

主要な植物病原性 *Fusarium* 菌の種分類の現状と簡易菌種同定法の利用例

岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野 須 賀 晴 久

は じ め に

鎌型から円筒形が多隔壁分生胞子をフィアライドから連続的に生じる子のう菌類の無性時代は *Fusarium* 属 (以降 *Fusarium* 菌) として分類される。*Fusarium* 菌は農作物に様々な病害をもたらし、また、かび毒を産生したり、真菌症の原因になったりするものがあることから、歴史的にも極めて注目されてきた糸状菌である。しかし、形態に基づいて始まった種分類は、体系によって種名やそれが示す実体 (範囲) が異なり、加えて変種 (variety), 分化型 (forma specialis: f. sp.), レースの設定、さらには、生物学的種概念や分子系統学的種概念の導入によって混乱を極めてきた。種の定義の基本である遺伝的交流は一般に交配実験によって裏づけられる。しかし、有性世代を持たない *Fusarium* 菌については交配実験自体が成立しない。また、有性世代を持つものについても、必ずしも実験的な交配の成立が自然状態での遺伝的交流を保証するものではない。一方、菌が持つ DNA の塩基配列に基づく分子系統解析は、進化的系統関係や自然状態の遺伝的交流の有無が反映された結果を得ることができるため、より正確な分類が可能である。近年 *Fusarium* 菌においては分子系統解析により、それまで形態によって単一種とされてきた種内に複数の種 (隠蔽種) が含まれていることや、複数の種をまとめていた上位分類階級の形態節が必ずしも進化系統を反映したものではないことが明かにされてきた。そこで *Fusarium* 菌では進化系統を反映した複数の種のまとまりとして「種複合体 (species complex)」の用語が用いられている。ここでは *Fusarium* 菌の中でも様々な植物病原菌が含まれる *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*, および *Fusarium fujikuroi* 種複合体それぞれについて、種分類の現状と簡易菌種同定法の利用例を紹介する。

I *Fusarium solani* 種複合体

かつて *F. solani* (広義), あるいは *Martiella* 形態節の

種として扱われてきたものの多くは、現在、*F. solani* 種複合体にまとめられている。*F. solani* は各種作物に根腐れを起こす病原菌として、またヒトでは角膜真菌症の原因菌として知られている。従来から単一種として扱われてきたが、種内には宿主とする植物に特異性を持つ菌群が見られることから分化型 (f. sp.) に細分化されてきた。また、カボチャ特異的菌群 (f. sp. *cucurbitae*) については、病原性の違いからさらにレース 1 とレース 2 に分けられていた。*F. solani* に限ったことではないが、近年 *Fusarium* 菌の種同定においては Translation elongation factor 1 α (Tef), Histone H3 (His), DNA-directed RNA polymerase II largest subunit および同 second largest subunit 等いずれの分離株でも PCR で増幅でき、かつ多型を多く含む遺伝子の塩基配列を解析し、*Fusarium* MLST (<http://www.cbs.knaw.nl/fusarium/>) や *Fusarium* ID (<http://isolate.fusariumdb.org/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 等のデータベースで相同性を示す種を検索するという方法がとられている。形態観察によって分離株の種を同定しようとする場合、*Fusarium* 菌に特有な知識、経験、識別眼を必要とするが、塩基配列解析の場合、必ずしもそのようなものは必要ない。しかし、塩基配列解析は、分子生物学が専門外の者にとって、また専門の者でも調査株数が多くなればそれなりの負担となるため、より簡易な菌種同定法が求められる。簡易菌種同定法としては種特異的プライマーを使用する PCR が考えられるが、近縁種間の識別になるほど、プライマーの開発は困難になり、また、実際の PCR では DNA 増幅の失敗に基づく誤判定の問題を常に抱えることになる。それらの問題を回避できる方法として PCR-RFLP がある。PCR-RFLP は以前から DNA の多型分析法の一つとして様々な分野で利用されてきた方法である。この方法の場合、PCR による増幅 DNA の取得が必須のため、増幅の失敗による誤判定の問題は起こらない。また、菌種同定の識別精度は塩基配列解析より下がるものの、PCR 後は制限酵素処理とアガロースゲル電気泳動という簡便な操作のみとなっている (特殊な場合を除き、通常 PCR 後は DNA 精製などの必要はなく、溶液の一部を直接制限酵素処理液に混合するのみである)。*F. solani* について我々は、10 分化型に属する 38 株

Current Systematics of Primary Phytopathogenic *Fusarium* Species and their Case Studies with Simple Species Identification Methods. By Haruhisa SUGA

(キーワード: 分類, 簡易菌種診断, 種複合体, 系統進化)

の rDNA-ITS の塩基配列を調べ、分化型同定のための PCR-RFLP に有効な 4 種類の制限酵素 (*Rsa* I, *Nru* I, *Bsa* II, *Nla* IV) を選抜した。この PCR-RFLP では約 500 bp の rDNA-ITS 領域を増幅し、4 種類それぞれの制限酵素で処理した際の DNA 切断パターンを調べる。この方法では *f. spp. mori*, *robiniae*, *pisi* 間は識別できなかったが、*f. spp. phaseoli*, *cucurbitae* レース 1, *batatas*, *piperis*, *eumartii*, *xanthoxyli* 間は識別できた (図-1; SUGA et al., 2000)。一方、*F. solani* においては各分化型およびレースはそれぞれ独立した交配群 (mating population; MP) であることが明らかにされており、分子系統解析からもそれらの間で遺伝的交流がないことが裏付けられている (O'DONNELL, 2000; SUGA et al., 2000)。したがって、有性世代が見いだされている分化型およびレースそれぞれは単独の種に違いないが、現在それぞれに種名は与えられていない。ただし、有性世代が見いだされていない *f. sp. phaseoli* (インゲン根腐病菌) については、近縁な *f. sp. glycines* (ダイズ突然死症候群の原因菌) などとともに分子系統解析が行われ、現在七つの種 (*F. azukicola*, *F. brasiliense*, *F. crassistipitatum*, *F. cuneirostrum*, *F. phaseoli*, *F. tucumaniae*, *F. virguliforme*) に分けられている (AOKI et al., 2003; 2005; 2012 a)。

II *Fusarium graminearum* 種複合体

コムギやオオムギにムギ類赤かび病が発生すると収量が低下して問題となる。さらにその原因菌はトリコセセン (デオキシニバレノール, ニバレノール) やゼアラレノンといったかび毒を産生するため、食の安全上も問題となっている。ムギ類赤かび病の原因菌とされた *Fusarium graminearum* Schwabe についてはヘテロタリックとホモタリックの菌群を内在していることがわかり、*F. pseudograminearum* (ヘテロタリック) と *F. graminearum* (ホモタリック) に分けられることとなった。さらに、*F. graminearum* (ホモタリック) について世界各地から分離された株の分子系統解析が進められた。その結果、本菌種は分子系統的に独立した 16 の菌群を内在していることが判明し、現在一つを除いてそれぞれに種名 (*F. acaciae-mearnsii*, *F. aethiopicum*, *F. asiaticum*, *F. austroamericanum*, *F. boothii*, *F. cortaderiae*, *F. brasiliense*, *F. gerlachii*, *F. graminearum* s. str., *F. louisianense*, *F. nepalense*, *F. meridionale*, *F. mesoamericanum*, *F. ussuriense*, *F. vorosii*) が与えられている (AOKI et al., 2012 b)。したがって、*F. graminearum* は単一種としてではなく種複合体として扱われている。分子系統解析は主に形態的種

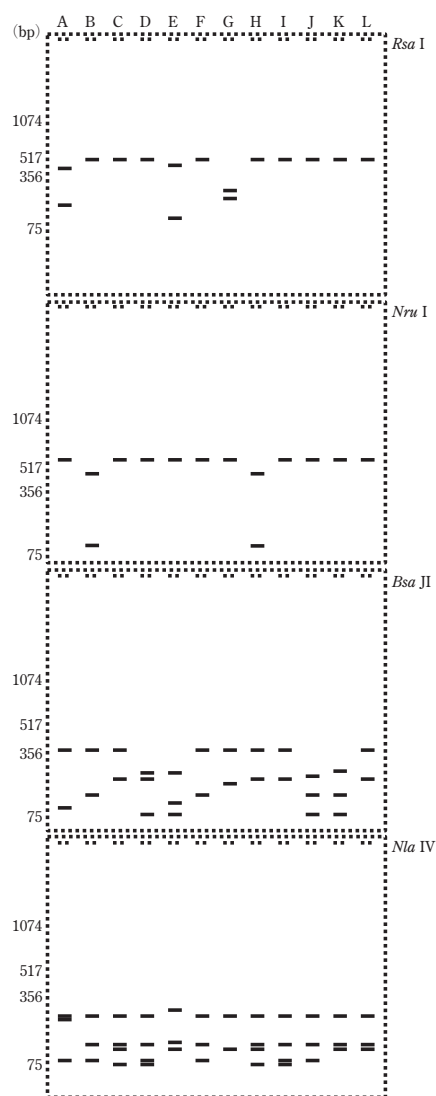


図-1 PCR-RFLP による *F. solani* の分化型同定
TS1 プライマー (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') と ITS4 プライマー (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') による PCR で rDNA-ITS 領域約 500 bp を増幅後、制限酵素 *Rsa* I, *Nru* I, *Bsa* II, *Nla* IV それぞれで切断した際に得られた DNA のゲル電気泳動パターン。縦 6 cm の 2.0% (*Nru* I, *Bsa* II) あるいは 2.5% アガロースゲル (*Rsa* I, *Nla* IV) を使用。
各レーンの上部点線は試料の電気泳動開始位置。
A : *f. sp. phaseoli* 4 株, B : *f. spp. mori* 3 株, *pisi* 5 株, *robiniae* 4 株, C : *pisi* 1 株, *radicicola* 2 株, *cucurbitae* レース 2 1 株, D : *f. sp. radicicola* 2 株, E : *f. sp. eumartii* 1 株, F : *f. sp. piperis* 2 株, G : *f. sp. cucurbitae* レース 1 2 株, H と I : *f. sp. cucurbitae* レース不明各 1 株, J と K : *f. sp. batatas* 各 1 株, L : *f. sp. xanthoxyli* 2 株。ただし、*Bsa* II と *Nla* IV については、ここで示したバンドのほかに部分分解によるものと考えられるバンドも見られることがある。

や生物学的種、また、分化型による分類などが系統進化した妥当であるかどうかを検証する目的で用いられてきたが、*F. graminearum* の研究では、むしろ分子系統解析によって隠蔽種が存在が明らかにされ、形態的種概念や生物学的種概念では必ずしもそれらの種を正確に検出できるわけではないことが示された。順次、*F. graminearum* 内に隠蔽種が見いだされてきた中、9 種まで見いだされた時点で O'DONNELL et al. (2004) は、*F. graminearum* 種複合体中のそれぞれの種を定義する特異的塩基を報告した。我々はそこで定義された特異的塩基をもとに、国内に存在するとされていた *F. asiaticum* と *F. graminearum* s. str. を簡易に同定するための PCR-RFLP を開発した。この方法では、一塩基多型を制限酵素切断で判定できるようにしたミスマッチ (dCAP) プライマーを利用した PCR により His 遺伝子の約 200 bp を増幅後、*Sty* I および *Eco* RV それぞれによる DNA 切断パターンを調べる (図-2; SUGA et al., 2008)。*F. asiaticum* の場合は *Sty* I、*F. graminearum* s. str. の場合は *Eco* RV で DNA が切断され、電気泳動上のバンドの位置の違いとして現れる。国内のムギから分離された *F. graminearum* 種複合体 298 株にこの方法を適用したところ、246 株が *F. asiaticum*、50 株が *F. graminearum* s. str. と判明した。菌株の分離地情報から *F. asiaticum* は主に南方、*F. graminearum* s. str. は北方に分布するとの違いがあることがわかり、また、それぞれの菌種のトリコテセン系かび毒タイプの構成にも違いあることが判明した (SUGA et al., 2008)。この調査では北海道分離株中にいずれの制限酵素でも切断されず、種を判定できなかったものが 2 株存在した。その後の塩基配列解析などから、それらは *F. vorosii* (当初は新種) であることが判明した。*F. graminearum* 種複合体についてはマルチピーズバイオアッセイ装置 Luminex を利用した種同定法も開発されている (WARD et al., 2008)。この方法は、種を定義した塩基を調べるという意味では塩基配列解析と違いはないが、多数の株について複数箇所の目的塩基を同時分析できることを特徴としている。しかし、PCR 後に様々な操作が必要なうえ、専用ピーズや反応を読み取るための Luminex が必要で、PCR-RFLP のように簡便ではない。

III *Fusarium fujikuroi* 種複合体

かつて *Fusarium moniliforme* (広義)、あるいは *Liseola* 形態節の種として扱われてきたものの多くは、現在、*F. fujikuroi* 種複合体にまとめられている。分子系統解析の結果、本複合体にはまだ種名が付けられていないものも入れて 50 種以上が含まれるとされている (O'DONNELL et

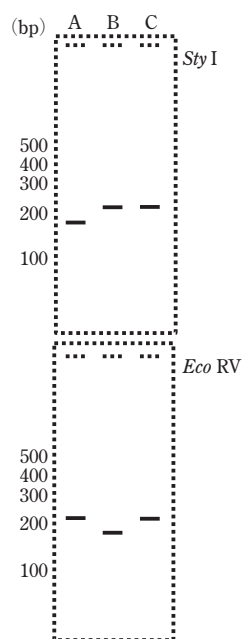


図-2 PCR-RFLP による *F. asiaticum* と *F. graminearum* s. str. の同定

H3 dStyI (5'-AGCATCACCYGAACATCGCATCATCCC ATG-3') と H3R1 プライマー (5'-TTGGACTGGATRGTT AACACGC-3') による PCR で Histone H3 遺伝子の約 200 bp を増幅後、制限酵素 *Sty* I (上) および *Eco* RV (下) それぞれで切断した際に見られた DNA のゲル電気泳動パターン。

縦 6 cm の 2.5% メタファーゲルを使用。

各レーンの上部点線は試料の電気泳動開始位置。

A : *F. asiaticum* 2 株, B : *F. graminearum* s. str. 2 株, C : *F. acaciae-mearnsii*, *F. austroamericanum*, *F. boothii*, *F. brasiliense*, *F. cortaderiae*, *F. meridionale*, *F. mesoamericanum* 各 2 株。

al., 1998; 2000)。これまでの研究でそのうちの 13 種 (*F. circinatum*, *F. fujikuroi*, *F. gaditjirrii*, *F. konzum*, *F. musae*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. temperatum*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides*, *F. xylarioides*) については独自の交配群 (MP) であることが確認されている (ただし、*F. verticillioides* と *F. musae* 間 および *F. fujikuroi* と *F. proliferatum* 間の生殖的隔離は完全ではないとの報告がある)。

イネばか苗病菌 *F. fujikuroi*、アスパラガス株腐病菌 *F. proliferatum*、トウモロコシ赤かび病菌 *F. verticillioides* 等 *F. fujikuroi* 種複合体の種には植物病原となっているものが多い。さらに、種全体として、あるいは種内の一部の株がフモニシンと呼ばれるかび毒を産生するものがある。イネばか苗病菌 *F. fujikuroi* とアスパラガス株腐

病菌 *F. proliferatum* は分子系統樹上で隣接する、つまり遺伝的に最も近縁な姉妹群の関係にあるが、*F. proliferatum* の場合は種全体でフモニシン産生能が認められるのに対し、*F. fujikuroi* の場合は一部の株のみにその産生能が認められるとされていた。これらの種は形態が類似しているうえ、いずれもイネやトウモロコシ等共通する作物から分離されることにより種の誤同定が頻繁に起こされている。そこで当初我々は、*F. fujikuroi* の一部に見られたとされたフモニシン産生能は種の誤同定によるものではないかと考え、*F. fujikuroi* 同定用 PCR-RFLP を開発して多数の株についてフモニシン産生能を調べてみることにした。まず、有性世代が認められている種を中心に Tef 遺伝子の塩基配列を調べ、*F. fujikuroi* の同定に有効な制限酵素 *Dde* I を見いだした。さらに、識別精度を上げるため、STEENKAMP et al. (1999) によって開発されていた His 遺伝子を標的とする PCR-RFLP も組合せることにした。この方法では Tef 遺伝子中の約 700 bp を PCR で増幅後、*Dde* I による DNA 切断パターンを、また、His 遺伝子中の約 500 bp を PCR で増幅後、*Dde* I と *Hha* I の同時処理の切断パターンを調べる (図-3)。これら 2 種類の PCR-RFLP の組合せることで *F. proliferatum* と *F. fujikuroi* 間をはじめ有性世代が見いだされている 8 種と見いだされていない 4 種、計 12 種の識別が可能である。我々は国内のイネなどから分離され、旧 *F. moniliforme* の特徴の一つであった小型分生胞子の連鎖状形成を示した *Fusarium* 菌にこの PCR-RFLP を適用して 93 株の *F. fujikuroi* を得た (ただし、国外で分離された 8 株も含む)。コーングリッツを用いた *in vitro* 培養によりそれぞれの株のフモニシン産生を調べたところ、50 株ではフモニシンが検出され、43 株ではフモニシンが検出されなかった。したがって、種の誤同定によるものではなく、*F. fujikuroi* そのものにフモニシン産生能があることが確認された。ただしここで、フモニシンが検出された株と検出されなかった株にはそれらの分離源に特徴があることがわかった。いずれの株もイネの種子 (籾付き) からは分離されていたが、トウモロコシなどイネ以外の作物から分離されていた 12 株に限ると、すべてでフモニシンが検出されていた。これに対し、ばか苗病のイネから分離されていた 21 株に限ると、すべてでフモニシンは検出されていなかった。その後の研究から、フモニシンが検出されなかった株においてはフモニシンの生合成に関与する遺伝子に異常があることが判明している。

おわりに

種分類と種同定は表裏一体の関係にある。*Fusarium*

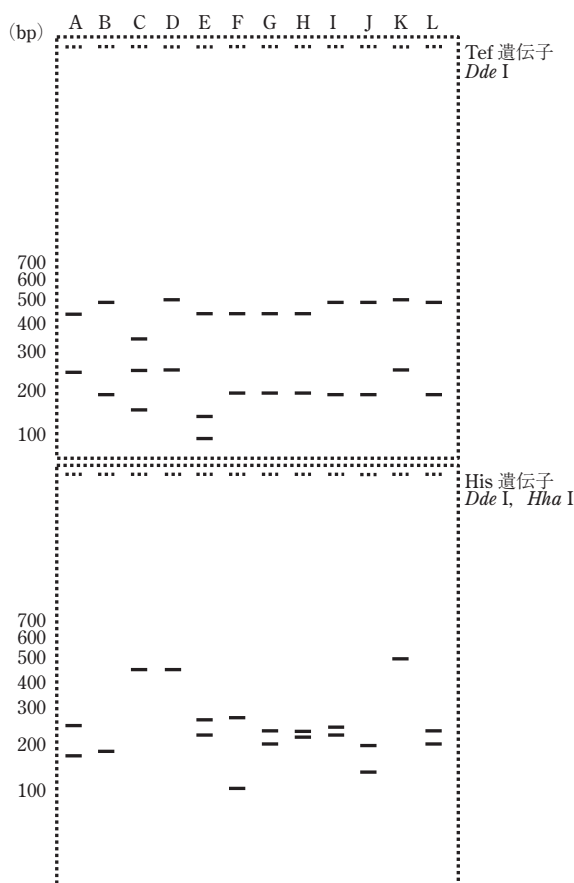


図-3 PCR-RFLP による *F. fujikuroi* 種複合体の菌種同定
HS392 プライマー (5'-TCAAAATGGGTAAGGARGAC AAGAC-3') と HS393 プライマー (5'-GCCTGGGARG TACCAGTSATCATGTT-3') による PCR で Translation elongation factor 1 α (Tef) 遺伝子の約 700 bp を増幅後、*Dde* I で切断した際に見られた DNA のゲル電気泳動パターン (上)、および H3-1 a (5'-ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG-3') プライマー と H3-1 b プライマー (5'-GCGGGCGAGCTGGATGT CCTT-3') による PCR で Histone H3 (His) 遺伝子の約 500 bp を増幅後、*Dde* I と *Hha* I で同時処理の切断した際に見られた DNA のゲル電気泳動パターン (下)。

縦 11 cm の 2.0% アガロースゲルを使用。

各レーンの上部点線は試料の電気泳動開始位置。

A : *F. verticillioides* 2 株, B : *F. sacchari* 3 株, C : *F. fujikuroi* 3 株, D : *F. proliferatum* 2 株, E : *F. subglutinans* 1 株, F : *F. thapsinum* 1 株, G : *F. nygamai* 3 株, H : *F. circinatum* 3 株, I : *F. concentricum* 3 株, J : *F. fractiflexum* 3 株, K : *F. globosum* 2 株, L : *F. mangifera* 1 株。ただし、*F. fujikuroi* と *F. proliferatum* の中には His 遺伝子の PCR-RFLP が K のパターン、*F. globosum* の中には Tef 遺伝子の PCR-RFLP が C のパターンを示すものもある。

菌の種分類は今でも変遷し続けているため、分離株の種同定にあたっては注意を要する。特に簡易同定法を利用する際は、*Fusarium* 菌の種分類の変遷のどの時点でその方法が開発されたのか、また、どのような菌集団中で目的菌種を同定できるとしたもののなかを把握しておくことが重要である。さらに、分離株の種を同定したことでもどこまでのことがわかるのかについても注意が必要である。一つの *Fusarium* 種をとりあげてみると、種全体としてある植物への病原性、あるいはあるかび毒の産生能を持っていることもあれば、種内の一部の株のみがそれらの性質を持っている場合もある。前者については、種を同定すればそれが、ある植物の病原菌、あるいはあるかび毒の産生菌であることを示している。一方後者については、種を同定することで、可能性がわかったとしても、その分離株が本当に病原菌なのかあるいはかび毒産生菌なのかはわからないということになる。多くの場合、分離株の病原性やかび毒産生性を調べるには手間、時間、特殊装置などが必要になることから、DNA を利用したより迅速・簡易な診断法が開発が求められている。そこでは、宿主植物特異的病原性やかび毒産生を担う遺伝子を診断の対象にするのが理想であるが、そのようなものでわかっているものはほとんどなく、またたとえば、簡易診断でそのような遺伝子が検出されたとしてもその遺伝子が機能しているとは限らない。一方、必ずしも宿主植物特異的病原性やかび毒産生を担う遺伝子では

なくとも、様々な DNA 多型の中からそれらの性質とリンクするマーカーを開発できれば、それを利用した診断が可能になるであろう。ただし、そのようなマーカーの開発段階では簡易菌種同定法の開発同様、特異性や正確性の確認に限界があることから、実際の利用にあたっては例外があるかもしれないことを念頭に入れておく必要がある。

謝辞 本文には、岐阜大学生命科学総合研究支援センター須賀研究室学生諸氏および技術補佐員、岐阜大学応用生物科学部百町研究室、岐阜大学流域圏科学研究センター景山研究室ほか、多くの関係者の協力により得られた内容および、JSPS 科研費 24580474 と農林水産省「食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト」により得られた成果を含む。ここに記してお礼申し上げる。

引用文献

- 1) AOKI, T. et al. (2003): *Mycologia* **95**: 660 ~ 684.
- 2) ——— et al. (2005): *Mycoscience* **46**: 162 ~ 183.
- 3) ——— et al. (2012 a): *Mycologia* **104**: 1068 ~ 1084.
- 4) ——— et al. (2012 b): *Mycotoxins* **62**: 91 ~ 102.
- 5) O'DONNELL, K. et al. (1998): *Mycologia* **90**: 465 ~ 493.
- 6) ——— (2000): *ibid.* **92**: 919 ~ 938.
- 7) ——— et al. (2000): *Mycoscience* **41**: 61 ~ 78.
- 8) ——— et al. (2004): *Fungal Genet. Biol.* **41**: 600 ~ 623.
- 9) STEENKAMP, E. T. et al. (1999): *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3401 ~ 3406.
- 10) SUGA, H. et al. (2000): *Mycol. Res.* **104**: 1175 ~ 1183.
- 11) ——— et al. (2008): *Phytopathology* **98**: 159 ~ 166.
- 12) WARD, T. J. et al. (2008): *Fungal Genet. Biol.* **45**: 473 ~ 484.

登録が失効した農薬 (26.3.1 ~ 3.31)

掲載は、**種類名**、登録番号：**商品名**（製造者又は輸入者）登録失効年月日。

「殺虫剤」

●ジクロシメット粉剤

22131：デラウス箱粉剤 5（住友化学）3/5

●シロマジン液剤

20171：トリガード液剤（シンジェンタジャパン）3/26

「殺菌剤」

●チウラム水和剤

5652：チウラミン水和剤（北興化学工業）3/15

●プロシミドン粉剤

14504：住化スミレックス FD（住友化学）3/19

●銅粉剤

830：ホクコー撒粉ボルドー（北興化学工業）3/29

●リニュロン水和剤

9515：デュボンロックス（TKI JAPAN 株式会社）3/27

「除草剤」

●ピラクロニル・ブロモブチド・ベンスルフロンメチル水和剤

22141：イッポンフロアブル（デュボン）3/19

●グリホサートイソプロピルアミン塩液剤

19168：ラウンドアップ除草スプレー（日産化学工業）3/26

「誘引・誘殺・交尾阻害剤」

●オリフルア・トートリルア・ピーチフルア・ピリマルア剤

21479：コンフューザー MM（信越化学工業）3/23