

比較ゲノム解析が拓く炭疽病菌の病原性とその進化

熊倉 直祐・白須 賢

理化学研究所環境資源科学研究センター

Evolution of virulence in *Colletotrichum* species revealed by comparative genomics

Naoyoshi Kumakura and Ken Shirasu

RIKEN Center for Sustainable Resource Science

要旨: Members of the genus *Colletotrichum* infect many commercially important crops and cause anthracnose disease. *Colletotrichum* species infect diverse hosts and/or adopt a variety of infection lifestyles. Even though most members are identified as hemibiotrophic plant pathogens, some species have been categorized as endophytes. In the past several years, it has been made possible to elucidate the molecular mechanisms underlying the host specificity or the diversity of different lifestyles by sequencing the genomes of different *Colletotrichum* species. This genome information enables us to relate genomic features to different *Colletotrichum* species phenotypes. In this review, we discuss recent comparative genomic analyses of the *Colletotrichum* genus.

1. 炭疽病菌研究の歴史

植物病害によって失われる世界の食糧生産のうち約八割が糸状菌(カビ)によるものと推定されている。特に、炭疽病菌(*Colletotrichum* 属菌)は主要な植物病害糸状菌の一つであり、木本から草本に至るまで多様な植物に病害をもたらしている。例えばイチゴ、マンゴー、柑橘類、アボカド、バナナなど果実への被害は特に著しく、圃場での病害だけではなく収穫後の果実におけるポストハーベスト病の原因ともなっている。また、トウモロコシ、ソルガム、サトウキビを含む穀物、およびコーヒーの被害も深刻である。このように炭疽病菌は世界中に広くみられ、被害の大きさや研究対象としての重要性から、最も重要な植物病害糸状菌トップ10にランクインしている(Dean et al. 2012)。

炭疽病菌は進化の過程で、様々な宿主への感染を成立させ、病原菌・共生菌といった異なる感染様式へと多様な種分化を遂げてきており、現在では600種以上が報告されている(O'Connell et al. 2012)。このような炭疽病菌の宿主・病原性・感染形態の違いを生むメカニズムの解明の手段として、ゲノム解析は非常に強力なツールであり、ゲノム全体を比較することで炭疽病菌が種ごとに持つ生物学的な特徴とゲノムがもつ特徴を関連づけることができる。つまり、極めて広範な宿主範囲と高い特異性を持つ炭疽病菌の比較ゲノムを通じて、病原性に関わる遺伝子の特徴や、ゲノム進化について新たな知見を得ることができるはずである。本稿では、炭疽病菌のユニークな生物学的特徴に、比較ゲノム解析によって切り込んだ最新の研究例を紹介したい。

2. 炭疽病菌の比較ゲノム解析

炭疽病菌のゲノム解析は、2012年以降にイネ科炭疽病菌(*Colletotrichum graminicola*)、アブラナ科炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*) (O'Connell et al. 2012)、ウリ類炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)、イチゴ炭疽病菌(*Colletotrichum fructicola*) (Gan et al. 2013)と公開されてから、現在も増え続けている。本項では、今年になって公開されたダイコン炭疽病菌(*Colletotrichum incanum*) (図1, 図2)を中心に、最新の比較ゲノム解析を紹介したい。

2.1. 宿主の違いに着目した比較ゲノム解析

炭疽病菌の系統は非常に複雑であり、4つ以上の遺伝子配列を用いて、系統および種が特定される(図3)。例えば、アブラナ科炭疽病菌は *destructivum* 系統群に属するが、ダイコン炭疽病菌は *spaethianum* 系統群に属する。しかし、両菌ともモデル植物のシロイヌナズナにも感染することから、比較研究がしやすい菌である。興味深いことに、アブラナ科炭疽病菌とダイコン炭疽病菌が感染可能なシロイヌナズナの近交系統(アクセッション)のプロファイルは異なっていた(Narusaka et al. 2004; Gan et al. 2016)。一般的に、ある病原体が感染できる宿主範囲は、宿主植物に対して病原性を増進させるエフェクター(主にタンパク質)を病原体が持つか否かに依存すると考えられている。そして、エフェクタータンパク質が植物の持つ抵抗性タンパク質に認識されると、感染した部位で細胞死を引き起こす抵抗反応が誘導され、病原体の感染は抑制される。シロイヌナズナの近交系統である Columbia (Col-0) は、アブラナ科炭疽病菌に対しては罹病性(感染される)だが、ダイコン炭



図1 シロイヌナズナに感染したダイコン炭疽病菌の病徴二種の近交系統 (Col-0と Bay-0) にダイコン炭疽病菌を噴霧接種後, 6日目の写真. Col-0では病徴が見られないが, Bay-0では激しい病徴 (黒い病斑と黄化) が見られる.

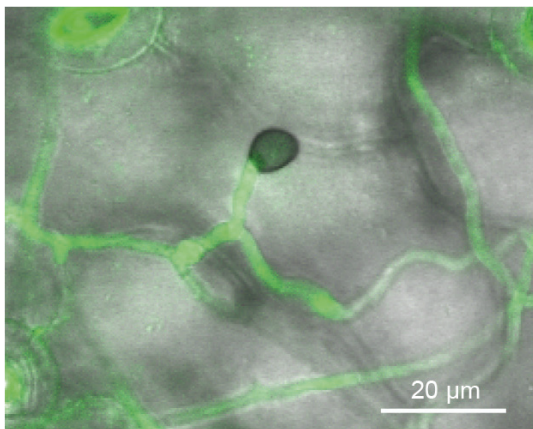


図2 GFPを発現するダイコン炭疽病菌 GFPを過剰発現するダイコン炭疽病菌をシロイヌナズナに接種し, 表皮細胞での菌糸を共焦点蛍光顕微鏡で観察した.

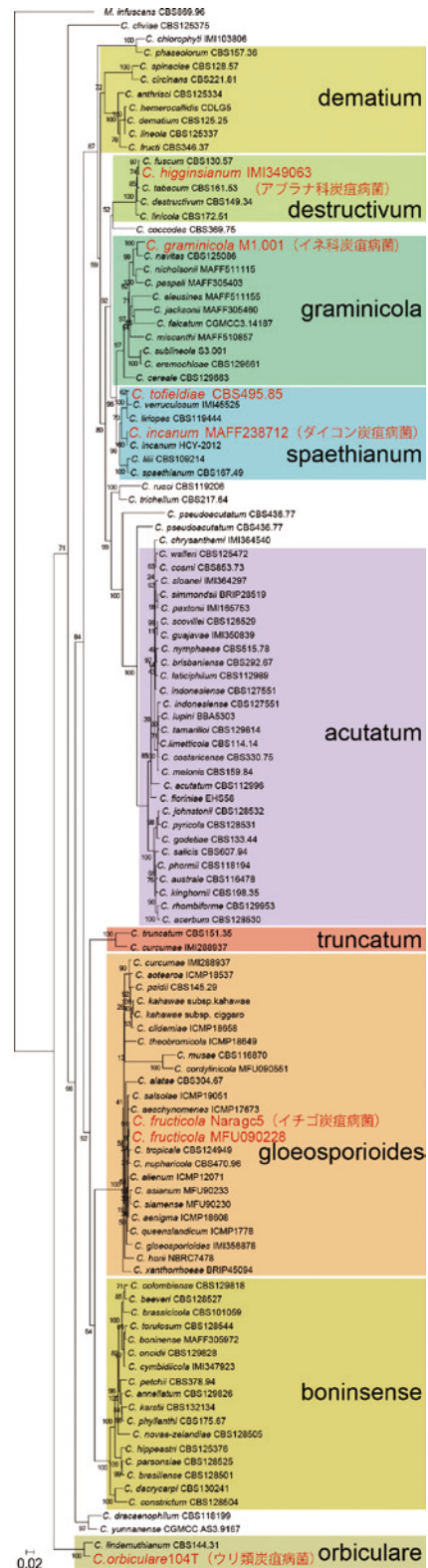


図3 炭疽病菌の分子系統樹
既知の炭疽病菌種について, 4つの遺伝子配列 (chitin synthase, actin, internal transcribed spacer (ITS), Tubulin) に基づき, 分子系統樹を描いた. 本文中に登場する菌種については赤字で記してある. 彩色した四角で囲われた範囲の炭疽病菌は同一の系統群に属する. 分岐点の値は, 1,000回の試行から得られたブートストラップ値を表す.

炭疽病菌に対しては抵抗性を発揮する。このことから、アブラナ科炭疽病菌は、Col-0の抵抗性タンパク質に認識されるエフェクターを持たないが、ダイコン炭疽病菌はそれを持つことが予想される。比較ゲノム解析によるエフェクター候補の絞り込みや、ダイコン炭疽病菌に対して罹病性の近交系統 (Bay-0 など) と抵抗性の Col-0 (図1) を交配することで、シロイヌナズナのダイコン炭疽病菌に対する抵抗性遺伝子の特定が可能となる。

さらに興味深いことに、ダイコン炭疽病菌はシロイヌナズナのような双子葉植物だけでなく、ユリ科の植物など単子葉植物にも感染することがわかってきた。双子葉植物と単子葉植物は細胞壁の構成成分が異なり、炭疽病菌が植物細胞へ侵入する際に分泌する分解酵素群も、宿主に応じた進化を遂げていることが予想された。実際に、比較ゲノム解析によって糖質関連酵素 (Carbohydrate active enzymes, CAZyme) のプロファイル調べると、双子葉植物のみに感染するアブラナ科炭疽病菌のゲノムは、単子葉植物のみに感染するイネ科炭疽病菌より多くのペクチン分解酵素をコードしていた (O'Connell et al. 2012)。ダイコン炭疽病菌は、イネ科炭疽病菌に系統的には近いが、CAZymeのプロファイルはアブラナ科炭疽病菌とよく似ていた。このことから、ダイコン炭疽病菌がより双子葉植物に適応してきたと考えられている。

2.2. *C. tofieldiae* (共生菌) とダイコン炭疽病菌 (病原菌) の比較ゲノム解析

炭疽病菌である *C. tofieldiae* はスペイン中央部に原生するシロイヌナズナから共生菌として分離された菌である。スペイン中央部の土壌は、植物が利用することのできるリン酸の含有量がごくわずかであり、*C. tofieldiae* はリン酸を供給することで宿主のシロイヌナズナの成長を促していることが明らかとなった (Hiruma et al. 2016)。しかし、同じ *spathianum* 系統群に属する近縁種であるダイコン炭疽病菌がシロイヌナズナの根に感染してもリン酸を供給することはない。*C. tofieldiae* と、その近縁種であるダイコン炭疽病菌に、共生菌と病原菌という差異をもたらす違いは何だろうか？ 分子系統樹解析によると、*C. tofieldiae* とダイコン炭疽病菌は、わずか880万年程前に分岐したと推測されるが、4億年前に誕生したと推測される *Colletotrichum* 属菌の歴史から考えると、病原菌から共生菌への進化は、ごく最近の出来事であろうといえる。*C. tofieldiae* とダイコン炭疽病菌のゲノム間での違いとしては、分泌性タンパク質をコードする遺伝子群が *C. tofieldiae* で減少していたこと、キチン結合性タンパク質や二次代謝物合成に関わるタンパク質ファミリーの *C. tofieldiae* での増加が挙げられた他には、あまり大きな違いはなかった (Hacquard et al. 2016)。しかしながら、*C. tofieldiae* とダイコン炭疽病菌の比較トランスクリプトーム解析では、病原性を高める

働きを持つと予想されるエフェクター候補遺伝子群の発現に大きな違いが見られた。病原菌のダイコン炭疽病菌では共生菌の *C. tofieldiae* の7倍以上のエフェクター候補遺伝子の発現が上昇していたのである。ダイコン炭疽病菌の遺伝子発現パターンは他の病原性炭疽病菌種のものによく似ていたが、*C. tofieldiae* の感染時の遺伝子発現の変動は、病原菌と比較してより小さく、植物との共生関係を成立させる際に特徴的な発現パターンであると考えられた。これらの結果から、病原性から共生性へ遷移した理由の一つとしては、シロイヌナズナ内において病原性に関わる遺伝子の転写物が *C. tofieldiae* において減少したことが挙げられる。しかし、ダイコン炭疽病菌がシロイヌナズナ以外で共生菌の様に振る舞うか、また *C. tofieldiae* がシロイヌナズナ以外で病原菌の様に振る舞うかはまだわかっていない。炭疽病菌は共生フェーズと病原フェーズをもち、宿主あるいは環境によって使い分けている可能性もあり、これからの研究に注目したい。

3. 最後に

炭疽病菌は古くから研究対象となり、細胞生物学・形態学・遺伝学的な知見が蓄積してきた。さらに近年のゲノム解読技術の高速化・費用の低下により、多くの炭疽病菌のゲノム情報が明らかになってきた。このゲノム解読により、宿主が異なる種ごとの表現系や病原性の異なるレースの表現型をゲノム情報とリンクさせて解析できるようになった。またゲノム情報はそれ自体の比較のみならず、逆遺伝学的な遺伝子 (例: 病原性を高めるエフェクター等) の探索にも用いられており、今後の炭疽病菌研究の強力な推進力になるだろう。

謝辞

本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議のSIP (戦略的イノベーション創造プログラム) 「次世代農林水産業創造技術」 (管理人: 農研機構 生物系特定産業技術研究支援センター, 略称「生研センター」) および農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業によって実施されました。また分子系統樹作成にご協力いただいたパメラ・ガン博士にこの場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- Dean, R, van Kan, J, Pretorius, Z, Hammond-Kosack, KE, Di Pietro, A, Spanu, PD, Rudo, JJ, Dickman, M, Kahmann, R, Ellis, J and Foster, GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13 : 414-430.
- Gan, P, Ikeda, K, Irieda, H, Narusaka, M, O'Connell, RJ, Narusaka, Y, Takano, Y, Kubo, Y and Shirasu, K (2013) Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytol* 197 : 1236-1249.
- Gan, P, Narusaka, M, Kumakura, N, Tsushima, A, Takano, Y, Narusaka,

- Y and Shirasu, K** (2016) Genus-Wide Comparative Genome Analyses of *Colletotrichum* Species Reveal Specific Gene Family Losses and Gains during Adaptation to Specific Infection Lifestyles. *Genome Biol Evol* **8** : 1467-1481.
- Hacquard, S, Kracher, B, Hiruma, K, Münch, PC, Garrido-Oter, R, Thon, MR, Weimann, A, Damm, U, Dallery, J-F, Hainaut, M, Henrissat, B, Lespinet, O, Sacristán, S, Ver Loren van Themaat, E, Kemen, E, McHardy, AC, Schulze-Lefert, P and O'Connell, RJ** (2016) Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat Commun* **7** : 11362-11373.
- Hiruma, K, Gerlach, N, Sacristán, S, Nakano, RT, Hacquard, S, Kracher, B, Neumann, U, Ramírez, D, Bucher, M, O'Connell, RJ and Schulze-Lefert, P** (2016) Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell* **165** : 464-474.
- Narusaka, Y, Narusaka, M, Park, P, Kubo, Y, Hirayama, T, Seki, M, Shiraishi, T, Ishida, J, Nakashima, M, Enju, A, Sakurai, T, Satou, M, Kobayashi, M and Shinozaki, K** (2004) *RCH1*, a Locus in *Arabidopsis* That Confers Resistance to the Hemibiotrophic Fungal Pathogen *Colletotrichum higginsianum*. *MPMI* **17** : 749-762.
- O'Connell, RJ, Thon, MR, Hacquard, S, Amyotte, SG, Kleemann, J, Torres, MF, Damm, U, Buiate, EA, Epstein, L, Alkan, N, Altmüller, J, Alvarado-Balderrama, L, Bauser, CA, Becker, C, Birren, BW, Chen, Z, Choi, J, Crouch, JA, Duvick, JP, Farman, MA, Gan, P, Heiman, D, Henrissat, B, Howard, RJ, Kabbage, M, Koch, C, Kracher, B, Kubo, Y, Law, AD, Lebrun, M-H, Lee, Y-H, Miyara, I, Moore, N, Neumann, U, Nordström, K, Panaccione, DG, Panstruga, R, Place, M, Proctor, RH, Prusky, D, Rech, G, Reinhardt, R, Rollins, JA, Rounsley, S, Schardl, CL, Schwartz, DC, Shenoy, N, Shirasu, K, Sikhakolli, UR, Stüber, K, Sukno, SA, Sweigard, JA, Takano, Y, Takahara, H, Trail, F, van der Does, HC, Voll, LM, Will, I, Young, S, Zeng, Q, Zhang, J, Zhou, S, Dickman, MB, Schulze-Lefert, P, Ver Loren van Themaat, E, Ma, L-J and Vaillancourt, LJ** (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genet* **44** : 1060-1065.
- 連絡先 : 〒 230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22
理化学研究所環境資源科学研究センター
白須 賢
FAX : 045-503-9573
E-mail : ken.shirasu@riken.jp