

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870142

研究課題名(和文)モデル生物スエヒロタケの交配家系を用いた材質腐朽病の病原性関連遺伝子領域の同定

研究課題名(英文) Identification of the virulence-related genetic regions of a wood rot disease, using a crossbred family of a model fungus *Schizophyllum commune*

研究代表者

竹本 周平 (Takemoto, Shuhei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：90724724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：樹木腐朽病の新規防除法の開発には、その病原機構の深い理解が必要である。そこで、実験的取扱が容易で、交配に供するための胞子を得やすい腐朽病菌スエヒロタケをモデルとして、樹木への病原性を簡便に評価できる実験系を確立することを目的とした。宿主として改良ポプラを用いた接種試験において、接種点付近における変色長が病原力の指標として利用できることを見出した。変色長には品種間差のほか枝の個性、枝の太さ、接種する位置が影響を及ぼしており、それらの外生的要因を統計学的に補正する病原力評価法を確立した。ハプロイド菌株群の病原力には親菌株群の病原力と関連性が見られ、病原力に関連する遺伝的な因子の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A profound understanding of pathogenic mechanisms is needed to develop novel control measures for wood rot diseases. I aimed to establish an experimental system, where the pathogenicity and/or virulence of a pathogen can efficiently be evaluated. I used a fungus *Schizophyllum commune* as a model organism, taking advantage of its suitability for experimental use and availability of spores for crossbreeding. I used crossbred poplar cultivars as hosts, and revealed that discoloration length at inoculation points could be used as an index value of virulence. The discoloration length was influenced by the individuality and the diameter of inoculated shoots and the position of inoculation points, in addition to host cultivars. There was a correlation between the virulence of haploid isolates and their ancestral isolates, inferring the involvement of a hypothetical genetic factor(s). I proposed a novel evaluation method for virulence, in which exogeneous factors were corrected statistically.

研究分野：森林科学

キーワード：腐朽病害 病原力評価法 病原機構 交配家系 多犯性 樹病

1. 研究開始当初の背景

樹木の腐朽病は古くから現在に至るまで農林生産や都市住民の生活に様々な被害をもたらしている。効果的な防除法を得るためには、その病原機構を深く理解することが必要である。一般に樹木の腐朽病は再現するのに長期間を要し再現性も低いということが実験上の難点として挙げられる。また多くの場合、腐朽病菌の子実体(きのこ)を人工的に形成させることは容易でなく、したがって、きのこから担子胞子を得て交配に供するのが困難であることから、病原機構の理解に向けた遺伝学的なアプローチはほとんどとられてこなかった。例外的に、欧州の針葉樹に大きな被害を及ぼしているマツノネクタケの病原性に関連する遺伝子領域が、本菌の交配家系を利用した QTL 解析等 (Lind et al. (2007) *Curr Genet* 52: 35-44.; Dalman et al. (2013) *PLoS One* 8: e53525) によって特定されている。しかし、マツノネクタケは子実体形成が容易でなく、病原性を評価するための苗の育成にも時間がかかる。申請者は、腐朽病の病原機構の全容解明のためには、扱いやすい実験材料によって実験系が構築されている必要があると考え、そのような要件を満たす実験材料として、担子菌きのこの一種スエヒロタケが最もふさわしいと考えるに至った。

2. 研究の目的

申請者は、取扱いの容易なスエヒロタケとポプラを利用した腐朽病のモデル実験系により、その病原機構の全容解明を目指している。本申請研究ではその足がかりとして、スエヒロタケのポプラに対する病原性を評価できる実験系を確立することを目的とした。なお後述のように、本申請研究期間内には達成に至らなかったが、当初はスエヒロタケの交配家系を用いた QTL 解析により病原性関連遺伝子領域を網羅的に同定することも目的としていた。

本申請研究の最大の特色は、実験材料の扱いにくさから網羅的な解析が試みられてこなかった樹木の腐朽病の病原機構に対して、モデル実験系を利用してアプローチする点である。植物病理学の分野全体においても、病原体の交配家系を利用して病原性関連遺伝子を網羅的に明らかにしようとする試みはまだ多くない。とくに、材質腐朽病菌であり、またきわめて多犯性である病原菌を取り扱った研究はこれまでに例がなく、本申請研究は腐朽病あるいは多犯性病害に特有の病原性関連遺伝子の全体像を初めて明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

スエヒロタケの簡便な病原性評価法を確立するため、ニホンナシに対する病原性評価法と同様の方法を用いて改良ポプラ(以下、単にポプラとよぶ)当年生切枝に対する接種

試験を行った。具体的な方法は、当年生シュートを長さ 1 m に調整し、下端から 20 cm の部位を起点として 10 cm おきに直径 2.5 mm のドリルビットを用いて穴を空け、接種菌の蔓延した妻楊枝をその穴に差し込み、突出している妻楊枝の端を切り落としてワセリン、ついでパラフィルムとビニルテープを巻き重ねて封じるといったものである。接種後、シュートは下端 5 cm を水切りし、脱イオン水に水差して 25 ℃ の人工気象器内にて 12 時間明 / 12 時間暗の条件下で培養した(図 1)。なお、病原性評価に適した品種を選定するため、接種対象としてポプラ 20 品種および対照としてニホンナシを用い、スエヒロタケ 2 菌株との組み合わせで試験を実施した(接種試験 I)。



図 1. スエヒロタケ菌を接種したポプラ切枝の培養の様子。

他の病原菌においてストレス耐性と病原力との関連性が知られていることから、スエヒロタケ菌が強い寒冷ストレスにさらされていると考えられる北海道を中心に標本の収集をおこなった。これらを含む日本各地産の標本から 84 菌株を取得し、うち 20 菌株について、ポプラ 2 品種 (Kamabuchi-1 および LW42) に対する病原力を評価した(接種試験 II)。ついで、上記とは異なる 27 菌株についてポプラ 1 品種 (Kamabuchi-1) に対する病原力を評価した(接種試験 III)。菌株以外の要因が変色長に及ぼす影響を統計的に除去したうえで、接種試験に供試した 47 菌株すべてのなかから最も病原力の強い菌株群および弱い菌株群を選定した。それら菌株の分離原である子実体から担子胞子を取得し、培地上で独立に発芽させ、単核のハプロイド菌株を取得した。子実体から担子胞子が取得できなかった菌株については、胆汁末含有培地による脱二核化を経てハプロイド菌株を取得した。得られた計 18 ハプロイド菌株およびそれらの元となった 8 親菌株の病原力をポ

プラ品種 Kamabuchi-1 の切枝を用いて評価した (接種試験 IV)。

スエヒロタケのポプラ切枝に対する病原力が野外での病原力と一致するかどうか検討するため、接種試験 IV と同じ菌株を用いて同じポプラ品種 (Kamabuchi-1) の生立木の当年生シュートに対する接種試験を行った (接種試験 V)。

4. 研究成果

接種試験 I により、ポプラにおいてもニホンナシと同様の変色が見られること (図 2) を確認し、この変色の軸方向の長さが病原力の指標として利用できることを見出した。また、変色の明瞭さや変色長の分散の小ささを考慮し病原力の評価に適していると思われる 2 ポプラ品種 Kamabuchi-1 および LW42 を選定した。変色長には、品種間差のほか枝の個性、枝の太さ、接種する位置が影響を及ぼしていた。なお、このことは以降の接種試験 II ~ V でも一貫して確認され、病原力の評価の際にはこうした要因を統計解析において考慮する必要性が明らかになった。



図 2. スエヒロタケ菌を接種したポプラ切枝の柱目断面。

接種試験 II および III により、病原力の強い菌株および弱い菌株を選抜した。これらを親菌株としてハプロイド菌株を取得し、接種試験 IV により親菌株とハプロイド菌株の病原力の関係を調査したところ、変色長の大小は親菌株の病原力に基づくグループ分けと全体的に整合した。つまり、強病原力のグループから得られたハプロイド菌株群の病原力が、弱病原力のグループから得られた菌株群より強かった (図 3)。このことは病原力に関連する遺伝的な因子があることを示唆する。なお、同じ地域から得られた標本に由来する菌株であっても病原力にはばらつきが目立ったことから、地理的な由来が病原力の強弱に及ぼす影響は相対的に小さいと考えられる。

接種試験 V では、室内実験系における病原力の大小と野外におけるそれとの相関が確認できなかった。このことから、室内実験系と野外とで異なる病原機構・防御機構がはたらいた可能性も考えられるが、単に病原力のばらつきが大きかったことに起因する可能性もあり、断定はできない。

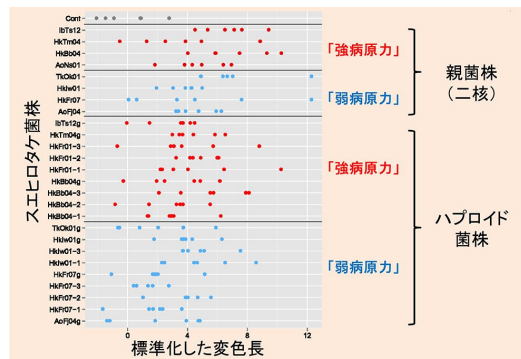


図 3. スエヒロタケハプロイド菌株およびそれらの親菌株の病原力。赤色のシンボルは事前の接種試験で強病原力と判定された親菌株およびそれらから派生したハプロイド菌株を示す。水色のシンボルは弱病原力と判定された親菌株およびそれらから派生したハプロイド菌株を示す。灰色のシンボルは無菌の妻楊枝を用いた対照である。

以上の研究結果から、スエヒロタケの病原力が遺伝的な形質であることが示唆され、これを簡便に評価する実験系および評価方法が確立できた。また、遺伝解析に用いる交配親となり得る菌株も選抜した。しかしながら、病原力の指標値にはばらつきが大きく、今後 QTL 解析等を用いてゲノム情報との対応関係を探る際、統計的に信頼性の高い結果を得るために必要なサンプルサイズが非現実的に大きくなるおそれも予想される。研究リソースの投入を大幅に増大させることなくこの問題を解決するためには、変色長に代わってより鋭敏な指標となり得る特徴量をポプラにおいて見出すか、より安定した指標値の得られるモデル宿主を新たに探索する必要があると考えられる。

なお、申請者らの研究グループでは、スエヒロタケがマメ科キバナフジ属の花木であるキングサリ「ボッシー」の辺材にも同様の病徴を引き起こすことを確かめている。これはキングサリに対するスエヒロタケの病原性を明らかにした初めての事例である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

・竹本周平, ロール=シャピユイ, 鳥居正人, 山田利博 (2015) キバナフジ「ボッシー」の胴枯症状の病原菌について. 樹木医学会第 20 回大会, 東京, 2015/10/25.

このほか学会大会併催の研究集会における招待講演あり

・竹本周平 (2016) スエヒロタケの辺材における病原性 - ポプラ緑枝をモデルとして - . 第 26 回樹木病害研究会「ぼくのわたしの病

原性」(第127回日本森林学会大会併催), 藤沢, 2016/3/30.

()

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
(該当なし)

アウトリーチ活動

公開セミナーでの招待講演

・竹本周平(2014)きのこが樹を食い倒す! 腐朽病害のメカニズムに迫る. 第116回森林科学セミナー, 秋田県立大学生物資源科学部, 秋田, 2014/11/4.

・竹本周平(2015)モデル生物スエヒロタケで腐朽病害のメカニズムに迫る. 森林科学セミナー, 東京大学農学部, 東京, 2015/4/16.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹本 周平 (TAKEMOTO, Shuhei)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・附属演習林・助教
研究者番号: 90724724

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者