

Fusarium oxysporum の病原性関連遺伝子の探索

中央農業総合研究センター ^{かわ}川 ^べ部 ^{まさ}眞 ^と登
東京農工大学 ^{あり}有 ^え江 ^{つとむ}力

はじめに

Fusarium oxysporum は土壤中に普遍的に存在する糸状菌の一種であり、通常、土壤中で腐生生活を送っている (GORDON and MARTYN, 1997)。これら *F. oxysporum* の一部は植物に対し病原性を持ち、多くの栽培種を含む植物に病害を引き起こし、経済的にも大きな被害を与えている (BOOTH, 1971)。一方で、*F. oxysporum* は宿主特異性が高く、宿主範囲により 100 以上の分化型 (formae specialis) に分けられる (BOOTH, 1971)。

F. oxysporum が宿主植物に感染し、発病に至らしめるには以下の現象が正確な制御下において続いて起こらなくてはならないとされている (Di PIETRO et al., 2003)。①宿主植物からのシグナルの認識、②根部表面への付着と侵入菌糸の分化、③根表皮への侵入と導管までの物理的障壁の排除、④植物が生産する抗菌物質への耐性などを含んだ宿主環境への適応、⑤導管内部での菌体の増殖、⑥低分子ペプチドや植物毒素等の病原性を決定づける物質の分泌、である。これらの現象のそれぞれにかかわる、いわゆる「病原性関連因子」を解析するため、多数の研究が行われている。*F. oxysporum* は核相が通常単相 ($n = 1$) であるため、遺伝子破壊による遺伝子機能解析が有効である。これには、病原性に関連すると推定される遺伝子の破壊解析 (ターゲティング) などによるアプローチ、病原性変異株を作出・利用した欠損遺伝子の同定や mRNA あるいはタンパク質発現プロファイルの差等に基づいて病原性関連遺伝子を解析するアプローチがある。前者のアプローチでは、遺伝子の機能の予想が比較的容易である反面、新たな病原性機構を明らかにすることが困難な場合が多い。後者のアプローチでは、新たな病原性機構を見いだす可能性は大きい、遺伝子機能の推定が困難な場合が多い。このようにいずれのアプローチにも長所と短所が存在する。これらのアプローチを組み合わせ、複数の研究グループが *F. oxysporum* の病原性機構に関する研究を行ってきている (Di PIETRO and RONCERO, 1996 ; 1998 ; ARIE et al., 1998 ; HUERTAS-GONZÁLEZ et al. 1999 ; RUIZ-ROLDÁN et al. 1999 ; GARCÍA-

MACEIRA et al., 2000 ; 2001 ; RONCERO et al., 2000 ; Di PIETRO et al., 2001 a ; 2001 b ; 2003 ; GÓMEZ-GÓMEZ et al., 2001 ; 2002 ; NAMIKI et al., 2001 ; INOUE et al., 2002 ; JAIN et al., 2002 ; 2003 ; CARACUEL et al., 2003 ; MADRID et al., 2003 ; OSPINA-GIRALDO et al., 2003 ; KAWABE et al., 2004 ; 2006 ; 2008 ; DUYVESTEIJN et al., 2005 ; REP et al., 2005 ; IMAZAKI et al., 2007 ; MARTÍN-URDÍROZ et al., 2008 ; YOSHIDA et al., 2008 ; JONKERS et al. 2009)。報告された *F. oxysporum* の病原性関連遺伝子に関する研究を表-1 にまとめた。これら報告された遺伝子の中には、シグナル伝達系に関与するもの、宿主環境への適応に関与するもの、細胞壁などの分解に関与するものなど、病原性機構内での役割が明らかとなっているものもある。これらの研究により、*F. oxysporum* の病原性機構は徐々に明らかにされつつあるが、いまだ明らかとなっていないことは多い。また、近年、今まで明らかとなっていなかった宿主特異性に関する遺伝子が報告された (REP et al., 2004 ; HOUTERMAN et al., 2008 ; 2009)。これらの遺伝子は、品種間での病原性の違いを表すレースを決定する非病原性遺伝子としてトマト萎凋病菌において見いだされており、これら遺伝子のさらなる研究が、宿主決定の要因、特に *F. oxysporum* に特徴的な高い宿主特異性を決定する要因の解明の一助となることも考えられる。

現在、多くの病原性関連遺伝子が報告されているが、本稿ではそれら病原性関連遺伝子に関する研究の一例として、筆者らがこれまでに行った *F. oxysporum* の病原性関連遺伝子の遺伝子レベルでの探索について紹介する。

I 病原性変異株の作出と病原性関連遺伝子の探索

筆者らは、病原性変異株を作出・選抜し、病原性変異株において破壊された複数の遺伝子を病原性関連遺伝子として解析してきている (KAWABE et al., 2004 ; YOSHIDA et al., 2008)。変異株作出には、糸状菌において有効と考えられている Restriction Enzyme Mediated Integration (REMI) 法を用いた。この方法は、マーカーとなる薬剤耐性遺伝子をもつプラスミドを制限酵素の消化により直鎖化し、その制限酵素と直鎖化されたプラスミドを同時に菌プロトプラストへ導入することによって、菌ゲノム上の制限酵素サイトにプラスミドが挿入され、その領

The Seeking of Pathogenicity Related Genes in *Fusarium oxysporum*. By Masato KAWABE and Tsutomu ARIE

(キーワード：病原性、フザリウム、トマト、遺伝子破壊)

表-1 既報の *Fusarium oxysporum* 病原性関連遺伝子の研究

遺伝子名	コードする (推定) タンパク質	引用
<i>ARG1</i>	argininosuccinate lyase	NAMIKI et al., 2001
<i>chsV</i>	class V chitin synthase	MADRID et al., 2003 ; MARTÍN - URDÍROZ et al., 2008
<i>chsVb</i>	class VII chitin synthase	MARTÍN - URDÍROZ et al., 2008
<i>FCD1</i>	cellobiose : quinon oxydoreductase	KAWABE et al., 2006
<i>fga1</i>	G protein alpha subunit	JAIN et al., 2002
<i>fgb1</i>	G protein beta subunit	JAIN et al., 2003
<i>fmk1</i>	MAP kinase	Di PIETRO et al., 2001 a
<i>FoSNF1</i>	protein kinase	OSPINA - GARALDO et al., 2003
<i>FOW1</i>	mitochondrial carrier protein	INOUE et al., 2002
<i>FOW2</i>	transcription regulator	IMAZAKI et al., 2007
<i>FPD1</i>	transmembrane protein	KAWABE et al., 2004
<i>FRP1</i>	F - box protein	DUYVESTEIJN et al., 2005 ; JONKERS et al., 2009
<i>PacC</i>	pH signaling transcription factor	CARACUEL et al., 2003
<i>pg1</i>	endopolygalacturonase	ARIE et al., 1998 ; Di PIETRO and RONCERO, 1996 ; 1998
<i>pg5</i>	endopolygalacturonase	GARCÍA - MACEIRA et al., 2001
<i>pgx4</i>	exopolygalacturonase	GARCÍA - MACEIRA et al., 2000
<i>pl1</i>	pectate lyase	HUERTAS - GONZÁLEZ et al. 1999
<i>Prt1</i>	subtilase	Di PIETRO et al., 2001 b
<i>sap1</i>	aspartic proteinase	YOSHIDA et al., 2008
<i>SIX1</i>	cysteine - rich protein	REP et al., 2005
<i>SIX3</i>	unknown	HOUTERMAN et al., 2009
<i>SIX4</i>	unknown	HOUTERMAN et al., 2008
<i>xyl3</i>	endoxyalanase	RUIZ - ROLDÁN et al., 1999
<i>xyl3</i>	endoxyalanase	GÓMEZ - GÓMEZ et al., 2002 ; RUIZ - ROLDÁN et al., 1999
<i>xyl4</i>	endoxyalanase	GÓMEZ - GÓMEZ et al., 2002
<i>xyl5</i>	endoxyalanase	GÓMEZ - GÓMEZ et al., 2001

域に存在する遺伝子の破壊とタギングが同時に起こることを期待する方法である (RIGGLE and KUMAMOTO, 1998)。

筆者らはトマト萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) race 2 880621a-1 株より、薬剤耐性遺伝子としてハイグロマイシン B 耐性遺伝子をもつプラスミド pCSN43 を用いた REMI によって、1,500 以上の形質転換株を作出した。得られた形質転換株からは、病原性検定 (バイオアッセイ) によって病原性変異株を選抜した後、以降の解析に適するサンプルを選抜するため、選抜した病原性変異株のゲノム DNA 上へのプラスミドの挿入様式を決定した。解析に適する挿入様式と適さない挿入様式の一例の模式図を図-1 に示した。図-1 (1) ではゲノム上の 1 箇所 (*Hind* III サイト) にプラスミドの挿入が起きており、この場合、プライマー A またはプライマー A' を用いた TAIL-PCR (LIU and WHITTIER, 1995) などによる手法で、既知塩基配列 (プラスミド) に隣接した未知塩基配列 (α または α') を単離できるため、解析に適したサンプルとなる。しかし、図-1 (2) ではゲノム上に 2 箇所以上 (*Hind* III サイト) でプラスミドの挿入が起きており、この場合、プライマー A またはプライマー A' を用いた TAIL-PCR などによる手法で、既知塩

基配列 (プラスミド) に隣接した未知塩基配列が二つずつ (α と β または α' と β') 単離されてしまい、どちらの領域へのプラスミドの挿入が病原性への変異を引き起こしたのか不明である。そのため、解析に適さないサンプルとなる。また、REMI による染色体異常により、解析に適さないサンプルとなることもある。

病原性変異株として選抜されたうちの 1 株, r120 株では、ゲノム上の *Hind* III サイト (REMI 法で用いた制限酵素サイト) の 1 箇所 で 1 コピーのプラスミド挿入が起きていることが、ゲノムサザンハイブリダイゼーションにより確認された (図-1 (3))。このゲノムサザンハイブリダイゼーションには、プローブとして REMI に用いたプラスミド pCSN43 を用い、ゲノムの消化には REMI に用いた *Hind* III と、プラスミド上に制限酵素サイトのある *Mlu* I を用いた。図-1 (3) で示されたバンドパターン (*Hind* III 消化では 1 バンド, *Mlu* I 消化では 2 バンド) より、ゲノム上へのプラスミドの挿入は 1 箇所 で起きていることが考えられた。

r120 で破壊された遺伝子は pCSN43 によりタギングされているため、プラスミドの既知塩基配列に隣接した *F. oxysporum* のゲノム領域を TAIL-PCR により単離し、

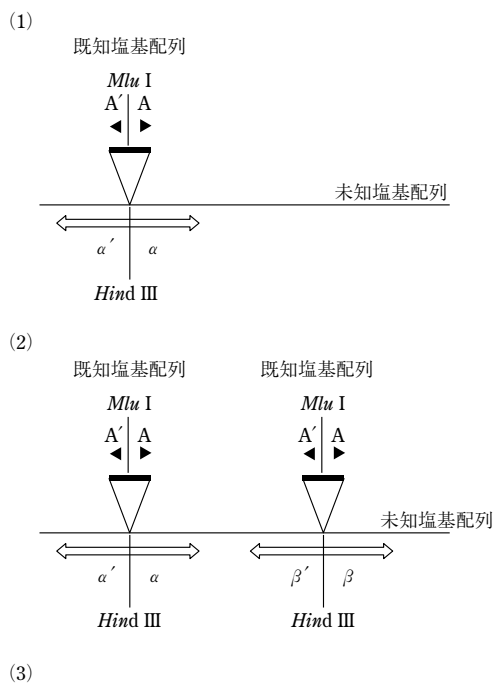


図-1 ゲノム上でのプラスミドの挿入様式と解析に適するサンプルの選抜の一例

A, A' は TAIL-PCR に用いるプライマーを, α , α' , β , β' は得られる未知の配列領域を示す。(1) ゲノム上の 1 箇所でのプラスミドの挿入が起きている挿入様式。以降の解析に適する。(2) ゲノム上の 2 箇所以上でプラスミドの挿入が起きている挿入様式。以降の解析に適さない。(3) 実際の解析に用いた r120 のゲノムサザンハイブリダイゼーションの結果。プローブでは REMI に使用したプラスミドを用い, *Mlu* I によるゲノムの消化では 2 バンドが, *Hind* III によるゲノムの消化では 1 バンドが見られた。

ゲノムウォーキングによりプラスミド挿入部位とその周辺ゲノム領域の塩基配列を決定した。この塩基配列情報から、プラスミド挿入部位に病原性関連遺伝子 *FPD1* がコードされていることを推定し、さらに、reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) や rapid amplification of cDNA ends (RACE) によって *FPD1* 全塩基配列を確定した (GenBank acc. no. AB110097)。その結果, *FPD1*

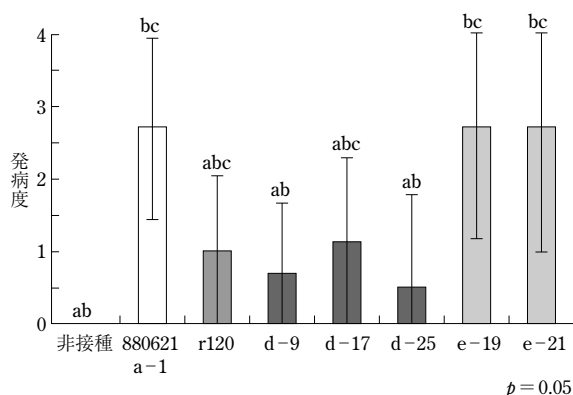


図-2 *FPD1* 破壊株とトマト (品種: 桃太郎) に対する病原性検定

発病度は 0 = 健全, 1 = 1 ~ 2 葉の萎凋, 2 = 3 ~ 4 葉の萎凋, 3 = 全体の萎凋, 4 = 枯死とした。880621a-1 は野生株, r120 は病原性変異株, d-9, d-17, d-25 は *FPD1* 破壊株, e19, e21 はプラスミドの ectopic 挿入株。バーは標準偏差を示し, 有意差検定は Turkey 法 ($p = 0.05$) で行った。KAWABE et al. (2004) を参考とした。

は 47 bp のイントロンを挟んだ 350 bp と 613 bp の二つのエクソンからなる 321 aa のタンパク質をコードしていることが明らかとなった。また, サザンハイブリダイゼーションなどにより, *FPD1* がゲノム上に一つしか存在しないことも確認した。この遺伝子はアフリカツメガエルの chloride conductance regulatory protein (ICln) と部分的な相同性をもち, 推定の膜貫通ドメインをもつことなどから, 膜上に存在するチャネルの一種であると考えられた。*FPD1* は他の糸状菌 (*F. graminearum* や *Magnaporthe oryzae*, *Neurospora crassa* 等) にも存在することが示されており, またトマト萎凋病菌の他のレースや *F. oxysporum* の他分化型菌株でも同様にこの遺伝子の存在が確認されている。これらのことより, *FPD1* は病原性関連遺伝子ではあるが, 宿主範囲 (特異性) の決定には関与していないと考えられた。

FPD1 を破壊した菌株をトマトに接種すると病原性の低下が見られた (図-2; KAWABE et al., 2004)。また, 経時的に観察すると, *FPD1* 破壊株は病徴 (萎凋症状) が引き起こされるまでの期間にばらつきが見られ, 病徴が引き起こされた後, 枯死するまでの時間は野生株と差が見られない。さらに, 根を切り取ったトマトに接種した結果, *FPD1* 破壊株は野生株と病原性に差が見られなかった。これらのことより, *FPD1* は病原性機構のかなり初期の段階で関与していると考えられた。

II *FPD1* の隣接遺伝子と病原性への関連

他の植物病原菌では病原性関連遺伝子がクラスターを成してゲノム上に存在する場合があることが知られて (HACKER and KAPER, 2000 ; BASSE et al., 2002 ; LIU et al., 2003) いたため, *FPD1* の周辺領域に他の病原性関連遺伝子が存在する可能性が想定された。そこで, *FPD1* 周辺領域に関する解析を引き続き行った (KAWABE et al., 2006)。その結果, *FPD1* に隣接する遺伝子として *FCD1* の存在が推定され, RT-PCR や RACE によって *FCD1* の全塩基配列を確定した (acc. no. AB205115)。

FCD1 は 46 bp のイントロンを挟んだ 615 bp と 1,017 bp の二つのエキソンからなる 544 aa のタンパク質をコードしていることが明らかとなった。また, サザンハイブリダイゼーションなどにより, *FCD1* がゲノム上に一つしか存在しないことも確認した。遺伝子やタンパク質のデータベースに対する相同性検索の結果, この遺伝子は他の子囊菌や担子菌のセルロース分解に関与するセロビオース脱水素酵素 (CDH) のフラビン含有ドメインと高い相同性を示した。つまり, *F. oxysporum* の *FCD1* は CDH のフラビン含有ドメインのみからなることが示された。この CDH はセロビオースを酸化し, 得られた電子はヘム含有ドメインを通じて電子受容体に渡され, 3 価の鉄を含む化合物 (シトクロム *c*) を良好な受容体とする。CDH は通常フラビン含有ドメインとヘム含有ドメインがリンカータンパク質で結合されて酸化還元酵素として機能しているが, プロテアーゼによって

リンカーが切断されて放出されるフラビン含有ドメインもセルロースやリグニンの分解に関与するセロビオース: キノン酸化還元酵素 (CBQ) として機能する。CBQ はシトクロム *c* などを還元できず, キノン類 (リグニンなど) を電子受容体とする (図-3 ; RAÍCES et al., 2002)。以上のことより, *FCD1* は CDH のフラビン含有ドメイン, つまり CBQ を直接コードしていることが推定された。

既報の CBQ はすべて CDH のプロテアーゼ代謝によって派生するとされており, *FCD1* は CBQ そのものをコードする遺伝子としての初の報告であった (KAWABE et al., 2006)。

細胞壁の構成成分であるセルロース分解に関する酵素は病原性と関連があると考えられている。また, CDH が, 植物病原菌 *Sclerotinia sclerotiorum* の病原性に関連するとの報告 (BAMINGER et al., 2001) がある。そこで, *FCD1* が細胞壁分解酵素として *F. oxysporum* の病原性に関与している可能性を検討するため, *FCD1* を破壊し, 病原性との関連を調査した。残念ながら, 破壊株における病原性の低下は見られなかった。しかし, セルロース加用 MM 培地で静置培養した菌の上清の CDH と CBQ 活性を測定した結果, CDH 活性は野生株と *FCD1* 破壊株において差はないが, CDH と CBQ 活性を合わせたものでは *FCD1* 破壊株において活性の低下が見られ (図-4), *FCD1* 破壊株が CBQ 活性を完全には欠損していないことを見いだした (KAWABE et al., 2008)。

これらのことより, *FCD1* 破壊株では他の遺伝子

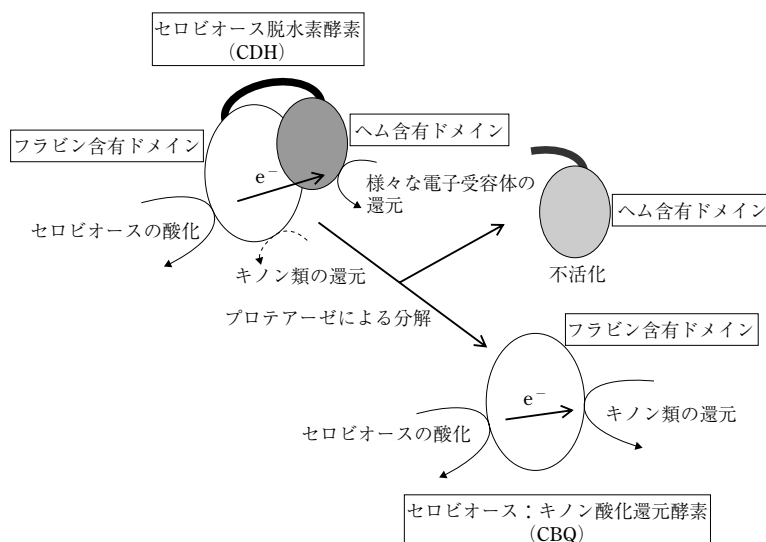


図-3 セロビオース脱水素酵素 (CDH) とセロビオース: キノン酸化還元酵素 (CBQ) の模式図
CDH はフラビン含有ドメインとヘム含有ドメインからなり, リンカーの切断によって放出されるフラビン含有ドメインは CBQ として働く。KAWABE et al. (2006) を参考とした。

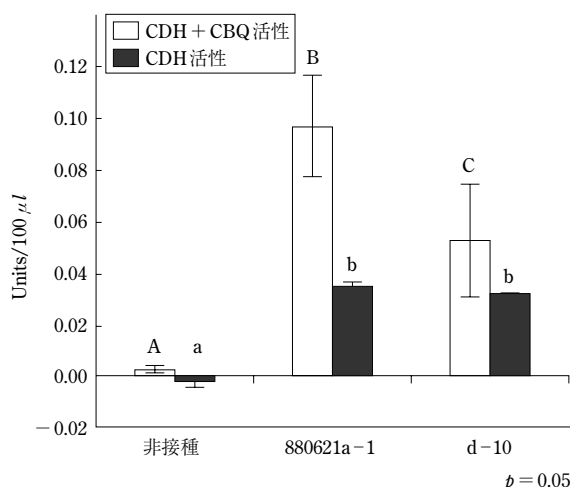


図-4 *FCD1* 破壊株のセロビオース脱水素酵素とセロビオース：キノン酸化還元酵素活性
880621a-1 は野生株，d-10 は *FCD1* 破壊株。1 μM の DCIP または シトクロム *c* を 1 分間に還元できる酵素量を 1 U とした。バーは標準偏差を示し，有意差検定は Turkey 法 ($p = 0.05$) で行った。KAWABE et al. (2008) を参考とした。

(CDH をコードする遺伝子など) 産物によって CBQ の活性が相補され，*FCD1* 破壊株の病原性に低下が見られなかったことが推測された。植物病原菌が保持する細胞壁分解にかかわる酵素は，通常，複数が機能的に相補し合い病原性と関連するため，一つの酵素の破壊では病原性に変化が認められないことが多く，*F. oxysporum* においても多くの研究が同様の結果を支持している (Di PIETRO and RONCERO, 1996 ; 1998 ; ARIE et al., 1998 ; RUIZ-ROLDÁN et al., 1999 ; GARCÍA-MACEIRA et al., 2000 ; 2001 ; Di PIETRO et al., 2001 b ; 2003 ; GÓMEZ-GÓMEZ et al., 2001 ; 2002)。実際，ゲノムデータベースに基づいてホモロジーサーチを行うと，*F. oxysporum* が CDH ホモログを複数保持する可能性が示された。なお，*FCD1* はトマト萎凋病菌の他のレースや *F. oxysporum* の他分化型でも存在が確認されており，宿主範囲の決定には関与していないことが推定されている。

おわりに

本稿では，病原性機構の初期に関与すると考えられる *FPD1* と細胞壁分解酵素の一つであり病原性への関与が考えられる *FCD1* の二つの遺伝子に関する研究を紹介した。現在も *F. oxysporum* の病原性関連遺伝子の研究は行われており，多くの病原性遺伝子が単離され，遺伝子破壊などにより病原性との関連や宿主特異性との関連が考察されている。しかし，これら目的遺伝子破壊によ

る考察だけでは病原性機構の一部分に明かりを当てただけであり，病原性因子や機構を明らかにするためには，もっと様々なアプローチによる多くの研究が必要である。今後も遺伝子レベルの仕事はもちろんのこと，形態学的な観察やバイオインフォマティクス等多方面からの解析が必要となってくると考えている。

引用文献

- 1) ARIE, T. et al. (1998) : Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **64** : 7 ~ 15.
- 2) BAMINGER, U. et al. (2001) : Appl. Environment. Microbiol. **67** : 1766 ~ 1774.
- 3) BASSE, C. W. et al. (2002) : Mol. Microbiol. **43** : 75 ~ 93.
- 4) BOOTH, C. (1971) : The genus *Fusarium*. Surrey : Commonwealth Mycological Institute.
- 5) CARACUEL, Z. et al. (2003) : Mol. Microbiol. **48** : 765 ~ 779.
- 6) Di PIETRO, A. and M. I. G. RONCERO (1996) : Phytopathology **86** : 1324 ~ 1330.
- 7) ——— (1998) : Mol. Plant-Microb. Interact. **11** : 91 ~ 98.
- 8) ——— et al. (2001 a) : Mol. Microbiol. **39** : 1140 ~ 1152.
- 9) ——— et al. (2001 b) : Mol. Plant-Microb. Interact. **14** : 653 ~ 662.
- 10) ——— et al. (2003) : Mol. Plant Pathol. **4** : 315 ~ 325.
- 11) DUYVESTEIJN, R. G. E. et al. (2005) : Mol. Microbiol. **57** : 1051 ~ 1063.
- 12) GARCÍA-MACEIRA, F. I. et al. (2000) : Mol. Plant-Microbe Interact. **13** : 359 ~ 365.
- 13) ——— et al. (2001) : Appl. Environ. Microbiol. **67** : 2191 ~ 2196.
- 14) GÓMEZ-GÓMEZ, E. et al. (2001) : Curr. Genet. **40** : 268 ~ 275.
- 15) ——— et al. (2002) : Fungal. Genet. Biol. **35** : 213 ~ 233.
- 16) GORDON, T. R. and R. D. MARTYN (1997) : Annu. Rev. Phytopathol. **35** : 111 ~ 128.
- 17) HACKER, J. and J. B. KAPER (2000) : Annu. Rev. Microbiol. **54** : 641 ~ 679.
- 18) HOUTERMAN, P. M. et al. (2008) : PLoS. Pathog. **4** : e1000061.
- 19) ——— et al. (2009) : Plant. J. **58** : 970 ~ 978.
- 20) HUERTAS-GONZÁLEZ, M. D. et al. (1999) : Curr. Genet. **35** : 36 ~ 40.
- 21) IMAZAKI, I. et al. (2007) : Mol. Microbiol. **63** : 737 ~ 753.
- 22) INOUE, I. et al. (2002) : Plant Cell. **14** : 1869 ~ 1883.
- 23) JAIN, S. et al. (2002) : Curr. Genet. **41** : 407 ~ 413.
- 24) ——— et al. (2003) : Curr. Genet. **43** : 79 ~ 86.
- 25) JONKERS, W. et al. (2009) : Mol. Plant-Microbe Interact. **22** : 507 ~ 518.
- 26) KAWABE, M. et al. (2004) : J. Gen. Plant. Pathol. **70** : 16 ~ 20.
- 27) ——— et al. (2006) : Gene **382** : 100 ~ 110.
- 28) ——— et al. (2008) : Soil Microorganisms **62** : 43 ~ 47.
- 29) LIU, Y. G. and R. F. WHITTER (1995) : Genomics **25** : 674 ~ 681.
- 30) LIU, X. et al. (2003) : Curr. Genet. **44** : 95 ~ 103.
- 31) MADRID, M. P. et al. (2003) : Mol. Microbiol. **47** : 257 ~ 266.
- 32) MARTÍN-URDÍROZ, M. et al. (2008) : Eukaryot. Cell **7** : 12 ~ 121.
- 33) NAMIKI, F. et al. (2001) : Mol. Plant-Microbe Interact. **14** : 580 ~ 584.
- 34) OSPINA-GIRALDO, M. D. et al. (2003) : Curr. Genet. **44** : 49 ~ 57.
- 35) RAÍCES, M. et al. (2002) : Biochim. Biophys. Acta. **1576** : 15 ~ 22.
- 36) REP, M. et al. (2004) : Mol. Microbiol. **53** : 1373 ~ 1383.
- 37) ——— et al. (2005) : Mol. Plant-microbe Interact. **18** : 15 ~ 23.
- 38) RIGGLE, P. J. and C. A. KUMAMOTO (1998) : Curr. Opin. Microbiol. **1** : 395 ~ 399.
- 39) RONCERO, M. I. G. et al. (2000) : Rev. Iberoam. Micol. **17** : S47 ~ S53.
- 40) RUIZ-ROLDÁN, M. C. et al. (1999) : Mol. Gen. Genet. **261** : 530 ~ 536.
- 41) YOSHIDA, T. et al. (2008) : J. Pestic. Sci. **33** : 234 ~ 242.