

# 植物病原性 *Verticillium* 属菌における DNA 解析の 現状と同定・診断技術への応用

千葉大学園芸学部植物病理学研究室 宇佐見 俊 行

## はじめに

*Verticillium* 属には、*Verticillium dahliae* のほかに *V. longisporum* や *V. albo-atrum* など、いずれも植物に萎ちょう性の病害を引き起こす土壌伝染性糸状菌が含まれている (PEGG and BRADY, 2002)。中でも *V. dahliae* は、その宿主範囲の広さから、我が国で最も警戒が必要な植物病原菌の一つに挙げられている。*V. dahliae* の種内には病原性の異なる様々な種内菌群が存在することが知られているが、これらは、ワタに病原性を示す菌の「落葉系」・「非落葉系」や、国内では飯嶋 (1983) による「トマト系」・「非トマト系」、萩原 (1990) による「トマト系」・「ピーマン系」・「ナス系」などのような病原性系統として整理されている。

近年では、いくつかの植物病原菌の病原性メカニズムが分子レベルで明らかにされているが、*Verticillium* 属菌の病原性発現機構や宿主決定機構、あるいは種や病原性系統の分化機構はいまだ解明されておらず、これが本属菌による病害の防除を難しくする遠因ともなっている。ところが最近の数年間では、本属菌 (特に *V. dahliae*) における DNA レベルでの研究報告も増加しており、その展開が期待されている。また、DNA 解析により得られた知見を、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による菌の同定や検出、土壌や植物の診断などに応用している例もある。ここでは、国内外において展開されている本属菌の DNA レベルでの研究について、その現状を紹介する。

## I RAPD 法を用いた解析

Li ら (1999) や ZEISE ら (2002) は、いくつかの *Verticillium* 属菌のゲノムを Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法を用いて解析しているが、いずれも種特異的なパターンを得ることに成功している。特に、*V. albo-atrum* (*V. dahliae* と類縁性が高いと

される種) や *V. longisporum* (最近になって *V. dahliae* から分けられた種) が *V. dahliae* と容易に区別できたことから、*Verticillium* 属菌の種間レベルでの遺伝的相違は、RAPD 法により効率的に検出できると考えられる。

一方で、*V. dahliae* の病原性系統についての解析も行われている。RAMSAY ら (1996) と PEREZ-ARTES ら (2000) は、ともにワタに病原性を示す *V. dahliae* を対象に RAPD 解析を行っている。RAMSAY らの解析結果においては RAPD パターンと菌の病原性との間に関連性は見出せなかったものの、PEREZ-ARTES らは落葉系および非落葉系を明確に区別することに成功した。

このような RAPD 解析は国内においても行われている。KOIKE ら (1996) は、国産の *V. dahliae* および *V. albo-atrum* について RAPD 解析を行い、それぞれの種がいくつかの種内グループに分けられることを報告した。このとき、*V. dahliae* のトマト系は他の系統とは異なるパターンを示す傾向が認められた。筆者らの行った研究においてもこれと同様の結果が得られているが、トマト・ピーマン系 (トマトとピーマンに病原性を合わせもつ系統) はトマトに対して強い病原性をもつにもかかわらず、ピーマン系やナス系と同じパターンになるという結果が得られた。そこで筆者らは継続的に RAPD 解析を行ったところ、トマトに対して病原性をもつすべての系統 (トマト系とトマト・ピーマン系) に特異的な DNA 領域が見出された (宇佐見ら, 2002)。また同様に、ピーマンに対して病原性をもつすべての系統 (ピーマン系とトマト・ピーマン系) に特異的な DNA 領域も見出され、将来的にはトマト系、ピーマン系、ナス系、トマト・ピーマン系のすべての病原性系統を遺伝的に区別することも可能であることが示唆された (宇佐見ら, 2002)。この RAPD 解析では、トマト系のレース 1 に特異的なバンドも見出された (USAMI et al., 2001)。トマト系のレースを対象とした RAPD 解析の報告はこれまでもあるが (DOBINSON et al., 1998)、レース特異的なバンドは報告されておらず、今後の研究材料として興味深いものであるといえよう。一方で KOMATSU ら (2001) は、北海道のジャガイモより分離された *V. dahliae* の各菌株について RAPD および Repetitive Extragenic Palindromic-

Genomic Analyses of Plant Pathogenic *Verticillium* spp. and Its Application for Fungal Identification and Disease Diagnosis. By Toshiyuki USAMI

(キーワード: *Verticillium* spp., DNA 解析, PCR, 同定, 診断)

PCR (REP-PCR) 解析を行い、北海道の分離株は本州の分離株とは遺伝的に異なることを明らかにしている。

## II リボゾーム DNA の解析

核およびミトコンドリアのリボゾーム DNA は、分子進化時計的な配列として注目されることが多い。PRAMATEFTAKI ら (2000) の報告においても、核リボゾーム DNA の intergenic spacer (IGS) 領域の配列が *Verticillium* 属菌の種間および菌株間において極めて高い多様性を示すことが明らかにされている。この研究では IGS 領域の配列と菌の種や病原性との関連性は必ずしも明確ではなかったが、Li ら (1994) はミトコンドリア DNA 上のリボゾーム DNA (small subunit) の配列に種間差を見出し、*V. dahliae* に特異的な PCR プライマーをデザインしている。

一方で NAZAR ら (1991) は、リボゾーム DNA の internal transcribed spacer (ITS) 領域の配列に種間差があることを見出し、*V. dahliae* と *V. albo-atrum* にそれぞれ特異的な PCR プライマーのデザインに成功した。また同じ研究グループにより、やはり ITS 領域の配列から、*V. tricorpus* に特異的なプライマーもデザインされた (MOUKHAMEDOV ら, 1994)。ところでこれらの ITS 解析の過程で、形態的には *V. albo-atrum* と同定されるものの、従来の *V. albo-atrum* (これを *V.a.a.1* とする) とは ITS 領域の塩基配列が異なり、むしろ *V. tricorpus* に類似している菌株 (これを *V.a.a.2* とする) の存在が明らかとなった (ROBB et al., 1993)。その後 MAHUKU ら (2002b) は、*V.a.a.2* のゲノムを複数の方法で解析し、*V.a.a.2* は *V. albo-atrum* とも *V. tricorpus* とも異なる別種であるとの見解を示した。これは今後、分類学的な議論の対象となるかもしれない。

以上のように、*Verticillium* 属菌ではリボゾーム DNA の塩基配列に種間差が存在し、種レベルの同定には利用できると考えられる。しかし筆者らの検討によれば、*V. dahliae* の病原性系統間には必ずしも配列の差異は認められず、本配列による系統判別は困難と考えられる。

## III 菌の同定・検出および病害診断への応用

### 1 PCR による病原性系統の判別

先の RAPD 解析の項で述べたように、PEREZ-ARTES ら (2000) はワタに病原性を示す *V. dahliae* を対象に RAPD 解析を行い、落葉系および非落葉系に特異的なパターンを見出した。彼らはその後、各系統に特異的な増幅産物の塩基配列を決定し、落葉系および非落葉系に特異的な PCR プライマーをそれぞれデザインした (PEREZ-

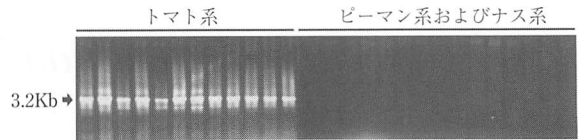


図-1 *Verticillium dahliae* のトマト系に特異的なプライマー Tg5 および Tc3 を用い、各菌株 DNA を鋳型とした PCR を行った。約 3.2Kb の増幅産物はトマト系のみ認められる

ARTES et al., 2000 ; MERCADO-BLANCO et al., 2001 ; 2002)。これらのプライマーを用いることにより、接種試験を行うことなく落葉系/非落葉系を判別することが可能である。

また雨宮ら (2000) は、differential hybridization により *V. dahliae* のトマト系に特異的な DNA 領域を見出したが、この中に見出された遺伝子 *vd1* (宇佐見ら, 2001) の配列からデザインした PCR プライマー Tg5 (5'-GAGAATAGAGTCTACTGATCAGCTGCCA-3') および Tc3 (5'-GAATTCGTTCCAGGTCACCTTGTCCACCAAC-3') を組み合わせて用いることにより、本菌トマト系菌株を特異的に検出できることが確認されている (図-1, USAMI et al., 2002)。トマトに対してトマト系と同様の病原性をもつ「トマト・ピーマン系」は本プライマーセットでは検出できないが、現在我が国においてはトマト・ピーマン系の発生はまれであり、これまでにも 2 菌株が報告されているに過ぎない。したがって、本プライマーセットの実用性への影響は少ないと考えられるが、現在、トマト系以外の病原性系統をも判別し得るプライマーを開発中である。

### 2 植物体や土壌からの菌の検出

PCR 法を用いた植物体からの *Verticillium* 属菌の検出は今日では広く行われており、オリーブ (MERCADO-BLANCO et al., 2001 ; 2002)、アルファルファおよびヒマワリ (HU et al., 1993)、ジャガイモ (MAHUKU et al., 1999 ; DAN et al., 2001)、トマト (HEINZ et al., 1998) などからの検出が報告されている。筆者らも、プライマー Tg5 および Tc3 を用いた PCR により、トマトおよびナスから *V. dahliae* のトマト系を特異的に検出し得ることを確認している (図-2, USAMI et al., 2002)。特にナスは *V. dahliae* 各病原性系統の共通宿主として知られているが、この方法を用いることで、菌の分離や接種試験などの手順を経ることなく、ナスに感染した菌の系統を迅速に調査できる。

一般的に、土壌サンプルからの DNA の抽出は植物サンプルからの場合よりも困難である。しかも、通常 *Verticillium* 属菌は耐久生存体の状態で土壌中に存在し

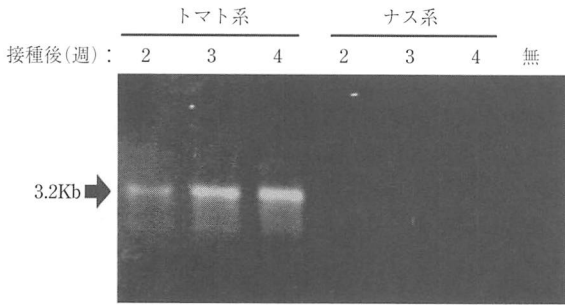


図-2 *Verticillium dahliae* のトマト系およびナス系の胞子を浸根接種して2～4週間経過したナスの胚軸からDNAを抽出し、これを鋳型にしてプライマーTg5およびTc3を用いてPCRを行った。ナスは両系統の共通宿主であるが、トマト系のみを検出することができる。無は無接種

ているため、DNAの抽出は一層困難になる。したがって、PCR法を用いて土壤中から菌を検出する場合、DNAの抽出法が大きな鍵となってくる。*Verticillium* 属菌の検出を目的とした土壌からのDNA抽出法として現在最も広く用いられている方法は、VOLOSSIOUKら(1995)の方法である。またHEINZとPLATT(2000a)は、VOLOSSIOUKらの方法の改法を報告している。KAGEYAMAら(2003)もDNA抽出法を報告しているが、この方法は*Pythium* や*Plasmosiophora*などの菌の検出にも有効とされる。最近では土壌サンプルからDNAを抽出するためのキットも販売されているが、各土壌ごとにその性質も様々に異なっていると考えられ、供試する土壌ごとに最適なDNA抽出法を選択することが望ましい。DNAさえ抽出できれば、適当なプライマーを選択して菌の検出を行うことが可能であろう。

### 3 定量的PCRによる菌の検出

HUら(1993)は、NAZARら(1991)がデザインした種特異的プライマーを用いて、競合的PCRにより*V. dahliae*および*V. albo-atrum*を植物から定量的に検出する試みを行っている。そして、希釈平板法よりも簡便に、精度および感度の高い検出結果を得ている。HEINZら(1998)は、この成果を*V. albo-atrum*の感染動態の調査に応用している。トマトに*V. albo-atrum*を接種した後に経時的に茎を採取し、競合的PCRにより菌を定量的に検出したところ、驚くことに抵抗性品種においても接種後4日の茎上位から菌が検出された。この結果の解釈は別として、定量的PCRを用いた応用研究としては一定の成果を収めているといえよう。ただ、PCRは必ずしも生菌だけではなく、単なる物質としてのDNAをも検出してしまうという点には注意が必要かもしれない。

またDANら(2001)は、やはりNAZARら(1991)のプライマーを用いて定量的PCRを行い、ジャガイモ品種の抵抗性検定を行っている。さらに、ジャガイモ圃場の土壌からの*V. dahliae*の検出(MAHUKU et al., 2002a)や、土壌およびジャガイモからの*V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. tricorpus*の検出(MAHUKU et al., 1999)、同じく土壌およびジャガイモからの*V. tricorpus*の検出(HEINZ and PLATT, 2000b)など、競合的PCRにより菌の定量を行っている研究報告は多数ある。今後、リアルタイムPCRなどが用いられれば、さらに精度の高い結果が得られるだろう。

### 4 病害診断の新しい手法

トマトに萎ちょう性の病害を引き起こす病原菌は、糸状菌および細菌を通じて多数存在する。USAMIら(2002)は、*V. dahliae*のトマト系(トマト半身萎凋病菌)に特異的なプライマーであるTg5およびTc3を用いてPCRを行った場合、トマト萎凋病菌やトマト根腐萎凋病菌、ナス科青枯病菌などのDNAからは一切増幅が生じないことを示し、トマト萎ちょう性病害の病原を特定するために本プライマーを用いることが可能であると示した。ただしこのプライマーでは、トマト半身萎凋病のみしか診断できない。これに対してLIEVENSら(2003)は、*Fusarium oxysporum*, *V. dahliae*, *V. albo-atrum*などトマトに萎ちょう性病害を引き起こすいくつかの菌について、リボゾームDNAのITS領域から種特異的なDNAプローブをデザインしてDNAアレイを作成した。そして、このDNAアレイを用いれば、植物体や土壌などへの病原菌が存在するかを迅速に診断できることを示した。将来、対象病原菌がより多いDNAアレイが開発されれば、病害診断のための強力なアイテムになることは間違いないだろう。

## IV さらなる研究への展望

### 1 病原性系統に特異的に発現する遺伝子

筆者らは、*V. dahliae*のトマト系に特異的なDNA領域の中に、推定137アミノ酸のポリペプチドをコードする遺伝子*vdt1*を見出した(宇佐見ら, 2001)。*vdt1*はトマト系において特異的に、しかも胞子や微小菌核、宿主に侵入した菌体内においても盛んに転写されていることが明らかになっているが、その機能は不明である。トマト・ピーマン系が本遺伝子をもたないことや、本遺伝子を破壊あるいは導入してもトマトに対する病原性に変化が認められなかったことから、残念ながら本遺伝子がトマト系の病原性を決定している可能性は否定された。しかし、このような系統特異的遺伝子が存在することは非常に興

味深い。今後、RAPD解析などにより新たな系統特異的遺伝子が見出され、それが *V. dahliae* の宿主決定機構を解明するきっかけとなることも、十分に考えられよう。

## 2 レトロトランスポゾン

最近、雨宮ら (2000) がクローニングした *V. dahliae* に種特異的な DNA 断片の中に、レトロトランスポゾン様配列が存在することが明らかになった (宇佐見ら, 2003)。この配列は *V. dahliae* のみならず *V. longisporum* のゲノム上にも多数分布しており、両種は遺伝的な関連性をもつと考えられた。一方で、*V. albo-atrum* や *V. nigrescens* には本配列は存在していなかった。このようなレトロトランスポゾン様配列は、*Verticillium* 属菌の種あるいは系統の分化を考察する材料になるかもしれない。

## 3 EST 解析

最近 NEUMANN ら (2003) は、様々な条件で培養した *V. dahliae* について cDNA ライブラリーを構築し、Expressed Sequence Tag (EST) 解析を行っている。この結果、微小菌核の形成を誘導した場合および導管液を含む培地で培養した場合に転写されているいくつかの遺伝子が明らかにされた。さらに、そのうちの一つであるトリプシプロテアーゼの遺伝子 (微小菌核形成時に発現) については、クローニングもされている (DOBINSON et al., 2003)。今後、微小菌核形成や寄生性に関与する遺伝子が多数見出される可能性もあり、続報に注目したい。

## 4 抵抗性遺伝子 *Ve* のクローニング

KAWCHUK ら (2001) は、*V. dahliae* や *V. albo-atrum* に対するトマトの真性抵抗性遺伝子、*Ve* のクローニングに成功した。彼らが明らかにしたところによると、*Ve* 遺伝子座には *Ve1*、*Ve2* の二つの遺伝子が存在し、それぞれがレセプター様の細胞膜局在型タンパク質をコードしているという。これは、*Ve* による真性抵抗性メカニズムがいわゆる「リガンド・レセプターモデル」に適合するものであることを示し、菌側にも非病原性遺伝子が存在することを示唆している。KAWCHUK らの推察のとおり、*Ve1* および *Ve2* がコードするレセプターがそれぞれ異なるリガンドを認識するならば、*V. dahliae* や *V. albo-atrum* のレース 1 は 2 種類の非病原性因子をもっている可能性もある。いずれにしろ、将来この非病原性因子も明らかにされれば、*Verticillium* と植物の相互作用をより深く理解する助けとなることは間違いない。

## おわりに

*Verticillium* 属菌における DNA 解析は、当初は分類学や分子進化学的な立場から行われるのが主であった。しかし、植物病理学的立場から最も重要視されるのは、

本属菌の病原性決定メカニズムの解明ではないだろうか。現在までに我々が得ている知見は、まだまだ十分とはいえない。しかし、分子生物学的な研究手法は時として絶大な威力を発揮する。現在行われている数々の研究がさらに進展すれば、*Verticillium* 属菌の病原性に関する我々の理解は一気に進むかもしれない。もし「病原性の決定に関与する遺伝子」が解明されれば、これを指標とすることにより、真に正確な DNA 診断も可能となるであろう。

## 引用文献

- 1) 雨宮良幹ら (2000) : 土と微生物 54 : 149 ~ 157.
- 2) DAN, H. et al. (2001) : Plant Dis. 85 : 700 ~ 705.
- 3) DOBINSON, K.F. et al. (1998) : Mycol. Res. 102 : 1089 ~ 1095.
- 4) ——— et al. (2003) : Curr. Genet. (印刷中)
- 5) 飯嶋 勉 (1983) : 東京農試研報 16 : 63 ~ 128.
- 6) 萩原 廣 (1990) : 植物防疫 44 : 299 ~ 303.
- 7) HEINZ, R. et al. (1998) : Physiol. Mol. Plant Pathol. 52 : 385 ~ 396.
- 8) ——— and H. W. PLATT (2000a) : Can. J. Plant Pathol. 22 : 117 ~ 121.
- 9) ——— (2000b) : ibid. 22 : 122 ~ 130.
- 10) HU, X. et al. (1993) : Physiol. Mol. Plant Pathol. 42 : 23 ~ 36.
- 11) KAGEYAMA, K. et al. (2003) : J. Gen. Plant Pathol. 69 : 153 ~ 160.
- 12) KAWCHUK, L. M. et al. (2001) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 : 6511 ~ 6515.
- 13) KOIKE, M. et al. (1996) : Plant Dis. 80 : 1224 ~ 1227.
- 14) KOMATSU, T. et al. (2001) : J. Gen. Plant Pathol. 67 : 23 ~ 27.
- 15) LI, K. N. et al. (1994) : Appl. Environ. Microbiol. 60 : 4324 ~ 4331.
- 16) ——— et al. (1999) : Mycol. Res. 103 : 1361 ~ 1368.
- 17) LIEVENS, B. et al. (2003) : FEMS Microbiol. Lett. 223 : 113 ~ 122.
- 18) MAHUKU, G. S. et al. (1999) : Can. J. Plant Pathol. 21 : 125 ~ 131.
- 19) ——— and H. W. PLATT (2002a) : Amer. J. Potato Res. 79 : 107 ~ 117.
- 20) ——— (2002b) : Mol. Plant Pathol. 3 : 71 ~ 79.
- 21) MERCADO-BLANCO, J. et al. (2001) : Plant Pathol. 50 : 609 ~ 619.
- 22) ——— et al. (2002) : Eur. J. Plant Pathol. 108 : 1 ~ 13.
- 23) MOUKHAMEDOV, R. et al. (1994) : Phytopathology 84 : 256 ~ 259.
- 24) NAZAR, R. N. et al. (1991) : Physiol. Mol. Plant Pathol. 39 : 1 ~ 11.
- 25) NEUMANN, M. J. and K. F. DOBINSON (2003) : Fungal Genet. Biol. 38 : 54 ~ 62.
- 26) PRAMATEFTAKI, P. V. et al. (2000) : ibid. 29 : 19 ~ 27.
- 27) PEGG, G. F. and B. L. BRADY (2002) : *Verticillium* Wilts., CAB International.
- 28) PEREZ-ARTES, E. et al. (2000) : Eur. J. Plant Pathol. 106 : 507 ~ 517.
- 29) RAMSAY, J. R. et al. (1996) : Aust. J. Agric. Res. 47 : 681 ~ 693.
- 30) 宇佐見俊行ら (2001) : 土と微生物 55 : 21 ~ 27.
- 31) USAMI, T. et al. (2001) : Proceedings of 10th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Madison, WI, U.S.A.
- 32) ——— et al. (2002) : J. Gen. Plant Pathol. 68 : 134 ~ 140.
- 33) 宇佐見俊行ら (2002) : 日植病報 68 : 191.
- 34) ———ら (2003) : 同上 69 : 242.
- 35) VOLOSSIOUK, T. et al. (1995) : Appl. Environ. Microbiol. 61 : 3972 ~ 3976.
- 36) ZEISE, K. and A. V. TIEDEMANN (2002) : J. Phytopathol. 150 : 557 ~ 563.