



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Elucidation of Gene Diversity Affecting
Gibberellin Producibility in *Fusarium fujikuroi*

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2021-06-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: BAO WANXUE メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/81603

氏 名 (本 国 籍)	BAO WANXUE	(中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)	
学 位 記 番 号	農博甲第 7 5 7 号	
学 位 授 与 年 月 日	令和 3 年 3 月 1 5 日	
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物環境科学専攻	
研究指導を受けた大学	岐阜大学	
学 位 論 文 題 目	Elucidation of Gene Diversity Affecting Gibberellin Producibility in <i>Fusarium fujikuroi</i> (<i>Fusarium fujikuroi</i> のジベレリン産生性に影響を与える 遺伝子の多様性解明)	
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授 清 水 将 文 副査 岐阜大学 准教授 須 賀 晴 久 副査 静岡大学 准教授 一 家 崇 志	

論 文 の 内 容 の 要 旨

イネの重要病害の一つにばか苗病がある。本病の病原菌である *Fusarium fujikuroi* はジベレリンを病原因子として産生する。ジベレリンは 136 種類の構造が知られたジテルペン化合物であり、GA₁、GA₃、GA₄、GA₇ に植物物ホルモン活性がある。*F. fujikuroi* が主要に産生するジベレリンは GA₃ である。但し、*F. fujikuroi* におけるジベレリンの産生性は菌株によって多様である。近年、*F. fujikuroi* の株ではジベレリンの産生性とカビ毒であるフモニシンの産生性に逆の傾向が認められ、分子系統解析も *F. fujikuroi* がジベレリン産生(G)グループとフモニシン産生(F)グループに分けられることを支持した。G グループ株はジベレリンの産生性が高く、イネにばか苗病の病徴を引き起こす。一方、F グループ株はジベレリンの産生性が低く(あるいは検出されず)、イネにばか苗病の病徴を起こさない。本研究では、*F. fujikuroi* のジベレリン生産制御を明らかにするため、G グループと F グループのジベレリンの産生性の違いの原因となっている遺伝子の多様性を調べた。

F. fujikuroi においてジベレリンは、ジベレリン生合成遺伝子クラスターと呼ばれるゲノム上で 7 つの隣り合った GA 遺伝子 (*P450-1*、*P450-2*、*P450-3*、*P450-4*、*DES*、*GGs2*、*CPS/KS*) の働きによって生合成される。まず、G グループと F グループのジベレリンの産生性の違いがジベレリン生合成遺伝子クラスターに起因しているかを明らかにするため、連鎖解析を行った。GA₃ 産生性が高い G グループ Gfc0801001 株(以降、G1)と GA₃ 産生性が低い F グループ Gfc0825009 株(以降、G9)の交配子孫株を 42 株取得した。それらの GA₃ 産生性と一塩基多型を調べたところ、ジベレリン生合成遺伝子クラスター内の一塩基多型 P4504_C842T が GA₃ 産生性に完全に連鎖していた。G1 と G9 の株間で GA 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列を比較したところ、全ての違いは置換であり、98%以上の相同性が認められた。

GA 遺伝子の機能が十分ではないことが、F グループ株のジベレリン産生性が低い原因ではないかと予想されたため、GA 遺伝子を持つプラスミドによる形質転換で相補試験をすることにした。ジベレリン生合成遺伝子クラスターを *DES*、*P450-4*、*P450-1*、*P450-2* を含む DP2 領域と *GGs2*、*CPS/KS*、*P450-3* を含む GP3 領域に分け、G グループ G1 を遺伝子供与株として F グループ G9 株を相補した。形質転換元株の F グループ G9 は、薄層クロマトグラフィーで GA₃ のスポットが検出されないことから、相補試験で得られた形質転換体についてスポットが検出された場合をジベレリン産生が上昇したと判定した。当初、DP2 領域あるいは GP3 領域のいずれかでジベレリン産生上昇個体が検出されるであろうと予想していたが、実際には両方の領域についてジベレリン産生上昇個体が検出された。ジベレリン産生性が低い原因が GP3 領域にもある可能性は否定できないものの、32 形質転換体中のジベレリン産生上昇個体が、DP2 領域では 14 個体、GP3 領域では 1 個体のみであったことから、更なる研究は DP2 領域に焦点を当てることにした。DP2 領域を *DES*、*P450-4*、*P450-1*、*P450-2* 領域に分け、それぞれで同様の相補試験を行ったところ、いずれの遺伝子相補でもジベレリン産生上昇個体が検出された。これらの結果は、DP2 領域中のいずれの遺伝子相補も F グループ Gfc0825009 株の GA₃ 産生量を上昇させることを示唆している。形質転換体の中で GA₃ のスポットが検出されたものを GA 回復体、されなかったもの非回復体と定義して、GA₁、GA₃、GA₄、GA₇ 量を UPLC-MS/MS で、*P450-1*、*P450-2*、*P450-4* の発現量を逆転写-qPCR で調べた。その結果、GA 回復体では GA₃ 量は明確な、他の GA はわずかな上昇が認められた。*P450-1* の回復体では予想通り *P450-1* の発現量が上昇していたが、予想に反して *P450-2* と *P450-4* も発現量が上昇していた。このように *P450-1*、*P450-2*、*P450-4* の同時発現量上昇は、*P450-4*、*P450-2*、*DES* による回復体でも検出された。一方、形質転換元株の F グループ G9 および非回復体ではそのような同時発現量上昇は起きていなかった。近年、GA 遺伝子の発現にヒストン修飾の関与が明らかにされたため、遺伝子相補がヒストンの修飾に影響し、その結果、複数の GA 遺伝子の同時発現量上昇が生じた可能性が考えられた。同時発現量上昇の正確なメカニズムは不明であるが、連鎖解析と GA 遺伝子の相補試験の結果は、F グループ株のジベレリン産生性の低い原因が GA 遺伝子の発現量の低さにあることを示した。

更に、F グループ G9 株で発現の低さが確認された *P450-4* と *P450-1* に着目して研究を進めた。*F. fujikuroi* の近縁菌種である *Fusarium proliferatum* は、ジベレリン生合成遺伝子クラスターを持つものの、ジベレリンは産生しない。*F. proliferatum* においては *P450-4* と *P450-1* の双方向プロモーター領域の GATA モチーフに起きている塩基置換が、*P450-1* の低発現の原因であると報告されていた。そこで、*F. fujikuroi* G グループの 11 株と F グループの 13 株の *P450-4* と *P450-1* の双方向プロモーター領域の塩基配列と *P450-4* と *P450-1* の発現量を調べた。その結果、G グループの 11 株の塩基配列に違いはなかった。その配列に対して、F グループ 13 株は様々な位置に様々な塩基置換を持っていたが、ほとんどの塩基置換は F グループ株に共通しておらず、GATA モチーフ中でもなかった。F グループ株は全体として 7 種類の塩基配列タイプに分けられ、いずれのタイプも *P450-4* と *P450-1* の発現量は低いことが判明した。

以上の結果より、F グループ株はジベレリン生合成遺伝子クラスターを保有しているものの、少なくとも *P450-4* と *P450-1* の発現量の低く、それらの双方向性プロモーター領域に様々な塩基置換を持つことが判明し、*F. fujikuroi* のジベレリン生産性の違いについての基礎的な知見が得られた。

審 査 結 果 の 要 旨

イネの重要病害の一つにばか苗病がある。申請者 BAO WANXUE 氏の研究は、イネばか苗病の原因菌種 *Fusarium fujikuroi* の病原性因子であるジベレリンの産生性に影響を与える遺伝子の多様性を明らかにしたものである。*F. fujikuroi* にはジベレリンの産生性が大きくことなる G グループと F グループがあり、申請者はその原因がジベレリン生合成遺伝子クラスターにあることを明らかにすると共に、そのクラスターの遺伝子発現を制御未知の機構が存在することを見出した。また、F グループ株はクラスター中の *P450-4* 遺伝子と *P450-1* 遺伝子の発現量が低く、それらの双方向性プロモーター領域について G グループ株に塩基置換がないのに対して F グループ株には様々な塩基置換が存在することを明らかにした。

以上の研究成果はいずれも学術的新規性が極め高く、植物病原性の分子機構の解明に寄与するものであることを認める。

基礎となる学術論文

- 1) Bao, W.X., T. Nagasaka, S. Inagaki, S. Tatebayashi, I. Imazaki, S. Fuji, T. Tsuge, M. Shimizu, K. Kageyama and H. Suga: A single gene transfer of gibberellin biosynthesis gene cluster increases gibberellin production in a *Fusarium fujikuroi* strain with gibberellin low producibility. *Plant Pathology*, 69, 901-910, 2020.
- 2) Bao, W.X., S. Inagaki, S. Tatebayashi, S. Sharmin, M. Shimizu, K. Kageyama and H. Suga: Expression difference of P450-1 and P450-4 between G- and F-groups of *Fusarium fujikuroi*. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02133-3>, 2020

既発表学術論文

Sultana, S., W.X. Bao, M. Shimizu, K. Kageyama and H. Suga: Frequency of three mutations in the fumonisin biosynthetic gene cluster of *Fusarium fujikuroi* that are predicted to block fumonisin production. *World Mycotoxin Journal*. (in press)