

大学研究室紹介

リレ一随筆

キャンパスだより(37)

滋賀県立大学
植物病理学研究室

鈴 木 一 実

所在地：滋賀県彦根市八坂町 2500

Laboratory of Plant Pathology, Department of Biological
Resources Management, School of Environmental Science, The
University of Shiga Prefecture. By Kazumi SUZUKI

(キーワード：植物病理学，炭疽病菌，付着器の機能発現，
トウガラシ属植物，ウイルス抵抗性育種)



滋賀県立大学のシンボルであるエンビツ塔

はじめに

滋賀県立大学は「キャンパスは琵琶湖，テキストは人間」をモットーに1995年に4年制大学として滋賀県彦根市八坂町に開設され，今年で開学15年目を迎えた。公共建築百選にも選ばれた美しいキャンパスの中で，実践的教育を軸とした「人が育つ大学」としての学風を培ってきた。現在，環境科学部，工学部，人間文化学部，人間看護学部の4学部，環境科学研究科，工学研究科，人間文化学研究科，人間看護学研究科の4つの大学院研究科から構成されている。環境科学部は学生定員が1学年180名であり，環境生態学科，環境政策・計画学科，環境建築デザイン学科，生物資源管理学科の4学科から成り立っていて，植物病理学研究室は生物資源管理学科に属している。文部科学省資料によれば，本学が開設された1995年度に，全国の大学で環境の文字が使われた学部は滋賀県立大学環境科学部1校のみであったが，2008年度末では国立大学4大学，公立大学10大学，私立大学31大学，合計45大学に達している。これらの動向は環境科学をとりまく社会の変容が私たちが考えている以上に速度を増していることを示している。

生物資源管理学科は1学年の定員が60名，教員数は18名である。本学科はアドミッションポリシーを「当学科は生物生産と生物機能を適切に制御，管理する知識と知恵を学ぶところです。自然や生命現象に関心が高く，農業などの生物生産とその環境への影響や生物機能を用いた物質生産と環境改善，土壌・水資源の保全と活用などを学ぶ意欲を示し，これらを学ぶための基礎的な学力を有し，真理の探究に対して行動力

のある学生を求めます」とし，環境問題に配慮した生物生産と生物機能の制御・管理に関する教育・研究に取り組んでいる。

I 研究室の歴史と現状

植物病理学研究室の歴史は環境科学部の前身である滋賀県立短期大学農業部にまで遡る。京都大学をご退官後初代の教授となられた逸見武雄教授から，園芸作物のウイルス病などをご専門とされていた近藤章教授，つづいて園芸作物の種子伝染性病害の研究に精力的に取り組まれた遠山明教授へと研究室の運営が引き継がれた。4年制の滋賀県立大学が設立されてからは但見明俊教授が研究室を主宰され，おもにイネ科牧草におけるエンドファイトの研究で多くの成果を挙げられた。現教授の鈴木一実は但見教授の後任として岩手生物工学研究センターから2006年4月に異動してきた。

生物資源管理学科は学科の教育・研究理念として前



図-1 植物病理学研究室から望む圃場実験施設

述したように持続可能な生物生産と生物機能の制御・管理を取り上げ、それに関連した専門科目はもとより、多くの実験・実習科目や環境フィールドワークなどの特徴ある講義科目を設定している。卒業研究を実施する研究室への学部生の分属は3回生後期に決定され、4回生から実際の卒業研究の指導が開始される。植物病理学研究室の属する生物資源管理学科は大講座制をとっており、植物病理学の教員は鈴木教授1名である。現在研究室に所属する学生は7名（学部4回生4名、大学院修士3名）である。応用微生物学を専門とする同学科の入江俊一助教と研究グループを形成し、合同で研究室ゼミを開設している。入江俊一助教はおもに白色腐朽菌のリグニン分解酵素の生産制御に関わる分子生物学的解析を精力的に実施している。

II 研究紹介

1 各種炭疽病菌の付着器の機能発現に関する解析

(1) 炭疽病菌の付着器侵入における活性酸素種の蓄積とその意義

植物病原菌と植物との相互関係において、植物側が生成する活性酸素種に関しては多くの報告があるが、植物病原菌もまた活性酸素種を生産することが報告さ

れている。ウリ類炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* 104-T株の分生孢子懸濁液に、活性酸素種（ROS）除去剤として知られているアスコルビン酸（AA）とジフェニレンヨードニウム（DPI）をそれぞれ培養開始時に添加した場合、分生孢子発芽・付着器形成率にはほとんど影響がなく、植物細胞壁のモデル系であるセルロース膜上で付着器からの侵入菌糸形成率の著しい低下が認められた。AAとDPIを培養開始後経時的に添加し、侵入菌糸形成率を調査した結果、培養12時間後までに添加した場合、侵入菌糸形成率の低下が認められたが、培養18時間後以降に添加した場合には侵入菌糸形成率の低下は認められなかった。アブラナ科植物炭疽病菌 *C. higginsianum* 337-5株においても、104-T株と同様の傾向が認められた。

ウリ類炭疽病菌 PKS1株（104-T株を野生株とするメラニン合成欠損突然変異株）の分生孢子から経時的にNBT（nitro blue tetrazolium）を用いて O_2^- を検出した結果、付着器内部のNBT染色反応は培養開始12時間後が最も強かった。また、AAおよびDPIを培養開始時に添加して培養したところ、無添加条件と比較して付着器内部のNBT染色反応は弱かった。ROS除去剤を添加した104-T株および337-5株の分生孢子懸濁液を宿主葉に接種した場合、無添加条件と比較して病斑形成数が減少し、侵入菌糸を形成した付着器数が減少した。これらのことから、炭疽病菌の付着器侵入における活性酸素種の関与が示唆された。

(2) 炭疽病菌の付着器侵入に対するカルシウムシグナル伝達経路阻害剤の影響

炭疽病菌の付着器形成には、カルシウムシグナル伝達経路が関与しているといわれている。植物細胞壁のモデル系であるセルロース膜を用い、カルシウムシグナル伝達経路の付着器侵入に対する関与を検討した。ウリ類炭疽病菌104-T株の分生孢子懸濁液にカルシウムシグナル伝達経路に関与するといわれている種々の薬剤をそれぞれ培養開始時に添加した場合、分生孢子発芽・付着器形成率にはほとんど影響がなく、侵入菌糸形成率の著しい低下が認められた。また、培養開始後経時的に添加した結果、付着器の形成前に添加した場合、侵入菌糸形成率の低下が認められたが、付着器形成段階で添加した場合には侵入菌糸形成率の低下は認められなかった。さらに、薬剤を添加した分生孢子懸濁液をキュウリ本葉に接種した場合、病斑形成率の低下が認められた。アブラナ科植物炭疽病菌337-5株においても、104-T株と同様の傾向が認められた。これらのことから、炭疽病菌の付着器侵入に対するカルシウムシグナル伝達経路の関与が示唆された。



図-2 研究室のメンバー（ガラス温室にて）



図-3 トウガラシの病害調査

2 トウガラシ属植物におけるウイルス抵抗性機構の解析

(1) トウガラシ属植物におけるトバモウイルス抵抗性素材の探索および解析

ピーマンやトウガラシの栽培において、ウイルス感染による被害は少なくない。ピーマンやトウガラシが含まれるカプシウム属植物には *Tomato mosaic virus* (ToMV) や *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) などのトバモウイルスに対する *L* 抵抗性遺伝子 ($L^1 \sim L^4$, L^{1a}) の存在が知られており、現在、交配育種によって *L* 抵抗性遺伝子を導入したウイルス抵抗性品種が育成されている。また、南部大長なんばんからは *L* 抵抗性遺伝子とは連鎖しないトバモウイルス抵抗性遺伝子 *Hk* が同定されている。*L* 抵抗性遺伝子については、その有無や遺伝子型を識別できる DNA マーカーが数種類開発されており、今後の育種への貢献が期待されている。

これまでに日本において市販されているピーマン・トウガラシ 66 品種・系統について、ウイルスの接種試験によってその *L* 抵抗性遺伝子型を明らかにした。また、これらの市販品種について、*L* 抵抗性遺伝子と連鎖する既知の DNA マーカーを用いて *L* 抵抗性遺伝子型を判別し、それぞれのマーカーについて接種試験の結果との整合性や、マーカーの適用性を調査した。現在、引き続きマーカーの実用性を調査するとともに、*Hk* 抵抗性遺伝子に連鎖する RAPD マーカーの選抜を行っている。さらに、トウガラシ属植物の栽培起源地である中南米で採集されたトウガラシ属植物の多くの系統に対して、各病原型のトバモウイルスの接種実験を実施し、抵抗性素材の探索を行った。

(2) 交配によるトバモウイルス抵抗性素材の作出
Hk 遺伝子を有する南部大長なんばんと L^{1a} 遺伝子を有する KC726 および KC780 との交配後代 (F_3 世代) から、*Hk* 遺伝子と L^{1a} 遺伝子をホモに有する系統をそれぞれ 6 系統、7 系統選抜した。選抜された F_3 世代系統の中からそれぞれ 3 系統についてウイルスに対する抵抗性の確認を行い、24℃ および 30℃ の温度条件下で ToMV および *Paprika mild mottle virus* (PaMMV) に対して安定な抵抗性を示すことを明らかにした。*Hk* 遺伝子と L^{1a} 遺伝子をホモに有する系統が 24℃ 条件下で PaMMV に対して安定な抵抗性を示すのは、両遺伝子の抵抗性が相乗的に現れたためであることが示唆された。

さらに、 L^{1a} 遺伝子や *Hk* 遺伝子の PaMMV に対する抵抗性の温度感受性や遺伝子数効果、両遺伝子の相補的な作用に関する解析を実施した。 L^{1a} 遺伝子および *Hk* 遺伝子をそれぞれホモ、ヘテロで有する系統に

PaMMV の接種を行い、24℃ 条件下における PaMMV に対する抵抗性は両遺伝子の保有する遺伝子数に、30℃ 条件下における PaMMV に対する抵抗性は *Hk* 遺伝子の遺伝子数に依存していることを明らかにした。病原型 P_0 および P_1 のトバモウイルスが蔓延した圃場において、温度に関わらず安定な抵抗性を示す、 L^{1a} および *Hk* 遺伝子を有する品種を導入することは効果的であると考えられた。

(3) 南部大長なんばんの *Hk* 抵抗性打破 PaMMV の解析

PaMMV を接種した南部大長なんばんから、*Hk* 抵抗性を打破する変異ウイルスを分離した。*L* 遺伝子または *Hk* 遺伝子を有するトウガラシ属植物および *N* 遺伝子を有するタバコに分離されたウイルスを接種し、*Hk* 抵抗性のみを打破する変異型 PaMMV であることが明らかとなった。この *Hk* 遺伝子抵抗性打破ウイルス (PaHk1) の 183 k 遺伝子の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を野生型 PaMMV (PaMMV-J) と比較したところ、メチルトランスフェラーゼ領域に位置する 241 番目のアミノ酸トレオニンのセリンへの置換が認められた。このアミノ酸置換を伴う塩基の変異を野生株に導入した変異ウイルスは *Hk* 遺伝子抵抗性を打破することが示され、このアミノ酸変異が *Hk* 遺伝子抵抗性の打破に関与することが示された。

3 植物病原糸状菌の薬剤耐性機構の解析

ベノミルなどのベンツイミダゾール系薬剤は病原糸状菌の β -チューブリンと結合して細胞分裂を阻害することが知られている。この薬剤は連用による薬剤耐性菌の出現が問題となっている。薬剤の作用点である β -チューブリン遺伝子には *TUB1*, *TUB2* 配列が存在し、ベノミル耐性菌では *TUB2* 配列の特定のアミノ酸に変異を持つことが知られている。ところで、*C. orbiculare* および *C. gloeosporioides* はベンツイミダゾール系薬剤に対して高い感受性を示し、薬剤存在下では菌糸生育は認められないが、*C. acutatum* や *C. higginsianum* は薬剤存在下で菌糸生育が認められ、低感受性を示す。この薬剤感受性の差異と *TUB1*, *TUB2* 配列の変異との関係について明らかにすることを目的として、これらの各種炭疽病菌の β -チューブリン遺伝子の解析を進めている。

4 トウガラシ属植物におけるうどんこ病および炭疽病に関する解析

(1) トウガラシ属植物におけるうどんこ病抵抗性素材の選抜

圃場でトウガラシ属植物を栽培したところ、*Leveillula taurica* によるうどんこ病に対する抵抗性素材がいくつか見出された。現在、市販ピーマンやトウ

ガラシ品種にはうどんこ病抵抗性素材は知られていない。多くの系統や品種からうどんこ病抵抗性素材の選抜を行い、感染過程の詳細な観察から抵抗性機構の解析を実施するとともに、交配による抵抗性の遺伝解析を実施したい。

(2) トウガラシ栽培圃場から分離された炭疽病菌の性質

圃場で栽培したトウガラシ属植物の果実に発生した、炭疽病と思われる果実病斑から炭疽病菌が分離された。分離菌株の分生胞子および付着器の形態、生育温度、薬剤感受性などの諸特性を調査するとともに、トウガラシに対する病原性を確認した。現在、分離された炭疽病菌を供試してトウガラシ属植物の炭疽病に対する抵抗性素材の選抜を実施している。炭疽病菌の種特異的プライマーを用いた遺伝子診断などの結果から、分離菌株は *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* と同定された。

おわりに

植物病理学や作物保護学の分野にも分子生物学、遺伝子工学などバイオテクノロジーの波が押し寄せているが、遺伝子がわかれば我々が親しんでいる生命現象をすべて解き明かせるというものでもない。初歩の学生にとって最も大切なことは、生物の世界で作物と病原体との間で繰り広げられる様々な興味深い現象を自らの目で見分ける力を養うことである。植物病理学や作物保護学は農業現場で起こる病気の被害を少なくする必要性から発達してきた学問であり、学生諸君には実際の田や畑で何が起きているか観察することを教

えたいと考えている。農業現場での病害発生の実態をまず正しくみてもらい、さらに進んで宿主～病原体の相互作用、特異性の成立を魅力ある生物現象として把握して欲しいものである。

生物資源の生産を最適な条件で行い環境への影響をより少なくするには、生物資源そのものである植物（作物）と病原体を熟知し、その生産の場をとりまく環境を適切に管理する技術とシステムが必要である。病原体の病原性発現の研究からは、病原体の作物に病気を引き起こす能力そのものをコントロールする、理想的な病害防除技術や防除薬剤の開発につながる新しい新知見が得られることが期待できる。また、植物の病害抵抗性発現の研究は新規な抵抗性遺伝子源、生物資源の探索、その育種素材としての有効利用につながるものと考えている。

最後に滋賀植物病理懇話会の紹介をさせていただく。この懇話会は滋賀県内の大学、県試験場、民間企業の植物病理関係者の勉強会であり、これまで本研究室が世話人を務めている。毎年1回（おもに1月）に3～4名の関係者に話題提供をお願いし、勉強会を開催するとともに、懇親会を企画して懇親の場を設けている。1991年に第1回の懇話会が滋賀県立短期大学農業部（草津市）で開催されていることから、20年近くの歴史がある。これまでに延べ63名の方（農業メーカー、種苗会社、滋賀県試験場関係者、大学関係者）が話題提供をされている。現場での病害防除の実際や問題点、滋賀県の農業現場での重要病害の動向を知る上でたいへん有意義な会であり、学生諸君にも参加を勧めている。

発生予察情報・特殊報 (21.8.1～8.31)

各都道府県から発表された病害虫発生予察情報のうち、特殊報のみ紹介。発生作物：発生病害虫（発表都道府県）発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病害虫。

※詳しくは各県病害虫防除所のホームページまたはJPP-NET (<http://www.jpnpn.ne.jp/>) でご確認下さい。

- キク：茎えそ病（香川県：初）8/5
- ニガウリ：青枯病（大分県：初）8/6
- トマト：ポテトスピンドルチューバーウィロイドによる病害（福島県：初）8/7 ※発病終息
- ホウレンソウ：モザイク病（長野県：初）8/7
- キク科作物：アワダチソウグンバイ（鹿児島県：初）8/7
- ウメ：plum pox virus（プラムボックスウイルス）による病害（神奈川県：初）8/13
- チャ：ミカントゲコナジラミ（島根県：初）8/18
- トマト：すすかび病（兵庫県：初）8/20

- バレイショ：イエシロアリ、ヤマトシロアリ（福岡県：初）8/21
- キク科作物（キク、ヒマワリ等）、サツマイモ、ナス：アワダチソウグンバイ（宮崎県：初）8/27
- ルッコラ：ミドリサルゾウムシ（神奈川県：初）8/28
- トルコギキョウ：黄化えそ病（神奈川県：初）8/28
- スッキーニ：カボチャモザイク病（徳島県：初）8/28
- リンゴ、日本ナシ：ヒメボクトウ（福島県：初）8/31
- ニラ：えそ条斑病（福岡県：初）8/31