

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780039

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遺伝子の解明

研究課題名（英文） Study on pathogenicity gene 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・助教

研究者番号：50334173

研究成果の概要（和文）：トマト半身萎凋病菌 (*Verticillium dahliae*) のレース 1 に特異的な配列を含む DNA 領域 TomR1 の中に、同菌のレースを決定する非病原性遺伝子 *VdAve1* を見出した。本遺伝子の翻訳産物は、トマトの真性抵抗性因子 *Ve* により認識されるエリシターである一方で、*V. dahliae* のトマトに対する病原性を増強するエフェクタータンパク質でもあったと考えられた。しかし、本遺伝子は *V. dahliae* のトマトに対する基本的な病原性を決定する因子ではなく、病原性を増強する補助的な因子であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：An effector gene, *VdAve1*, was found in the DNA fragment TomR1 that includes sequence specific to race 1 of *Verticillium dahliae* that is pathogenic on tomato. *VdAve1* appeared to be not only an avirulent factor of tomato resistance gene *Ve*, but also a virulent factor on tomato. However, *VdAve1* was not a decisive factor of basic pathogenicity on tomato.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：病原性因子

1. 研究開始当初の背景

(1) トマト半身萎凋病を引き起こす *Verticillium dahliae* は、植物の根から道管に侵入する土壌伝染性の植物病原糸状菌である。本菌は多犯性であり、トマト以外にも様々な植物に病原性を示す。しかし、特定の植物に対する病原性は菌株ごとに明確に異なっている。例えば、表 1 に示したように、トマトに病原性を示す菌株（トマト系）はピーマンに病原性を示さず、ピーマンに病原性を示す菌株（ピーマン系）はトマトに病原性を示さない。ただし、例外的にトマトとピーマンの両方に病原性を示す菌株が存在し、これはトマト・ピーマン系と呼ばれる。トマト・ピーマン系の菌株は、日本ではこれまで

に 3 例が報告されているのみである。このように、*V. dahliae* のトマトおよびピーマンに対する病原性は明確に分化しているが、菌の病原性を決定するメカニズムは不明であった。

表 1. *V. dahliae* 病原性系統の各植物に対する病原性

	トマト	ピーマン	ナス
トマト系	+	-	+
ピーマン系	-	+	+
トマト・ピーマン系	+	+	+
ナス系	-	-	+

(2) 我々は、病原性系統間の遺伝的な差異に着目すれば本菌の病原性決定機構を解明することができるのではないかと考え、継続的に研究を行ってきた。まず、トマトに病原性を持つ系統に特異的な DNA 配列が本菌のトマトに対する病原性を決定している可能性があるとの観点から、そのような DNA 配列の探索を行った。TomR1 (GenBank accession no. AB095266) は、random amplified polymorphic DNA 解析を手がかりとしてクローニングされた約 32kbp の DNA 領域である。TomR1 は、トマトに病原性を持つ系統 (トマト系およびトマト・ピーマン系) に特異的な配列を含む一方で、同系統のレース 1 に特異的な配列をも含んでいた。この配列の病原性への関与を調査するために、同配列を持たず、トマトに強い病原性を示さない菌株にこれを導入したところ、トマトに対して非常に強い病原性を示すようになった。しかし、本領域内のどのような遺伝子が菌のトマトに対する病原性を増強したかは不明であった。

2. 研究の目的

TomR1 には、*V. dahliae* のトマトに対する病原性に関与する何らかの遺伝子が含まれると思われる。そこで本課題では、TomR1 に含まれる病原性関連遺伝子を明らかにし、本菌のトマトに対する病原性機構の一端を解明することを目的として研究を行った。また同時に、本菌のレース決定機構との関連性についても調査した。

3. 研究の方法

(1) トマト半身萎凋病菌レース 1 の培養菌体から全 RNA を抽出し、SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech 社) を用いて cDNA ライブラリを構築した。そして、TomR1 の配列をプローブとしてプライクハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。選抜された cDNA の塩基配列を決定し、TomR1 内の遺伝子を明らかにした。

(2) TomR1 内に見出された遺伝子の転写領域およびその上流配列を含むゲノム DNA 断片を、糸状菌用のハイグロマイシン B 耐性遺伝子を含むプラスミドベクター pUCH1 に連結した。これを用いてトマト半身萎凋病菌のレース 2 菌株を形質転換した。形質転換株を、真性抵抗性遺伝子 *Ve* を持つトマト品種および同遺伝子を持たないトマト品種に接種し、病原性および病原力を調査した。

(3) TomR1 内に見出されたエフェクター遺伝子 *VdAve1* の塩基配列より PCR プライマーをデザインした。これを用いて PCR を行うことで、国内で分離された *V. dahliae* の各菌株が *VdAve1* を持つかどうかを調査し、トマ

トに対する病原性やレースとの関係を考察した。

(4) エフェクター遺伝子 *VdAve1* の転写領域およびその上流のプロモーター領域を含む DNA 断片を、糸状菌用のハイグロマイシン B 耐性遺伝子を含むプラスミドベクター pUCH1 に連結した。これを用いてトマトに病原性を持たない *V. dahliae* の菌株を形質転換した後、トマトに対する病原性を調査した。

4. 研究成果

(1) トマト半身萎凋病菌のレース 1 菌株である TV103 の cDNA ライブラリを構築し、TomR1 の配列をプローブとしてプライクハイブリダイゼーションにより選抜を行ったところ、478bp の cDNA が得られた。この塩基配列を決定して TomR1 の配列と比較したところ、5' 非翻訳領域内に 55bp のイントロンを持ち、135 アミノ酸をコードする推定 ORF を含む転写領域 (ORF1 と仮称) が確認された。一方、カリフォルニア大学の研究グループが公開した *V. dahliae* レタス分離株の全ゲノム配列に基づいて、オランダのワーゲニンゲン大学の研究グループが数菌株のレース 1 およびレース 2 のリシーケンスを行い、レース 1 に特異的な DNA 領域を見出した。見出されたこの領域は TomR1 と重複するものであり、ワーゲニンゲン大学のグループが RNA シーケンスにより同領域内に見出した ORF は、ORF1 に一致した。そこで以降は各研究グループと情報を共有しながら共同研究を行った。

(2) ORF1 の転写領域およびその上流約 500bp を含むゲノム DNA 断片をサブクローニングし、糸状菌用のハイグロマイシン B 耐性遺伝子を含むプラスミドベクター pUCH1 に連結した。これを用いてトマト半身萎凋病菌レース 2 の 3 菌株を形質転換した。トマト系レース 2 の各菌株は本来 ORF1 を持たないが、形質転換された各菌株はいずれも ORF1 を持ち、RT-PCR により転写も確認された。これらの菌株を、真性抵抗性遺伝子 *Ve* を持つトマト品種 (桃太郎) に接種した。すると、非形質転換株および pUCH1 による形質転換株が病原性を示したのに対して、ORF1 を導入した各形質転換株は病原性を示さなかった (図 1)。従って、ORF1 はトマトの真性抵抗性遺伝子 *Ve* に対する非病原力 (AVR) 遺伝子であると考えられた。一方、同様の菌株を *Ve* を持たないトマト品種 (大型福寿) に接種したところ、非形質転換株および pUCH1 による形質転換株の病原力が比較的弱かったのに対して、ORF1 を導入した各形質転換株は非常に強い病原性を示した (図 2)。従って、ORF1 の翻訳産物はトマトに対する病原因子 (エフェクター) としても作用すると考えられた。これ

らの結果に基づき、ORF1 を *VdAve1* と命名した。



図1 トマト半身萎凋病菌レース2の菌株（左）にORF1 (*VdAve1*)を導入した形質転換株（右）は、真性抵抗性遺伝子 *Ve* を持つトマト品種（桃太郎）に対して病原性を示さなくなった。



図2 トマト半身萎凋病菌レース2の菌株（左）にORF1 (*VdAve1*)を導入した形質転換株（右）は、真性抵抗性遺伝子 *Ve* を持たないトマト品種（大型福寿）に対して非常に強い病原性を示すようになった。

(3) 国内各地より分離したトマト半身萎凋病菌（トマトに病原性のある *V. dahliae*）のレース1（19菌株）およびレース2（15菌株）について、*VdAve1*の有無をPCRにより調査した。その結果、全てのレース1菌株は *VdAve1*を持ち、全てのレース2菌株はこれを持たなかった。従って、本遺伝子の有無が菌のレースを決定していることが確認された。一方、トマトに病原性を持たない *V. dahliae*の菌株（54菌株）についても調査したところ、これらの菌株は全て *VdAve1*を持たなかった。

このことから、*VdAve1*はトマトに対する病原性のみに関与したものである可能性が考えられた。

(4) 米国では *V. dahliae* に対して真性抵抗性を持つレタス品種が開発されており、これに対する菌のレース分化も確認されている。また、レタスにおける菌のレースがトマトにおける場合と同様の遺伝子 (*VdAve1*) によって決定されることも指摘されている。*V. dahliae* によるレタスの病害の発生は国内において報告がなかったが、2009年に茨城県で初めて報告された。そこでその分離株における *VdAve1*の有無をPCRにより調査した。その結果、5菌株のうち4菌株は *VdAve1*を持ち、レース1と判断された。また、1菌株は *VdAve1*を持たず、レース2と判定された。抵抗性レタス品種は未だ国内に導入されていないが、仮に今後導入したとしても、これを打破するレース2がすでに国内に存在することが明らかとなった。

(5) トマトに病原性を持たない *V. dahliae*の菌株は一様に *VdAve1*を持たなかったため、*VdAve1*を導入することによってこれらの菌株がトマトに病原性を示すようになるかどうかを確認した。レース2の菌株の形質転換に用いたものと同様のベクターを用いて、トマトに対する病原性を持たない5菌株に *VdAve1*を導入した。PCRによりそれぞれの形質転換株が *VdAve1*を持つことを確かめ、RT-PCRによりその転写も確認した。それらの形質転換株を、*Ve*を持たないトマト品種（大型福寿）に接種したが、いずれの場合も全く病原性を示さなかった。従って、エフェクター遺伝子である *VdAve1* はあくまで病原力を補強する補助的因子であり、トマトに対する基本的な病原性を支配するものではないと考えられた。今後は、トマトに対する基本的な病原性を決定する遺伝因子を探索する必要がある。

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2件）

① de Jonge, R., van Esse, H. P., Maruthachalam, K., Bolton, M. D., Santhanam, P., Keykha Saber, M., Zhang, Z., Usami, T., Lievens, B., Subbarao, K. V., Thomma, B. P. H. J., Tomato immune receptor *Ve1* recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 査読有, 109, 2012, 5110-5115,

② Usami, T., Itoh, M., Morii, S., Miyamoto, T., Kaneda, M., Ogawara, T., Amemiya, Y., Involvement of two different types of *Verticillium dahliae* in lettuce wilt occurred in Ibaraki prefecture, Japan., Journal of General Plant Pathology, 査読有, 78, 2012, 348-352, DOI: 10.1007/s10327-012-0394-6

〔学会発表〕(計4件)

- ① 宇佐見俊行, *Verticillium dahliae* の寄生性分化に関する研究, 平成 25 年度日本植物病理学会大会, 2013 年 3 月 27 日～29 日, 岐阜大学
- ② 宇佐見俊行・高橋伊織・高倉拓也・原田凌輔・雨宮良幹, エフェクター遺伝子 *VdAve1* は *Verticillium dahliae* のトマトに対する基本的な病原性を決定する因子ではない, 平成 25 年度日本植物病理学会大会, 2013 年 3 月 27 日～29 日, 岐阜大学
- ③ 小宮良美・雨宮良幹・宇佐見俊行, プロトプラスト融合による *Verticillium dahliae* の病原性系統間の交雑, 平成 25 年度日本植物病理学会大会, 2013 年 3 月 27 日～29 日, 岐阜大学
- ④ 東 勇輝・雨宮良幹・宇佐見俊行, ゲノムサブトラクションによる *Verticillium dahliae* の病原性系統特異的 DNA 領域の探索, 平成 25 年度日本植物病理学会大会, 2013 年, 2013 年 3 月 27 日～29 日, 岐阜大学

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・助教
研究者番号: 50334173

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし