8 ではともに 0 $\mu\text{g/ml}$ 、1 コピー KO 株、6H10 では 24 $\mu\text{g/ml}$ の毒素が検出された (表 8)。

1-2-2. *ALT6*KO 株の相補実験

*ALT6*KO 株の相補は、材料と方法に従い、コトランスフォーメーションにより行った。ジェネティシン耐性遺伝子および導入した遺伝子の内部領域を PCR で検出することで、遺伝子の導入を確認した。KO 株 6H8 株の相補により、目的遺伝子が導入された株が 2 株得られた。これら菌株の病原性および毒素生産能検定を行ったが、病原性および毒素生産能は復帰しなかった。

1-3. *ALT10*KO 株の相補実験、成長比較、病原性および AAL 毒素生産能検定

*ALT10*KO 株の相補は、*ALT6*と同様に行った。PCR およびサザン解析により相補株 10H36::*G1* および 10H36::*G8* が得られた (図 4)。*ALT10*KO 株および相補株の病原性検定の結果、KO 株、10H36 に野生株でみられた病斑はみられなかった。一方、相補株 10H36::*G1* および 10H36::*G8* は野生株と同等の病斑がみられた (図 5a)。毒素生産能検定を行った結果、野生株および相補株、10H36::*G1* および 10H36::*G8* では壊死がみられた。一方、*ALT10*KO 株、10H36 では、全く壊死はみられなかった (図 5b)。HPLC 解析を行った結果、野生株および相補株では、AAL 毒素を示すピークが検出された。一方、KO 株、10H36 では、AAL-TA を示すピークは検出されなかったが未知のピークが検出された (図 6a)。このピークは LC-MS 解析の結果、トリカルボン酸のない pentolamine と同一の質量が示された (データなし)。毒素量の定量により、野生株では 26.0 $\mu\text{g/ml}$ 、KO 株、10H36 では 0 $\mu\text{g/ml}$ 、相補株、10H36::*G1* では 42.0 $\mu\text{g/ml}$ 、10H36::*G8* では 17.0 $\mu\text{g/ml}$ の毒素が検出された (表 9)。菌糸成長比較を行ったところ、PDA 培地では差はみられず、ハイグロマイシン B 含有培地では、野生株以外は成長に差はみられなかった。ジェネティシン含有培地では、野生株および KO 株、10H36 において菌糸の成長はみられなかった。相補株、10H36::*G1* および 10H36::*G8* では菌糸の成長に差は見られなかった (図 6b)。

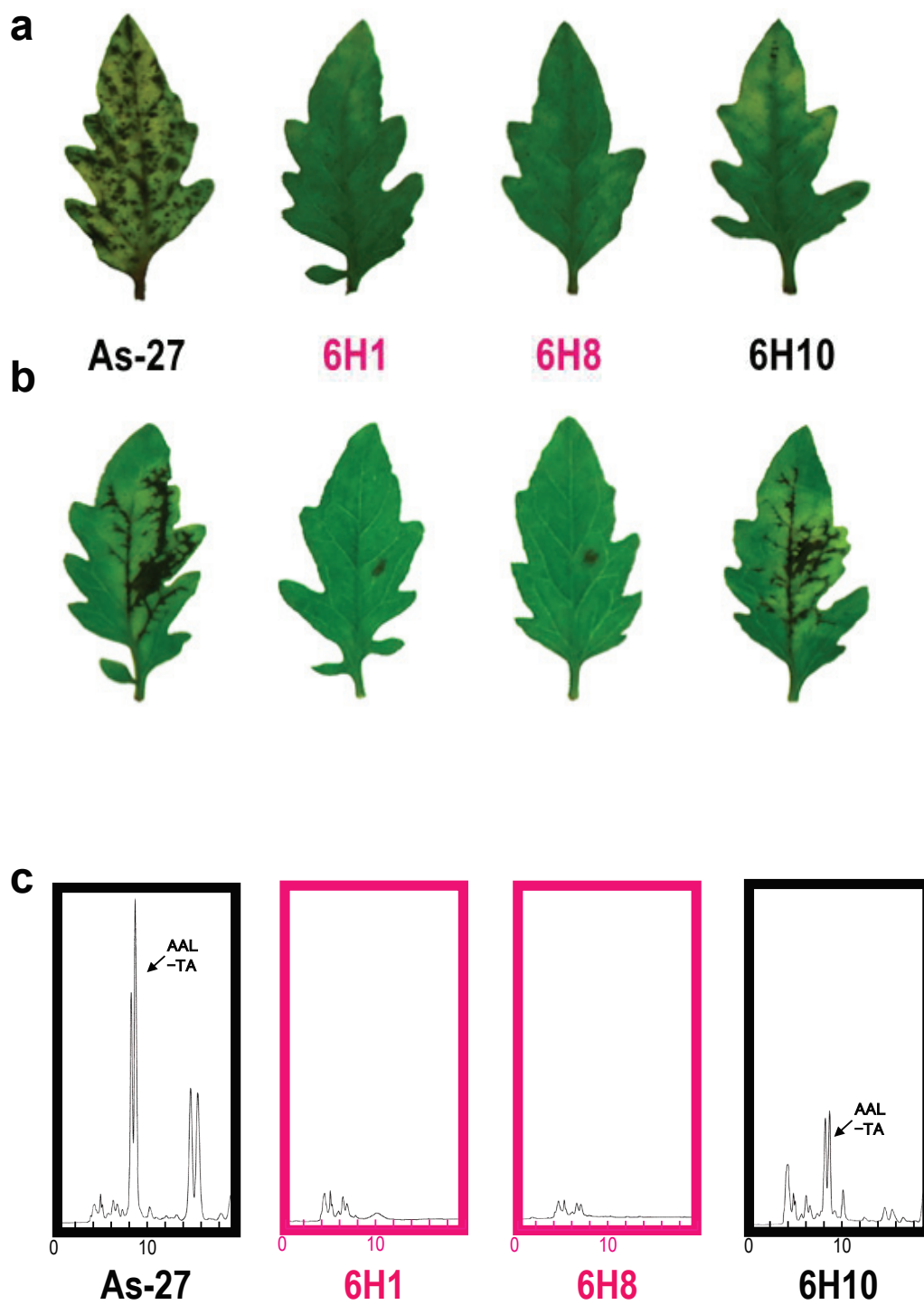


図3 *ALT6KO* 株の病原性検定、毒素生産能検定および HPLC 解析

a; *ALT6KO* 株の病原性検定

b; *ALT6KO* 株の毒素生産能検定

c; *ALT6KO* 株の HPLC 解析

As-27; 野性株、6H1, 6H8; *ALT6KO* 株、6H10; 1 コピー-KO 株

表 8 HPLC による AAL 毒素の定量

菌株	AAL-TA ($\mu\text{g/ml}$)
As-27	71.5 $\mu\text{g/ml}$
6H1	0 $\mu\text{g/ml}$
6H8	0 $\mu\text{g/ml}$
6H10	24 $\mu\text{g/ml}$

HPLC 解析に基づいて AAL-TA の定量を行った。

As-27; 野性株

6H1, 6H8; *ALT6*KO 株

6H10; 1 コピー-KO 株

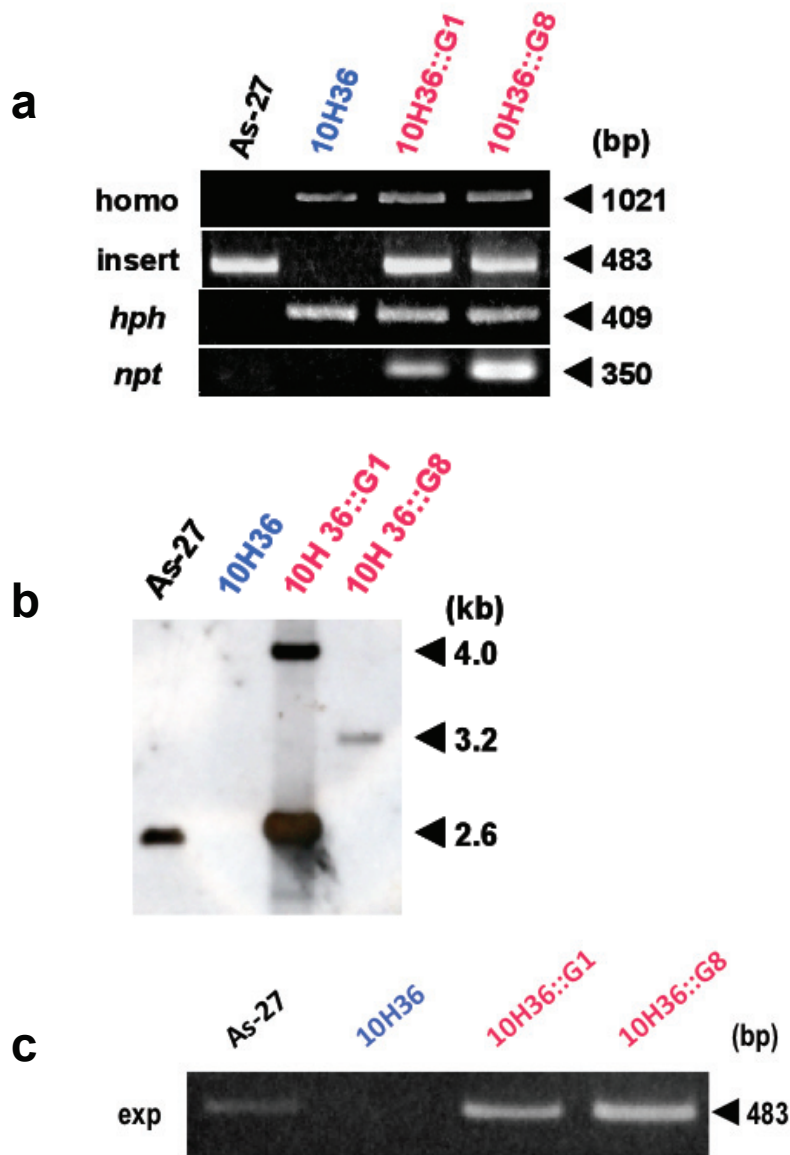


図4 PCR およびサザンブロットングによる *ALT10*KO 株と相補株の選抜

a; PCR による *ALT10*KO 株および相補株の選抜

homo; 相同組込みにより生じるバンド

insert; 相同組込みにより *hph* カセットと置換されるバンド

hph; ハイグロマイシン B 耐性遺伝子の内部領域

npt; ジェネティシン耐性遺伝子の内部領域

b; *ALT10*KO 株および相補株のサザンブロットング

プローブ; *ALT10* insert

c; *ALT10*KO 株および相補株の *ALT10* の発現解析

菌体を4日間培養後、RNAを抽出しcDNA合成した。得られたcDNAをテンプレートに *ALT10* の発現をRT-PCRで確認した。

As-27; 野性株、10H36; *ALT10*KO 株、10H36::G1, 10H36::G8; *ALT10* 相補株

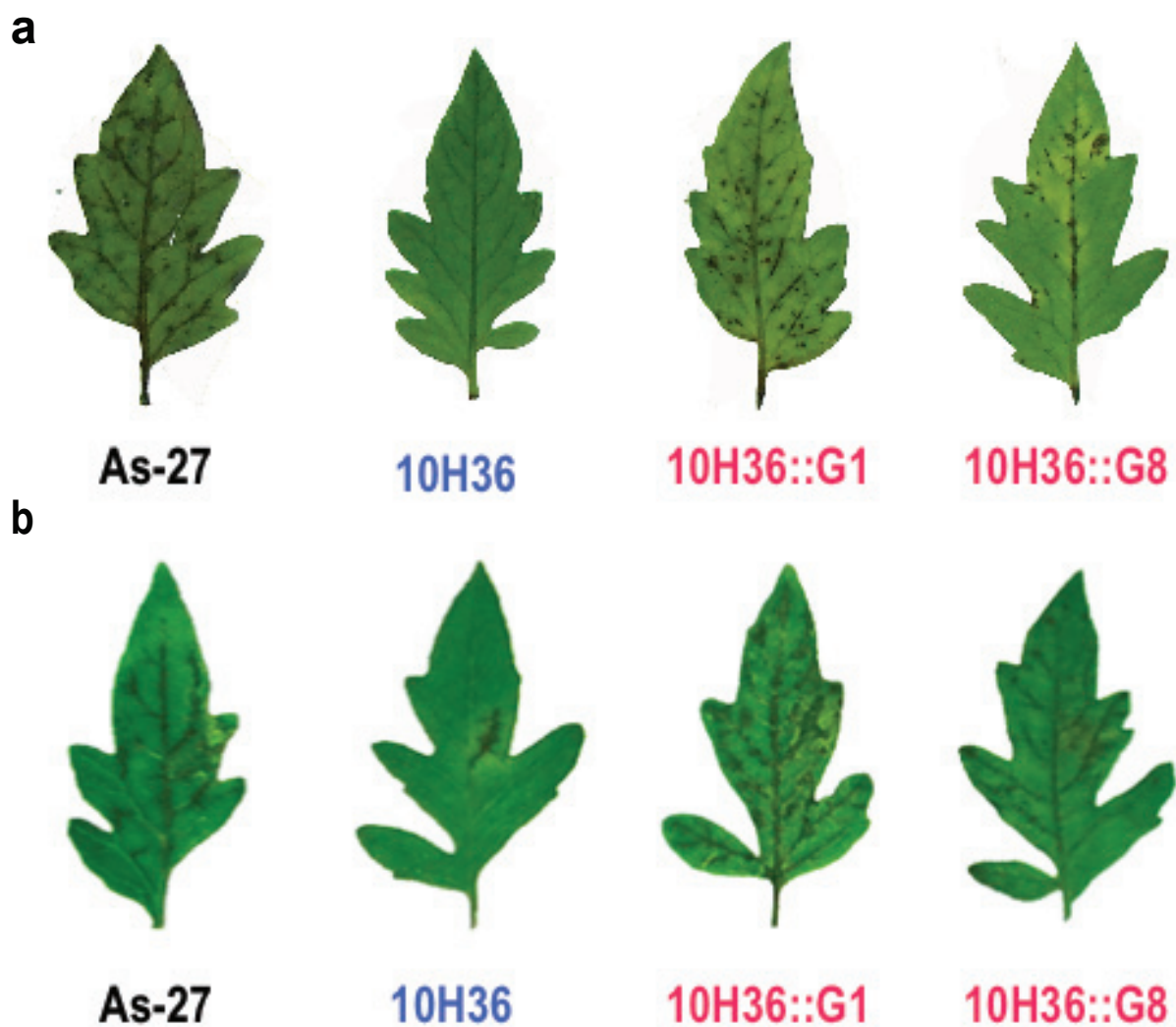


図5 *ALT10KO* 株および相補株の病原性および毒素生産能検定

a; *ALT10KO* 株と相補株の病原性検定

b; *ALT10KO* 株および相補株の毒素生産能検定

As-27; 野性株

10H36; *ALT10KO* 株

10H36::G1, 10H36::G8; *ALT10* 相補株

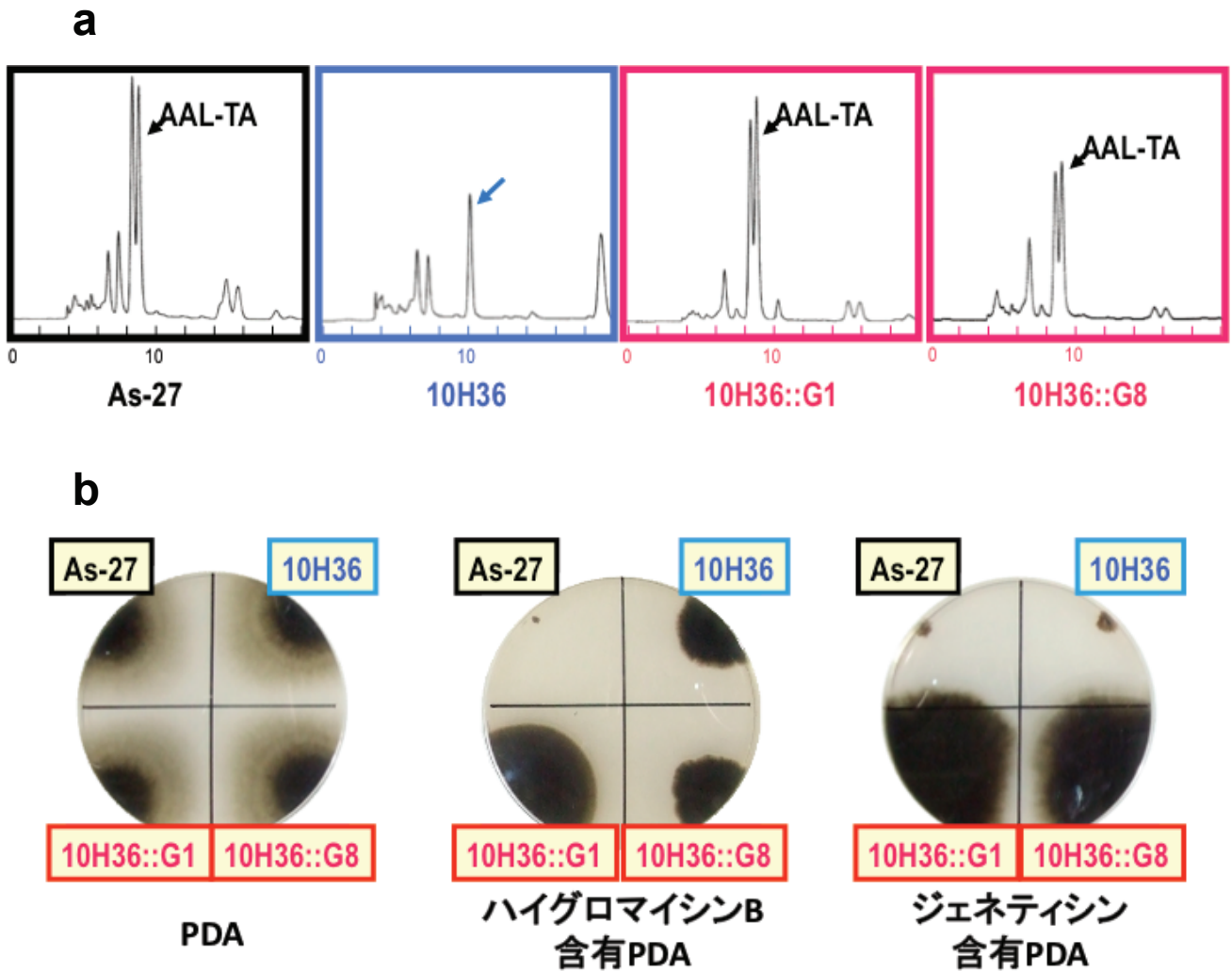


図6 *ALT10KO* 株および相補株の HPLC 解析および菌糸成長比較

a; *ALT10KO* 株と相補株の HPLC 解析

青矢印で示したピークは *ALT10KO* 株のみ見られた新規のピーク

b; *ALT10KO* 株と相補株の菌糸成長比較

抗生物質の濃度は 100 ppm

As-27; 野性株

10H36; *ALT10KO* 株

10H36::G1, 10H36::G8; *ALT10* 相補株

表 9 HPLC による AAL-TA の定量

菌株	AAL-TA ($\mu\text{g/ml}$)
As-27	26 $\mu\text{g/ml}$
10H36	0 $\mu\text{g/ml}$
10H36::G1	42 $\mu\text{g/ml}$
10H36::G8	17 $\mu\text{g/ml}$

HPLC 解析にもとづいて AAL-TA の定量を行った。

As-27; 野性株

10H36; *ALT10*KO 株

10H36::G1, 10H36::G8; *ALT10* 相補株

1-4-1. *TRF1-4* 遺伝子の形質転換と KO 株の選抜

CDC に存在する 4 つの転写調節遺伝子、*TRF1- TRF4* の機能解析を行った。これら遺伝子はそれぞれ Zn(II)₂Cys₆ 型の転写因子 (*TRF1* および *TRF2*)、C₂H₂ finger domain protein (*TRF3*) および C₆ zinc finger domain containing protein (*TRF4*) をコードしていると予想されている。PCR およびサザン解析の結果から、*TRF1* では、*TRF1H5* を KO 株とし、以降の実験に用いた (図 7)。同様に *TRF2* では、*TRF2H9* および *TRF2H45* を KO 株とし、以降の実験に用いた (図 8)。同様に *TRF3* では、*TRF3H2* を KO 株とし、以降の実験に用いた (図 9)。また、同様に *TRF4* では、*TRF4B4* および *TRF4D2* を KO 株、*TRF4A16* を一コピー KO 株とし、以降の実験に用いた (図 10)。

1-4-2. *TRF1-4* 遺伝子の菌系成長比較、HPLC 解析および発現解析

各菌株を PDA および V8 培地に植菌し、1 週間後の菌の形態を観察したが、野性株と KO 株に差はみられなかった。AAL 毒素の定量のため HPLC 解析を行った結果、*TRF1-4* の全ての菌株において AAL-TA を示すピークが検出された (図 7d) (図 8d) (図 9d) (図 10c)。*TRF1H5* において ALT クラスター遺伝子の発現解析を行った結果、野性株よりも KO 株の方がやや発現量が増加していた。また、*ALT1* において KO 株では最小のバンドが最も発現量が多かった (図 11)。

1-5-1. *AVE1* 遺伝子の形質転換と KO 株の選抜

CDC に存在する avenacinase をコードしていると予想されている *AVE1* 遺伝子の機能解析を行った。PCR およびサザン解析の結果から *AVH6* を KO 株とし、以降の実験に用いた (図 12a)。

1-5-2. *AVE1*KO 株の病原性検定およびトマチン耐性検定

病原性検定を行ったところ、野性株と KO 株に顕著な差はみられなかった (図 12b)。また、トマチン耐性検定を行った結果、野性株および KO 候補株の孢子発芽に顕著な差はみられなかった (データ無し)。

2. 常染色体に座乗する遺伝子の機能解析

2-1-1. *AaGPA1* 遺伝子の形質転換と KO 株の選抜

常染色体に存在する G protein α -subunit をコードすると推定される遺伝子、*AaGPA1* の機能解析を行った。PCR およびサザン解析の結果から *GPA1H1* および *GPA1H2* を KO 株とし、以降の実験に用いた (図 13a)。

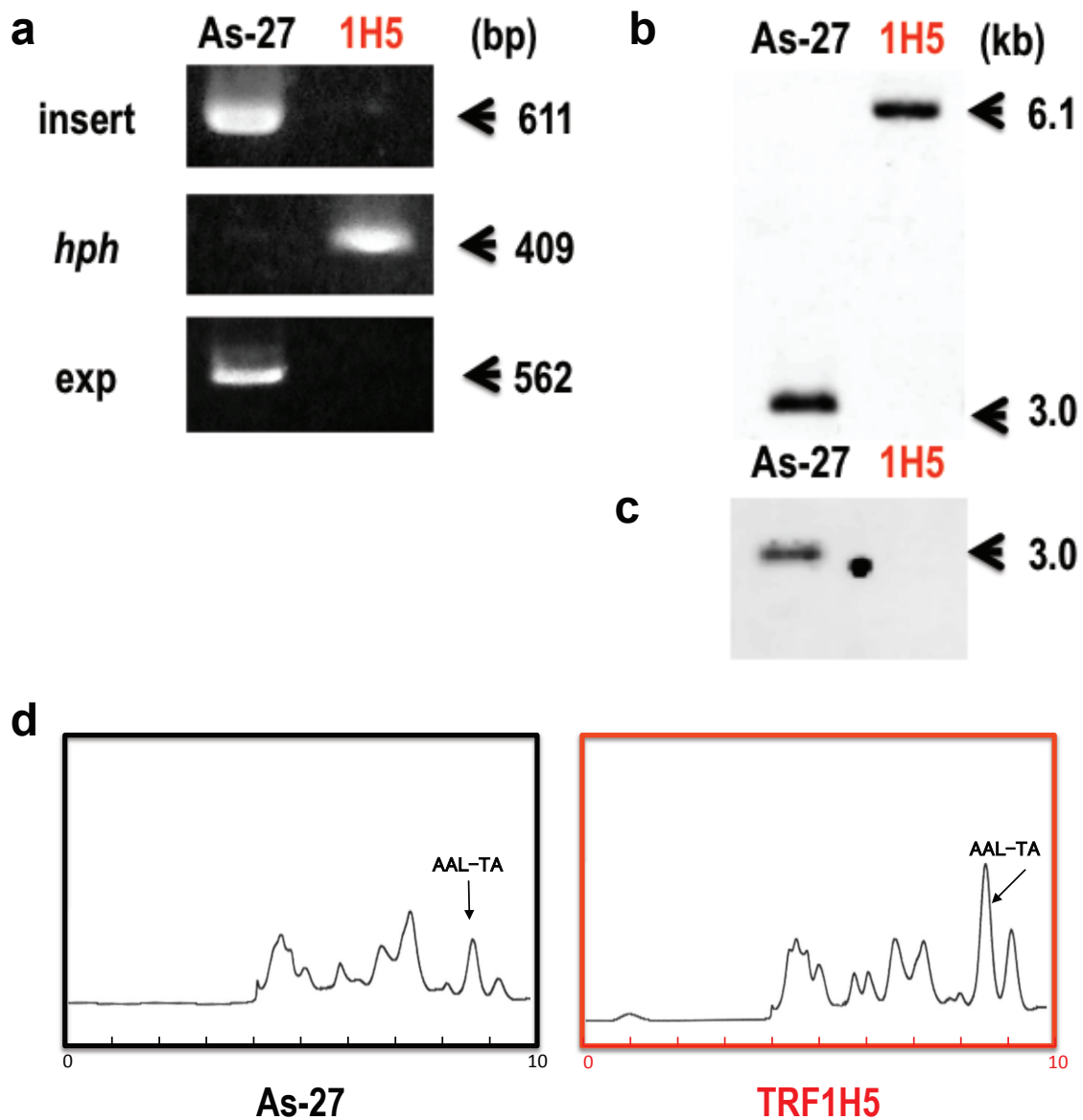


図7 PCRとサザンブロットイングによる *TRFIKO* 株の選抜および HPLC 解析

a; PCR による *TRFIKO* 株の選抜

insert; 相同組込みにより *hph* カセットと置換されるバンド

hph; ハイグロマイシン B 耐性遺伝子の内部領域

exp; RNA を抽出し cDNA を合成後、*TRF1* の発現を RT-PCR で確認した。

b; *TRFIKO* 株のサザンブロットイング、プローブ; *TRF1 A*

c; *TRFIKO* 株のサザンブロットイング、プローブ; *TRF1 insert*

d; *TRFIKO* 株の HPLC 解析

As-27; 野性株、1H5; *TRFIKO* 株

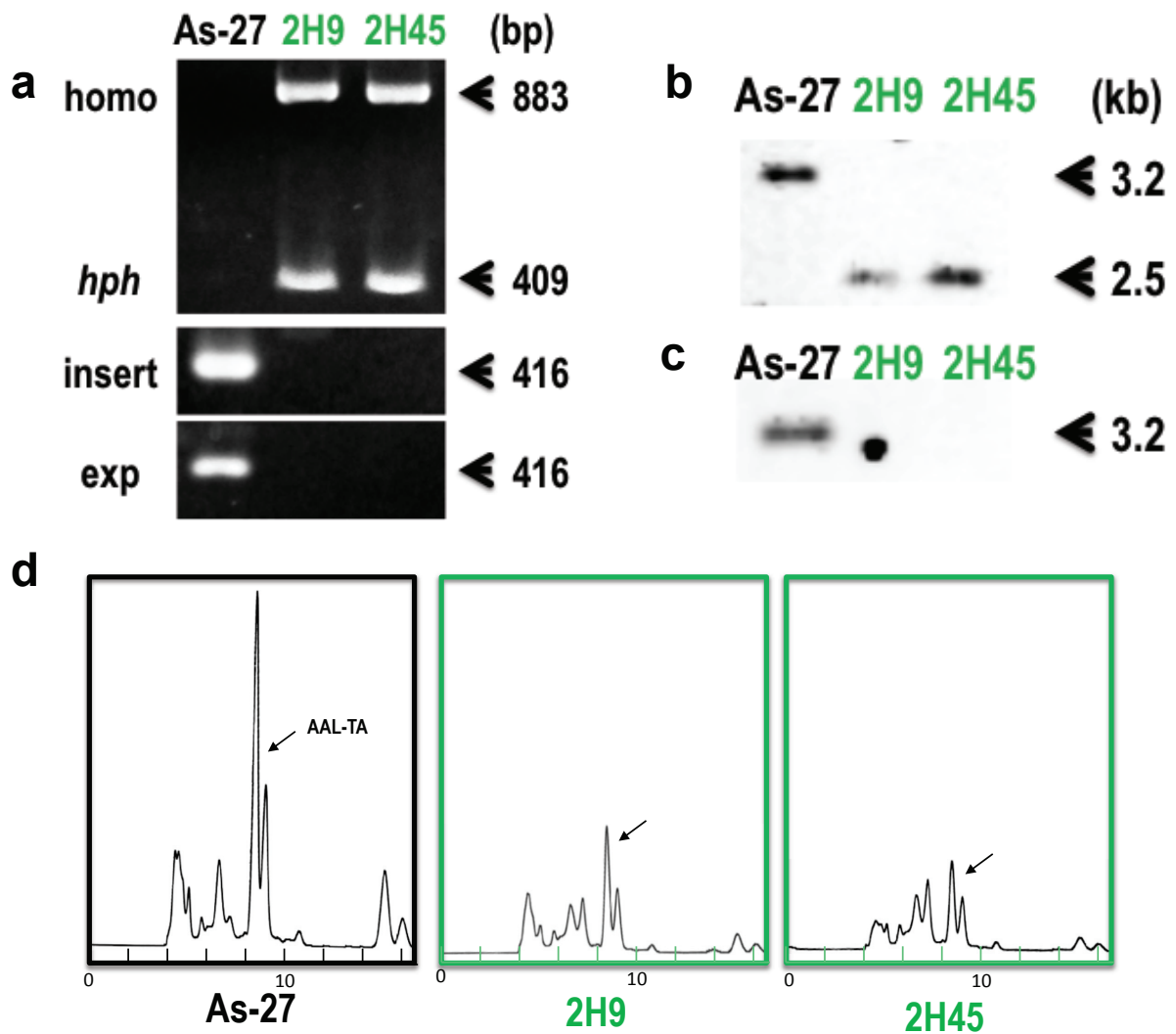


図 8 PCR とサザンブロッティングによる *TRF2*KO 株の選抜および HPLC 解析

a; PCR による *TRF2*KO 株の選抜

homo; 相同組込みにより生じるバンド

insert; 相同組込みにより *hph* カセットと置換されるバンド

hph; ハイグロマイシン B 耐性遺伝子の内部領域

exp; RNA を抽出し cDNA を合成後、*TRF2* の発現を RT-PCR で確認した。

b; *TRF2*KO 株のサザンブロッティング

プローブ; *TRF2* B

c; *TRF2*KO 株のサザンブロッティング

プローブ; *TRF2* insert

d; *TRF2*KO 株の HPLC 解析

矢印は AAL 毒素を示す。

As-27; 野性株、2H9, 2H45; *TRF2*KO 株

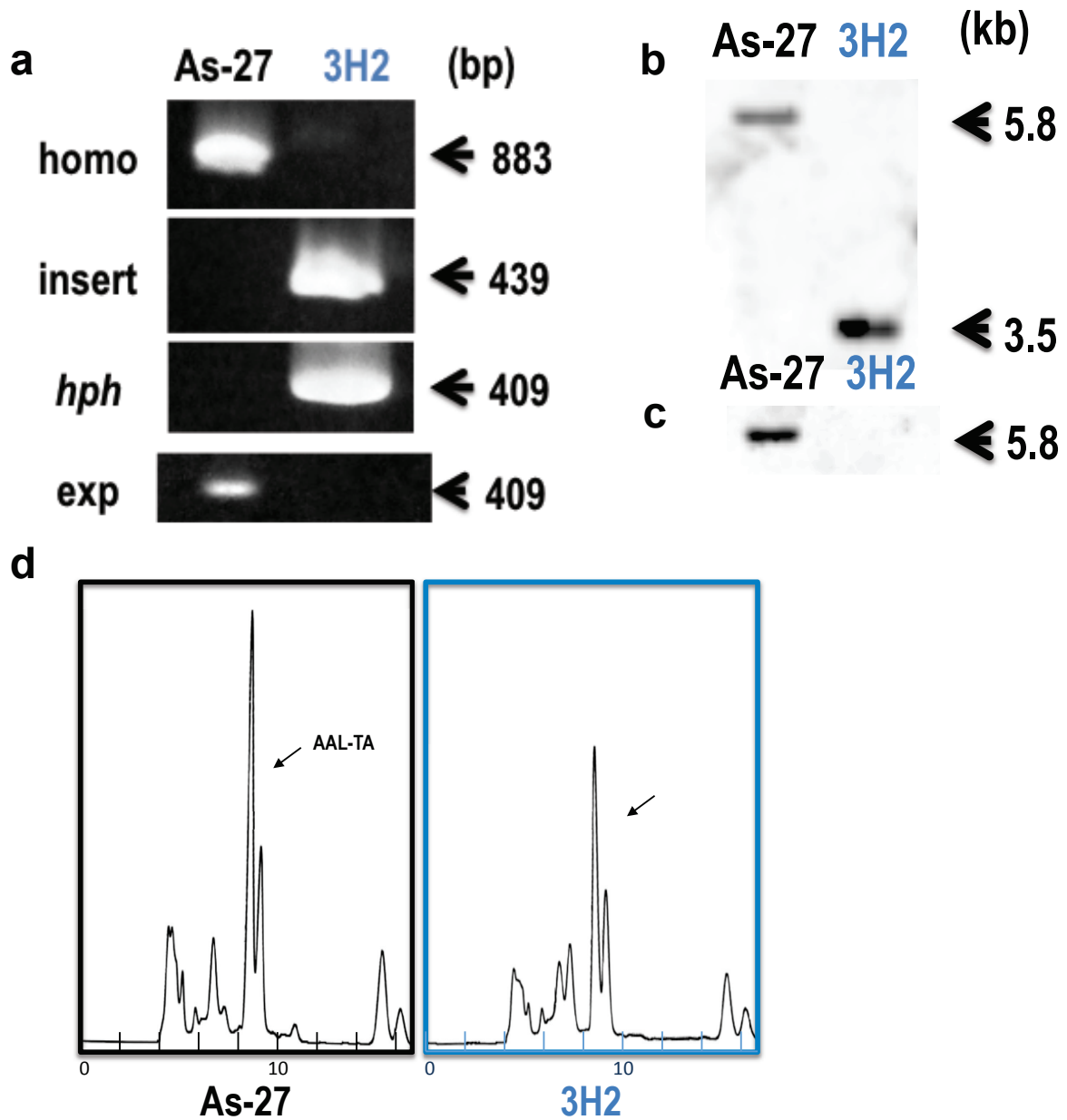


図9 PCRとサザンブロッティングによる *TRF3*KO 株の選抜および HPLC 解析

a; PCR による *TRF3*KO 株の選抜

homo; 相同組込みにより生じるバンド

insert; 相同組込みにより *hph* カセットと置換されるバンド

hph; ハイグロマイシン B 耐性遺伝子の内部領域

exp; RNA を抽出し cDNA を合成後、*TRF3* の発現を RT-PCR で確認した。

b; *TRF3*KO 株のサザンブロッティング、プローブ; *TRF3* B

c; *TRF3*KO 株のサザンブロッティング、プローブ; *TRF3* insert

d; *TRF3*KO 株の HPLC 解析

矢印は AAL 毒素を示す。

As-27; 野性株、3H2; *TRF3*KO 株

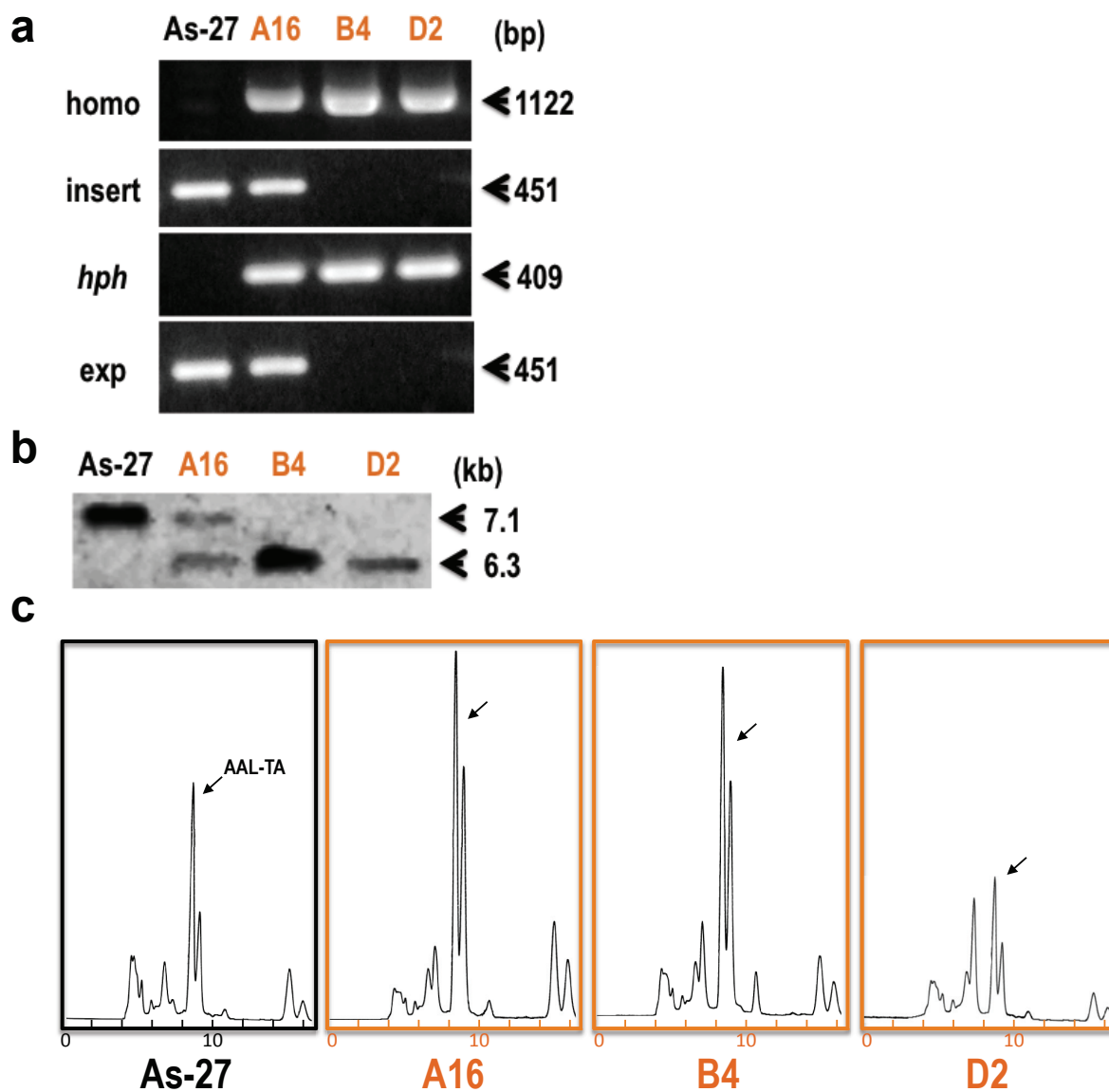


図 10 PCR とサザンブロットイングによる *TRF4*KO 株の選抜および HPLC 解析

a; PCR による *TRF4*KO 株の選抜

homo; 相同組込みにより生じるバンド

insert; 相同組込みにより *hph* カセットと置換されるバンド

hph; ハイグロマイシン B 耐性遺伝子の内部領域

exp; RNA を抽出し cDNA を合成後、*TRF4* の発現を RT-PCR で確認した。

b; *TRF4*KO 株のサザンブロットイング、プローブ; *TRF4* A

c; *TRF4*KO 株の HPLC 解析

矢印は AAL 毒素を示す。

As-27; 野性株、B4, D2; *TRF4*KO 株、A16; 一コピーKO 株

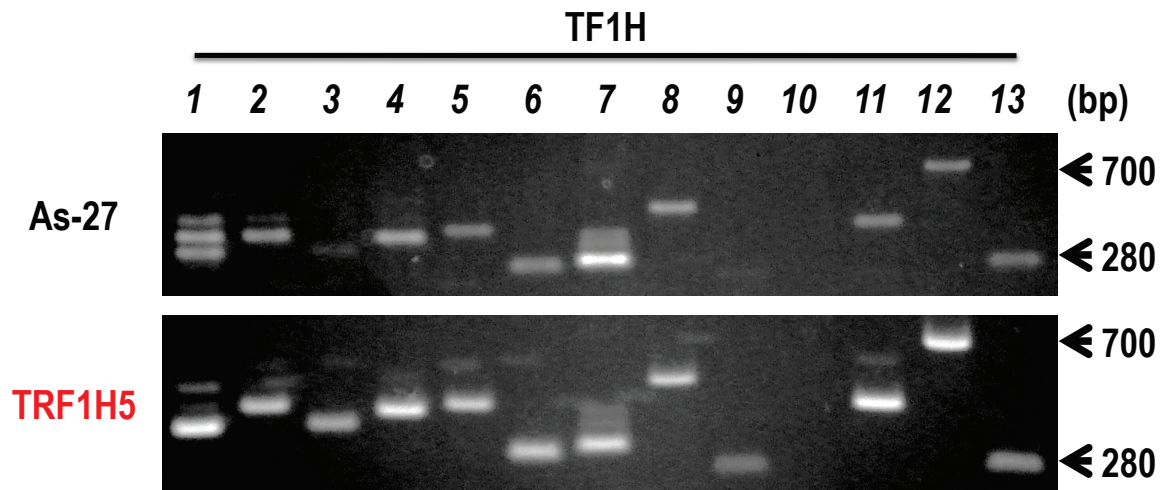


図 11 *TRF1KO* 株における *ALT* クラスター遺伝子の発現解析

RNA はリチャーズ液体培地で 5 日間振とう培養した菌体から抽出し、cDNA 合成後、*ALT* クラスター遺伝子の発現を RT-PCR で確認した。

As-27; 野生株

TRF1H5; KO 株

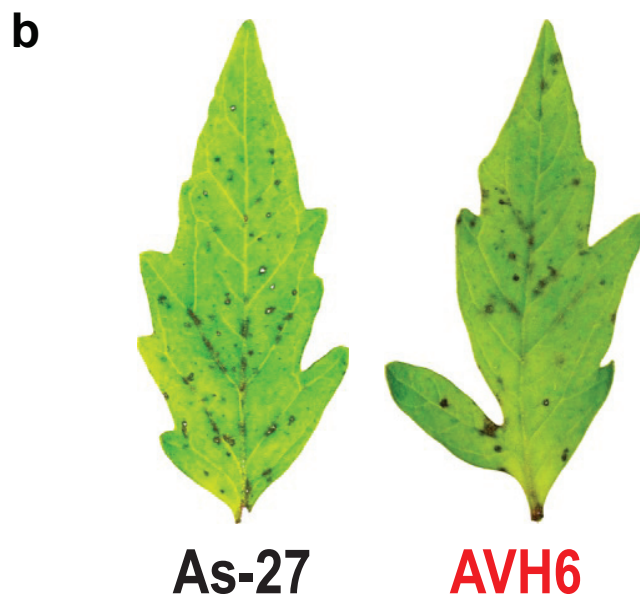
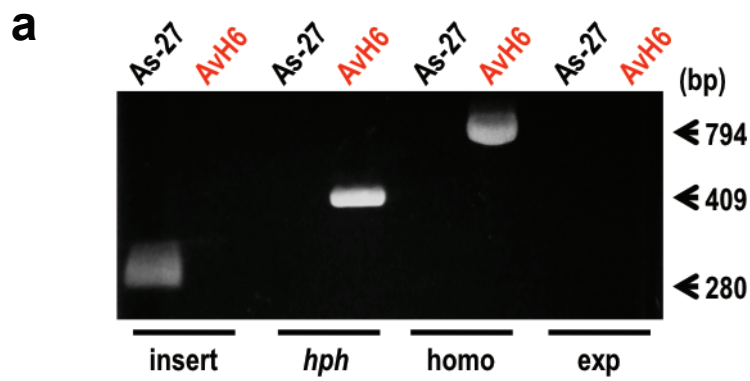


図 12 PCR による *AaAVE1KO* 株の選抜および病原性検定

a; PCR による *AaAVE1KO* 株の選抜

homo; 相同組込みにより生じるバンド

insert; 相同組込みにより *hph* カセットと置換されるバンド

hph; ハイグロマイシン B 耐性遺伝子の内部領域

exp; RNA を抽出し cDNA を合成後、*AaAVE1* の発現を RT-PCR で確認した。

b; 病原性検定

1×10^5 個/ml に調製した孢子懸濁液を使用した。

As-27; 野性株

AVH6; *AaAVE1KO* 株

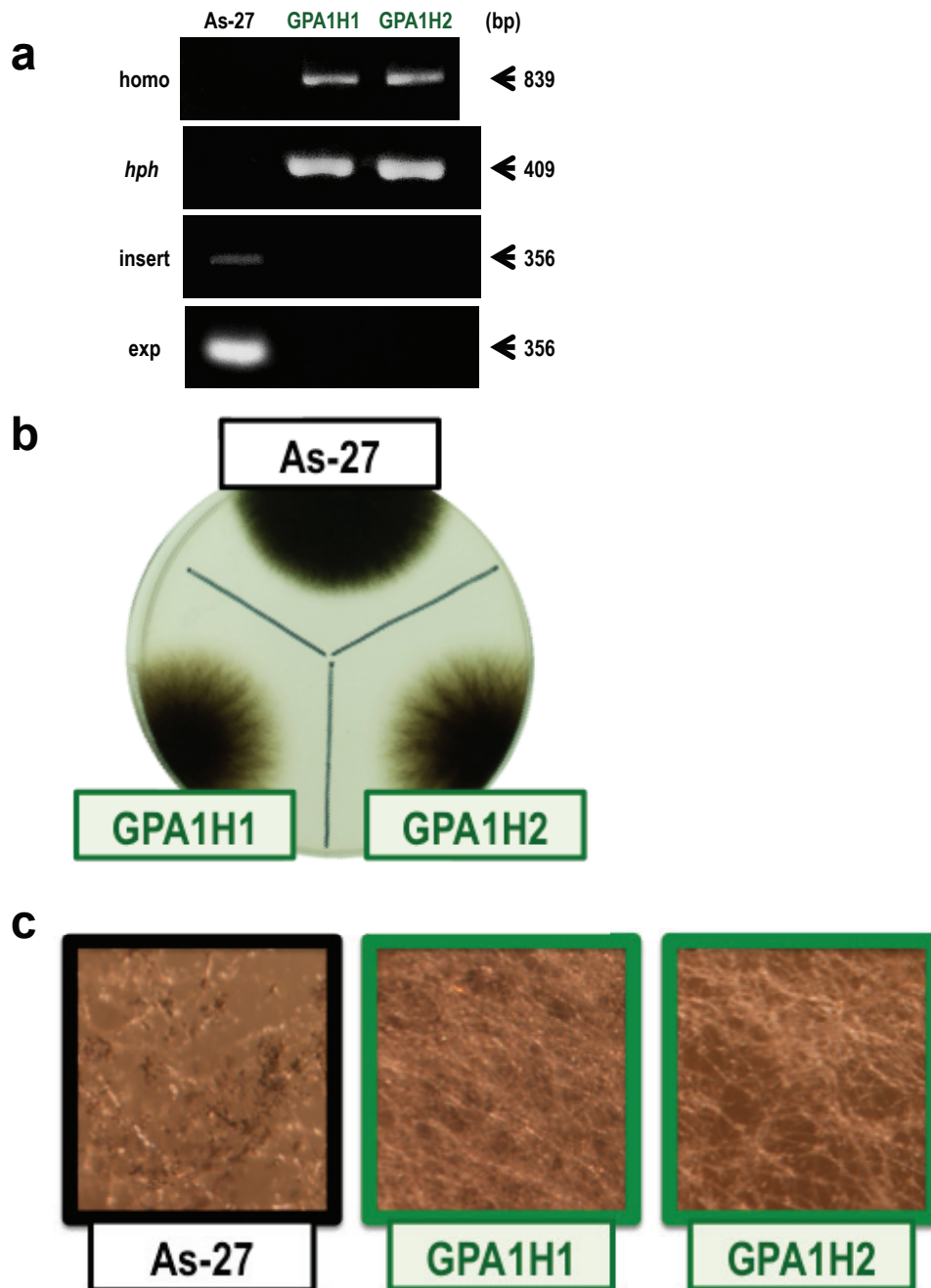


図 13 PCR による *AaGPA1KO* 株の選抜および病原性検定

a; PCR による *AaGPA1KO* 株の選抜

homo; 相同組込みにより生じるバンド、insert; 相同組込みにより *hph* カセットと置換されるバンド、*hph*; ハイグロマイシン B 耐性遺伝子の内部領域

exp; RNA を抽出し cDNA を合成後、*AaGPA1* の発現を RT-PCR で確認した。

b; 菌糸成長比較

c; 実体顕微鏡による菌そうの比較

As-27; 野性株、GPAH1, GPAH2; *AaGPA1KO* 株

2-1-2. *AaGPA1KO* 株の菌糸成長比較

菌糸成長比較を行った結果、野生株と比較して全ての KO 株で気中菌糸が減少し、菌そうが変化していた (図 13b)。また、菌糸の観察を行った結果、野生株で孢子の生産が見られる一方、KO 株、GPA1H1 および GPA1H2 ではほとんど見られなかった (図 13c)。

2-1-3. *AaGPA1KO* 株の病原性および AAL 毒素生産能検定

病原性検定は孢子の回収が難しかったため、スポット接種により行った。野生株で病斑が数個見られる一方、KO 株 GPA1H1 および GPA1H2 では病斑が激減していた。AAL 毒素生産能検定を行った結果、野生株で見られる壊死が KO 株 GPA1H1 および GPA1H2 では増加していた (データ無し)。

2-2-1. 茎枯病菌における GPCR ホモログの分類

2-18 に従い、茎枯病菌における GPCR ホモログを同定した。7 個のホモログが見つかったが、そのうち GPCR の共通構造 NCBI で系統樹を作製したところ、*AaGPR1* は cAMP 様 GPCR に、*AaGPCR2* および *AaGPCR3* は carbon/amino グループに、*STE2* は Ste2 グループに分類された。

2-2-1. *AaGPR1-3* 遺伝子の形質転換と KO 株の選抜

常染色体に存在する G protein coupled receptor をコードすると推定される遺伝子、*AaGPR1-3* の機能解析を行った。*AaGPR1* では、PCR およびサザン解析の結果から GPR1N1 および GPR1N2 を KO 株とし、以降の実験に用いた (図 14)。同様に *AaGPR2* では、GPR2H1、GPR2H5 および GPR2H8 を KO 株とし、以降の実験に用いた (図 15)。*AaGPR3* では、GPR3H17 を KO 株とし、以降の実験に用いた (図 16)。

2-2-2. *AaGPR1-3KO* 株の菌糸成長比較および病原性検定

各菌株の菌糸成長を比較したが、顕著な差はみられなかった (図 17)。また、病原性検定を行った結果、野生株および KO 株に顕著な差はみられなかった (図 18)。

2-2-3. *AaGPR3KO* 株の相補実験

AaGPR3KO 株の相補は、*ALT6* と同様にして行った。PCR およびサザン解析により相補株 GPR3H17::G1 および GPR3H17::G16 が得られたことから以降の実験に用いた (図 16b, c)。

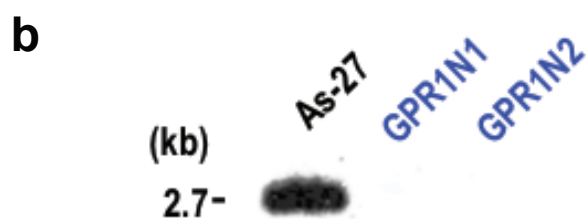
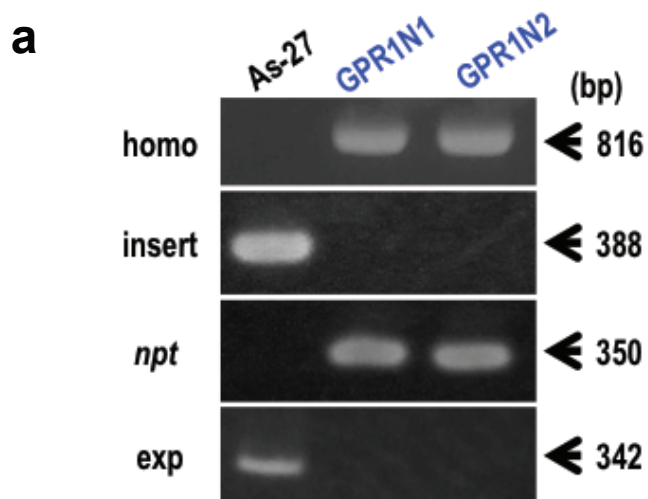


図 14 PCR とサザンブロッティングによる *AaGPR1* KO 株の選抜

a; PCR による *AaGPR1* KO 株の選抜

homo; 相同組込みにより生じるバンド

insert; 相同組込みにより *npt* カセットと置換されるバンド

npt; ジェネティシン耐性遺伝子の内部領域

exp; RNA を抽出し cDNA を合成後、*AaGPR1* の発現を RT-PCR で確認した。

b; *AaGPR1* KO 株のサザンブロッティング

プローブ; *AaGPR1* insert

As-27; 野性株

GPR1N1 および GPR1N2; *AaGPR1* KO 株

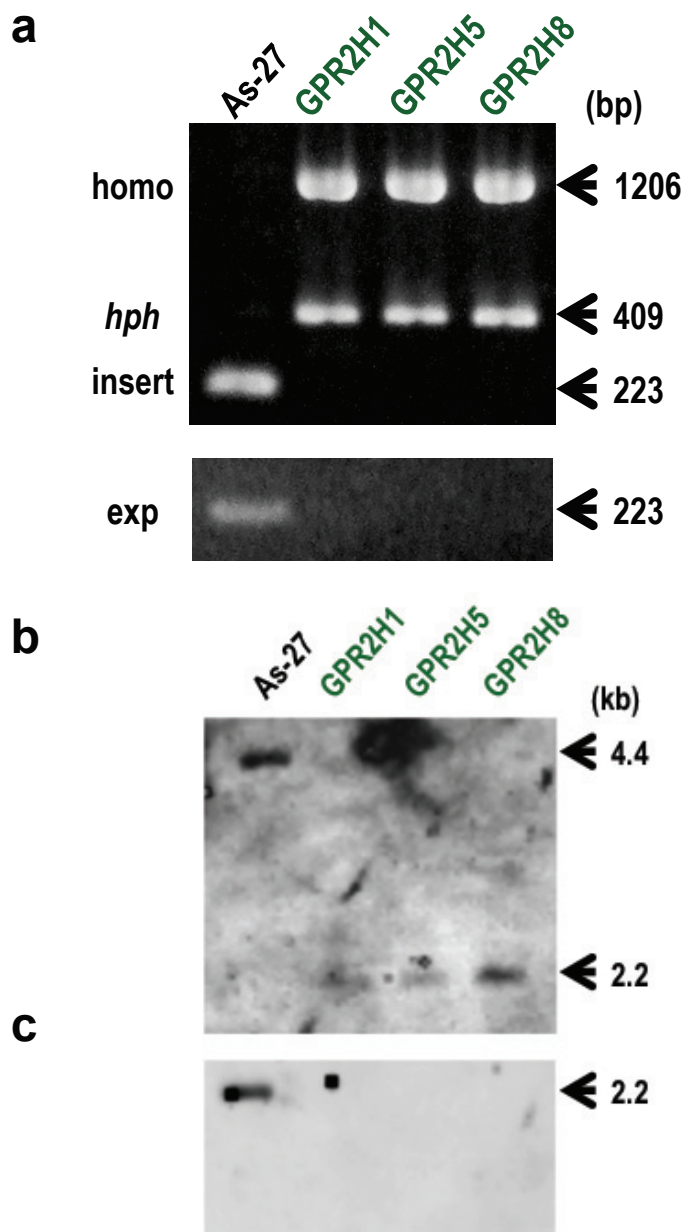


図 15 PCR とサザンブロットイングによる *AaGPR2*KO 株の選抜

a; PCR による *AaGPR2*KO 株の選抜

homo; 相同組込みにより生じるバンド

insert; 相同組込みにより *hph* カセットと置換されるバンド

hph; ハイグロマイシン B 耐性遺伝子の内部領域

exp; RNA を抽出し cDNA を合成後、*AaGPR2* の発現を RT-PCR で確認した。

b; *AaGPR2*KO 株のサザンブロットイング

プローブ; *AaGPR2* B

c; *AaGPR2*KO 株のサザンブロットイング

プローブ; *AaGPR2* insert

As-27; 野性株、GPR2H1、GPR2H5 および GPR2H8; *AaGPR2*KO 株

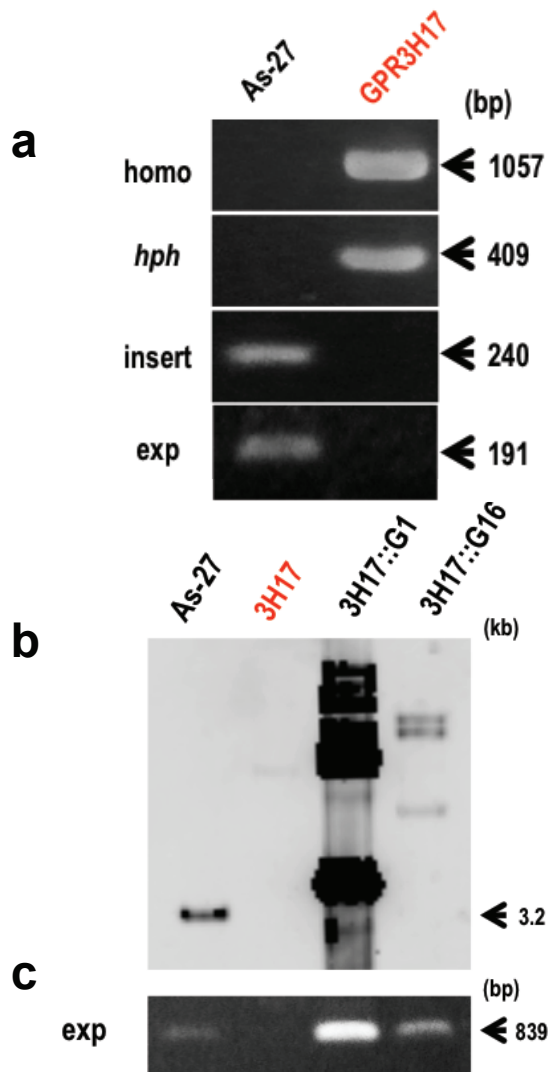


図 16 PCR による *AaGPR3*KO 株の選抜、相補株のザンブロットイングおよび発現解析

a; PCR による *AaGPR3*KO 株の選抜

homo; 相同組込みにより生じるバンド

insert; 相同組込みにより *hph* カセットと置換されるバンド

hph; ハイグロマイシン B 耐性遺伝子の内部領域

exp; RNA を抽出し cDNA を合成後、*AaGPR3* の発現を RT-PCR で確認した。

b; *AaGPR3* 相補株のザンブロットイング

プローブ; *AaGPR3* insert

As-27; 野性株、GPR3H17; *AaGPR3*KO 株

3H17::G1, 3H17::G16; *AaGPR3* 相補株

c; *AaGPR3* 相補株の発現解析

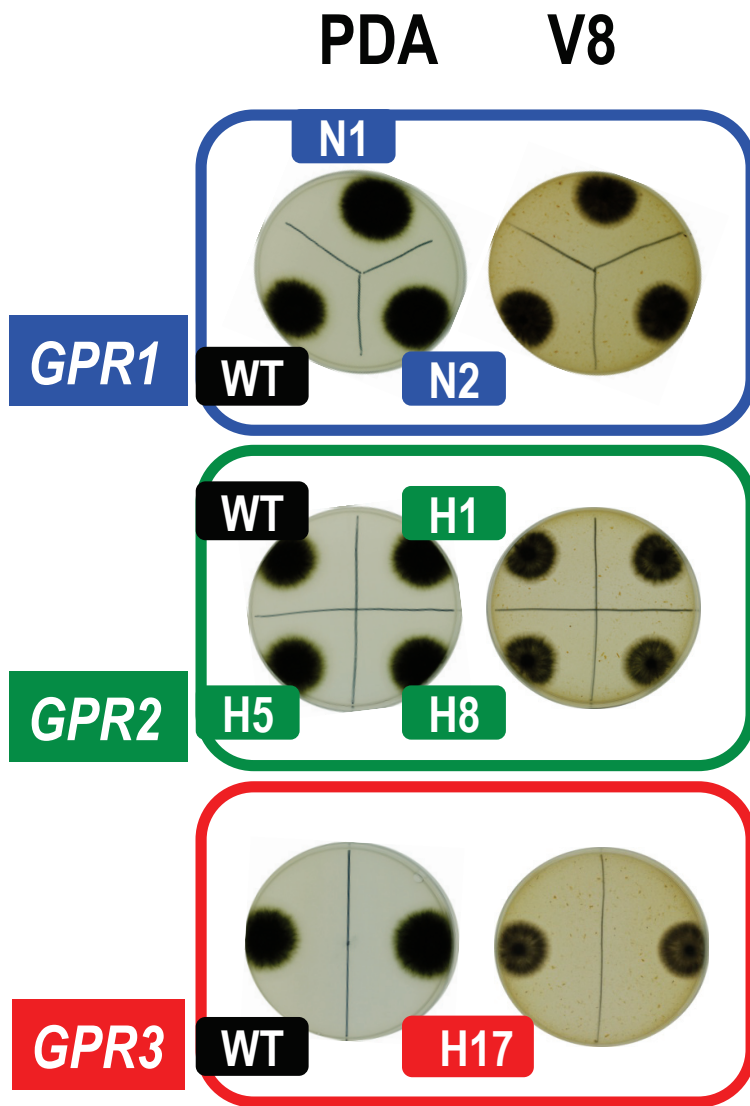


図 17 *AaGPR1-3KO* 株における PDA、V8 およびリチャーズ培地での形態比較
 a; PDA および V8 培地での *AaGPR1-3KO* 株の形態比較
 各菌株を植菌 4 日後に撮影した。

WT; As-27 (野生株)

N1 および N2; *AaGPR1KO* 株

H1、H5 および H8; *AaGPR2KO* 株

H17; *AaGPR3KO* 株

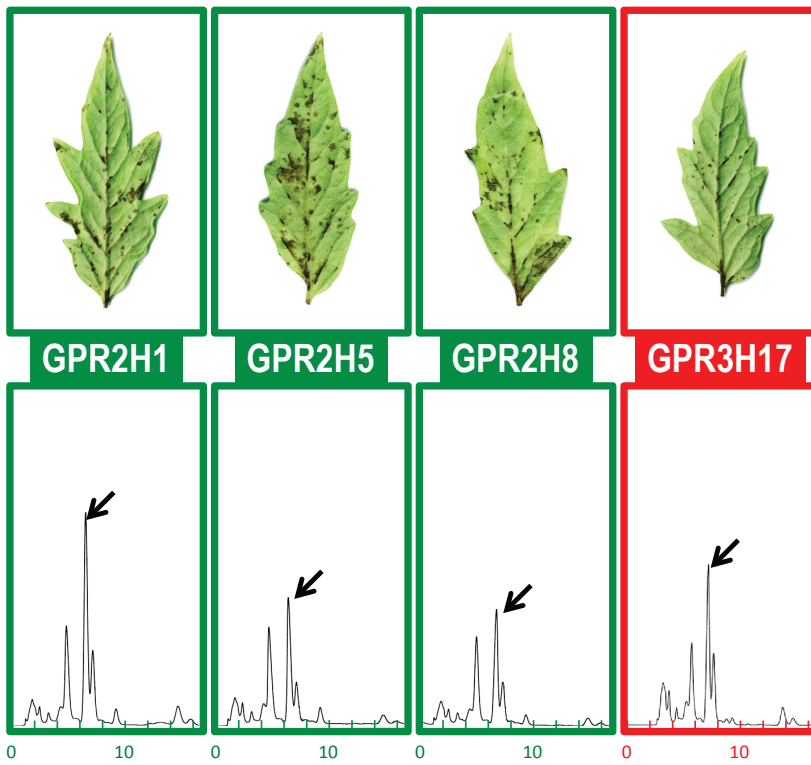
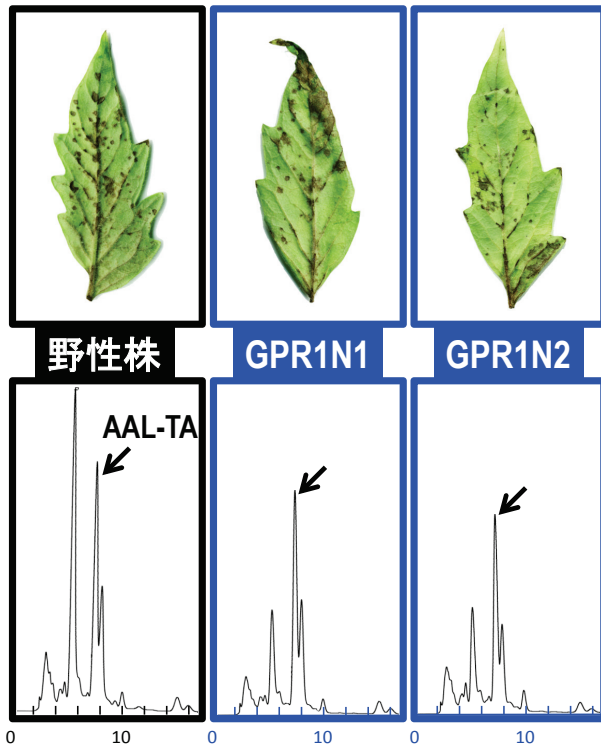


図 18 *AaGPR1-3KO* 株の病原性検定および HPLC 解析
 GPR1N1, GPR1N2; *AaGPR1KO* 株、GPR2H1, GPR2H5, GPR2H8; *AaGPR2KO* 株
 GPR3H17; *AaGPR3KO* 株

2-2-4. *AaGPR3* 相補株の孢子比較および病原性検定

孢子比較を行った結果、孢子の大きさは野生株では平均 18 μm 、KO 株では 15 μm 、相補株では 20 μm だった (図 19a)。病原性検定を行った結果、*AaGPR3* KO 株において病原力の低下が認められた (図 18)。

2-3. *AaSTE2* 遺伝子の形質転換と菌糸成長比較および病原性検定

常染色体に存在する G protein coupled receptor をコードすると推定される遺伝子、*AaSTE2* の機能解析を行った。PCR およびサザン解析の結果から 2 菌株の KO 株が得られた。菌糸成長比較および病原性検定を行ったところ野生株と KO 株で顕著な差はみられなかった (データ無し)。

2-4-1. *LAEA* 遺伝子の形質転換と KO 株の選抜

常染色体に存在するヒストンの methyltransferase をコードすると推定される遺伝子、*LaeA* のホモログが *A. alternata* の各病原型に普遍的に存在するかどうかを PCR によって確認した。その結果、全ての病原型菌で *LaeA* のホモログを示すバンドが検出された。茎枯病菌の *LaeA* ホモログである *AtLAEA* の形質転換を行った結果、LAEAH40、LAEAH41 および LAEAH43 の KO 株が得られた。リンゴ病原型菌の *LaeA* ホモログである *AaLAEA* の形質転換を行った結果、KO 株 H13 および H15 が得られた。イチゴ病原型菌の *LaeA* ホモログである *AsLAEA* の形質転換を行った結果、KO 株 H16、H20、H25 が得られた。

2-4-2. *AtLAEAKO* 株の菌糸成長比較、孢子生産能比較、菌体量比較、病原性および AAL 毒素生産能検定

菌糸成長を比較した結果、KO 株、LAEAH40、LAEAH41 および LAEAH43 では野生株でみられた気中菌糸が激減していた (図 20)。孢子生産能比較および病原性検定を行った結果、KO 株では、野生株でみられた孢子および病斑が激減していた (図 21)。また、毒素生産能検定を行った結果、KO 株では野生株でみられた壊死斑が激減していた (図 22a)。HPLC 解析を行った結果、全ての菌株において AAL 毒素を示すピークが検出された (図 22b)。毒素量の定量により、野生株では 16.1 $\mu\text{g/ml}$ 、KO 株、LAEAH40、LAEAH41 および LAEAH43 ではそれぞれ 1 $\mu\text{g/ml}$ 、1.1 $\mu\text{g/ml}$ および 1.2 $\mu\text{g/ml}$ の毒素が検出された (表 10)。菌体量を比較した結果、KO 株は野生株菌体量の約 2/3 程度に減少していた (図 22c)。

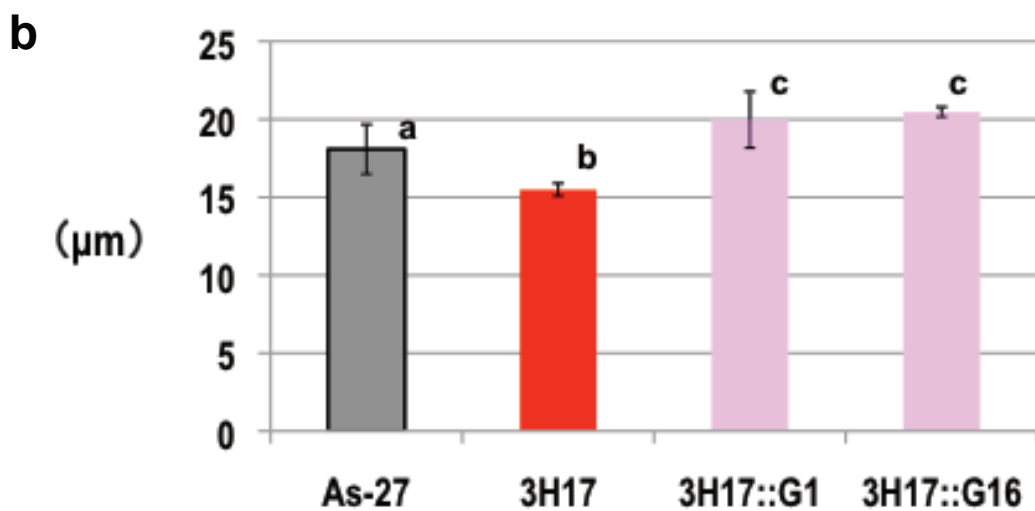
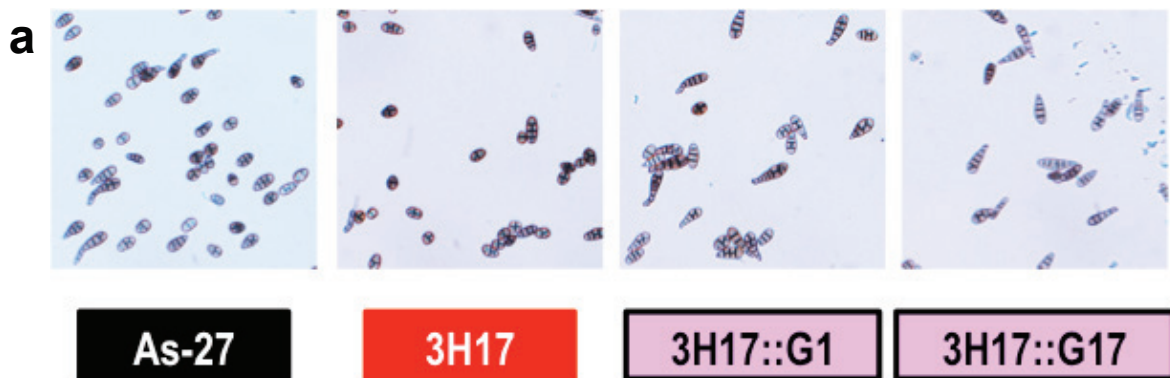


図 19 *AaGPR3*KO 株および相補株の孢子成長

a; *AaGPR3*KO 株および相補株における孢子
V8 培地で 2 週間培養し、孢子を回収した。

b; *AaGPR3*KO 株および相補株における孢子長
a, b, c にはそれぞれ有意差が認められた。

As-27; 野性株

3H17; *AaGPR3*KO 株

3H17::G1 および 3H17::G17; *AaGPR3* 相補株

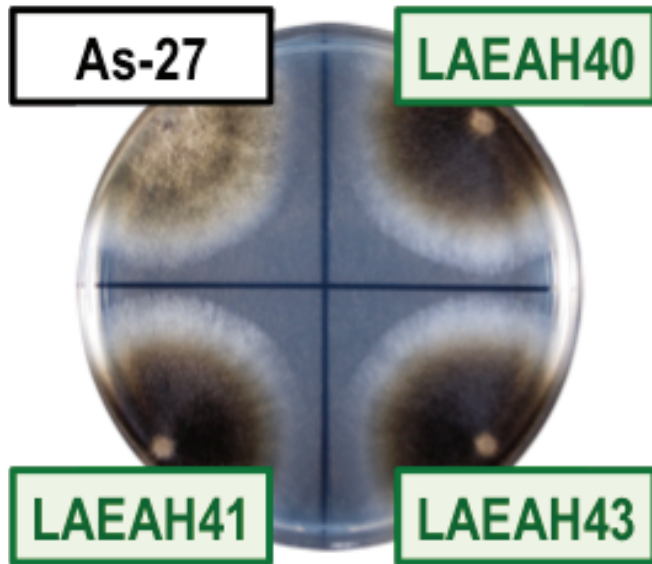
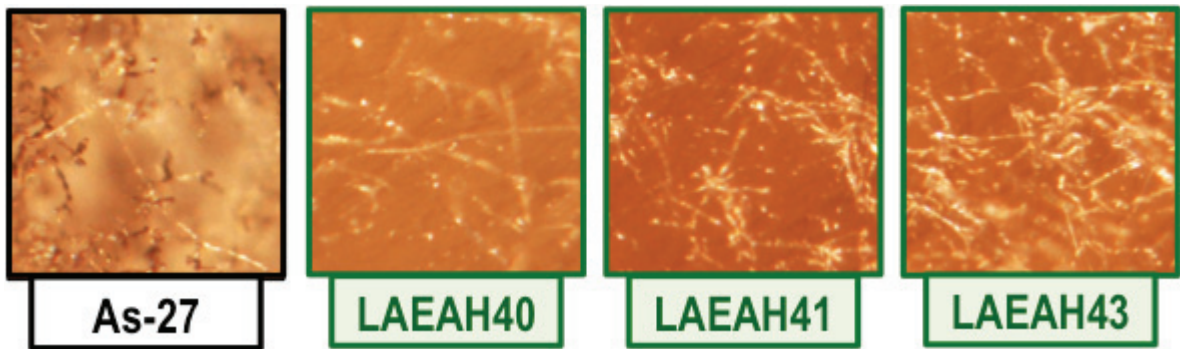


図 20 *AtLAEAKO* 株の菌糸成長

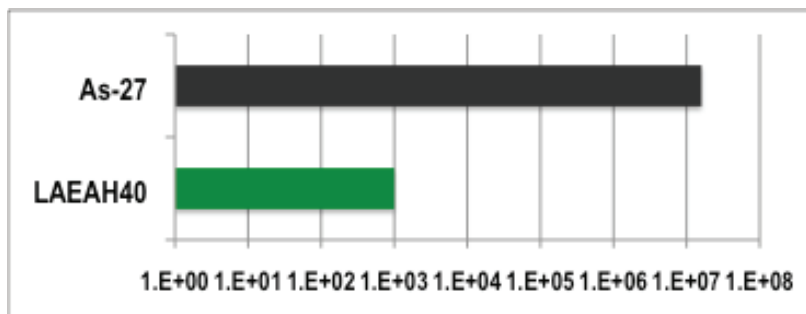
As-27; 野生株

LAEAH40、LAEAH41 および LAEAH43; *AaLAEAKO* 株
PDA で培養後 5 日目に撮影した。

a



b



c



図 21 *AtLAEAKO* 株の形態、胞子生産能および病原性検定

a; *AtLAEAKO* 株の実体顕微鏡により観察した KO 株の菌そう

b; *AtLAEAKO* 株のプレート 1 枚あたりの胞子数比較

c; *AtLAEAKO* 株の病原性検定

As-27; 野生株、LAEA40, LAEA41, LAEA43; *AaLAEAKO* 株

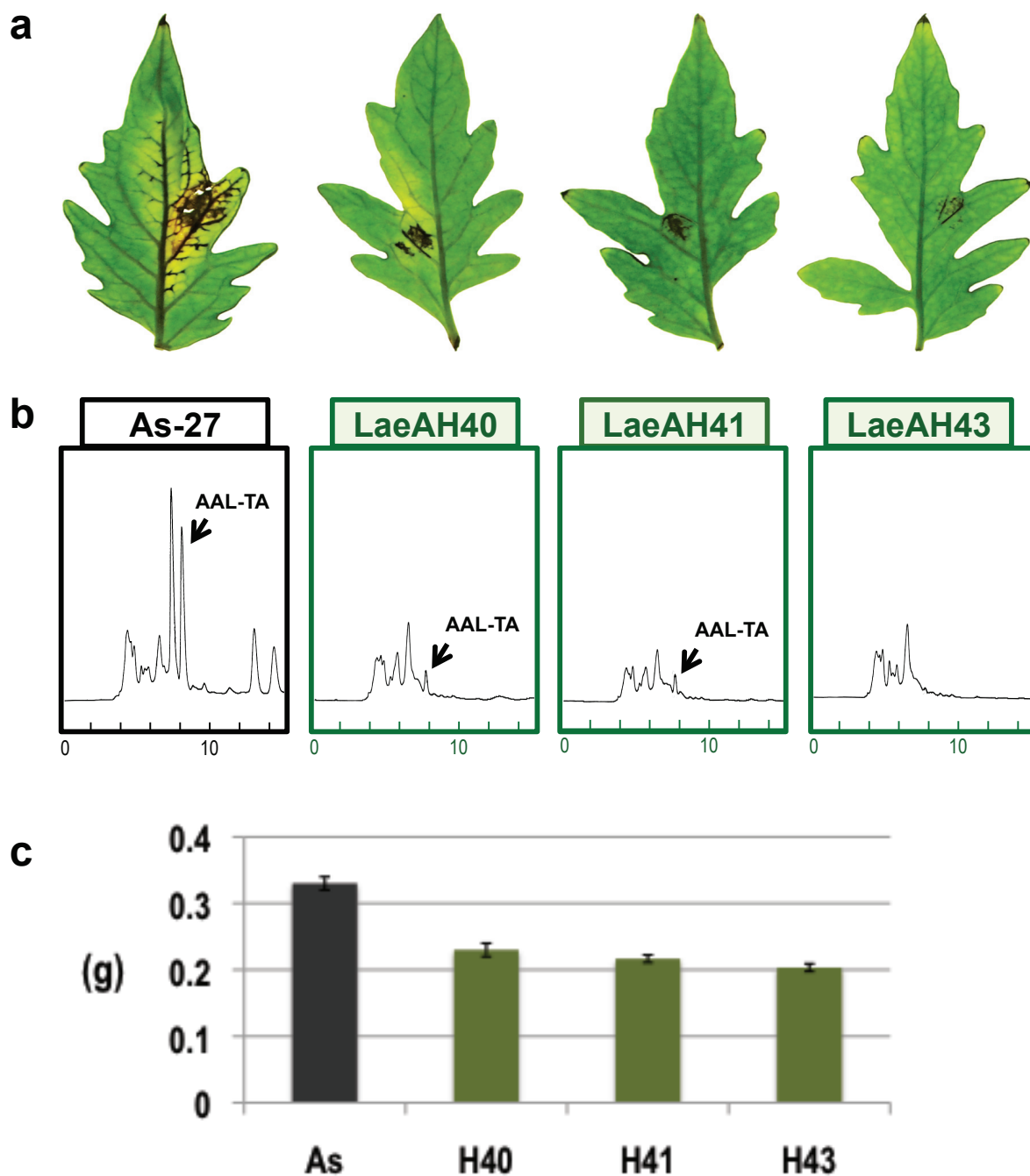


図 22 *AtLAEAKO* 株の毒素生産能検定、HPLC 解析および菌体量

a; *AtLAEAKO* 株の毒素生産能検定

b; *AtLAEAKO* 株の HPLC 解析

c; *AtLAEAKO* 株の菌体量

リチャーズ液体培地で 2 週間培養後、乾燥させ重量を測定した。

As-27; 野生株、LAEAH40、LAEAH41 および LAEAH43; *AaLAEAKO* 株

表 10 HPLC による AAL 毒素の定量

菌株	AAL-TA ($\mu\text{g/ml}$)
As-27	16.2 $\mu\text{g/ml}$
LAEAH40	1 $\mu\text{g/ml}$
LAEAH41	1.1 $\mu\text{g/ml}$
LAEAH43	1.2 $\mu\text{g/ml}$

AAL 毒素の定量は HPLC に基づいて行った。

As-27; 野生株

LAEAH40、LAEAH41 および LAEAH43; *AaLAEAKO* 株

2-4-3. *AtLAEAKO* 株の遺伝子発現解析

RNA を抽出し、遺伝子の発現解析を行ったところ、KO 株では *ALT* クラスター遺伝子の発現量が野性株よりも減少していた。一方、クラスター内に存在する metalloprotease 遺伝子は野性株と KO 株で発現量に変化はなかった (図 23a)。また、発現量の絶対量を比較したところ、野性株で高かったクラスター遺伝子の発現が KO 株で減少していた。*ALT* クラスター以外の遺伝子は野性株および KO 株で発現量が少なかった (図 23b)。常染色体に存在する遺伝子の発現解析を行った結果、KO 株の発現量は野性株の発現量と比較して *AKS* では 7 倍、*VKS* は約 3 倍に増加していた。*MATI* および *ALM* では発現量に顕著な差はみられなかった。野性株では 4 遺伝子の発現量全てが β -tubulin と比較して少なかった (図 24)。

2-4-4. *AaLAEA* および *AsLAEAKO* 株の菌糸成長比較、病原性および AAL 毒素生産能検定

菌糸成長比較を行った結果、*AaLAEA* および *AsLAEAKO* 株ともに、野性株ではみられた気中菌糸がほとんどみられなかった (図 25)。HPLC 解析を行った結果、全ての菌株において毒素を示すピークが検出された (図 26)。病原性検定および毒素生産能検定を行った結果 *AsLAEAKO* 株では、野性株でみられる病斑および壊死斑はほとんどみられなかった (図 27)。

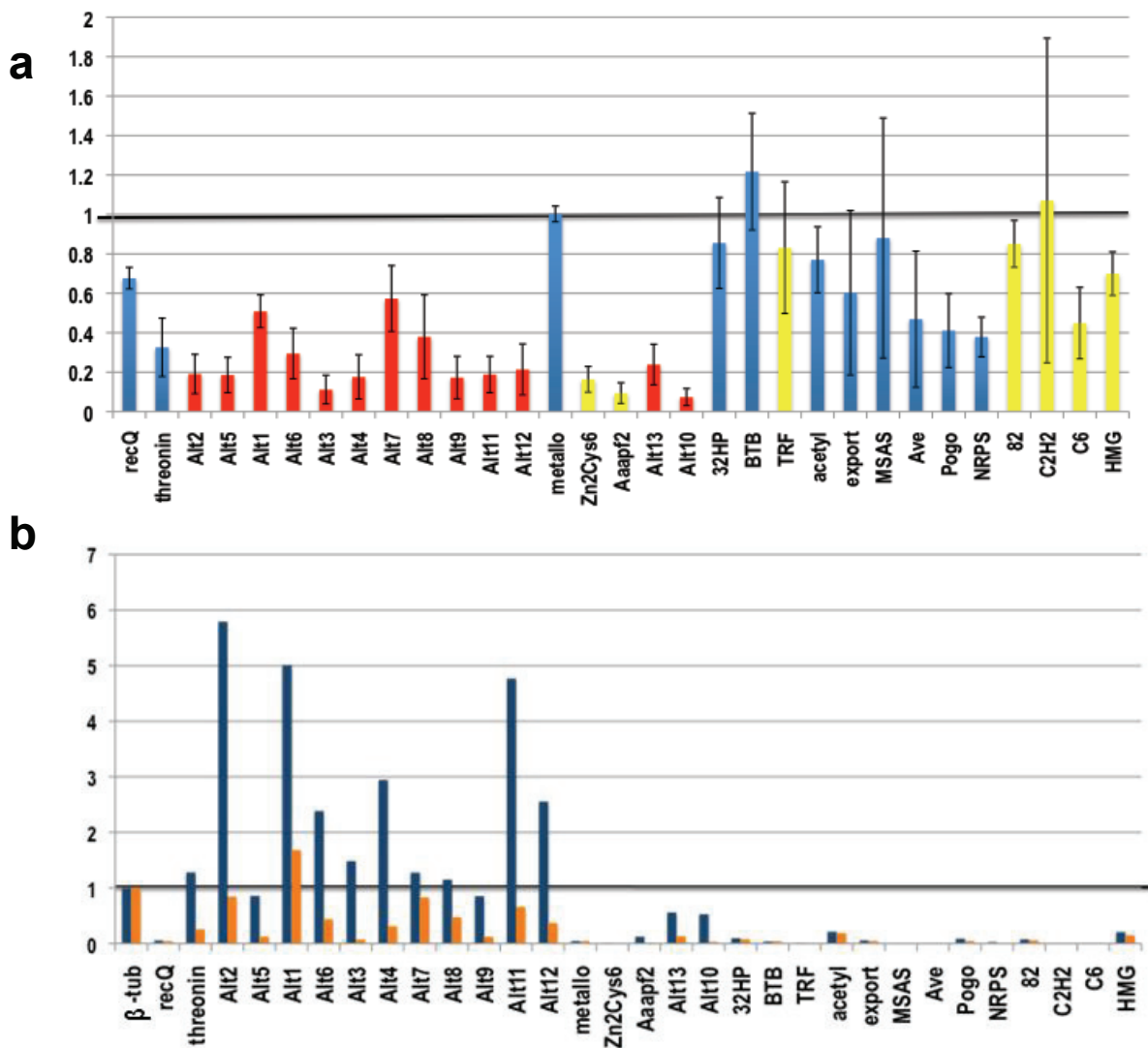


図 23 *AtLAE*KO 株および野生株における CDC 上遺伝子の比較発現解析

赤; *ALT* クラスター遺伝子

黄色; 転写調節因子

青; 上記以外の遺伝子

a; 野生株との相対値

各遺伝子発現は β -tublin 遺伝子を 1 としてまず数値化した。

野生株で得られた数値を 1 として KO 株の発現量をグラフに示している。

b; 発現量の絶対値

β -tublin 遺伝子を 1 とした時の発現量

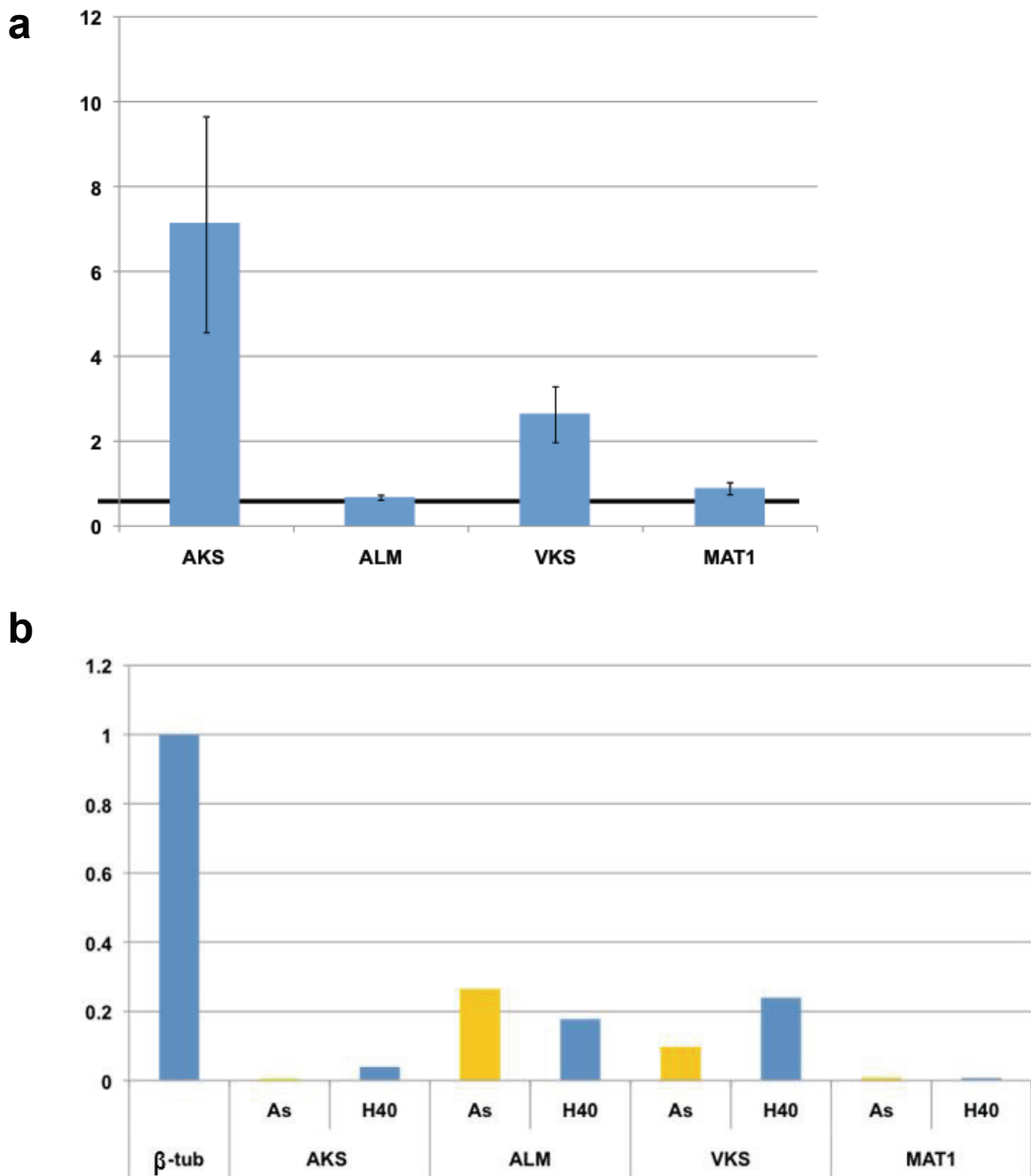


図 24 *AtLAEAKO* 株の常染色体上遺伝子の発現解析

リチャーズ培地で振とう培養 8 日後の菌体から RNA を抽出し、cDNA を合成後、リアルタイム PCR によって発現量を定量した。

a; β -tubulin 遺伝子および野性株の各遺伝子発現を 1 とした場合の *AtLAEAKO* 株遺伝子の野生株との相対値

b; β -tubulin 遺伝子を 1 とした場合の各遺伝子の発現量の絶対値

黄: As-27; 野性株

青: H40; *AtLAEAKO* 株

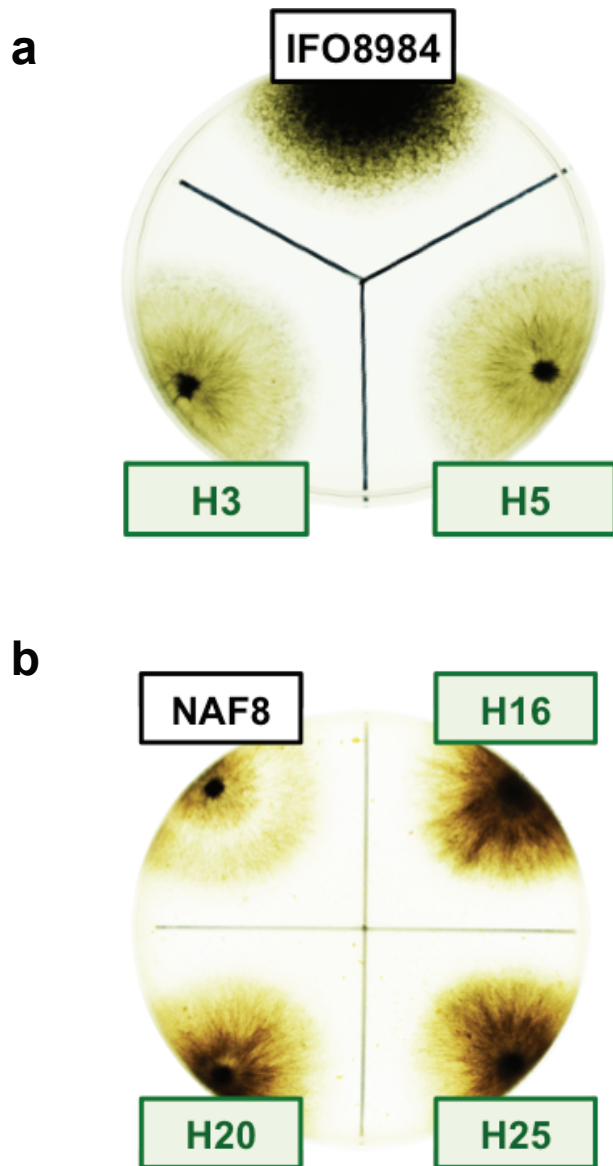


図 25 *A. alternata* リンゴ病原型およびイチゴ病原型の *LaeAKO* 株 (*AaLAEAKO* 株および *AsLAEAKO* 株) の菌糸成長

a; *AaLAEAKO* 株の菌糸成長

PDA に植菌後、5 日目に撮影した。

IFO8984; リンゴ斑点落葉病菌

H3 および H5; *AaLAEAKO* 株

b; *AsLAEAKO* 株の菌糸成長

PDA に植菌後、5 日目に撮影した。

NAF8; イチゴ黒斑病菌

H16、H20 および H25; *AsLAEAKO* 株

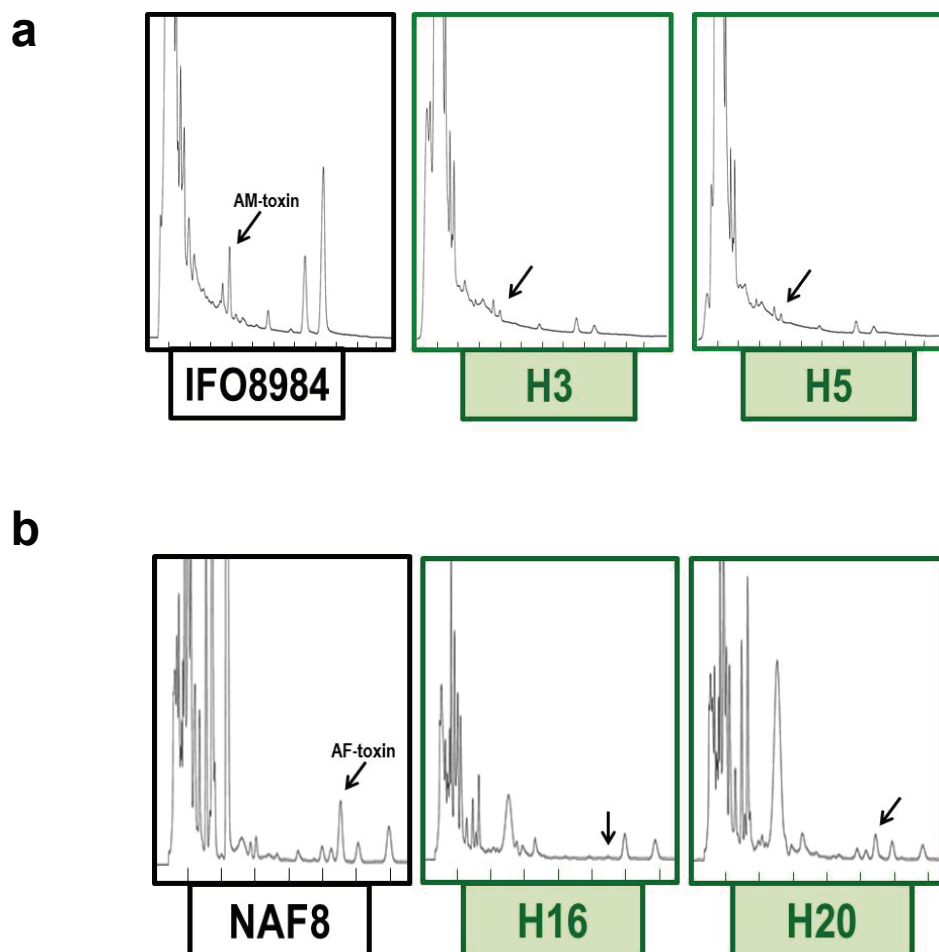


図26 *A. alternata* リンゴ病原型およびイチゴ病原型の *LaeAKO* 株 (*AaLAEAKO* 株
および *AsLAEAKO* 株) の HPLC 解析

a; *AaLAEAKO* 株の HPLC 解析

IFO8984; リンゴ斑点落葉病菌

H3 および H5; *AaLAEAKO* 株

b; *AsLAEAKO* 株の HPLC 解析

NAF8; イチゴ黒斑病菌

H16、H20 および H25; *AsLAEAKO* 株

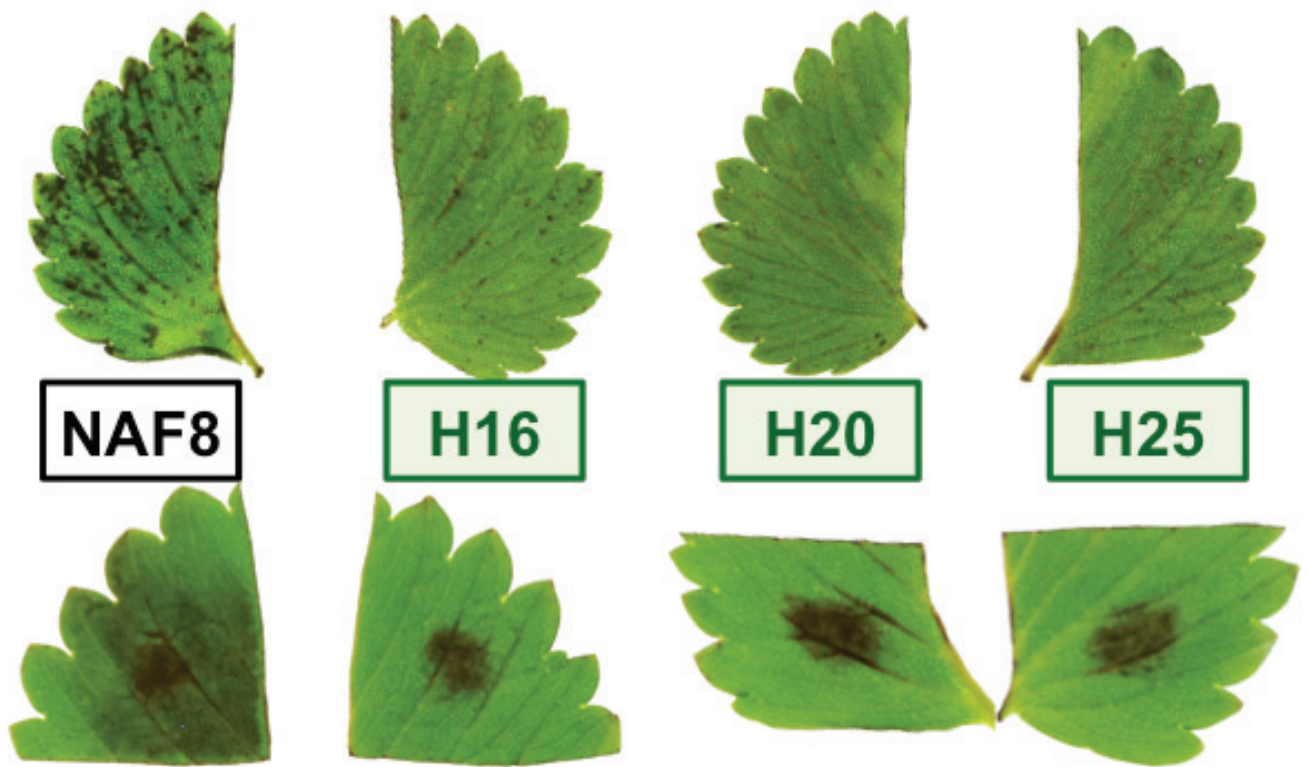


図 27 *AsLAEAKO* 株の病原性検定および毒素生産能検定
葉は感受性イチゴ品種盛岡 16 号を使用した。

NAF8; イチゴ黒斑病菌

H16、H20 および H25; *AsLAEAKO* 株

上; 病原性検定

1×10^5 個/ml に調製した孢子懸濁液を使用した。

下; 毒素生産能検定

第4節 考察

次々に登場する新型シーケンサーの発展により、大量のゲノム情報が蓄積されつつある。菌類においても *Aspergillus* 属や *Neurospora crassa* およびイネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* など多くの菌についてゲノム解析が終了した (Dean et al. 2005, Galagan et al. 2003, Galagan et al. 2005, Machida et al. 2005)。最近では、これらゲノムの比較解析が行われ、菌類における進化や分化などを網羅的に解析することが可能となりつつある (Gao et al. 2011, Ma et al. 2010, Amselem et al. 2011)。ゲノム全体を利用した比較解析は、菌株間での相同領域、あるいは転座や大きなデリレーションなどを見出す場合に非常に有効である。そのため、病原性菌が持つ遺伝的特徴などを見出すことが可能である。一方、多くの場合、非常に近縁の菌株間でさえ、そのゲノム構成は異なるため、個々の遺伝子がどういった機能をしているかは、それぞれの遺伝子について遺伝子破壊やサイレンシングなどをする必要がある。

A. alternata は、これまでに少なくとも7つの病原型が報告されており、それぞれ異なる宿主特異的毒素 (HST) を生産することが知られている。また、7病原型のうちタバコをのぞく病原型でHST生産に関与する遺伝子が単離、同定されている (Aakagi et al. 2009, Akamatsu et al. 2003, Miyamoto et al. 2009, Tanaka et al. 1999, 2000, Hatta et al. 2002, Ruswandi et al. 2005, Johnson et al. 2000, 2001, Harimoto et al. 2007)。トマト、リンゴおよびイチゴの3病原型においては、これら遺伝子がクラスター化しており、かつ生存には必須ではない染色体である conditionally dispensable chromosome (CDC) に座乗していることが報告されている (Akagi et al. 2009, Harimoto et al. 2007, Hatta et al. 2002)。

各病原型が保有するHST生合成遺伝子は、ほとんどの場合、他のHST生合成遺伝子と相同性がなく、萎枯病菌で見出された13のAAL毒素生合成遺伝子 (*ALT* 遺伝子) のホモログは、他の *A. alternata* においては見出されていない。一方で、essential chromosome (EC) 上の遺伝子は異なる病原型間でも非常に高い相同性が認められている (Kusaba et al. 1995, Akagi et al. 2009)。今回の実験で、萎枯病菌から得た *LaeA* のホモログ、*AtLAEA* の配列を基に作製したプライマーを使用した際、検定した全ての病原型で目的のバンドが検出されたことから、CDC以外の遺伝子は非常に相同性が高いことがうかがえる。このように、病原性 *A. alternata* は、高度に保存されたECと、とてもユニークな配列、すなわちHST生合成遺伝子が座乗するCDCを保持した極めて特徴的なゲノム構造を有しているとの考えがされ始めている。

A. alternata はこれまでの研究で、遺伝子ターゲティング法が構築されており、標

的遺伝子の機能解析をスムーズに行うことが可能である。また、トマト病原型である萎枯病菌は、CDC の全配列情報およびドラフトゲノム解析から得たほぼ全てのゲノム情報が利用可能である。そこで、本研究では、宿主特異的 AAL 毒素生合成遺伝子である *ALT* クラスター遺伝子など CDC 上の遺伝子と EC 上に座乗し、*A. alternata* が共通して保存する遺伝子をゲノム情報を基に検索し、それら遺伝子の機能解析を行った。

CDC 上の遺伝子の機能解析

ALT 遺伝子

CDC の全配列情報から *ALT* クラスターは CDC 上に 2 セット存在していることが示唆されている。*ALT* クラスターのうち 8 遺伝子の機能は既に明らかとなっている。本研究では、残りの 5 遺伝子 *ALT5*、6、10、11 および 12 の機能解析を行った。これら遺伝子はそれぞれ ABC transporter、short chain dehydrogenase/reductase、fatty acyl-CoA synthetase、phytanoyl-CoA synthetase および peptide synthetase をコードしていると推測されている。*ALT5*、*ALT11* および *ALT12* の形質転換では、それぞれ 500 以上の形質転換体を得られたが、ノックアウト (KO) 株は得られなかった。*ALT11* および *ALT12* はクラスター内に 2 コピー存在するため、ゲノム内に 4 コピー存在する。したがって、一部のコピーを破壊することは可能であったが、一度の形質転換で全てのコピーを破壊することは確率的に困難であったのかもしれない。最近、*A. alternata* ではタンジェリン病原型で RNA サイレncing法が確立されたことから (Miyamoto et al. 2008)、これら遺伝子については、サイレンシング法による機能解析が有効だと思われる。*ALT5* については、KO 株が得られた場合、その全てで CDC が脱落していた。このため、*ALT5* のみの機能を解析することが出来なかった。今後、ターゲティングの位置などを変えて形質転換を行う必要がある。

ALT6 の KO 株は、AAL 毒素生産能および病原性が失われていた。*ALT6* はフモニシン生合成遺伝子 (*FUM* 遺伝子) における *FUM13* と相同性が高く、short chain dehydrogenase/reductase をコードしていると推測されている。*FUM13* の機能解析により、Fum13p はフモニシンにおける C3 のケト基を水酸基に還元することが示されている (Butchko et al. 2003, Yi et al. 2005)。これらのことから、*ALT6* は AAL 毒素における C2 のケト基を水酸化する reductase であると推測される。

ALT10 の KO 株は、AAL 毒素のピークは失われていたが、新規ピークがみられた。このろ液を使用し、バイオアッセイを行ったところ、壊死はみられなかったことから新規ピークは、宿主に対して毒性がないことが示唆された。病原性検定においても KO 株は病原性を失っていた。また、この新規ピークの質量解析により、AAL 毒素のトリ

カルボン酸が失われた pentolamine と同一の質量を示したこと、および *FUM* 遺伝子における *ALT10* ホモログ、*FUM10* の機能解析においても同様の結果が得られたことから (Butchko et al. 2003)、本遺伝子のコードするタンパク質の機能は、トリカルボン酸への CoA の付加と考えられた。

AaTRF1-4

転写調節因子をコードすると推測される *TRF1-4* は CDC 上で見出された遺伝子であり、*TRF1* は *ALT* クラスタ内存在する。これら 4 遺伝子をそれぞれ KO し、AAL 毒素生産能および病原性を検定したが、野生株と比べ有意な差はみられなかった。*TRF1* の KO 株において *ALT* 遺伝子の発現を野生株と比較したところ、*ALT1* のバンドが変化していた。また、ほとんどの *ALT* 遺伝子が野生株に比べ、シグナルが弱くなっていた。しかしながら、今回の実験では、リアルタイム PCR のような定量を行っていないため、今後、正確に発現量を調べる必要がある。*TRF1* は、リンゴ病原型およびイチゴ病原型でホモログが見出されており、リンゴ病原型では AM 毒素の生産を負に制御していることが示唆されている。一方、イチゴ病原型では、AF 毒素の生産に影響を及ぼさないことが示唆されている (播本私信)。これらの結果から、*TRF1* は毒素量の変化には至らない程度のわずかな発現量の制御を担っている可能性も考えられた。また、今回は培養条件が変法リチャーズ培地のみであったため、条件を変えることで、これら *TRF* 遺伝子の機能が明らかになる可能性もある。

AaAVE1

avenasinase のホモログと推定された *AVE1* の機能解析の結果、病原性および AAL 毒素生産に影響はみられなかった。またトマチン処理した胞子も野生株と同様に発芽した。また、変法リチャーズ培地上での発現が非常に低く、同条件でも発現がみられないことがあった。これらの結果から、*AVE1* は、病原性に関与していない、あるいは機能ホモログがゲノム上に存在する可能性が示唆された。実際、茎枯病菌ドラフトゲノムデータを使ったホモログの検索の結果、複数のホモログが見出されている。

今回、CDC 上で *ALT* 遺伝子以外の病原性関連遺伝子を見出すことは出来なかった。しかしながら、今回の実験は AAL 毒素生産に有利な条件のみで発現解析を行っていることから、宿主葉上などの条件下で再度実験を行うことで、表現型の変化を見出せる可能性もある。

EC 上の遺伝子の機能解析

AaGPA1

G タンパク質複合体は、 α 、 β および γ サブユニットから構成されており、外部からの刺激をシグナルとして膜貫通受容体から細胞膜内部の受容体へと伝達している (Neer et al. 1995, Idnurm and Howlett 2001)。これまでに、*A. alternata* のタンゼリン病原型菌 およびリンゴ病原型における G タンパク質(サブユニットホモログの機能解析では、本遺伝子が孢子形成に関与することが示唆されている (Wang et al. 2010, Yamagishi et al. 2006)。G タンパク質 α サブユニットをコードすると推定される *AaGPA1* の KO 株は、孢子生産が野生株に比べ、減少していた。また、菌そうが野性株とは異なっていた。これらの結果から、*AaGPA1* はタンゼリン病原型およびリンゴ病原型菌で報告された結果と同様、孢子の生産に関与することが明らかになった。また病原性検定の結果、野性株に比べ、*AaGPA1*KO 株では病原性が減少していたことから (データ無し)、*AaGPA1* 遺伝子の病原性への関与が示唆された。

AaGPR1-3

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) と推定された *AaGPR1-3* のうち、*AaGPR3* の KO 株のみ表現型に変化がみられ、ほとんどの孢子サイズが矮化し、隔壁形成が未熟であるものが多くみられた。同時に病原力低下が認められた。相補実験によりこの表現型は野生株と同等に復帰したことから、本遺伝子は、孢子の成熟に関与している可能性が示唆された。*AaGPR3* も含め、これら 3 遺伝子は GPCR の分類上 cyclic AMP タイプに分類される (Lafon et al. 2006)。このタイプの機能は菌類ではほとんど報告されていないため、今回の結果から、このタイプの新たな機能が示された。

AaSTE2

GPCR のうち *STE2* タイプに属する遺伝子は、菌類で性分化に関与していることが報告されている (Burkholder and Hartwell 1985, Kim and Borkovich 2004)。本遺伝子ホモログの KO 株は、表現型に影響がみられなかった。*A. alternata* は交配が自然界でも実験室レベルでも見出されていないため、仮に子のう殻形成が可能な条件が見出された場合、本遺伝子の機能が見出される可能性がある。

AtLAEA、AsLAEA および AaLAEA

A. nidulans で見出された *LaeA* は methyltransferase をコードし、複数の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを制御していることが報告されている。*Aspergillus* 属ではマイコトキシンであるアフラトキシンやその前駆体のステリグマトシスチンなどを正に制御していることが報告されている。また、*LaeA* は velvet タンパクと複合体を形成することが知られている。まだはっきりとは分かっていないが、これら複合体あるいはそ

れぞれがヒストンを修飾することで、遺伝子クラスターを正または負に制御していると考えられている (Palmer and Keller 2010)。

本実験では、ドラフトゲノムシーケンスデータからトマト病原型 (*AtLAEA*)、イチゴ病原型 (*AsLAEA*) およびリンゴ病原型 (*AaLAEA*) の 3 病原型からそれぞれ *LaeA* ホモログを見出し、機能解析を行った。トマト病原型の *LaeA* ホモログ、*AtLAEA* の KO 株は、AAL 毒素生産能、病原性、菌糸成長、胞子生産能およびメラニン化など複数の表現型に影響がみられた。また、*ALT* 遺伝子を含む CDC 上の遺伝子の発現をリアルタイム PCR で検討した結果、KO 株は、全ての *ALT* 遺伝子の発現が減少した。また、*ALT* 遺伝子以外のクラスター内遺伝子も発現が減少していた。一方で、クラスター内に存在する metallo protease は発現量に変化がみられなかった。metallo protease は CDC 上の別の場所にも存在し、塩基レベルでも互いに相同性が高いことから、クラスター外の metallo protease を検出している可能性があり、2 遺伝子間で確実に異なる領域をプライマーとして使用し、再度検討する必要がある。今回の発現解析で、*AtLAEA* は *ALT* クラスターを正に制御していることが示唆された。*ALT* クラスターは CDC のシーケンス解析から、サブテロメア領域に位置していることが示されている。*A. nidulans* の *LaeAKO* 株の解析でも同様にサブテロメア領域のクラスターを制御していることが報告されており (Shwab et al. 2007)、異なる菌においても制御の‘位置効果’が共通していることが示された。

液体培地により菌糸を比較した際、KO 株は野生株とは異なり、ほとんどメラニン化していなかった (データなし)。また、メラニン生合成遺伝子は 5.7 Mb 以上の染色体に座乗していることが報告されている (Akamatsu et al. 1999, Akagi et al. 2009a, b)。したがって、*AtLAEA* の制御は CDC のみならず、他の染色体にも影響を与えることが示唆された。

AsLAEA の KO 株では、AF 毒素生産能および病原性が減少した。また、*AaLAEA* においても AM 毒素生産能が減少した。今回、病原性検定は出来なかったが、毒素量の減少により病原性が低下することから (Harimoto et al. 2007)、KO 株も病原性に影響が出ることが考えられた。

以上の結果から、*LaeA* のホモログ遺伝子は、*A. alternata* における病原型に関係なく HST 生合成を正に制御していることが示唆された。今後、詳細な発現解析を行う予定である。

本実験では、ドラフトゲノム情報を基に既知の病原性関連遺伝子のホモログを探索し、機能解析を行った。その結果、ゲノム情報がない状態では、クローニングが困難だった GPCR 遺伝子 (*AaGPR1-3* および *AaSTE2*) など多くの遺伝子をクローニングすることが可能となった。今回利用したゲノム情報は、完全なゲノム解析から得られ

たデータではなかったが、機能解析を行うのには十分であった。PKS や NRPS など非常に長い配列の場合、完全長が得られないことがあるが、部分配列を利用しても KO 実験は可能であるため、機能が重要であるかどうかの判断にはドラフト解析のデータで十分であった。

今回、茎枯病菌における 16 遺伝子とリンゴおよびイチゴ病原型における *AtLAEA* のホモログの 2 遺伝子の計 18 遺伝子の KO 実験を試みた。3 遺伝子については KO することが出来なかったが、15 遺伝子の KO に成功した。また、これら 15 遺伝子のうち、6 遺伝子が病原性に関与することが示唆された。本実験により見出された、*LaeA* ホモログである 3 遺伝子は、異なる病原型間にも関わらず、それぞれの HST 生産を正に制御していることが示された。これら遺伝子は非常に相同性が高いことから、本遺伝子を標的にした薬剤などを利用することで、複数の病気に対処出来る日が来るかもしれない。

第 4 章 宿主特異的 AAL 毒素生合成遺伝子クラスターの非病原性 *A. alternata* 菌への導入

第 1 節 序論

A. alternata の病原型菌は HST を生産し、特定の宿主に病気を引き起こす。茎枯病菌、リンゴ斑点落葉病菌およびイチゴ黒斑病菌は HST である AAL、AM および AF 毒素をそれぞれ生産し、特定の品種に病気を引き起こす (Hrimoto et al. 2007, Johnson et al. 2001, Johnson et al. 2000a, Johnson et al. 2000b, Hatta et al. 2002)。これら毒素の生産には数十個からなる生合成遺伝子が関与していること、クラスター化していることが報告されている。近年の研究からこれら *A. alternata* の HST 生合成クラスターは 1.8 Mb 以下の染色体に座乗していることが明らかとなっている。

3 章でも述べたように、茎枯病菌の 13 からなる AAL 毒素生合成遺伝子クラスター (*ALT* クラスター) は 1 Mb の CD 染色体に座乗している。茎枯病菌の CD 染色体はシーケンス解析から同腕染色体であること、*ALT* クラスターは本染色体の両腕に 1 コピーずつの計 2 コピー以上座乗していることが明らかとなっている。これまでの研究からこれら 13 の遺伝子中 8 遺伝子が毒素生産および病原性に関与していることが示唆されている。さらに、リンゴ病原型菌で AM 毒素生合成遺伝子 (*AMT*) が 1.1-1.7 Mb の (Johnson et al. 2000, Johnson et al. 2001)、イチゴ病原型菌では AF 毒素生合成遺伝子が 1.05 Mb の CD 染色体に座乗している事が明らかとなっている (Hatta et al. 2002)。

当研究室では以前、茎枯病菌の CD 染色体が非病原性 *A. alternata* 菌に水平移動することにより、新たな茎枯病菌が誕生したとする、CD 染色体の水平移動説を証明している (Akagi et al. 2009a, b)。一方で、*ALT* クラスター遺伝子のみを非病原性 *A. alternata* 菌に導入した場合、その導入菌は AAL 毒素生産能が得られるか否か、また、導入菌が AAL 毒素を生産できた場合、病原性も賦与されるどうかは明らかとなっていない。一方、茎枯病菌の毒素生産能および病原性の保持には *ALT* クラスター遺伝子とは別に常染色体上に座乗する遺伝子が関与している可能性も考えられる。

以前より *ALT* クラスターを導入する方法として、BAC クローンをベクターに用いる方法が考えられていた。100 kb 程の *ALT* クラスターの全長が導入されている BAC を非病原性菌に導入すれば、*ALT* クラスター導入形質転換体が作出できることが予想された。一方、BAC はサイズが大きいことから、精製の作業中に切断されることが多いこと、またコピー数が少ないことから大量の DNA を得ることが困難であることなどから、形質転換体を得ることは出来なかった。

そこで本研究では、簡易に大量の DNA が増幅可能な long PCR を使用し、*ALT* クラスターを 4 断片に分けて増幅した。これらの PCR 産物を非病原性 *A. alternata* 菌株に導入することで、これまでに見出されている AAL 毒素生合成遺伝子で AAL 毒素が生産可能であるかどうかを検討した。

第 2 節 材料と方法

1: 供試菌

AAL 毒素を生産する病原性 *A. alternata* 菌、As-27 および非病原性 *A. alternata* 菌、O-94 菌株を使用した。

2: DNA 操作

DNA や RNA の抽出、簡単な操作は第 2 章に従った。

3: *ALT* クラスタ遺伝子導入株の作成

As-27 の DNA をテンプレートに *ALT* クラスタを 4 断片に分け、PCR により増幅した (図 28)。増幅には KOD FX (TOYOBO) を使用した。同様にハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hph*) についてもプラスミド DNA の pAN7-1 をテンプレートに増幅した。これら 5 種類の PCR 産物を、O-94 菌株に 2-10 に従い co-transformation した。ただし、今回はプロトプラスト 80 μ l (1.25×10^8 個/ml) に対し、5 種の PCR 産物を約 50 μ l 用いた。形質転換により 94H2 菌株が得られたが、この菌株の *ALT10* に欠失が見られた。そのため、*ALT10* の ORF (Alt10AF/Alt10-ComR) およびジェネティシン耐性遺伝子 (*npt*) を PCR により増幅し、上記と同様な方法で 94H2 に co-transformation した。

4: *ALT* クラスタ遺伝子導入株のスクリーニング

2-10 に従って選抜されたハイグロマイシン耐性菌株を電子レンジ法により DNA 抽出後、Quick Taq (TaKaRa) によりそれぞれ *ALT* クラスタ 4 断片の一部である *ALT1*, *ALT2*, *ALT3* および *ALT10* の内部領域を PCR により増幅した。電気泳動でバンドを確認後、3 本以上バンドが検出される菌株についてのみ、再度、液体窒素法で DNA を抽出し、PCR により *ALT1-13* の内部領域を増幅後、電気泳動でバンドの有無を確認した。

5: 発現解析

ALT クラスタが導入されたと考えられる菌株の発現解析を行った。2-4-1 に従い、RNA を抽出後、逆転写反応を行い、*ALT* クラスタ遺伝子それぞれの内部領域を増幅するプライマーで PCR を行った。

6: DNA シーケンス

各菌株の MAT1-1-1 遺伝子の塩基配列の解析は株式会社ファスマックの受託 DNA シーケンス解析を利用した。得られた配列は GENETYX を使用し、アラインメントを行った。画像の加工には Adobe Photoshop Elements 8 を使用した。

第3節 結果

1: コンストラクトの作成

全 *ALT* クラスターの遺伝子を導入するためのコンストラクトの構築を試みた。PCR で *ALT* クラスターの全長および *ALT3-11* の増幅を行ったが、PCR 増副産物は得られなかった (データなし)。そこで、*ALT* クラスターの *ALT* 遺伝子部分のみを PCR で増幅し、かつ導入する断片が少数になるようにコンストラクトを構築した (図 28)。

2: 導入株の作出

5-2-3 に従い、As-27 の DNA をテンプレートにし long PCR を行った。Long PCR 増幅産物、4 断片を電気泳動によりサイズを確認した結果、13.6 kb, 12.9 kb, 15.8 kb および 17.7 kb だった。続いて 5-2-3 に従い *hph* の増幅も行った。これら 5 つの PCR 増幅産物を 2-10 および 2-16 に従い、O-94 菌株に co-transformation した。

5-2-4 に従い、*ALTI-13* 遺伝子の内部領域を PCR で増幅し、ハイグロマイシン耐性形質転換体 136 菌株のスクリーニングを行ったところ、2 菌株で全てのバンドが検出された。これら 2 菌株を 94H2 および 94H36 とし、以降の実験に用いた (図 29a)。

3: 発現解析

2-4 および 5 に従い、As-27 および 94H2 菌を変法リチャーズで 7 日間静置培養し、RNA を抽出後、cDNA を行い、これをテンプレートとして *ALTI-13* の内部領域を増幅するプライマーで PCR を行った。予想通り As-27 のバンドと同サイズのバンドが 94H2 菌株で検出された。一方、親株とした O-94 菌株が保持していない *MSAS* 遺伝子の内部領域を増幅したバンドは両菌株で検出されなかった (図 29b)。

4: 94H2 菌株の HPLC 解析および LC-MS 解析

2-15-1 および 2-15-3 に従い、培養ろ液から AAL 毒素の抽出を行った。それらの HPLC 解析を行った結果、94H36 菌株由来の培養ろ液からは目立ったピークが検出されなかった一方、94H2 菌株の培養ろ液からは AAL 毒素とは異なるリテンションタイムにピークが見られた。これは以前、*ALT10* の KO 株で得られたピークとリテンションタイムが同一だった (図 30a)。LC-MS 解析を行った結果、これらのピークは AAL-pentolamine と同一だった (図 30b)。

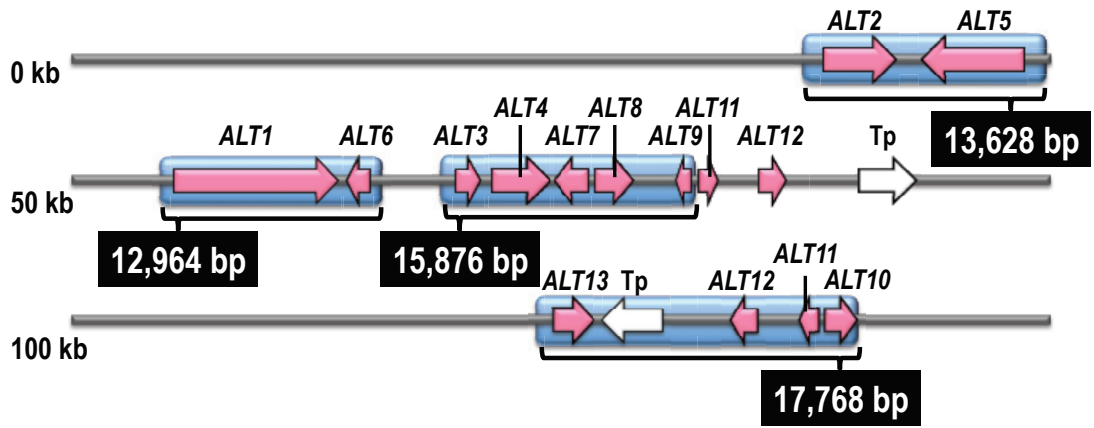
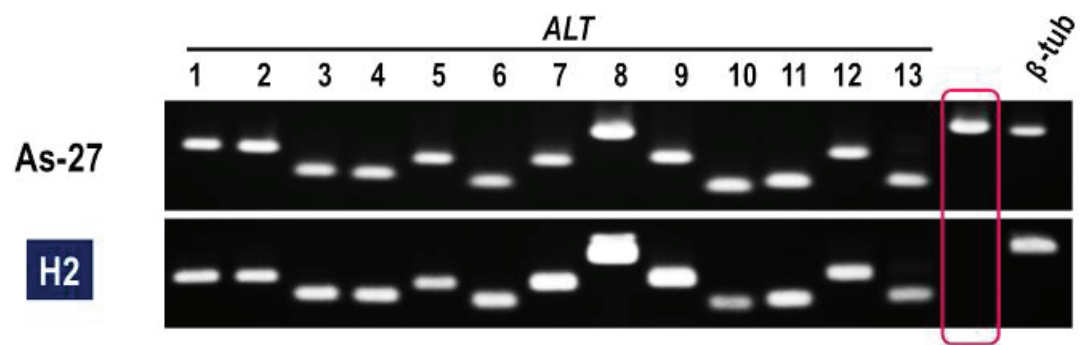


図 28 増幅した *ALT* 遺伝子の位置およびサイズ

a



b

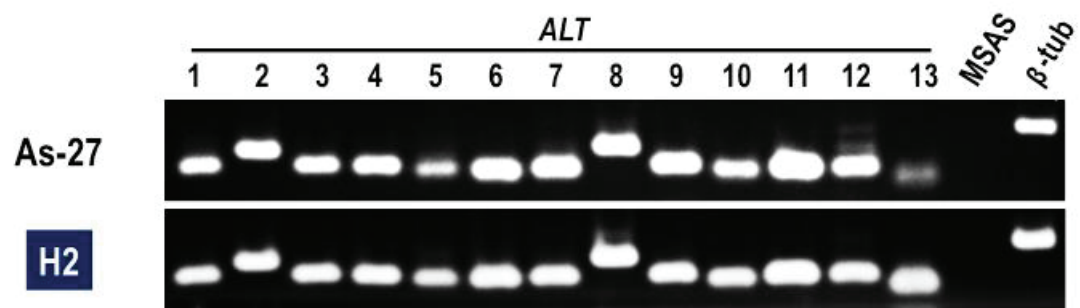
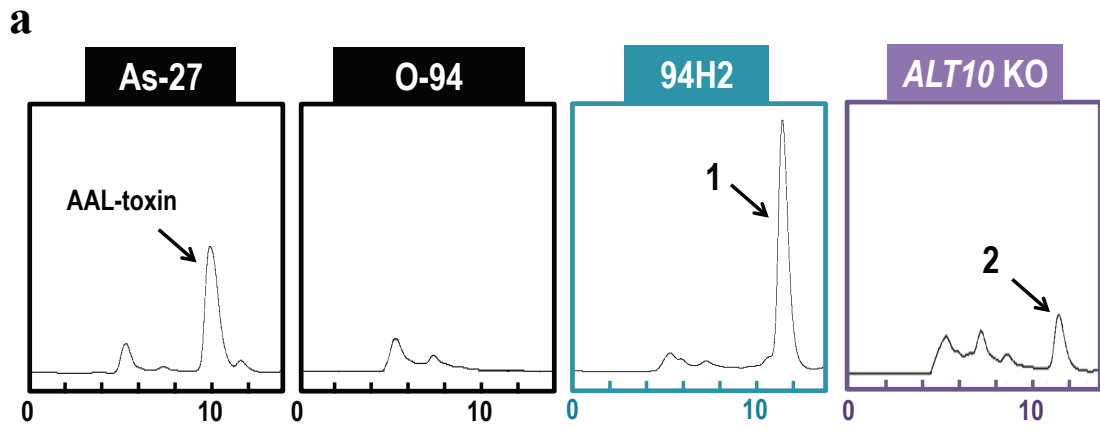


図 29 *ALT1-13* 遺伝子の導入の確認

a; テンプレートに DNA を用いた

b; *ALT1-13* 遺伝子の発現解析



b

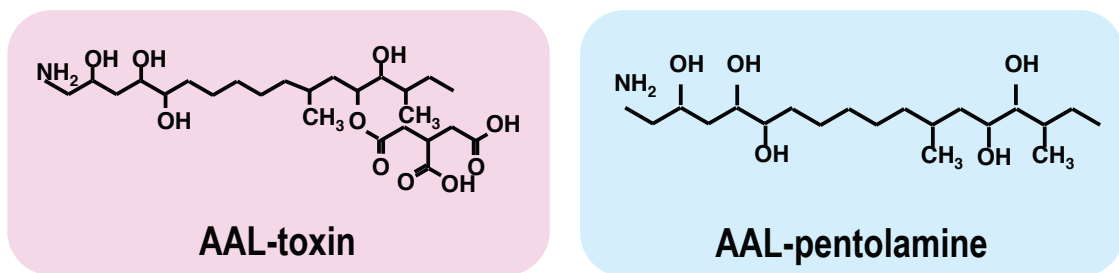


図 30 AAL 毒素および AAL 毒素類似体の解析

a; 94H2 および *ALT10KO* 株の HPLC 解析

1, 2; 同一ピーク

b; AAL 毒素および AAL-pentolamine の構造

5: 94H2 菌株の病原性検定および毒素生産能検定

94H2 菌株の病原性検定および毒素生産能検定は 2-15-2 および 2-14 に従って行った。野性株、As-27 で見られる病斑が 94H2 および *ALT10KO* 株ではほとんど見られなかった。また、毒素生産能検定でも同様に As-27 で見られる壊死が 94H2 および *ALT10KO* では激減していた (図 31)。

5: 94H2::*ALT10* 株の作出

94H2 菌株が *ALT10KO* 株と同一な物質を生産したことおよび AAL 毒素生合成の推定経路から *ALT3*, *9*, *10* および *12* に問題が生じている可能性が考えられた。これら 4 遺伝子は O-94H2 に導入した *ALT* クラスター 4 断片の端に位置しているものが多い。*ALT* クラスター導入時に使用したコンストラクト増幅用プライマーで 94H2 菌株の DNA をテンプレートに long PCR を行った。その結果、94H2 菌株では *ALT10-13* までは含む 17.7 kb のバンドが検出されなかった (図 32)。これらの結果から、導入したコンストラクトの *ALT10* 側に何らかの問題が生じた可能性が考えられたため、*ALT10* を 5 つの断片に分けて PCR 解析を行った (図 33a)。その結果、94H2 菌株では *ALT10* の 3' 側のバンドが増幅されなかった (図 33b)。そこで、*ALT10* の ORF を 5-2-3 に従い、ジェネティシン耐性遺伝子 (*npt*) とともに 94H2 に co-transformation した。*ALT10* の内部領域を PCR によりスクリーニングした結果、ジェネティシン耐性形質転換体 100 菌株中 9 菌株でバンドが検出された。そのうちの 2 菌株を 94H2G36 および 37 菌株とし、以降の実験に用いた。

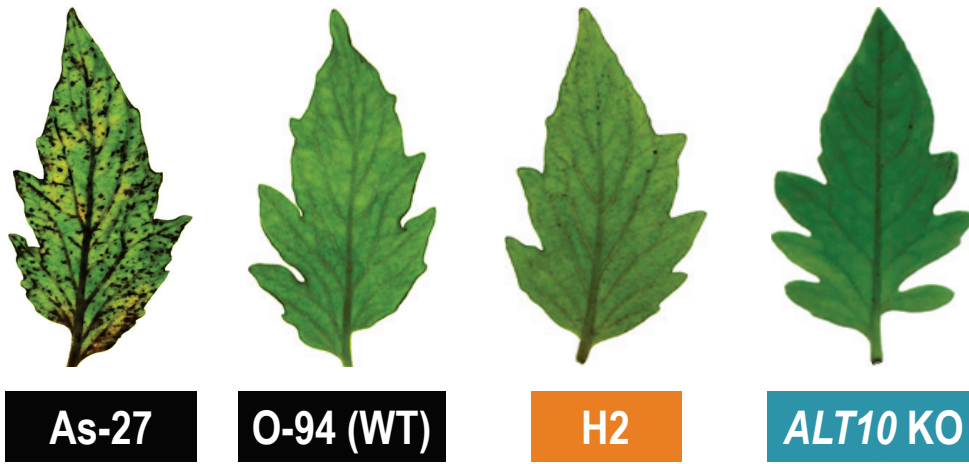
6: *ALT* クラスターおよび *ALT10* 導入株の HPLC 解析および病原性検定

94H2G36 および 37 の HPLC 解析および病原性解析を 2-15 および 2-14 に従って行った。94H2G36 および 37 菌株には As-27 菌株と同一な AAL 毒素のピークが検出された。また、AAL-pentolamine を生産する 94H2 菌株では病斑は見られない一方、94H2G36 および 37 菌株では野性株と同様の病斑がみられた (図 34)。

7: コンタミネーションの確認

94H2G36 および 37 菌株が As-27 のハイグロマイシン形質転換体のコンタミネーションである可能性も考えられたため、O-94 菌株では検出されない *MSAS* 遺伝子の内部領域を PCR により増幅した。その結果、As-27 菌株では見られるバンドが形質転換体では検出されなかった (図 35a)。As-27 と O-94 では異なる配列を持つ *MAT1-1-1* 遺伝子について、これら菌株のシーケンス解析を 5-2-7 に従って行った。結果、O-94 および形質転換体の *MAT1-1-1* 遺伝子の配列は全て同一である一方で、As-27 とは

a



b



図 31 *ALT* クラスター遺伝子導入菌株 (94H2) の表現型解析

a; 94H2 の病原性解析

b; 94H2 の毒素生産能解析

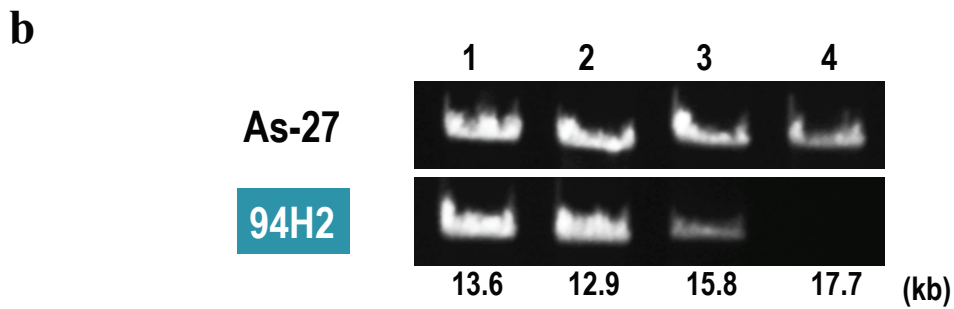
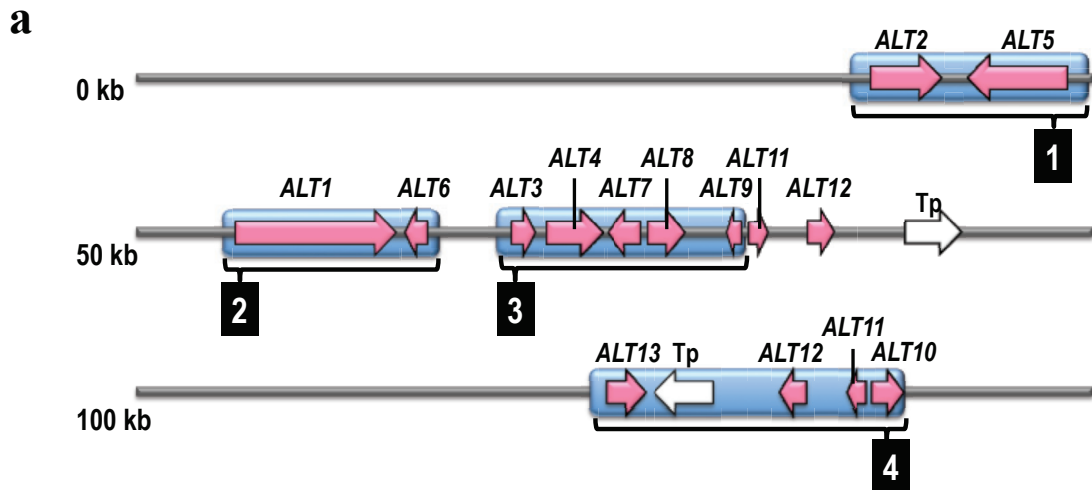


図 32 PCR による導入断片の確認

a; *ALT* クラスターの構造

1-4; PCR により増幅した範囲

b; 増幅断片の泳動図

数字の 1-4 は a に対応している。

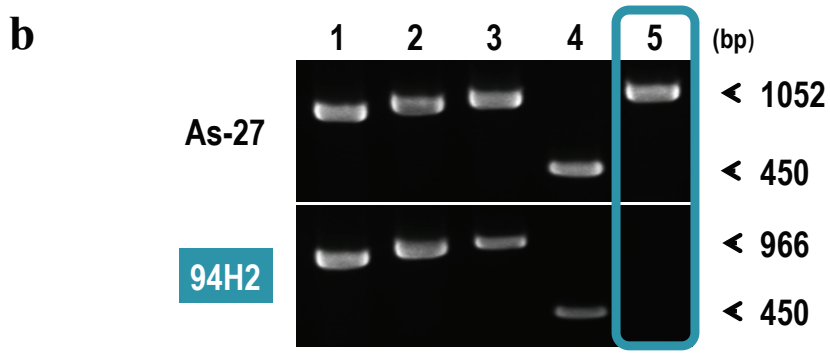
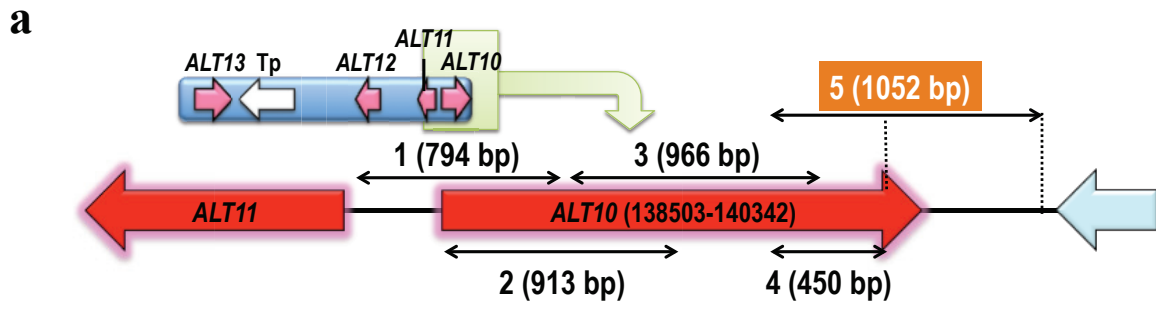


図 33 94H2 菌株における *ALT10* の欠失
 a; *ALT10* 付近の模式図
 b; 94H2 における *ALT10* 付近の 5 断片の PCR 解析
 1-5 は a の模式図に対応している。

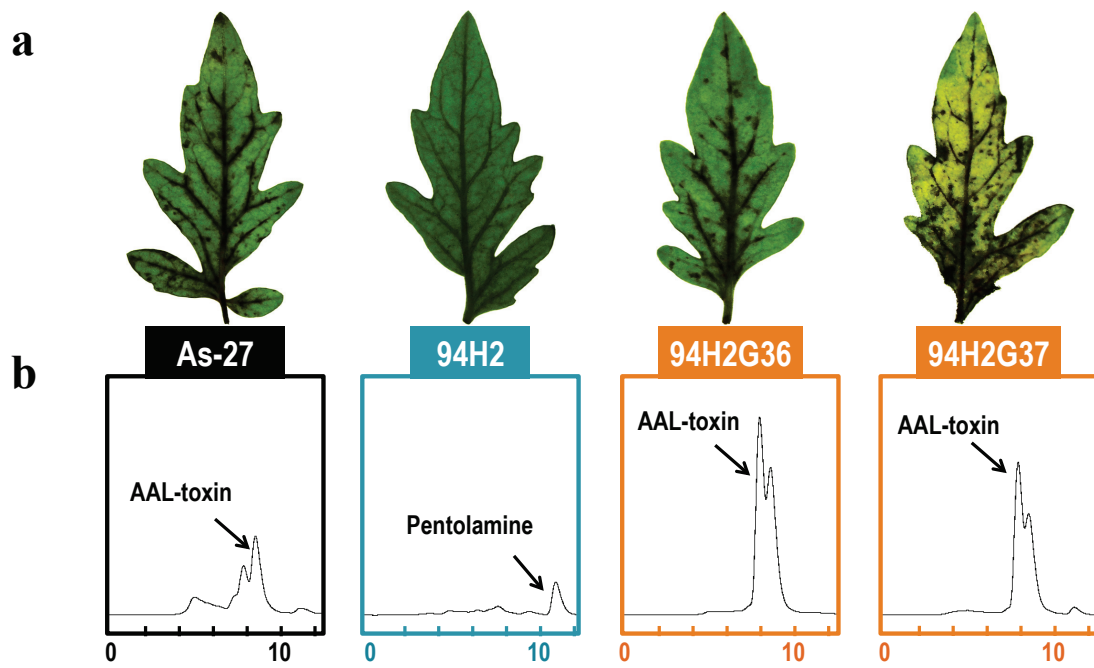


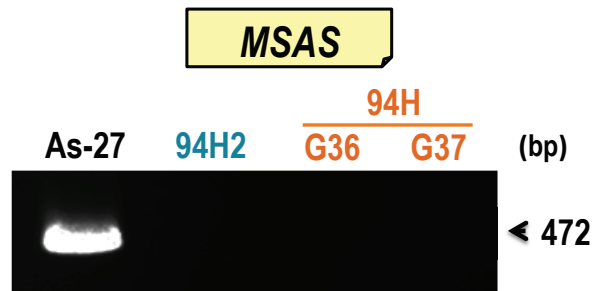
図 34 94H2::*ALT10* 株の病原性および HPLC 解析

a; 94H2::*ALT10* 株の病原性解析

As-27: 野性株、94H2: *ALT* クラスター遺伝子導入株、94H2G36-37: 94H2 に *ALT10* を相補した株

b; 94H2::*ALT10* 株の HPLC 解析

a



b

MAT1-1-1

```
94H2G37 61 GCTCTTAATGCCTTTGTTGGATTTCTGTGTAAGTACACTACTCCCCACCGCAGCGAAATC120
94H2G36 61 GCTCTTAATGCCTTTGTTGGATTTCTGTGTAAGTACACTACTCCCCACCGCAGCGAAATC120
94H2     61 GCTCTTAATGCCTTTGTTGGATTTCTGTGTAAGTACACTACTCCCCACCGCAGCGAAATC120
O-94    61 GCTCTTAATGCCTTTGTTGGATTTCTGTGTAAGTACACTACTCCCCACCGCAGCGAAATC120
O-94 MAT 61 GCTCTTAATGCCTTTGTTGGATTTCTGTGTAAGTACACTACTCCCCACCGCAGCGAAATC120
As-27   61 GCTCTTAATGCCTTTGTTGGATTTCTGTGTAAGTACACTACTCCCCACCGCAGCGAAATC120
```

図 35 94H2 および 94H2G36-37 菌株の親株の確認

a; 94H2G36-37 菌株の MSAS 遺伝子の増幅

b; 94H2 および 94H2G36-37 菌株における MAT1-1-1 遺伝子のシーケンスアラインメント

配列が異なっていた (図 35b)。さらに核型についても検討を行った。2-17に従い、各菌株の核型解析を行ったところ、As-27 で見られる 1 Mb の CD 染色体は他の菌株では見られなかった (図 36)。

8: 94H2 菌株の CHEF サザン解析

プローブに *ALT6* の内部領域を用いた CHEF サザン解析を行った結果、As-27 菌株では 1 Mb の CD 染色体にのみバンドが検出された。一方で、導入株の 94H2 菌株には 4 本の常染色体にバンドが検出された (図 36)。

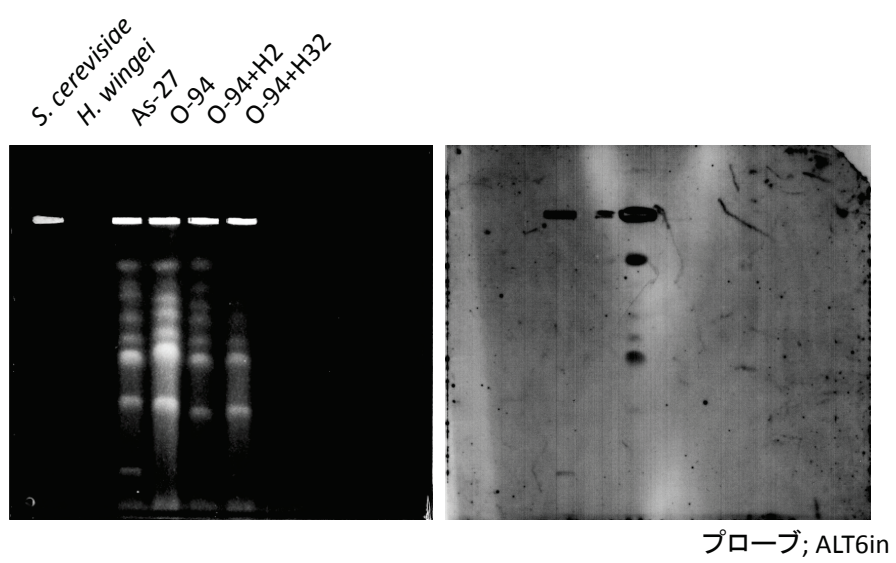


図 36 94H2 および 94H2G36-37 菌株の CHEF 解析

第4節 考察

ALT クラスターを含む4断片を導入後、得られた94H2および94H36の両菌株は*ALT1-13*までの遺伝子が発現していた。94H2菌株の培養ろ液からはpentolamineが検出された一方で、94H36菌株の培養ろ液からはO-94と同様なピークが検出された(データ無し)。PentolamineはAAL毒素のトリカルボン酸部分が付加されていない物質であることから、AAL毒素の生合成経路のうち、トリカルボン酸の付加に關与する遺伝子に異常があると考えられた。導入した4断片のPCRを94H2で行ったところ、*ALT10*を含む17.7 kbの断片はPCRによりバンドが得られなかった(図32b)。これらのことから、94H2は、導入断片の端部に欠失もしくは何らかの変異が起きていると考えられた。そこで本断片の5'側および3'側の詳細な解析を行った結果、*ALT10*の3'側が欠失していることが示された(図33b)。これまでに当研究室では形質転換を行う際に8 kb以上の長鎖のコンストラクトを使用したことが無く、コンストラクトに長鎖を用いることの可否については不明だった。今回の結果から、長鎖の断片を形質転換に使用できる可能性が明らかとなった。一方で、コンストラクトの末端部が形質転換時に欠失や変異が起きる可能性を考慮し、コンストラクトの両端を遺伝子に含まない程度、余分に増幅した方が良いと考えられた。

導入した各断片の染色体での順序を調べるため94H2をテンプレートに、それぞれ断片の末端部位にプライマーをとり、long PCRにより増幅した。検出されたバンドから、断片2および3が近接して導入されていると考えられた。一方、これら以外の断片においてはlong PCRで増幅可能な距離よりも離れていることが示唆された。HST生合成遺伝子は染色体上にクラスター化していることが報告されている(Akagi et al. 2005, Akamatsu et al. 2003, Harimoto et al. 2007, Hatta et al. 2002, Johnson et al. 2001)。また茎枯病菌においては約100 kbに*ALT* 遺伝子が座乗していることが報告されている(赤木 2010)。これらのことから、94H2に導入した*ALT* クラスター遺伝子断片が近接していなくとも、pentolamineを合成可能であることが示唆された。

94H2に*ALT10*のORFを導入した菌株、94H2G36および37菌株はAAL毒素を生産し、病原性を獲得した。CD染色体の配列は、今回O-94に導入した4断片以外は、AAL毒素の生産および病原性に不必要であることが示唆された。*A. nidulans*の転写調節遺伝子であるAflRはアフラトキシン生合成クラスターの制御を行うことが報告されている。クラスター遺伝子であるA遺伝子がAflRの制御を外れた場所に再導入された場合、その遺伝子はAflRの制御を受けない。今回の実験から、第3章で機能解析を行ったグローバルレギュレーターLaеAはCD染色体に座乗していない、

順序や座乗染色体が異なる *ALT* クラスター遺伝子においても制御が可能であること、また AfIR のように SM クラスターを一括して制御していないことが強く示唆された。

イチゴ黒斑病菌、リンゴ斑点落葉病菌、ナシ黒斑病菌およびタンゼリン spot 病菌などの HST 生合成クラスター遺伝子の多くは、ゲノム上に 2 コピー以上存在している。イチゴ黒斑病菌、リンゴ斑点落葉病菌では 3 コピー以上ある遺伝子のうち、2 コピーの欠失株において該当遺伝子の発現低下が認められ、タンゼリン spot 病菌ではサイレンシングにより HST 生合成遺伝子の発現低下が認められた。これらの実験で得られた変異株は、それぞれ HST の生産能が減少、病原性も激減した。これらのことから HST の生産には生合成遺伝子の複数コピーが重要ではないかと考えられている。今回の実験では明らかに出来なかったが、今後、クラスターを一括して同じ場所に導入することが出来れば、コピー数に関する疑問を解く糸口になるかもしれない。また、特定の場所に一括導入することで、LaeA による SM クラスターの制御が染色体ごとなのか座乗位置ごとなのか、について詳細な結果を得られるだろう。さらに、今回の実験で、*ALT* クラスター遺伝子を非病原性 *A. alternata* 菌株に導入することにより、非病原型菌は AAL 毒素生産能および病原性を獲得できたことから、*ALT* クラスターのみで AAL 毒素を生産および病原性の獲得が可能であることが明らかとなった。一方で、茎枯病菌 As-27 と非病原性菌株 O-94 は常染色体の相同性が約 97% 以上であることがシーケンス解析の結果から明らかとなっており (赤木私信)、常染色体上にこれら AAL 毒素の生産や病原性に関与する遺伝子が他にも存在する可能性も考えられた。これを確かめるために、今後は *Magnaporthe oryzae* や *Fusarium verticillioides* などの他属菌に *ALT* クラスターを導入した菌株を作出し、毒素生産能や病原性について解析を行う必要がある。

第 5 章 摘要

植物病原糸状菌類において、近年、ゲノム情報を利用した病原性(力)発現機構解析が進行している。本研究では、宿主特異的毒素生産 *Alternaria alternata* 病原菌を対象として、ネクロトロフ植物病原菌における病原性遺伝子をゲノム情報に基づき機能解析し、その病原性発現機構を包括的に解明することを目指した。病原性関連遺伝子として、毒素生合成遺伝子、シグナリング関連遺伝子およびエピジェネティック制御に関わるグローバルレギュレーター遺伝子を主な解析対象とした。

トマトアルターナリア茎枯病菌 (*A. alternata* tomato pathotype、茎枯病菌) は宿主特異的 AAL 毒素を生産し、特定の感受性トマト品種にのみ病気を引き起こす。AAL 毒素生合成には、少なくとも 13 遺伝子からなる AAL 毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスターが関与する可能性が、これまでに示唆されている。本クラスターは、茎枯病菌が特異的に保有する 1 Mb conditionally dispensable chromosome (CD 染色体) 上の約 100 kb 領域に座乗している。*ALT* クラスターに含まれる 13 遺伝子のうち、毒素生産との関連が従来不明であった 2 遺伝子、*ALT6* (short-chain dehydrogenase/reductase) および *ALT10* (fatty acyl-CoA synthase) に関して、遺伝子ターゲットングによる目的遺伝子ノックアウト (KO) 株を作出した。*ALT6* および *ALT10* KO 株は、ともに AAL 毒素生産能および病原性を失活しており、両遺伝子が本菌の病原性遺伝子として機能していることが証明された。さらに、本菌における病原性染色体である CD 染色体に座乗する他の病原性関連遺伝子を探索するため、CD 染色体の完全シーケンスデータを利用して候補遺伝子を選抜した。CD 染色体に座乗する 4 つの転写調節因子遺伝子 (*TRF1-4*) およびアベナシン分解酵素遺伝子 (*AVE1*) をターゲットとし、遺伝子 KO 株を作出し病原性検定を行ったが、それぞれの表現型に明確な変化は認められなかった。

一般に、毒素等の二次代謝産物生合成には、多数の遺伝子群からなるクラスター全領域が必要であり、その一括導入は極めて困難である。本研究では、*ALT* クラスター遺伝子群のみによって、非病原性(腐生性) *A. alternata* に AAL 毒素生産能および病原性が付与されるかを明らかにするため、クラスター遺伝子群の一括導入を試みた。全長約 100 kb にわたるクラスター領域を 4 断片に分割して、非病原性系統に co-transformation により導入した。導入株の培養ろ液中には、AAL 毒素生産は認められなかったが、AAL 毒素前駆体の存在が見出された。本前駆体は *ALT10* KO 株において検出される代謝産物と一致していた。さらに導入配列を詳細に解析したところ、*ALT10* フランキング領域に欠失が認められた。そこで *ALT10* を本菌株に再導入した結果、AAL 毒素生産能および病原性が確認された。以上の結果から、*ALT* ク

ラスター遺伝子群のみで、非病原性 *A. alternata* 系統が AAL 毒素生産能および病原性を獲得できることが明らかとなり、本クラスターの病理学的重要性が確認された。

G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) は特徴的な 7 回膜貫通構造を持つ膜蛋白質であり、各種シグナル伝達に関与している。本研究では、茎枯病菌ドラフトゲノム情報から、本菌における GPCR 遺伝子の探索を行った。一般に、GPCR 遺伝子は生物間で相同性が低いため同定は困難であるが、ゲノム情報の活用により本菌から初めてクローニングされた。候補遺伝子において 7 回膜貫通構造を調べた結果、4 つの GPCR 様遺伝子 *AaGPR1-4* が見出された。それぞれの KO 株を作出し、病原性、AAL 毒素生産能および形態など各種表現型に及ぼす影響を検定した。その結果、carbon/amino acid receptor class に分類される *AaGPR3* 変異体において、孢子形態に差異が認められ、病原性の低下が観察された。この結果より、GPCR 遺伝子が本菌の形態形成および病原性発現に関与している可能性が示唆された。

エピジェネティック制御因子である *LaeA* は、菌類の二次代謝産物生合成におけるグローバルレギュレーターと称され、複数の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの発現に関与している。一方、植物病原菌における *LaeA* の機能に関しては不明な点が多い。本研究では茎枯病菌に加え、リンゴ斑点落葉病菌 (*A. alternata* apple pathotype) およびイチゴ黒斑病菌 (*A. alternata* strawberry pathotype) におけるゲノム情報を用いて、*LaeA* ホモログを local BLAST 解析により同定し、それぞれ *AtLAE1*、*AaLAE1* および *AsLAE1* と命名した。それぞれの遺伝子に関して KO 株を作出し、AAL 毒素、AM 毒素および AF 毒素生産能と病原性検定を行った。その結果、*LaeA* ホモログがそれぞれの宿主特異的毒素生産と宿主植物に対する病原性を正に制御していることが明らかとなった。さらに、*AtLAE1* KO 株において、培養時のコロニー形態が変化するとともに、孢子生産も著しく減少し、*LaeA* が本菌の表現型に多方面にわたり影響を及ぼしていることが明白となった。また、*AtLAE1* KO 株では、*ALT* クラスター全領域にわたり遺伝子発現が低下しており、*LaeA* により特定のゲノム領域が発現制御されている可能性が示唆された。

以上の結果、ネクロトロフ植物病原菌である *A. alternata* において、機能ゲノム解析を通して、毒素生合成遺伝子、シグナリング関連遺伝子およびグローバルレギュレーター遺伝子の病原性発現への関与が明らかとなった。

第 6 章 Summary

Alternaria alternata (Fr.) Keissler, which is distributed worldwide, is generally saprophyte. However, some strains produce host-specific toxins (HSTs) responsible for fungal pathogenicity/virulence and diseases on host plants. There are seven pathogenic variants (pathotypes) of *A. alternata* that produce HSTs and cause host plant diseases. The chemical structures and physiological modes of action differ among each HST. For example, HSTs produced by the tomato pathotype of *A. alternata* (synonym *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, synonym *A. arborescens*), the causal agent of *Alternaria* stem canker disease in tomato, are polyketide toxins known as AAL-toxins.

The AAL-toxin biosynthetic gene (*ALT*) cluster, which consists of 13 genes, was found to reside on 1.0 Mb of conditionally dispensable chromosome (CDC) in the tomato pathotype. Here, two *ALT* genes, *ALT6* and *ALT10* were disrupted to examine involvement in the toxin production and pathogenicity of the pathogen. Both of the knockout (KO) mutants for *ALT6* and *ALT10* lost AAL-toxin production and pathogenicity. The results indicated that *ALT6* and *ALT10* are essential for AAL-toxin biosynthesis and pathogenicity of the pathogen. In addition, the entire *ALT* cluster genes had been introduced to the nonpathogenic strain of *A. alternata*. The *ALT*-introduced strain produced AAL-toxin and showed complete pathogenicity on the host plant, indicating that the *ALT* cluster itself determines full pathogenicity of the tomato pathotype of *A. alternata*.

The global regulator *LaeA* is required for the expression of secondary metabolite biosynthetic genes in filamentous fungi such as *Aspergillus nidulans*. In this study, we identified *LaeA* homologues encoding methyltransferase in tomato, strawberry and apple pathotypes of *A. alternata*, designating them *AtLAE1*, *AsLAE1* and *AaLAE1*, respectively. Expression of the AAL-toxin biosynthetic gene *ALT1* in the *AtLAE1*-deleted mutant of the tomato pathotype was reduced. Correspondingly, AAL-toxin production and virulence of the mutant were significantly decreased. Spore production and hyphal growth of the mutant were also affected. Production of the host-specific AF-toxin by the strawberry pathotype was decreased in the *AsLAE1*-deleted mutant, with a reduction in virulence on the host plant. The mutant also showed defects in hyphal growth and sporulation. The *AaLAE1*-deleted mutant of the apple pathotype showed the same phenotype. Thus, the global regulator gene *LaeA* positively regulates HST biosynthesis, pathogenicity, growth and differentiation in *A.*

alternata pathotypes.

G protein-coupled receptors (GPCRs) are a large transmembrane receptor family that is involved in many cellular signaling pathways. In the present study, GPCR-family genes from the toxigenic and necrotrophic plant pathogen *A. alternata* have been cloned and characterized. Three GPCR-encoding genes, *AaGPR1*, 2, and 3 were identified in the draft genome data of the *A. alternata* tomato pathotype, which produces the host-specific AAL-toxin. *AaGPR1*, 2, and 3 encode proteins that containing the seven transmembrane domains that are characteristic of GPCRs. Targeted deletion of *AaGPR1*, 2, and 3 in the *A. alternata* tomato pathotype was conducted to understand the influence of G-protein signaling mechanisms on developmental processes and virulence of this pathogen. No changes in colony morphology or AAL-toxin production were observed for the deletion mutants $\Delta AaGPR1$, 2, and 3, compared with the wild-type strain. However, one deletion mutant, $\Delta AaGPR3$, exhibited aberrant conidial morphology including decreased conidial length and beak formation. The ability to induce the formation of necrotic lesions on susceptible leaves also significantly decreased in $\Delta AaGPR3$, indicating a reduction in virulence. These defects are similar to the phenotypes found for the $G\alpha$ gene mutant of *A. alternata*. These results indicate that the G-protein signal transduction pathway appears to be involved in conidial developmental and virulence of *A. alternata*.

第 7 章 引用文献

Akagi, Y., Akamatsu, H., Yamamoto, M., Tsuge, T., Otani, H. and Kodama, M. (2005) Characterization of the genomic region, controlling biosynthesis of host-specific AAL-toxins, on the conditionally dispensable chromosome of the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics Newsl* 52: 188

Akagi Y., Akamatsu H., Otani H. and Kodama M. (2009a) Horizontal chromosome transfer, a mechanism for the evolution and differentiation of a plant-pathogenic fungus. *Eukaryot Cell* 8: 1732-1738

Akagi, Y., Taga, M., Yamamoto, T., Tsuge, Fukumasa, Y., Nakai, H., Otani, H. and Kodama, M. (2009b) Chromosome constitution of hybrid strains constructed by protoplast fusion between the tomato and strawberry pathotypes of *Alternaria alternata*. *Journal of General Plant Pathology* 75: 101-109

Akamatsu, H., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H., and Kohmoto, K. (1997) AAL toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology* 87: 967-972.

Akamatsu, H., Otani, H. and Kodama, M. (2003) Characterization of a gene cluster for host-specific AAL-toxin biosynthesis in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics Newsl* 50 (Supl): 355

Amselem, J., Cuomo, A. C., Kan, A. L. V. J., Viaud, M., Benito, P. E., Couloux, A., Coutinho, M. P., Vries, P. R., Dyer, S. P., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, M. K., Pradier, J., Quevillon, E., Sharon, A., Simon, A., Have, ten A., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Winker, P., Andrew, M., Anthouard, V., Beever, E. R., Beffa, R., Benoit, I., Bouzid, O., Brault, B., Chen, Z., Choquer, M., Collemare, J., Cotton, P., Danchin, G. E., Silva, D. C., Gautier, A., Giraud, C., Giraud, T., Gonzalez, C., Grossetete, S., Guldener, U., Henrissat, B., Howlett, J. B., Kodira, C., Kretschmer, M., Lappartient, A., Leroch, M., Levis, C., Mauceli, E., Neuveglise, C., Oeser, B., Pearson, M., Poulain, J., Poussereau, N., Quesneville, H., Rasclé, C., Schumacher, J., Segurens, B., Sexton, A., Silva, E., Sirven,

C., Soanes, M. D., Talbot, J. N., Templeton, M., Yandava, C., Yarden, O., Zeng, Q., Rollins, A. J., Lebrun, M., Dickman, M. (2011) Genomic analysis of the Nectrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. PLoS Genet 7 (8)

Brody, H., and Carbon, J. (1989) Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. Proceeding of The National Academy of Science of The U.S.A. 86: 6260-6263.

Burkholder, A. C., and Hartwell, L. H. (1985) The yeast α -factor receptor: structural properties deduced from the sequence of the *STE2* gene. Nucleic Acids Research 13: 8463-8475

Butchko, R. A., Plattner, R. D., and Proctor, R. H. (2003) *FUM13* encodes a short chain dehydrogenase/reductase required for C-3 carbonyl reduction during fumonisin biosynthesis in *Gibberella moniliformis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 3000-3006

Covert, S. F. (1998) Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. Current Genetics 33: 311-319.

Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J. R., Pan, H., Read, N. D., Lee, Y. H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y. Y., Donofrio, N., Jeong, J. S., Soanes, D. M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeyer, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M. H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L. J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J. E., Birren, B. W. (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 434: 980-986

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., Lee, S. I., Basturkmen, M., Spevak, C. C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scaccocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G. H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G. H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J. H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E. U., Archer, D. B., Penalva, M. A., Oakley, B. R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai,

T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W. C., Denning, D. W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M. S., Osmani, S. A., Birren, B. W. (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438: 1105-1115

Galagan, J., Calvo, S., Borkovich, K., Selker, E., Read, N. D., FitzHugh, W., Ma, L.-J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Jaffe, D., Endrizzi, M., Qui, D., Planakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M. A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C. P., Kinsey, J. A., Braun, E. L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G. O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R. L., Perkins, D. D., Kroken, S., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R. J., Osmani, S. A., DeSouza, C. P. C., Glass, L., Orbach, M. J., Berglund, J. A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D. O., Alex, L. A., Mannhaupt, G., Ebbole, D. J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M. S., Lander, E. S., Nusbaum, C., Birren, B. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422: 859-868

Gao, Q., Jin, K., Ying, S., Zhang, Y., Xiao¹, G., Shang¹, Y., Duan¹, Z., Hu¹, X., Xie, X., Zhou, G., Peng, G., Luo, Z., Huang¹, W., Wang¹, B., Fang, W., Wang, S., Zhong, Y., Ma, L., Leger, J. St. R., Zhao, G., Pei, Y., Feng, M., Xia, Y., Wang, Y. (2011) Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet* 7 (1)

Gonzalez, C., Perdomo, G., Tejera, P., Brito, N., and Siverio, J. M. (1999) One-step, PCR-mediated, gene disruption in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 15:1323-1329

Harimoto, Y., Hatta, R., Kodama, M., Yamamoto, M., Otani, H. and Tsuge, T. (2007) Expression profiles of genes encoded by the supernumerary chromosome controlling AM-toxin biosynthesis and pathogenicity in the apple pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1463

Hatta, R., Ito, K., Hosaki, Y., Tanaka, T., Tanaka, A., Yamamoto, M., Akimitsu, K. and Tsuge, T. (2002) A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics* 161: 59-70

Idnurm, A. and Howlett, B. J. (2001) Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology* 2: 241-255

Itoh, Y., Johnson, R. and Scott, B. (1994) Integrative transformation of the mycotoxin-producing fungus, *Penicillium paxilli*. *Genetics* 25: 508-513

Johnson, L., Johnson, R. D., Akamatsu, H., Salamiah, A., Otani, H., Kohmoto, K. and Kodama, M. (2001) Spontaneous loss of a conditionally dispensable chromosome from *Alternaria alternata* apple pathotype leads to loss of toxin production and pathogenicity. *Current Genetics* 40: 65-72

Johnson, R. D., Johnson, L., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H., and Kohmoto, K. (2000a) Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13: 742-753

Johnson, R. D., Johnson, L., Kohmoto, K., Otani, H., Lane, C. R. and Kodama, M. (2000b) A polymerase chain reaction-based method to specifically detect *Alternaria alternata* apple pathotype (*A. mali*), the causal agent of Alternaria blotch of apple. *The American Phytopathological Society* 90: 973-976

Kheder, A. A., Akagi, Y., Akamatsu, H., Yanaga, K., Maekawa, N., Otani, H., Tsuge, T., Kodama, M. (2012) Functional analysis of the melanin biosynthesis genes *ALMI* and *BRM2-1* in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. *Journal of General Plant Pathology* 78: 30-38

Kim, H., and Borkovich, K. A. (2004) A pheromone receptor gene, *pre-1*, is essential for mating type-specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* 52: 1781-1798

Kodama, M., Otani, H. and Kohmoto, K. (1995) A rapid and sensitive procedure for the quantitative detection of AL-toxin by fluorescence derivatization and separation by high performance liquid chromatography. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 61: 477-480

Kohmoto, K., Otani, H. and Tsuge, T. (1995) *Alternaria alternata* pathogens. In: Kohmoto K, Singh US, Singh RP (eds) Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological biochemical, genetic and molecular bases, vol. 2. Eukaryotes, Pergamon, Oxford, pp 51-63

Kubo, Y., Suzuki, K., Furusawa, I., Yamamoto, M. (1982) Effect of tricyclazole on appressorial pigmentation and penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* 72: 1198-1200

Kusaba, M. and Tsuge, T. (1995) Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Current Genetics* 28: 491-498

Lafon, A., Han, K. H., Seo, J. A., Yu, J. H., Enfert, C. (2006) G-protein and cAMP-mediated signaling in aspergilli: A genomic perspective. *Fungal Genetics and Biology* 43: 490-502

Ma, L., Does, H. C., Borkovich, A. C., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Pietro, A. D., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., Houterman, M. P., Kang, S., Shim, W., Woloshuk, C., Xie, X., Xu, J., Antoniw, J., Baker, S. E., Bluhm, H. B., Breakspear, A., Brown, W. D., Butchko, A. E. R., Chapman, S., Coulson, R., Coutinho, M. P., Danchin, G. J. E., Diener, A., Gale, R. L., Gardiner, M. D., Goff, S., Hammond-Kosack, E. K., Hilburn, K., Hua-Van, A., Jonkers, W., Kazan, K., Kodira, D. C., Koehrsen, M., Kumar, L., Lee, Y., Li, L., Manners, M. J., Miranda-Saavedra, D., Mukherjee, M., Park, G., Park, J., Park, S., Proctor, H. R., Regev, M. A., Ruiz-Roldan, C., Sain, D., Sakthikumar, S., Sykes, S., Schwartz, D. C. B., Turgeon, G., Wapinski, I., Yoder, O., Young, S., Zeng, Q., Galagan, Z. J., Cuomo, A. C., Kistler, H. C. & Rep, M. (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464: 367-373

Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D. W., Galagan, J. E., Nierman, W. C., Yu, J., Archer, D. B., Bennett, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Fedorova, N. D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J. R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., Kikuchi, H. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438: 1157-1161

Miyamoto, Y., Ishii, Y., Honda, A., Masunaka, A., Gomi, K., Peever, T. L., Akimitsu, K. (2009) Function of genes encoding acyl-CoA synthetase and enoyl-CoA hydratase for host-selective ACT-toxin biosynthesis in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 99: 369-377

Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, H., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T. L., Akimitsu, K. (2008) Functional analysis of a multicopy host-selective ACT-toxin biosynthesis gene in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21: 1591-1599

Neer, E. J. (1995) Heterotrimeric G proteins: Organisers of transmembrane signals. *Cell* 80 (2): 249-257

Osbourn, A. E., Clarke, B. R., Dow, J. M., Daniels, M. J. (1991) Partial characterization of avenacinase from *Gaeumannomyces graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38: 301-312

Palmer, M. J. and Keller, P. N. (2010) Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Current Opinion in Microbiology* 13: 431-436

Proctor, R. H., Desjardins, A. E., Plattner, R. D. and Hohn, T. M. (1999) A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genetics and Biology* 27: 100 -112.

Rotem, J. (1994) The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity. American Phytopathological Society, St Paul.

Ruswandi, S. R., Kitani, K., Akimitsu, K., Tsuge, T., Shiraishi, T., and Yamamoto, M. (2005) Structural analysis of cosmid clone pcAFT-2 carrying AFT10_1 encoding an acyl-CoA dehydrogenase involved in AF-toxin production in the strawberry pathotype of *Alternaria alternata*. *Journal of General Plant Pathology* 71: 107-116

Shwab, E. K., Bok, J. W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S. and Keller, P. N. (2007) Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic cell* 6: 1656-1664

Suzuki, S., Taketani, H., Kusumoto, K., and Kashiwagi, Y. (2006) High-throughput genotyping of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* based on colony direct polymerase chain reaction. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102: 572-574

Takano, Y., Kubo, Y., Shimizu, K., Mise, K., Okumo, T., Furusawa, I. (1995) Structural analysis of PKS1, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Molecular and General Genetics* 249: 162-167

Takao, K., Akagi, Y., Tsuge, T., Otani, H. and Kodama, K. (2009) Functional analysis *ALT9* and *ALT10* on the AAL-toxin biosynthetic gene cluster of the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. The 9th Conference on fungal Genetics and Molecular Biology. P-82

Takao, K., Akagi, Y., Tsuge, T., Otani, H. and Kodama, K. (2009) G-protein-coupled receptor genes determined by draft sequencing of the genome of the *Alternaria alternata* tomato pathotype. The 10th Conference on fungal Genetics and Molecular Biology. P-83

Takao, K., Akagi, Y., Tsuge, T., Otani, H. and Kodama, K. (2011) Functional analysis of global regulator, *LaeA* in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. Asian Mycological Congress 2011. P-57

Tanaka, A., and Tsuge, T. (2000) Structural and functional complexity of the genomic region controlling AK-toxin biosynthesis and pathogenicity in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13: 975-986

Tanaka, A., Shiotani, H., Yamamoto, M., and Tsuge, T. (1999) Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 12: 691-702

Thomma, B. P. H. J. (2003) *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4: 225-236

Tseng, M. N., Chung, P. C., Tzean, S. S. (2011) Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 4508-4519

Tsuge, T., Nishimura, S. and Kobayashi, H. (1990) Efficient integrative transformation of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* mediated by the repetitive rDNA sequence. *Gene* 90: 207-214

Vollmer, S. J. and Yanofsky, C. (1986) Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The U.S.A.* 83: 4869-4873

Wang, N. Y., Lin, C. H., Chung, K. R. (2010) A G alpha subunit gene is essential for conidiation and potassium efflux but dispensable for pathogenicity of *Alternaria alternata* on citrus. *Current Genetics* 56: 43-51

Wolkow, P. M., Sisler, H. D., Vigil, E. L. (1983) Effect of inhibitors of melanin biosynthesis on structure and function of appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology* 23: 55-71

Yamagishi, D., Otani, H. and Kodama, M. (2006) G protein signaling mediates developmental processes and pathogenesis of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 19: 1280-1288

Yelton, M. M., Hamer, J. E. and Timberlake, W. E. (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proceeding of The National Academy of Sciences of The U.S.A.* 81: 1470-1474

Yi, H., Bojja, R. S., Fu, J. and Du, L. (2005) Direct evidence for the function of FUM13 in 3-ketoreduction of mycotoxin fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5456-5460

Yoder, O. C., Yang, G., Rose, M. S., Lu, S. W. and Turgeon, B. G. (1994) Complex genetic control of polyketide toxin production by *Cochliobolus heterostrophus*. *Advances in Molecular Plant Microbe Interactions* 3: 223-230

赤木靖典 (2010) トマトアルターナリア茎枯病菌における病原性の進化と多様性形成の分子機構に関する研究. 鳥取大学学位論文.

浜雅弘 (2011) トマトアルターナリア茎枯病菌の conditionally dispensable chromosome に座乗する病原性関連遺伝子の機能解析. 鳥取大学卒業論文.

中道真由美 (2010) トマトアルターナリア茎枯病菌における AAL 毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスターに含まれる cytochrome P450 monooxygenase 遺伝子 (*ALT2*) の機能解析. 鳥取大学卒業論文.

中林賢志 (2010) トマトアルターナリア茎枯病菌における AAL 毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスターの機能解析. 鳥取大学修士論文.

高尾和実、赤木靖典、柘植尚志、尾谷 浩、児玉基一朗 (2009) トマトアルターナリア茎枯病菌の AAL 毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスターに含まれる fatty acyl-CoA synthetase 遺伝子 (*ALT10*) の機能解析. 平成21年度日本植物病理学会関西部会. ポスター発表.

高尾和実、赤木靖典、柘植尚志、尾谷 浩、児玉基一朗 (2010) A transcription factor regulated AAL-toxin biosynthetic gene cluster in *A. alternata* tomato pathotype. 第33回日本分子生物学会年会. ポスター発表.

高尾和実、赤木靖典、柘植尚志、尾谷 浩、児玉基一朗 (2010) トマトアルターナリア茎枯病菌の AAL 毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスターに含まれる short-chain dehydrogenase/reductase 遺伝子 (*ALT6*) の機能解析. 平成22年度日本植物病理学会大会. ポスター発表.

高尾和実、赤木靖典、柘植尚志、尾谷 浩、児玉基一朗 (2010) マトアルターナリア茎枯病菌における G タンパク質共役型受容体遺伝子の機能解析. 平成22年度日本植物病理学会関西部会. 口頭発表.

高尾和実、赤木靖典、柘植尚志、尾谷 浩、児玉基一朗 (2011) トマトアルターナリア茎枯病における global regulator *AaLAEA* の機能解析. 平成23年度日本植物病理学会関西部会. 口頭発表.

高尾和実、赤木靖典、柘植尚志、尾谷 浩、児玉基一朗 (2011) トマトアルターナリア茎枯病菌のドラフトゲノム解析により見出された *AalaeA* 遺伝子の機能解析. 平成23年度日本植物病理学会大会. ポスター発表.

柘植尚志、児玉基一朗、秋光和也、山本幹博 (2002) 植物病原糸状菌の宿主特異的同素生合成の分子機構-毒素生合成遺伝子群をコードする CD 染色体. 科学と生物 40: 654-659

第 8 章 学会誌公表論文リスト

(1) 〔第 3 章〕

The global regulator LaeA controls biosynthesis of host-specific toxins, pathogenicity and development of *Alternaria alternata* pathotypes

Kazumi Takao · Yasunori Akagi · Takashi Tsuge · Yoshiaki Harimoto · Mikihiro Yamamoto · Motoichiro Kodama

Journal of General Plant Pathology (受理)

(2) 〔第 3 章〕

Functional characterization of putative G protein-coupled receptors in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*

Kazumi Takao · Yasunori Akagi · Takashi Tsuge · Motoichiro Kodama

Journal of General Plant Pathology (受理)