学会賞受賞者講演

植物病原糸状菌における種特異的寄生性の遺伝学的解析[†]

土 佐 幸 雄 *

TOSA, Y.*: Genetic analysis of the species-specific parasitism of plant pathogenic fungi

植物病原糸状菌はその宿主植物に対して複雑な寄生性分化を示すが、それは大きく2つの階層に分けることができる。第1は植物種に対する特異性(植物種特異性 *host species specificity*, *plant species specificity*)、第2は宿主植物種内の品種に対する特異性(品種特異性 *cultivar specificity*)である。*cultivar specificity*の成立機構については多くの遺伝学的研究が行われ、Flor (1956)の*gene-for-gene theory*で説明できることが証明されてきた。一方、*host species specificity*の成立機構については、遺伝的に複雑とされるのみでその実態は不明であった。本研究は、*host species specificity*と一般に考えられてきた特異性の中にも*gene-for-gene interaction*に支配されているものがあることを証明し、さらにその成果をもとに病原糸状菌の寄生性分化過程について考察したものである。

1. ムギ類うどんこ病菌分化型の特異性成立機構

ムギ類うどんこ病菌 *Blumeria graminis* は、オオムギのみに寄生する *B. graminis* f.sp. *hordei*、コムギのみに寄生する *B. graminis* f.sp. *tritici*、カモジグサのみに寄生する *B. graminis* f.sp. *agropyri*、ライムギのみに寄生する *B. graminis* f.sp. *secalis* 等、いくつかの分化型 (*forma specialis*; 以下本稿では、ムギ類うどんこ病菌の属名・種小名を省略)に分けられる。従来、この分化型－属間特異性は、*host species specificity*であり、従ってそこに関与する抵抗性は非宿主抵抗性 *nonhost resistance* であると考えられていた。ところが、筆者は、あるきっかけで f.sp. *hordei* をコムギ品種に接種したところ、コムギの f.sp. *hordei* に対する抵抗性に重要な役割を果たしているのは過敏感応反応であって、そのパターンはコムギ抵抗性品種の

f.sp. *tritici* 非親和性レースに対する抵抗反応と全く同じであることを見出した。一方、コムギに腐生性 *Alternaria alternata*、ウリ類炭疽病菌等を接種した場合には、すべての侵入行動がパピラで阻止された。以上のことから、コムギの f.sp. *hordei* 等「不適応分化型」に対する抵抗性は、品種抵抗性 *cultivar resistance* であるという仮説を立てた。これを証明するには、この分化型－属間特異性が *gene-for-gene theory* に従うことを示せばよいと考え、遺伝解析を開始した。

B. graminis の分化型間で交雑が可能であること、f.sp. *tritici* と f.sp. *agropyri* を交雑した場合に正常な F₁ が作出できることは、すでに岡山大学の日浦運治博士によって明らかにされていた。そこで両菌の F₁ 菌系群を作出して分離分析を行おうと考えた。ここで、大きな問題となったのは、うどんこ病菌が絶対寄生菌であるということであった。子嚢殻中に形成された F₁ をコムギの上で受け取ると、その時点でコムギに病原性のない菌系が脱落してしまう。カモジグサで受け取ると、その時点でカモジグサに病原性のない菌系が脱落してしまう。この隘路を打開するためには、f.sp. *tritici*、f.sp. *agropyri* 両分化型に感受性の植物があればよいと考え、これを探索したところ、1粒系コムギ *Triticum urartu* の1系統 accession 199-1 がそのような性質を持つことを見出した。そこで、本系統を「培地」として用いて f.sp. *tritici* と f.sp. *agropyri* の F₁ を240菌系作出し、これをコムギに接種して分離分析を行った。その結果、f.sp. *agropyri* がコムギに寄生できないのはコムギに対する基本的親和性を持っていないからではなく、コムギに対する非病原力遺伝子を持っているためであることが明らかとなった。そのような非病原力遺伝子を4つ同定し、*Ppm10*、*Ppm11*、*Ppm14*、*Ppm15* と命名した。つぎに、これら非病原力遺伝子それぞれに一对一に対応する抵抗性遺伝子がコムギに存在することを見出し、*Pm10*、*Pm11*、*Pm14*、*Pm15* と命名した。各コムギ品種は、概ねこれら抵抗性遺伝子のうち2つを

[†]平成21年3月26日 平成21年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨

* 神戸大学大学院農学研究科 Graduate School of Agricultural Sciences, Kobe University, Kobe 657-8501, Japan

保有し, *f.sp. agropyri* に対する抵抗性を発現していることが明らかとなった. 世界中から収集した約 360 品種を用いてこれら遺伝子の分布を調査した結果, 最も広く分布している抵抗性遺伝子は *Pm15* であることが判明した. さらに, 上記 1 粒系コムギ系統 199-1 が, *f.sp. secalis* にも感受性であったので, *f.sp. secalis* と *f.sp. tritici* を交雑して, その F_1 を 199-1 の上で回収した. これをコムギ品種に接種して分離分析をしたところ, *f.sp. secalis* は *Pm15* を保有すること, 従って, コムギ上では *Pm15* の作用を誘導し, 感染を阻止されていることが判明した. 以上の結果から, *B. graminis* の分化型とムギ類の間の特異性は, gene-for-gene theory に従うと結論した.

この結果から, *B. graminis* の各分化型はレースのような状態から次第に進化したという仮説を立てた. それを示す状況証拠はないかと考え, 様々なムギ類近縁野生植物に *f.sp. tritici*, *f.sp. agropyri*, *f.sp. secalis* を接種した. その結果, *Aegilops* 属植物系統が興味深い反応パターンを示した. 本属はコムギ *Triticum* 属の祖先野生種を含む集団である. したがって, これに上記分化型を接種すると, *f.sp. tritici* に感受性で他の 2 つの分化型には抵抗性を示すというのが一般的に予想されるところである. しかし, 実際の結果には, 全く統一性は認められなかった. *Aegilops* 属植物には, 系統によって, *f.sp. agropyri* のみに感受性を示すもの, *f.sp. secalis* のみに感受性を示すもの, 3 つのうちのいずれか 2 つに感受性を示すもの, など様々なものが存在し, その錯綜したパターンはレース-品種間特異性と同じであった. このことから, *Aegilops* 属植物は, これらの分化型を単なるレースとしてしか認識していないと考えた. これらの結果をもとに分化型とレースの進化過程を統一的に説明するモデルを構築しつぎの 2 つの考え方を提案した. (i) レース分化と分化型の進化は質的に同じ一連の過程である. (ii) そのメカニズムは非病原力遺伝子の喪失である.

2. イネ科栽培植物いもち病菌菌群の特異性成立機構

次に, イネ科栽培植物いもち病菌 *Magnaporthe oryzae* の菌群 (病原型) がイネ科植物に対して示す特異性に着目した. *M. oryzae* は, イネに寄生するイネ菌のほか, アワに寄生するアワ菌, コムギに寄生するコムギ菌, エンバクに寄生するエンバク菌等, 植物属に対する寄生性を異にするいくつかの菌群に分化している. この菌群-属間特異性も gene-for-gene theory に従うのではないかと考え, 遺伝解析を開始した. 解析を行うにあたり, 1980 年代にブラジルで発生した新規菌群, コムギ菌を中心に, これに他菌を次々と交雑して行く pivot turn 解析系を新たに構築した.

まず, コムギ菌とアワ菌を交雑して F_1 80 菌系を作出し, こ

れをコムギに接種して分離分析を行った. その結果, アワ菌がコムギに寄生できないのはコムギに対する基本的親和性を持っていないからではなく, 非病原力遺伝子を 2 つ持っているためであることを見出した. これらを *PWT1*, *PWT2* と命名した. *PWT1* は肉眼的には病斑色を規定し, 細胞レベルでは過敏感反応を支配していた. 一方, *PWT2* は肉眼的には病斑の数を規定し, 細胞レベルではパピラ形成を支配していた. *PWT1* に対応する抵抗性遺伝子 (*Rut1* と仮称) を同定するためには, *Rut1* を持たないコムギ品種を見出す必要がある. 普通系コムギ品種をスクリーニングしたところ, そのような品種は認められなかった. 一方, オオムギ品種を用いて検定を行ったところ, アワ菌のオオムギに対する非病原性も *PWT1* に支配されていること, さらに, *PWT1* に反応しない高度感受性オオムギ品種が存在することを見出した. そこで, この品種 (Nigrate) を感受性品種として分離分析を行った結果, *PWT1* に一対一に対応する抵抗性遺伝子を同定することに成功した. これは *Rut1* のオオムギホモログであると考えた.

つぎに, コムギ菌とエンバク菌を交雑して F_1 を作出し, これをコムギに接種して分離分析を行った. その結果, エンバク菌がコムギを侵せないのは, コムギに対する基本的親和性を持っていないからではなく, 非病原力遺伝子を 2 つ持っているためであることを見出した. これらを *PWT3*, *PWT4* と命名した. *PWT4* に反応しないコムギ品種は普通系コムギ集団の中に見出すことができたので, これを感受性品種として交雑・分離分析を行った. その結果, *PWT4* に対応する抵抗性遺伝子の同定に成功し, これを *Rmg1* (*Rut4*) と命名した.

さらに, コムギ菌とイネ菌を交雑して F_1 を作出し, これをコムギに接種して同様の分離分析を行った. イネ菌はアワ菌と系統的にきわめて近縁である. したがって, それらのコムギに対する非病原性には共通の遺伝子が関与していると予想した. 解析の結果, イネ菌のコムギに対する非病原性には, アワ菌に同定された *PWT1*, *PWT2* が関与していることが判明した. これらに加え, さらにもう 1 つの非病原力遺伝子が関与していることが明らかになり, この新規非病原力遺伝子を *PWT5* と命名した. これらの結果から, *M. oryzae* 病原型のイネ科植物に対する特異性も gene-for-gene theory に従うと結論した.

つぎに, アワ菌・イネ菌のコムギに対する非病原性を支配する *PWT1* が, これらの菌のエンバクに対する非病原性にも関与しているかどうかを検討した. まずコムギ菌とエンバク菌を交雑し, コムギ・エンバク両者に病原性の菌系を作出した. これにアワ菌を交雑し, 得られた雑種集団をコムギとエンバク両者に接種した. その比較解析の結果, *PWT1* はエンバクに対する非病原性にも関与していることが判明した. こ

のことは、*Rwt1* がエンバクにも存在していることを示唆した。同様の解析をイネ科の他属ならびに他亜科所属植物に対しても行った。その結果、イチゴツナギ亜科植物は調べた限りではすべて *Rwt1* を保有しているが、他亜科の植物は全くこれを保有していないことが判明した。このことから、*Rwt1* は、イチゴツナギ亜科の分化のきわめて初期に成立した、きわめて基本的かつ重要な抵抗性遺伝子であると考えた。

3. イネ科栽培植物いもち病菌菌群の進化過程

うどんこ病菌における結果といもち病菌における結果を総合し、病原菌の分化型・病原型の分化過程は非病原力遺伝子の特異的喪失過程として説明できるという仮説を立てた。この仮説が正しいか否かを調べるため、いもち病菌イネ菌群の分化過程を分子生物学的に検討した。着目したのは *AVR1-CO39* である。本遺伝子は、イネ品種 CO39 に対する非病原性を支配する遺伝子としていもち病菌実験室系統のゲノム中に見出されたもので、CO39 の保有する抵抗性遺伝子 *PiCO39 (t)* に対応してその機能を発揮する

まずいもち病菌集団における本遺伝子の分布を調査したところ、本遺伝子は *M. oryzae* のみに分布し、それ以外の種には全く存在しないことが明らかとなった。さらに、*M. oryzae* の中ではほとんどの菌が本遺伝子を保有していたが、例外的にイネ菌のみが本遺伝子を持たないことが判明した。イネ菌の *AVR1-CO39* 座をクローニングしたところ、G type と J type のいずれかの構造変異を起こしていることが明らかとなった。G type では *AVR1-CO39* 全体を含む約 20kb の領域が完全に欠失していた。一方、J type では *AVR1-CO39* の 5' 側半分が欠失し、そこに MAGGY 等のレトロトランスポゾンを含む DNA 断片が連結されていた。全てのイネ菌が例外なくどちらかのタイプの構造変異を起こしており、*AVR1-CO39* を intact な形で持つイネ菌は皆無であった。以上のことから筆者らは、(i) *AVR1-CO39* は *M. oryzae* の種分化初期段階において成立した (ii) その後 *M. oryzae* の中に菌群が分化する過程で、イネ菌のみがその分化初期段階において本遺伝子領域

に大規模な構造変異を起こし、本遺伝子の機能を欠失させたと考えた。

イネ菌を除く *M. oryzae* 菌株が保有する *AVR1-CO39* ホモログが機能を保持しているか否かを明らかにするため、*M. oryzae* 各菌群代表計 7 菌株の *AVR1-CO39* ホモログをイネ菌に形質転換し、CO39 に接種した。その結果、いずれのホモログも機能を保持していることが判明した。イネ菌以外の *M. oryzae* 菌株が例外なく intact な本遺伝子を保有しているということは、本遺伝子がいもち病菌に何か有利な形質を付与していることを示唆している。逆に言えば、イネ菌成立の際にはその有利な形質を犠牲にしてまで本遺伝子を失わせる強力な選択圧が働いたと推察される。

以上の結果を総合し、イネ菌群の分化の際に、非病原力遺伝子 *AVR1-CO39* の機能喪失が鍵となる役割を果たしたと考えた。すなわち、本節冒頭に述べた仮説（モデル）が分子レベルで支持された。以上、本研究では、*B. graminis* 分化型、*M. oryzae* 菌群の分化過程を説明するモデルを構築し、これを分子レベルで支持する結果を得た。さまざまな状況証拠から推察すると、このモデルはイネ科に寄生する他の植物病原菌種、たとえば *Puccinia graminis*, *P. recondita*, *Colletotrichum graminicola* 等にも適用可能と考えられる。

謝辞：本研究は、多くの先生方のご指導を仰ぎながら遂行したものである。獅山慈孝先生には植物病理学、常脇恒一郎先生には植物遺伝学、日浦運治先生には菌類遺伝学、Dr. S.A. Leong には分子生物学の手ほどきをして頂いた。加藤肇先生には、いもち病菌の世界の魅力と捉え方をご教示頂いた。これらの先生方の懇切なるご指導・ご鞭撻に、心より感謝申し上げます。また、本研究は、高知大学農学部小倉寛典名誉教授、神戸大学大学院農学研究科眞山滋志名誉教授、朴杓允教授、中屋敷均准教授のご支援・ご助言のもと、高知大学農学部植物病理学研究室学生諸氏、神戸大学農学部植物病理学研究室学生諸氏と共に行ったものである。これら共同研究者の方々に、心から感謝の意を表す。