

(様式第 13号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 高尾 和実

題目: *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)

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、遺伝子ターゲティ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賦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、機能ゲノミクス解析を通して、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。