

植物病原糸状菌の形態形成と植物免疫

京都府立大学大学院農学研究科 久保康之

はじめに

植物と病原菌の相互作用において、病原菌の生産する分泌性の物質や細胞壁成分が植物の防御応答を誘導する活性をもっていることは広く知られている。細菌における鞭毛タンパク質や、elongation factor といった細胞を構成する分子パターン (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) が宿主細胞の防御応答を誘導する仕組みについても詳細が明らかになりつつある (CHINCHILLA et al., 2007)。病原糸状菌においても、キチンやグルカンといった細胞壁を構成する要素が PAMPs として機能することが示されている (SHIBUYA and MINAMI, 2001)。

動物細胞—真菌系では細胞壁グルカンが免疫細胞のエリシター分子として機能し、自然免疫を誘導することが *Candida albicans* を用いた実験系で明らかにされている (BROWN and GORDON, 2005)。*C. albicans* では酵母生育をするステージと菌糸状生育をするステージの二型性を示し、細胞壁表層の構造を二つのステージで変化させている。病原性を示す菌糸状生育のステージでは表層のグルカンは表出せず、宿主の免疫細胞からの認識を回避することにより病原性を示すが、酵母生育ステージでは細胞表層のグルカンが表出し、宿主の自然免疫により感染を阻害されることが明らかにされている (GANTNER et al., 2005)。病原菌の形態形成と感染性に、相関性が認められるということを示す実験結果である。

一方、こうした観点からの植物病原菌の研究は限定的といつてよい。インゲンさび病菌を用いた研究では、感染過程において胞子発芽から付着器形成までは細胞壁の表層にはキチンが多く、侵入後に形成される感染嚢ではキチンよりキトサンが増え、植物からの認識を免れる仕組みをもっているとの報告がある (GUEDDARI et al., 2002)。このことは、植物病原糸状菌の形態形成が、宿主からの認識を免れる仕組みと連動している可能性を示唆している。本稿では、植物—病原糸状菌の相互作用における PAMPs と抵抗性誘導について、動物—真菌系と

の対比から紹介したい。

I 動物—真菌系における PAMPs と自然免疫

C. albicans —マクロファージ系における自然免疫の仕組みに関しては、詳細な研究が行われている。最近の研究では、マクロファージ表層のレクチンタイプ受容体である Dectin-1 が病原菌の細胞表層のベータグルカンを認識し、チロシンキナーゼシグナル伝達系を経て、食作用やインターフェロン分泌を伴った自然免疫応答を誘導することが明らかにされている (UNDERHILL et al., 2005)。さらに、Dectin-1 を介した自然免疫と病原真菌の感染の成否が、形態形成と細胞表層のグルカンの存在と関連していることが注目されている。ホワイトヘッド研究所の FINK 博士らは、出芽酵母のゲノムレベルでのノックアウト変異株の解析から Dectin-1 受容体に対する認識活性とベータグルカン抗体に対する認識活性に相関性を見出すとともに、細胞表層のグルカンが多い変異株が自然免疫活性誘導を増大させていることを見出している。さらに変異遺伝子の総合的な解析から、細胞表層のグルカン表出に関連する遺伝子のネットワークも明らかにしている (WHEELER and FINK, 2006)。

一方、近年注目されているグルカン合成阻害活性をもつ抗真菌剤カスポフンジンの生理活性が、グルカン合成阻害濃度より低い濃度で *in vivo* の活性を示すことが示されている。そしてこの *in vivo* の活性は、病原菌のグルカン層の表出によるマクロファージの認識活性の増大に基づく自然免疫活性によるものであることを明らかにしている (WHEELER and FINK, 2006)。こうした実験結果は、病原菌の細胞壁表層の組成の変化が宿主の認識と極めて密接な関係にあり、これが感染の成否を決定していることを示している。植物病原菌と植物との関連において、こうした視点からの研究はいまだ限定的であると思われる。本稿で取り上げるウリ類炭疽病菌の *ClasSD1* 遺伝子研究は、動物真菌と同じく植物病原菌においても細胞壁形成の制御と宿主による認識に関連性がある可能性を示した数少ない研究事例である (TANAKA et al., 2007 a; 2007 b)。

Morphogenesis of Plant Pathogenic Fungi and Plant Immune Responses. By Yasuyuki KUBO

(キーワード: ウリ類炭疽病菌, イネいもち病菌, 病原性, 防御応答, 細胞壁, 付着器)

II ウリ類炭疽病菌の *ClaSSD1* 遺伝子研究

1 *ClaSSD1* 遺伝子の同定

筆者の研究室ではウリ類炭疽病菌のアグロバクテリウムを用いた変異株作成の実験系を確立し、感染性が低下した変異株の網羅的なスクリーニングを進めてきた (Tsuji et al., 2003)。*ClaSSD1* 遺伝子は、5,000 を超える変異株のスクリーニングから選抜された変異株の一つである Lf2754 株の変異遺伝子として同定された。*ClaSSD1* 遺伝子は 956 のアミノ酸からなる推定 ORF を有し、出芽酵母の *SSD1* 遺伝子と高い相同性を有していた。*SSD1* 遺伝子は出芽酵母において細胞壁の健全性に関与し、本遺伝子の変異株はオスモチン様タンパク質 (PR5) やカフェインに対する感受性の増大を示す。また、*ClaSSD1* 遺伝子は出芽酵母の *ssd1* 変異株の変異を機能相補し、カフェインに対する感受性を野生型レベルへ低下させることを確認している。一方、*ClaSSD1* 遺伝子の推定コードタンパク質は出芽酵母の *SSD1* 遺伝子と同様に RNA 結合ドメインを有するが、出芽酵母と同様に遺伝子産物の分子レベルでの機能については不明な点が多い。

2 *ClaSSD1* 遺伝子の機能

ウリ類炭疽病菌の *ClaSSD1* 遺伝子機能を解析するために、遺伝子破壊変異株を作成した。遺伝子破壊株は発芽、付着器形成やセルロース膜上での感染菌糸形成能は野生型と全く変わりがなかったが、キュウリ葉に対する病原性は顕著な低下を示した。一方、出芽酵母と異なり、カフェインに対する感受性の増大は認められなかった。当初、変異株の病原性の低下は宿主の防御応答に伴う PR タンパク質や活性酸素に対する感受性の増大によると推定して研究を進めてきたが、*class1* 変異株は過酸化水素に対する感受性は野生型株と変わらず、また、病原菌の感染時における *PR5* 遺伝子の発現動向の RT-PCR による解析からも *PR5* の関与を示す実験結果は得られなかった。一方、電子顕微鏡による細胞学的観察を行ったところ、*class1* 変異株を接種した植物では顕著なパピラ形成の誘導が認められた (図-1)。このことは、変異株が抵抗性に対して感受性が増すというよりは、むしろ抵抗性を強く誘導している可能性を示唆していると考えられた。この可能性は、タマネギ鱗茎表皮細胞への接種実験において *class1* 変異株が野生型より迅速にパピラ形成を高頻度に誘導することから強く支持された。

一方、出芽酵母の *SSD1* 遺伝子研究で *ssd1* 遺伝子変異株が細胞壁の健全性の欠損による環境応答能の低下を

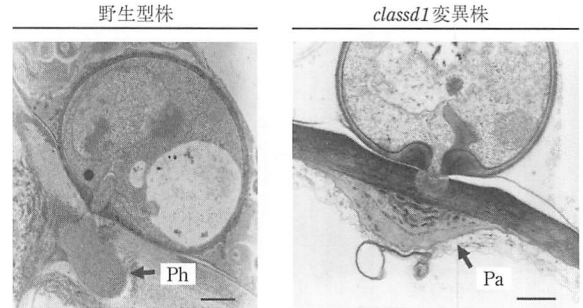
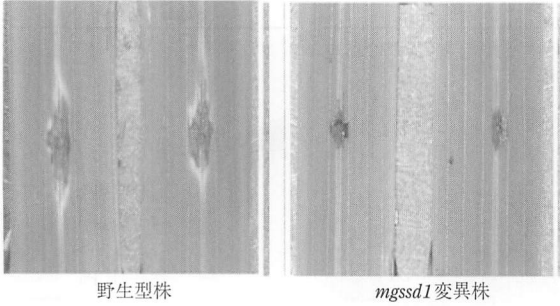


図-1 ウリ類炭疽病菌を接種したキュウリ葉の透過型電子顕微鏡観察
野生型株は侵入菌糸 (Ph) を形成して宿主細胞に侵入するが、*class1* 変異株は宿主のパピラ (Pa) により侵入菌糸の形成が抑制される。

示すことが知られていたが、2003年に FINK 博士らは病原性出芽酵母の *ssd1* 変異株が動物細胞に対する炎症誘導能を増大するという報告をした (WHEELER and FINK, 2003)。このことは、ウリ類炭疽病菌の *class1* 変異株がパピラ誘導能を高めるという実験結果と適合する。また、キュウリ子葉への接種実験において *class1* 変異株が野生型株よりも迅速に *PR1* 遺伝子の発現誘導を示すことが示され、植物病原菌における *SSD1* 遺伝子オルソログの変異は環境耐性よりもむしろ防御応答の誘導に関連していることが示唆された。防御応答の誘導が *class1* 変異株の感染に関与しているならば、植物の防御応答を何らかの形でかく乱することによって感染能の復帰が期待される。植物のヒートショック処理によって防御応答が乱されることが知られているが、キュウリ子葉に 50℃、30 秒のヒートショックを施すことによって *class1* 変異株の感染の復帰が認められた。このことは、*class1* の感染性の欠損に植物の抵抗性の誘導が深く関与していることを支持している。

これらの実験結果はウリ類炭疽病菌で得られた結果に基づいて、*SSD1* 遺伝子オルソログの機能の普遍性を検証するために、イネいもち病菌の *SSD1* 遺伝子オルソログ *MgSSD1* の単離と遺伝子破壊株の創出、および表現型の解析を進めた。その結果、イネいもち病菌においても炭疽病菌と同様に感染性の低下が認められるとともに (図-2)、アブシジン酸処理による抵抗性の抑制が *mgssd1* 変異株の感染を回復するという結果を得た。こうした生理学的アプローチで植物の防御応答と *ClaSSD1* 遺伝子の機能の関連性がウリ類炭疽病菌に限定されるのではなく、少なくともイネいもち病菌など他の植物病原糸状菌に対しても一般的なものである可能



野生型株 *mgssd1* 変異株

図-2 親和性品種「藤坂5号」に対する *mgssd1* 変異株の病原性試験

mgssd1 変異株は、野生型 (70-15系統) に対して顕著な病原性の低下を示した。

性が示唆された (TANAKA et al., 2007 a)。ここで示された宿主の防御応答系の関与については、さらに実験植物であるベンサミアーナタバコを用い、遺伝学的にも支持される結果を得ている。

III 植物の防御応答と *ClassD1* 遺伝子

ベンサミアーナタバコは VIGS (virus-induced gene silencing) 法による遺伝子サイレンシングを有効に行うことができる実験植物であり、ウリ類炭疽病菌に対しては感受性を示す宿主である。現在、VIGS により *classd1* 変異株の感染抑制に関与する遺伝子の同定を進めている。防御応答に関連のあることが報告されている遺伝子について VIGS を行い、*classd1* 変異株を接種することにより病斑形成能を回復させるかどうかを検討した。現在のところ SIPK/WIPK キナーゼ経路が関与することを示す実験結果を得ており、SIPK/WIPK キナーゼ遺伝子やその上流に位置する MEK2 遺伝子のサイレンシングにより *classd1* 変異株の顕著な病斑形成誘導が確認された。一方、過敏細胞死を伴う抵抗性遺伝子 (R 遺伝子) の抵抗性に関わる *SGT1*, *RAR1*, *HSP90* 遺伝子や活性酸素生成に関わる *NbrbohA*, *NbrbohB* 遺伝子は関与しないことが明らかになった (TANAKA et al., 2007 b)。*classd1* 変異株の感染阻止に至る抵抗性は、R 遺伝子に基づく抵抗性とは異なる経路が関与していることが示された。さらに、本来、親和関係にある病原菌においても、基本的抵抗性による防御応答で十分に病原菌の感染を抑制できることが示唆された。このことから、病原菌側から見れば *ClassD1* 遺伝子は宿主の防御応答を誘導する PAMPs の制御に関わっており、宿主からの認識を回避するための必須の役割を演じていると思われる。

IV 植物の基本的抵抗性と *ClassD1* 遺伝子

JONES and DANGLE は Nature 誌に The plant immune system (植物の免疫系) と題する総説を発表し (JONES and DANGLE, 2006), その中で “zigzag” モデルを提唱した。ここで、基本的抵抗性から過敏反応を伴う特異的抵抗性までを統一的に説明するモデルを示している。総説では基本的抵抗性を「感受性の宿主において病原菌によって活性化される抵抗性」と定義し、PAMPs によって誘導される抵抗性と感染誘導活性をもつエフェクターによる罹病化の差し引きが抵抗性の程度の強さを決めるとし、この強さが病原菌の感染抑制に有効な抵抗性の閾値の上か下かで感染の可否が決定されるとしている。ウリ類炭疽病菌の感染系では *classd1* 変異株とベンサミアーナタバコを用いた VIGS の実験から病斑形成率をもとに抵抗性の評価をするとともに何より感染の可否を基準とした有効な抵抗性 (感染成立) の明確な閾値を設定することができた。*classd1* の変異は親和性菌の感染を許さない強い防御応答を誘導することを明らかにするとともに、植物のもつ基本的抵抗性は潜在的には親和性の病原菌の感染をも抑制できる強い効果をもつことを示している。

おわりに

親和性関係にある病原菌に対する宿主植物の基本的抵抗性は親和性菌の感染を完全に抑えるほど強いものであるというのが、*SSD1* 遺伝子研究で得られた最も大きな発見である。このことは、植物の本来もつ基本的抵抗性を十分に開発できれば、病気の抑制を完全にできるということを示している。この基本的抵抗性を活かす防除戦略には、どのようなものが考えられるであろうか。現在のところ三つの可能性を描いている。一つは防除薬剤の開発として、*classd1* 変異株の表現型をもたらず生理活性をもつ農薬の開発。すなわち、病原菌に作用して病原菌のエリシター活性を高める薬剤である。植物に作用して誘導抵抗性のプライミング効果をもたらず薬剤は既に実用されているが、病原菌に作用して菌のエリシター活性を高めることによる抵抗性誘導剤の開発は新しい発想ではないかと思われる。こうした薬剤が開発されれば、病原菌が感染していない状態における植物に対してストレスを軽減できることも期待される。二つめは *classd1* 変異株がもつエリシター活性の実態解明ができれば、それ自体がエリシター製剤として利用できる可能性である。三つめは基本的抵抗性の発現機構を詳細に解明することにより、それに関わる植物の遺伝的性質を改変し、病害抵抗性植物を開発することである。病原菌の

PAMPsに対する植物の認識機構や、SIPK/WIPK シグナル伝達系の下流で制御される防御関連遺伝子の解明により、基本的抵抗性の機能開発に基づく遺伝的改変の戦略を明確にできると考える。

本稿で紹介した研究は京都府立大学大学院農学研究科植物病理学研究室の田中茂幸、山田かおり、藪本佳代、藤井 聡ら学生諸氏、津下誠治、辻 元人両教員の研究協力に基づくものであり、ここに感謝します。イネいもち病菌研究は石川県立大学の古賀博則博士、森 正之博士、土肥浩二博士の研究協力によるものであり、深く感謝します。また、名古屋大学の吉岡博文博士にはベンサミアータバコの VIGS 実験に関して研究指導と材料の提供をいただきました。深く感謝します。また、岡山大学の白石友紀博士には植物表層の病原菌—植物の相互作用に関してご指導をいただきました。ここに深く感謝します。本研究成果は日本学術振興会科学研究費補助金基

盤研究 (B) 「植物病原糸状菌の分子パターン認識と植物免疫」課題番号 19380029 によるものである。

引用文献

- 1) BROWN, G. D. and S. GORDON (2005): Cell Microbiol. 7: 471 ~ 479.
- 2) CHINCHILLA, D. et al. (2007): Nature 448: 497 ~ 500.
- 3) GANTNER, B. N. et al. (2005): The EMBO J. 124: 1277 ~ 1286.
- 4) GUEDDARI, N. E. E. et al. (2002): New Phytologist 156: 103 ~ 112.
- 5) JONES, J. D. G and J. L. DANGLE (2006): Nature 444: 323 ~ 329.
- 6) SHIBUYA, N. and E. MINAMI (2001): Mol. Plant Pathol. 59: 223 ~ 233.
- 7) TANAKA, S. et al. (2007 a): Mol. Microbiol. 64: 1332 ~ 1349.
- 8) ——— et al. (2007 b): The 13th Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Sorrento, Italy, July 21–27, Abstract, p. 357.
- 9) TSUJI, G. et al. (2003): J. Gen. Plant Pathol. 69: 230 ~ 239.
- 10) UNDERHILL, D. M. et al. (2005): Blood 106: 2543 ~ 2550.
- 11) WHEELER, R. T. and G. R. FINK (2006): PLoS Pathog. 2: e35.
- 12) ——— et al. (2003): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 2766 ~ 2770.

新刊紹介

植物病理学

大木 理 著 定 価：2,500円 (本体) B5判 161頁
発行日：2007/10/10 出版：東京化学同人

このたび、大学学部用教科書「植物病理学」を上梓しましたのでご紹介します。

本来であればどなたかに書評を書いていただくところなのですが、編集部からのお薦めにより自分で宣伝させていただくことになりました。大学学部用のスタンダードな教科書をめざしましたが、その他の場面でもご活用いただければ幸いです。

植物病理学分野では旧くから多くの教科書が作成され、中でも養賢堂と朝倉書店の二大名著が多くの学生を育ててきたことはご承知のとおりです。しかし私は、現代の学生に合わせた、新しいタイプの教科書があってもいいのではないかと考えてきました。

そこで、今回の教科書ではエッセンシャルな内容以外は書かず、十分な予備知識をもたない学生が読んで理解できること、予習復習に使えること、植物病理学のひとつの考え方と知識をバランスよく学べることを目的としました。

各章の最後にはその章の要点をまとめ、巻末には植物の主要伝染病の表と英語キーワードも収めました。

最近の学生は重たい教科書を嫌がりますのでソフトカバーにし、価格も抑えました。

本書の完成までには多くの方々にご協力をいただきましたが、何分にも私一人で断片的な時間の中で作業を続けて参りました。思い違いによる誤りや、不正確、不適当な表現もあるかもしれません。お気づきの点、改善のご意見などがありましたら、メールなどでお知らせいただければ幸いです。(大木 理)

