

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07309

研究課題名(和文) トマト半身萎凋病菌の病原性を決定するゲノム領域の解明

研究課題名(英文) Investigation of genomic region involved in pathogenicity of *Verticillium dahliae* on tomato.

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：半身萎凋病菌はトマト等に病害を引き起こすが、その機構は未解明である。本研究では、本菌の病原性を決定する遺伝子を明らかにする目的で、病原性の異なる菌株の交雑を行い、トマトに病原性を示す組換え株に共通する染色体を探索した。その結果、DNAマーカーT12が座乗する染色体の長腕側に存在する約113kbpのゲノム領域がトマトに対する病原性の有無によく一致し、ここに何らかの病原性遺伝子が存在すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Pathogenicity mechanisms of *Verticillium dahliae*, a causal agent of wilt disease of various dicot plants, are unknown. In this study, genetic recombination between two strains of *V. dahliae* was performed to find a genomic region involved in pathogenicity of this fungus on tomato. And it was found that a genomic region (approx. 113 kbp) completely accorded with pathogenicity of *V. dahliae* on tomato. Therefore, this genomic region possibly includes some gene(s) involved in pathogenicity of *V. dahliae* on tomato.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病害 植物病原性菌類 病原性 糸状菌 真菌 病原菌 子のう菌 宿主範囲

1. 研究開始当初の背景

(1) 半身萎凋病菌 (*Verticillium dahliae*) は、様々な双子葉植物の根に侵入し、道管に蔓延して萎凋性病害を引き起こす糸状菌である。本菌による病害の1つにトマト半身萎凋病があるが、例えば岐阜県飛騨地方では本病害が慢性的に発生し、2012年は全トマト農家の15% (約50戸) で76,000株以上が被害を受けた。本菌はナス、ジャガイモ、メロン、イチゴ、ハクサイ等々の植物にも大きな被害をもたらしている。各植物に対する病原性の有無 (宿主範囲) は菌株ごとに異なるが、菌の病原性を決定する機構は未解明で、防除を困難にする一因となっている。

(2) 申請者のこれまでの研究で、本菌のトマトに病原性を持つ菌株 (菌株 TV103) と持たない菌株 (菌株 Cns) を擬有性生殖により交雑したところ (図1)、トマトに病原性を示す組換え株と示さない組換え株が得られた。また、両親株のゲノムを区別できる数十種類の DNA マーカーを用いて雑種株の解析を行ったところ、マーカーの1つである T12 を増幅するプライマーを用いた場合に、PCR による増幅と病原性の有無が完全に一致した。すなわち、マーカー T12 が座乗する染色体 (あるいはゲノム領域) を持つ組換え株はトマトに病原性を示す一方で、これを持たない組換え株は病原性を示さなかった。従って、T12 を含む染色体 (ゲノム領域) が本菌のトマトに対する病原性を決定する可能性が示唆された (図1)。

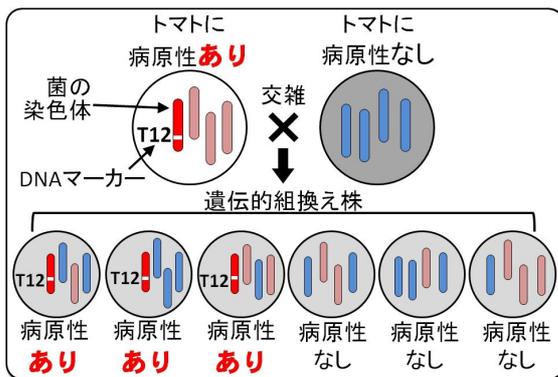


図1 菌株の交雑による病原性染色体の推定
 トマトに対する病原性が異なる半身萎凋病菌の菌株を擬有性生殖により交雑し、組換え株の遺伝的解析を行った。DNA マーカー T12 は、各組換え株のトマトに対する病原性の有無に一致し、この DNA マーカーが座乗する染色体が菌の病原性に関与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、DNA マーカー T12 が座乗する染色体の一次構造を決定し、他の菌株の病原性決定染色体との共通領域を探索することで、半身萎凋病菌のトマトに対する病原性を決定するゲノム領域を明らかにする。これを

手がかりとして本菌の病原性機構を解明できれば、本菌が引き起こす植物病害を防除するための重要な知見が得られる。

3. 研究の方法

(1) 擬有性生殖による交雑に用いたトマトに病原性を示す親株 TV103 の全ゲノム配列を、次世代シーケンサーにより解析する。そして、すでに解読・公開されている *V. dahliae* Ls.17 菌株の全ゲノム配列を参照配列としてゲノムマッピングを行う。また、TV103 のゲノムライブラリー (フォスミドライブラリー) を構築し、スキヤフォールドの境界部分をクローニングしてクローンの両端のシーケンス解析を行うことで、スキヤフォールド間の繋がりを調査する。これにより、組換え株のトマトに対する病原性と一致した DNA マーカー T12 が座乗する染色体のマップを作成する。そして、その染色体上に、親株 TV103 のゲノム配列に特異的な DNA マーカー (PCR プライマー) を多数デザインする。

(2) トマトに病原性を示す TV103 以外の菌株についても、擬有性生殖を用いた同様の方法により病原性に一致する染色体を明らかにし、マッピングを行う。そして、各菌株の染色体に共通するゲノム領域を特定する。

(3) 擬有性生殖により得た組換え株の中から、DNA マーカー T12 が座乗する染色体の一部を欠失したものを選抜する。選抜には、(1) でデザインした DNA マーカーを用いる。そして、染色体上のどの領域が組換え株のトマトに対する病原性に一致するかを調査する。

(4) トマト半身萎凋病菌レース 2 に対する真性抵抗性を持つトマト品種を発病させる菌株 (レース 3) を用いて擬有性生殖による遺伝的交雑を行い、得られた組換え株のレースを調査するとともに、DNA マーカーによる遺伝的解析を行い、レースを決定する非病原性遺伝子が座乗する染色体を調査する。

4. 研究成果

(1) トマトに病原性を示す菌株 TV103 の全ゲノムのドラフト解析を行い、スキヤフォールドの構築を行った。これらのスキヤフォールドを、すでに全ゲノム情報が公開されている菌株 JR2 のマップ上に配置した。また、フォスミドベクターにより菌株 TV103 のゲノムライブラリーを構築し、スキヤフォールドの境界に相当する領域をクローニングして塩基配列を決定し、スキヤフォールド間の連続性を調査した。このようにしてゲノムマッピングを行ったところ、DNA マーカー T12 が座乗する染色体は、JR2 の第 3 染色体に相当することが示された (図2)。また、この染色体上に、当初の T12 を含めて合計 15 種類の DNA マーカーをデザインすることができた (図2)。

(2) 菌株 TV103 と同様にトマトに病原性を示す菌株 Vdp4 と、トマトに病原性を示さない菌株 Chr208 を用いて擬有性生殖による遺伝的交雑を行い、得られた組換え株のトマトに対する病原性を調査するとともに、DNA マーカーを用いた解析を行った。その結果、Vdp4 の場合も、菌株 JR2 の第3染色体に相当する染色体上の DNA マーカーが病原性に一致し、この染色体がトマトに対する病原性に関与する可能性が支持された。Vdp4 の染色体も TV103 と同様にマッピングを行った。その結果、TV103 と Vdp4 の構造は類似し、ともに JR2 の第3染色体によく一致した(図2)。

(3) 当初は、TV103 と Vdp4 のように異なる菌株で病原性の有無に一致する染色体を特定し、この構造を比較することで共通するゲノム領域を探索する予定であったが、両菌株の染色体の構造が極めて類似していたことで、そのようなアプローチが困難となった。しかし、擬有性生殖による遺伝的組換え株を解析する過程で、染色体の一部の領域を欠失した組換え株が多数存在することが明らかとなり、これを利用して解析を行うことが可能と考えられた。そこで、前述した(1)でデザインした DNA マーカーを使用して組換え株の解析を行い、病原性の有無に一致するゲノム領域の探索を行った(表1)。その結果、この染色体の短腕側の領域を保有する組換え株の中にはトマトに対して病原性を示さないものもあった。さらに、短腕側を欠失していても、トマトに対して強い病原性を示す組換え株もあった。これらのことから、短腕側は病原性に関与しないと考えられた。一方で、病原性を示す組換え株は長腕側の中央部の領域を共通して保有しており(図2および表1) この周辺の領域が半身萎凋病菌のトマトに対する病原性に関与する可能性が示唆された。

(4) 染色体上の DNA マーカーを用いて解析を行った結果、トマトに病原性を示す組換え株に共通するゲノム領域を約 1Mbp にまで絞り込むことができた。しかし、それまでに解析に用いた組換え株の中には、この 1Mbp のゲノム領域内で欠失を生じている菌株がなく、それ以上領域を絞り込むことが困難であった。そこで、改めて擬有性生殖による菌株(TV103 と Cns) の遺伝的交雑を行い、新たに約 370 株の組換え株を得た。これら組換え株のトマトに対する病原性を接種試験により調査するとともに、前述の DNA マーカーを用いて解析を行った。その結果、トマトに病原性を示す組換え株に共通するゲノム領域を約 113kbp に絞り込むことができた。従って、この領域に半身萎凋病菌のトマトに対する病原性(宿主特異性)を決定する何らかの遺伝子が存在すると考えられた。

(5) 擬有性生殖による遺伝的交雑の親株と

して用いた菌株は、いずれもナスに対しては強い病原性を示す。また、交雑によって得られた全ての組換え株も、ナスに対して強い病原性を示した。これらのことから、上記の解析で見出されたゲノム領域は、半身萎凋病菌のトマトに対する特異的病原性に関与すると考えられた。すなわち、基本的な病原性因子ではなく、宿主決定因子であると考えられた。

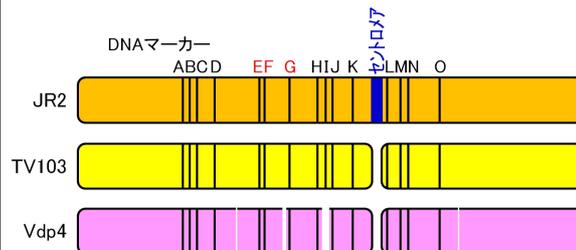


図2 T12 が座乗する染色体のマップ

すでに全ゲノム配列が解析・公開されている菌株 JR2 と、TV103、Vdp4 におけるマッピングの結果を示す。当初病原性と一致した DNA マーカー T12 は、図中では DNA マーカー B に相当する。赤字で示した 3 つの DNA マーカーは、最終的に組換え株のトマトに対する病原性の有無に完全に一致した。

表1 遺伝的組換え株が保有するゲノム領域と病原性の有無

菌株	病原性	DNA マーカー														
		長腕側										短腕側				
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
親1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
親2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

菌株：親1および親2は、擬有性生殖による遺伝的交雑に用いた菌株 TV103およびCnsを示す。1~23は、交雑により得られた組換え株を示す。病原性：各菌株のトマトに対する病原性の有無を示す。

DNA マーカー：各菌株における各DNA マーカーの配列の有無を示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Usami, T., Momma, N., Kikuchi, S., Watanabe, H., Hayashi, A., Mizukawa, M., Yoshino, K., and Ohmori, Y., (2017) Race 2 of *Verticillium dahliae* infecting tomato in Japan can be split into two races with differential pathogenicity on resistant rootstocks., Plant Pathology, 66: 230-238, DOI: 10.1111/ppa.12576

[学会発表](計4件)

今野義規・狩野晃一・菊池琴乃・宇佐見俊行 (2018) *Verticillium dahliae* のピーマンに対する病原性を決定する染色体の推定 .平成 30 年度日本植物病理学会大会

濱野あやめ・中尾圭佑・鈴木那奈・宇佐見俊行 (2017) トマト半身萎凋病菌の病原性決定染色体の推定と解析 3 .平成 29 年度日本植物病理学会大会

中尾圭佑・飯田尚子・宇佐見俊行 (2016) トマト半身萎凋病菌の病原性決定染色体の推定と解析 1 .平成 28 年度日本植物病理学会大会

鈴木那奈・大村祐輔・宇佐見俊行 (2016) トマト半身萎凋病菌の病原性決定染色体の推定と解析 2 .平成 28 年度日本植物病理学会大会

6. 研究組織

(1)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：5 0 3 3 4 1 7 3

(4)研究協力者

飯田 尚子 (IIDA, Naoko)
中尾 圭佑 (NAKAO, Keisuke)
鈴木 那奈 (SUZUKI, Nana)