

植物病原菌の宿主適応への新たな分子機構と病原性制御

豊田和弘 (岡山大学 農学部)

pisatin@cc.okayama-u.ac.jp

植物の病害は農業生産に多大な経済的被害をもたらしている。本研究では、病原菌糸状菌による植物への感染とその宿主特異性の分子機構について解析し、病原菌の宿主植物への新たな寄生戦略を提示した。一連の研究成果は、病原菌の感染に必須な宿主因子（遺伝子）の改変による耐病性付与の可能性を現実的なものとするなど、従来の病原菌と直接対峙する方法とは異なる病害防除理論の礎となるものである。本稿では、病原菌糸状菌による宿主植物における防御応答の制御機構とそれに基づく病原性制御について述べたい。

はじめに

最近、BSE、O-157、高病原性鳥インフルエンザなど、ヒトの健康や食の安全を脅かす感染症や病原体の名前をよく耳にする。新興病原体とも称された新たな病原体の出現に未経験のことではないが、日常生活に不便ささえ感じさせられるようになってきた。改めて記すまでもないが、同様の感染症は我々の生存基盤を支える作物（植物）にもある。飽食の時代であるがゆえ、この頃話題になることは少ないが、世界規模では年間、食糧生産の約 15%（約 8 億人分の食糧に相当する）が失われているのが現状である。したがって、食の安全を含めた食糧の恒久的な供給を脅かす植物の病気も今世紀に持ち越された重要課題といえる。

病原菌は宿主の情報伝達系を標的として寄生関係を成立させる

植物の病害や病原体による寄生の仕組みを明らかにすることは、自他識別という生命現象の根幹にも迫り得る課題であり、幾多の応用価値を秘めている。1960 年以降、植物の抵抗性や罹病性（感受性）を制御する病原菌の代謝産物が発見され、これらはエリクター（抵抗性誘導因子）やサプレッサー（抵抗性抑制因子）と呼ばれている。近年の研究から、植物の病原体に対する防御応答の過程は、「病原体の認識→情報の伝達→防御関連遺伝子の発現→防御因子の生成」と捉えられるが、認識から遺伝子応答に至る情報伝達系の全体像の解明にはいたっておらず、また、本過程に対するサプレッサーの作用機構については世界的にもほとんど解析されていない現状であった。

病原菌糸状菌の 1 種であるエンドウ褐紋病菌 (*Mycosphaerella pinodes*) の柄胞子発芽液中には、宿主の防御応答を誘導する物質（エリクター）と抑制する物質（サプレッサー）が存在する。サプレッサーは糖ペプチドを活性中心にもつ物質で、エンドウのファイトアレキシン（ピサチン）の生合成を始めとする複数の防御応答を抑制する。本物質で処理された宿主組織では、防御応答に関連した遺伝子発現が転写レベルから阻害（遅延）され、エンドウとは全く関連のない非病原性菌による感染が成立し発病する。そこで、エンドウをモデルとして、抵抗性発現に必須な情報伝達系を探索するとともに、本系に対するサプレッサーの作用機構について解析した。その結果、エリクターで処理された組織には、数分以内に細胞膜のポリホスホイノシチド代謝系が亢進し、防御関連遺伝子の発現に先行して細胞内情報伝達物質であるイノシトール三リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DAG) が一過的に生成されることを突き止めた (図 1a)^{3), 5)}。実際、ポリホスホイノシチド代謝系に作用点をもつネオマイシン（ホスホリパーゼ C 阻害剤）で処理した組織には、宿主による防御応答の発現が抑えられ、本来感染しない多数の非病原性菌が感染し増殖できるようになった^{3), 6)}。一方、本代謝系に対するサプレッサーの作用機構について解析した結果、エリクター処理によって誘導される IP₃ や DAG の生成を著しく阻害し、防御関連遺伝子の活性化を抑制することが示された⁵⁾。これらの一連

の実験証拠から、病原菌のサプレッサーが宿主の防御機構を支える情報伝達系を標的としており、この阻害が寄生関係の成立（発病）の鍵となると結論付けた⁹⁾。現在までに、8種のサプレッサー生産菌が知られているが、その作用機構が明確にされた例は少なく、本成果は病原系状菌の感染戦略の一端を捉えたものといえる。

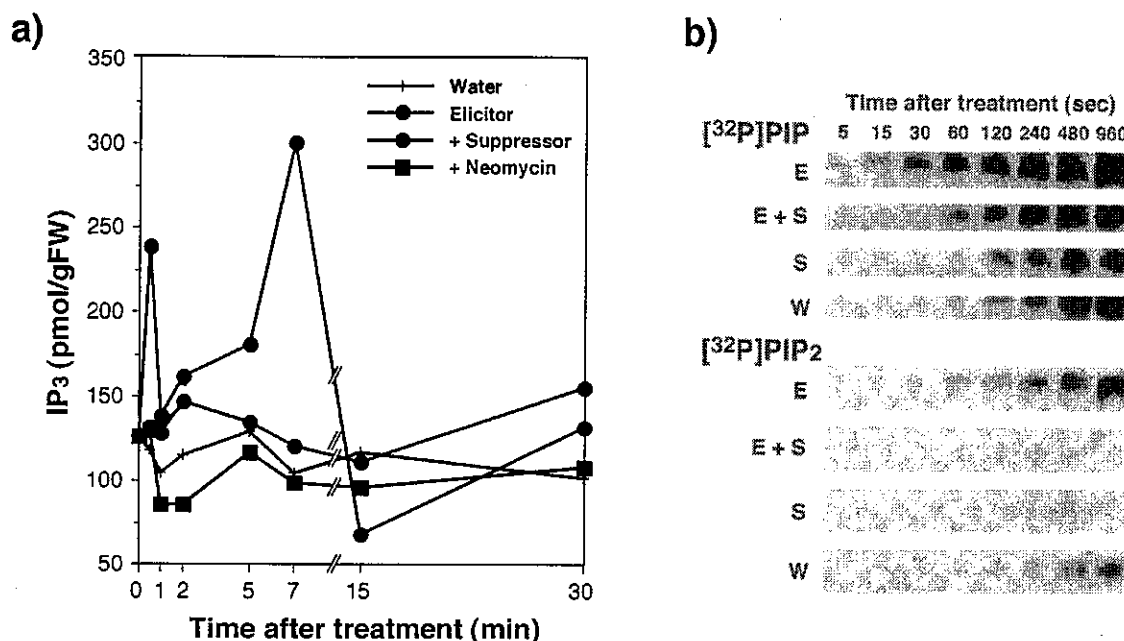


図1 病原菌シグナルで処理したエンドウ上胚軸組織における IP₃ 生成の経時変化 (a) と分離細胞膜における PIP kinase 活性に対する病原菌シグナル処理の影響 (b)

病原菌シグナルによる情報伝達系の制御

ポリホスホイノシド代謝系は真核生物に保存された情報伝達経路の1つであり、レセプターと共役して働く膜タンパク質（酵素）と、その下流の細胞質タンパク質から構成される。高等植物においても、感染応答を含む様々なストレス反応への関与が知られているが、その調節機構については依然不明な部分が多い。本研究では、数種の阻害剤を用いた薬理的解析を進め、その構成因子の1つであるジアシルグリセロールキナーゼ（DAG kinase）が感染応答に対する負の調節因子として働いていることを示した（図2）²⁾。すなわち、DAG kinase 阻害剤である R59022 の単独処理は宿主組織に対して何ら影響を示さないが、エリシターとの共存下には細胞内 DAG の恒常的な蓄積とそれに伴う防御関連遺伝子の強い発現が認められた。実際、ファイトアレキシン（ピサチン）の生合成にかかわるフェニルアラニンアンモニアリアーゼの蓄積レベルとその細胞内活性は、エリシターだけを与えた場合と比べて5倍以上に増加し、最終産物（ピサチン）の蓄積量の増加とよく比例していた²⁾。最近では、R59022 とエリシターで処理した組織には恒常的な MAP キナーゼの活性化が起り、逆にサプレッサーの共存下には認められない⁹⁾。したがって、ポリホスホイノシド代謝系を介して受容された感染シグナルは、下流の MAP キナーゼカスケードへと伝達され、遺伝子応答を伴う様々な防御応答が誘導されるものと推定した。

一方、エンドウの芽生えから細胞膜画分を調製し、ポリホスホイノシド代謝系を構成する膜酵素に対する作用について *in vitro* で解析した結果、サプレッサーはホスホリパーゼ C の上流で働くホスファチジルイノシトールリン酸キナーゼ（PIP kinase）の活性を著しく低下させていることが明らかとなった（図1b）⁶⁾。

前記の *in vivo* での結果とあわせて考えると、サプレッサーの主たる作用点は PIP kinase、もしくはその上流にあり、この阻害によってホリホスホイノシド代謝系の亢進が阻害されるものと考えられた。

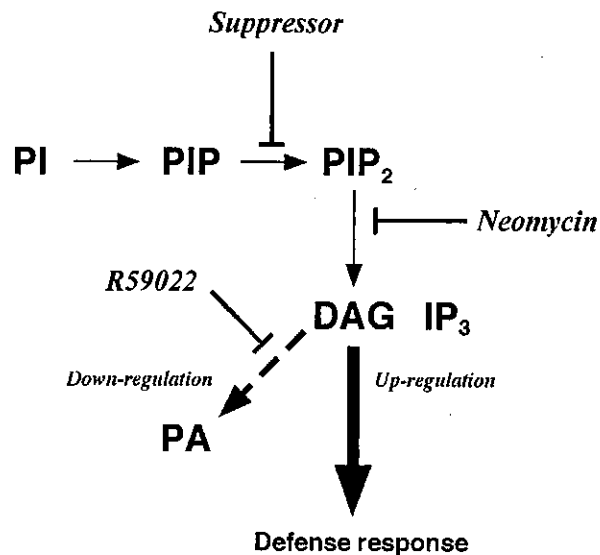


図2 エンドウにおける病害抵抗性シグナル伝達経路と病原菌サプレッサーによる制御

病原糸状菌による植物疾病の分子機構解明へ向けた新たな解析モデル

マメ科植物の実験材料として、エンドウ、ダイズ、インゲンなどが古くからよく使われているが、一般に形質転換が困難であり、ゲノムサイズが大きいため分子遺伝学的解析が遅れている。そのなかでも、アルファルファに近縁のタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) は、ゲノムサイズが ~520MB と小さく、形質転換が容易なことから、ミヤコグサとともにマメ科のモデルとして注目されている。近年、シロイヌナズナを中心にモデル解析システムが開発され、病原糸状菌や細菌 (バクテリア) に対する抵抗性遺伝子研究は著しい進歩を遂げている¹⁾。しかし、これらの多くは抵抗性に視点を置いたものであり、罹病性の解析モデルはこれまで切望されながらも未だ報告がない。このような状況の中、最近、褐紋病菌が自然宿主であるエンドウの以外にもタルウマゴヤシに感染することを見出した^{7) 8)}。そこで、世界の各国から集めた約 20 種のエコタイプに対する病原性について調べた結果、褐紋病菌はすべてに感染し、うち 2 種では柄子殻 (繁殖器官) の形成が認められた。また、タルウマゴヤシに対するサプレッサーの作用について調べたところ、エリシターや重金属の処理によって誘導される防御関連遺伝子の活性化を抑制し、その処理組織 (葉) には本来感染しない非病原性菌による侵入を許し発病に至ることが明らかとなった。すなわち、褐紋病菌とタルウマゴヤシを組み合わせた相互作用は、サプレッサーが介在する病原糸状菌による植物疾病の格好の解析モデルとなることを示した⁷⁾。

おわりに

前述のように、病原糸状菌が生産するサプレッサーの宿主植物に対する生理・生化学的研究から、その主たる作用点が防御関連遺伝子の発現より上流の情報伝達系にあることが明らかとなった。しかし、サプレッサーが介在する植物の疾病では、主要な宿主因子としてレセプターが推定されるが、その直接の相互作用分子や下流分子については未だブラックボックスのままである。現在、病原菌による“発病 (罹病性)”を1つの表現型として捉え、病原性相互作用の成立に関連する宿主遺伝子の解析を始めている。特に、病原性相互

作用の崩壊（破綻）を指標として選抜した変異体から原因遺伝子を特定し、当該遺伝子を人為的に改変することによって、「病原菌に不感受性の植物を作る」という狙いがある。これは、サプレッサーなどの病原性因子に対する標的分子を含む宿主の遺伝子型の改変によって寄生関係を破綻させれば、侵入と繁殖がうまく進まず、結果として病気を回避できるという考えに基づく。従来の病原菌と直接対峙する方法とは異なり、自然環境に対して負荷の少ない病害防除技術といえる。繰り返すが、植物の病気は人類の有史以来の問題であり、21世紀に持ち越された最重要課題といっても過言ではない。さらなる詳細な生理・生化学的、分子生物学的、分子遺伝学的解析を通して植物感染の原理や法則を知り、それらに基づいた恒久的な耐病性強化戦略が講じられ実施されることを期したい。

謝辞

本研究を進めるに当たって、終始格別なご指導を頂きました岡山大学農学部 白石友紀教授、故山田哲治教授、一瀬勇規教授ならびに岡山大学名誉教授 奥 八郎先生に深く御礼申し上げます。また、一貫して心温まるご指導と支援を頂きました三重大学名誉教授 久能 均先生（現 株式会社赤塚植物園）には心から感謝申し上げます。本研究は、岡山大学農学部植物病理学研究室で行われたものであり、研究室の先輩・後輩諸氏のご指導とご助言による賜物である。ここに記して深謝したい。最後に、日本農学進歩賞にご推薦くださいました日本植物病理学会会長 米山勝美先生ならびに岡山大学農学部長に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Toyoda, K., Collins, N.C., Takahashi, A. and Shirasu, K. (2002) Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens. *Transgenic Res.* 11, 567-582.
- 2) Toyoda, K., Kawahara, T., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (2000) Poentiation of phytoalexin accumulation in elicitor-treated epicotyls of pea (*Pisum sativum* L.) by a diacylglycerol kinase inhibitor. *J. Phytopathol.* 148, 633-636.
- 3) Toyoda, K., Kawahara, T., Mizukoshi, R., Koyama, M., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (1998) Elevation of diacylglycerol during the early stage of elicitor-signal transduction in pea (*Pisum sativum*). *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 64, 485-487.
- 4) Toyoda, K., Miki, K., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (1995) Plant lectins induce the production of a phytoalexin in *Pisum sativum*. *Plant Cell Physiol.* 36, 799-807.
- 5) Toyoda, K., Shiraishi, T., Ichinose, Y., Yamada, T. and Oku, H. (1993) Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiol.* 34, 729-735.
- 6) Toyoda, K., Shiraishi, T., Yoshioka, H., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1992) Regulation of polyphosphoinositide metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 33, 445-452.
- 7) 豊田和弘 (2004) 糸状菌による植物疾病の分子機構解明へ向けたタルウマゴヤシ解析システム—サプレッサーが介在する植物感染症の謎に迫る—, 化学と生物, 学会出版センター, 東京, pp.291-293.
- 8) 豊田和弘・白石友紀・一瀬勇規・山本幹博・稲垣善茂 (2002) 高等植物における病害抵抗性シグナル伝達と病原菌による制御, 植物微生物相互作用研究の現状と将来展望 (尾谷浩・児玉基一郎編), 日本植物病理学会, 東京, pp.67-76.
- 9) Uppalapati, S.R., Toyoda, K., Ishiga, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. (2004) Differential regulation of MBP kinases by a glycoprotein elicitor and a polypeptide suppressor from *Mycosphaerella pinodes* in pea. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64, 17-25.

Plant Defense and Requirements for Achievement of Susceptibility to Pathogen

Kazuhiro Toyoda (Okayama University, Faculty of Agriculture)

pisatin@cc.okayama-u.ac.jp