

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05641

研究課題名（和文）半身萎凋病菌の宿主を決定する遺伝因子の解明

研究課題名（英文）Identification genomic regions which are responsible for pathogenicity of *Verticillium dahliae*

研究代表者

宇佐見 俊行 (Usami, Toshiyuki)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：50334173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：半身萎凋病菌は、幅広い植物の根に感染して萎凋性病を引き起こす。これまでの研究で、本菌のトマトに対する病原性を決定する可能性のあるゲノム領域が明らかにされていた。本研究では、新たにピーマンに対する病原性を決定する可能性のあるゲノム領域を明らかにし、トマトの場合とあわせて病原性遺伝子の推定を行った。半身萎凋病菌の宿主範囲は、これらのようなゲノム領域を持つか持たないかによって決定されると推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

半身萎凋病菌は様々な種類の植物に感染する植物病原菌であるが、病原性を決定するメカニズムは解明されていない。本研究では、病原性の異なる菌株同士を遺伝的に交雑することで、本菌のトマトおよびピーマンに対する病原性を決定するゲノム領域を推定できた。また、その領域に存在する病原性決定遺伝子の候補を明らかにした。これを手がかりとして本菌の病原性メカニズムを解明できれば、病害を防ぐ方法の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：*Verticillium dahliae* causes vascular wilt disease on various dicot plant species. A genomic region which is responsible for pathogenicity on tomato had been estimated in our previous study. In this study, we successfully estimated a genomic region which is responsible for pathogenicity on sweet pepper. Both genomic regions were analyzed and candidates for pathogenicity-determining genes were estimated. Host range of *V. dahliae* is probably determined by combination of these genomic sequences.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原糸状菌 病原性 植物病害 土壌伝染病 菌類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 子の菌類に属する半身萎凋病菌 (*Verticillium dahliae*) は、様々な種類の双子葉植物の根に感染して道管内に蔓延し、萎凋性病害を引き起こす土壌伝染性の植物病原糸状菌である。本菌は、ナス科、ウリ科、マメ科、アブラナ科、キク科、バラ科、アオイ科、アカザ科、セリ科など非常に広範な植物に感染し、国内のみならず世界各地で様々な作物の生産に大きな被害をもたらしている。本菌は、ある一つの菌株が複数の植物に病原性を示すが、いずれの植物種に病原性を示すかは、菌株ごとに明確に異なっている。しかし、本菌が特定の植物に対してどのように病原性を発揮するかは一切解明されておらず、これが本病害の防除を困難にする一因となっている。

(2) 半身萎凋病菌は完全世代が確認されていない糸状菌 (不完全菌類) で、有性生殖による交雑はできない。しかし、これまでの研究で“擬有性生殖”による菌株の交雑方法が確立された (科研費 15K07309)。そして、トマトへの病原性が異なる 2 菌株を交雑し、DNA マーカーを用いた PCR 解析を行うことで、トマトに病原性を示す組換え株に共通したゲノム領域 (約 200kb) が見出された。

2. 研究の目的

本研究では、これまで明らかにされている「トマトに病原性を示す組換え株に共通したゲノム領域」の解析を行うと同時に、トマト以外の植物に対する病原性を決定するゲノム領域についても探索および解析を行い、多犯性の植物病原菌である半身萎凋病菌の病原性機構・宿主決定機構の解明を目指す。これらの成果は、本病害の効果的防除法を開発するために有益な情報となる。

3. 研究の方法

(1) ピーマンに病原性を示す半身萎凋病菌の菌株として Cns および Vdp4 を、ピーマンに病原性を示さない菌株として TV103 と Chr208 を選び、遺伝的交雑のマーカーとなる抗生物質耐性遺伝子を導入した。そして、TV103 にハイグロマイシン B 耐性遺伝子を導入した HR2 と Cns に対してジェネティシン耐性遺伝子を導入した GR8、Vdp4 にハイグロマイシン B 耐性遺伝子を導入した HR26 に対して Chr208 にジェネティシン耐性遺伝子を導入した GR12 を、それぞれ組み合わせで交雑を行った。交雑する菌株のプロトプラストを混合してポリエチレングリコール処理により融合させて擬有性生殖を誘導し、2 つの抗生物質に対する耐性を合わせ持つ菌株を遺伝的組換え株として選抜した。

(2) 各菌株を交雑して得られた組換え株をピーマンに浸根接種して 1 ヶ月栽培し、病徴 (葉の黄化・萎凋および道管褐変) を評価することで病原性の有無を調査した。次に、交雑に用いた親菌株のゲノムドラフト配列を得て、親株間で配列が異なる部分から PCR プライマー (DNA マーカー) を作成した。これらの DNA マーカーを用いて組換え株のゲノム DNA を鋳型として PCR 解析を行い、各組換え株がどちらの親株に由来する染色体 (ゲノム領域) を持つかを調査して、各植物に対する病原性の有無と一致する DNA マーカーを探索した。

(3) 組換え株の病原性の有無と一致する DNA マーカーが見出された場合は、親株の全ゲノム配列を参照して、このマーカーが座乗する染色体のマッピングを行った。そして、両親株の配列を区別できる DNA マーカーを当該染色体上の複数の箇所デザインし、これらマーカーを用いた PCR 解析を行った。そして、植物に対する組換え株の病原性と一致するゲノム領域を絞り込んだ。

(4) 病原性を示す親株のゲノム DNA ライブラリーを、フォスミドおよび BAC (bacterial artificial chromosome) により構築した。そして、組換え株の病原性と一致するゲノム領域に相当するクローンを、コロニーハイブリダイゼーションにより選抜した。このクローンを co-transformation により非病原性の親株に導入し、接種試験により病原性を確認した。また、当該ゲノム領域の塩基配列より遺伝子を推定し、菌株間での配列比較やエフェクター推定ソフトウェアによる解析を行い、病原性遺伝子の推定を行った。

4. 研究成果

(1) まず、ピーマンに対して病原性 (GR8) および非病原性 (HR2) の菌株を交雑することで得た 20 株の遺伝的組換え株について、ピーマンに対する病原性を調査した。すると、20 株のうち 12 株がピーマンに顕著な病原性を示し、残りの 8 株は一切病原性を示さなかった。次に、これら組換え株のゲノム DNA を鋳型として、ゲノムの各所にデザインした DNA マーカーを用いて PCR 解析を行った。その結果、DNA マーカーのひとつである Cns_Ch5_1 を用いた場合に、病原性を示す菌株に特異的な増幅が得られた (図 1)。

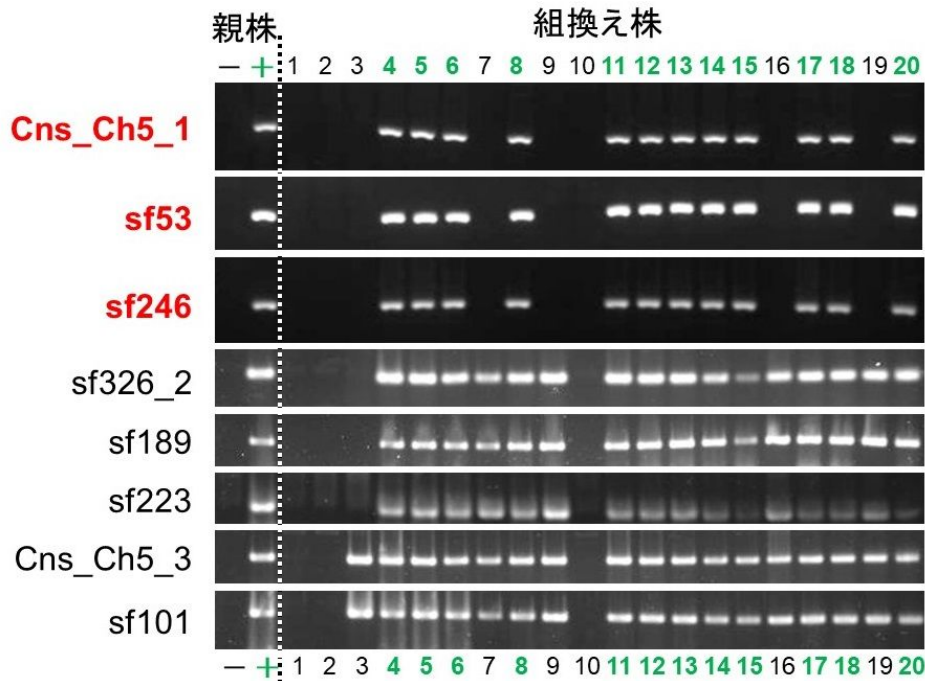


図1 DNA マーカーを用いた組換え株の PCR 解析の結果。親株 + はピーマンに病原性のある親株 GR8、- は病原性のない親株 HR2。ピーマンに病原性を示す組換え株は緑の数字で示した。ピーマンに対する病原性と一致する DNA マーカーの名称は赤字で表記した。

(2) 菌株 GR8 のドラフトゲノム配列および *V. dahliae* のリファレンス菌株である JR2 のゲノム情報を利用して、ピーマンに対する病原性と一致した DNA マーカー Cns_Ch5_1 のマッピングを行った。すると、Cns_Ch5_1 は JR2 の第 5 染色体に相当する染色体 (以下 GR8_Ch5 と表記) に座乗することが明らかとなった。そこで、染色体 GR8_Ch5 上に DNA マーカーをデザインし (図 2)、各組換え株のゲノム DNA を鋳型として PCR 解析を行った。その結果、Cns_Ch5_1 に加えて、これに隣接する 2 つの DNA マーカー (sf53, sf246) も病原性に一致したが、その他の DNA マーカーは一致しなかった。従って、これらの DNA マーカーの周辺に、ピーマンに対する病原性に関与する遺伝子が存在すると考えられた。



図2 菌株 GR8 の染色体 GR8_Ch5 のマップ。ピーマンに対する病原性と一致する DNA マーカーの名称を赤字で表記した。

(3) 一方、これまでの解析に使用した菌株 GR8 および HR2 のほかに、ピーマンに病原性を示す菌株 HR26 と非病原性の菌株 GR12 を交雑し、同様の解析を行った。この交雑により得た 27 菌株の組換え株について DNA マーカーを用いた PCR 解析を行ったところ、最終的に 3 つの DNA マーカー (Ch3sa_F, Ch3sa_G, Ch3sa_H) がピーマンに対する病原性に一致した。しかし、これらの DNA マーカーは GR8 の場合と異なり、リファレンス菌株 JR2 の第 3 染色体に相当する染色体 (以下 HR26_Ch3 と表記) に座乗していた (図 3)。



図3 菌株 HR26 の染色体 HR26_Ch3 のマップ。ピーマンへの病原性に一致する DNA マーカーを赤字で示す。黒い四角はセントロメアを、赤い四角はトマトへの病原性に一致する領域 (約 530kbp) をそれぞれ示す。

(4) *V. dahliae* のトマトに対する病原性に一致するゲノム領域は、菌株 HR2 (病原性あり) と GR8 (病原性なし)、菌株 HR26 (病原性あり) と GR12 (病原性なし) をそれぞれ交雑した場合のいずれにおいても、リファレンス菌株 JR2 の第 3 染色体に相当する染色体の長腕 (図 3) に座乗することが確認されている。従って、菌株 HR26 においてはトマトとピーマンの両方に対する病原性にひとつの染色体 (染色体 HR26_Ch3) が関与している可能性があり、大変興味深い。染色体 HR26_Ch3 上のトマトに対する病原性に一致するゲノム領域 (図 3 に赤い四角で示した領域) に該当する複数の BAC クローンを選抜し、これらを混合してトマトに病原性を示さない菌株に導入した。すると、トマトに対する病原力が増した形質転換株が認められたが、野生株の病原力に比べると大きく劣っていた。従って、この領域には効果の小さい病原力遺伝子が複数存在する可能性も考えられた。ゲノム配列からは、領域内には 35 の推定エフェクター遺伝子を含む 185 の遺伝子が存在すると推定された。そこで、数菌株におけるそれら遺伝子の配列を比較したが、ORF の有無や変異が菌株の病原性に一致するものは見出せなかった。

(5) 菌株 GR8 と HR26 では、ピーマンに対する病原性に一致するゲノム領域がそれぞれ異なる染色体上に特定された。両ゲノム領域に相同性の高い配列は含まれなかったため、ピーマンに対する病原性の有無を分ける遺伝子は菌株の組合せごとに異なっている可能性が考えられた。HR26 の染色体 HR26_Ch3 上に特定されたゲノム領域は約 360kbp で、その領域内に 12 の推定エフェクター遺伝子を含む 115 の推定遺伝子が存在した。その中で、病原性を示す菌株に特異的な推定遺伝子は 14 あり、そのうちのひとつが分泌性のペプチドをコードすると推定され、病原性遺伝子の候補と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Usami Toshiyuki, Iida Naoko, Nakao Keisuke, Hamano Ayame, Suzuki Nana, Ohmura Yusuke, Komiya Yoshimi	4. 巻 86
2. 論文標題 Identification of the chromosome region responsible for pathogenicity of <i>Verticillium dahliae</i> on tomato using genetic recombination through protoplast fusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 477 ~ 485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-020-00955-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chen, Z. , Usami, T.
2. 発表標題 Genomic region responsible for pathogenicity of <i>Verticillium wilt</i> pathogen on bell pepper
3. 学会等名 III Asian Horticultural Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 陳暉・佐藤優貴子・宇佐見俊行
2. 発表標題 半身萎凋病原菌のピーマンに対する病原性を決定するゲノム領域の推定
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 添田悠美・山本沙季・宇佐見俊行
2. 発表標題 トマト半身萎凋病菌の病原性決定染色体の推定と解析 4
3. 学会等名 令和2年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------