

# アブラナ科野菜根こぶ病における 宿主植物ホルモン生合成系の役割と これを利用した抵抗性育種の可能性

農業生物資源研究所 <sup>あん</sup>安 <sup>とう</sup>藤 <sup>すぎ</sup>杉 <sup>ひろ</sup>尋  
 農業環境技術研究所 <sup>つし</sup>對 <sup>ま</sup>馬 <sup>せい</sup>誠 <sup>や</sup>也  
 農業生物資源研究所 <sup>た</sup>田 <sup>べ</sup>部 <sup>い</sup>井 <sup>ゆたか</sup>豊

## はじめに

アブラナ科野菜根こぶ病は、根こぶ病菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woron.) の感染によって引き起こされる土壌病害であり、アブラナ科作物の栽培において甚大な被害をもたらす難防除病害の一つである。根こぶ病菌の休眠胞子は土壌中で十数年間病原性を維持することから、一度土壌が汚染されると産地の崩壊に繋がる危険性もある。その対策として、主に根こぶ病抵抗性品種の導入や土壌殺菌剤などが用いられてきたが、抵抗性品種の罹病化やモントリオール議定書による土壌殺菌剤である臭化メチルの撤廃問題などから、本病害に対する早急な対策が求められている。

根こぶ病発病機構の解析は、根こぶ病菌が絶対寄生菌であり試験管内での培養系が確立されていないことから著しく遅れており、未解明な点が多いのが現状である。しかしながら、根がこぶ状に肥大する病徴から植物ホルモン、特にオーキシンとサイトカイニンの関与は古くから提唱されており、実際に根こぶでのサイトカイニン、オーキシン含量の増加が報告されている (LUDWIG-MÜLLER, 1999)。その詳細な制御機構と役割については明確な結論が得られていないが、近年の分子生物学的手法を用いた解析により、多くの知見が蓄積しつつある。本稿では、最近の研究で明らかになってきた根こぶ病発病機構における植物ホルモン生合成・代謝系の関与と、これを利用した根こぶ病抵抗性育種の可能性について筆者らの研究を中心に概説する。

## I サイトカイニンの関与

前章で述べた通り、肥大した根こぶにおいてサイトカイニンが増加していることが知られており、宿主細胞質と根こぶ病菌変形体のサイトカイニン含量が異なること、変形体が *in vitro* でサイトカイニン (*trans*-zeatin) 合成能を有することが示されたことから、根こぶ形成時のサイトカイニンは根こぶ病菌によって産生・放出されていると考えられてきた (LUDWIG-MÜLLER, 1999)。しかし当時は植物のサイトカイニン生合成経路は明らかにされておらず、宿主のサイトカイニン生合成系の関与については検討されていなかった。そこで筆者らは、宿主サイトカイニン合成酵素 (Isopentenyltransferase) 遺伝子 (*IPT*) の根こぶ形成時の発現変動を調べることにより宿主のサイトカイニン生合成系の関与を検討した (ANDO et al., 2005)。まず、ハクサイ (*Brassica rapa*) から 5 種類の *IPT* 遺伝子を単離し、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *IPT* 遺伝子との相同性を基に *BrIPT1*, 3, 5, 7, 8 と名付けた。このうち *BrIPT8* を除く四つが根で発現していたが、肥大した根こぶでは発現が低下していた。この結果から、根こぶ肥大時のサイトカイニン含量の上昇は過去の報告通り、根こぶ病菌由来のサイトカイニンによるものである可能性が高いと考えられる。しかし、罹病根の肥大前の部分においては一過的に *BrIPT1*, 3, 5, 7 の発現が上昇することも確認しており、この発現上昇が根こぶ形成の引き金になっている可能性も考えられる。これに反して、シロイヌナズナを用いた根こぶ病菌接種後の宿主応答のマイクロアレイ解析では、感染初期に宿主の *IPT* 遺伝子の発現が既に減少していた (SIEMENS et al., 2006)。このような相違は、シロイヌナズナでは根全体を用いたことから、発現が低下した部位も含めて解析していると推定されるのに対し、ハクサイでは局所的な発現変動を検出しているためであると考えられる。一方、DEVOS et al. (2005) はハクサイを用い、根こぶ病菌感染初期にサイトカイニン含

Interaction between Infection of *Plasmodiophora brassicae* and Phytohormone Biosynthesis of Host Plant and Trail for Development of Clubroot Resistance Breeding. By Sugihiko ANDO, Seiya TSUSHIMA and Yutaka Tabei

(キーワード: 根こぶ病, アブラナ科, オーキシン, サイトカイニン)

量が低下することを報告している。この結果は、感染初期に根こぶ病菌がサイトカイニンのシンクとなってこれを消費し、宿主がそのソースになっていると考え、筆者らの結果と矛盾しない。しかし、根こぶ病感染初期における宿主のサイトカイニン生合成系の役割について、さらに詳細な解析が求められる。さらに、先のマイクロアレイ解析によってサイトカイニンの不可逆的な分解に働く Cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) 遺伝子の発現が根こぶ病菌接種区で低下していることが明らかとなった (SIEMENS et al., 2006)。これは、根こぶ病菌が宿主のサイトカイニン分解活性を抑えることで、より微量のサイトカイニン合成の増加で効率的に根こぶ形成を誘導できるようにしていると考えられる。さらには CKX 遺伝子を過剰発現させた形質転換体では根こぶ形成が抑制されることから、根こぶ形成へのサイトカイニンの重要性が示唆されている (SIEMENS et al., 2006)。

以上のことから、根こぶ形成においてサイトカイニンが非常に重要な役割を果たしていることは、ほぼ間違いないと考えられる。しかし、現在のところ根こぶ病菌による産生・分解および宿主の生合成・代謝系がどのように関連し、それぞれがどの程度根こぶ形成に寄与しているかについては全く明らかにされていない。病原菌側のサイトカイニン生合成系の解明が大きな課題となっているが、前章で述べた通り根こぶ病菌が絶対寄生菌であることやゲノム情報が非常に限られていることなどが、研究の大きな障壁となっている。

## II オーキシンの関与

オーキシンについても、肥大した根こぶで含有量の上昇が多数報告されている (LUDWIG-MÜLLER, 1999)。しかし、反対に根こぶでオーキシン含量が減少したとする例や、経時変化の解析において経時点によって増減がかなり異なることなどから、非常に複雑な制御機構の存在がうかがわれる。またサイトカイニンとは異なり、根こぶ病菌の変形体にオーキシン産生能力がなかったことなどから、宿主による生合成系が深く関与していると考えられている (LUDWIG-MÜLLER, 1999)。

植物のオーキシン生合成経路については、いまだ議論の余地があるのが現状だが、アブラナ科植物などグルコシノレート類を産生する植物では Indole-3-acetaldoxime (IAOx) から Indole-3-methylglucosinolate (IMG), Indole-3-acetonitrile (IAN) を経て Indole-3-acetic acid (IAA: オーキシン) が産生される経路の存在が考えられている (図-1)。根こぶ病菌は、アブラナ科以外の植物の根毛にも感染はできるが、こぶ形成を

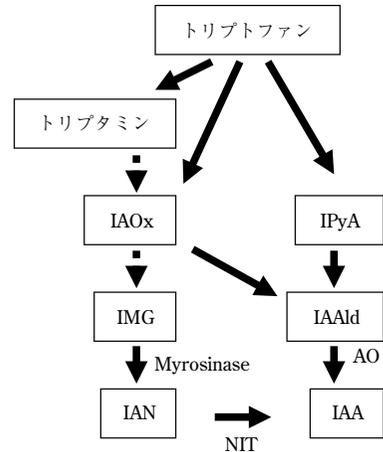


図-1 オーキシン生合成経路モデル

伴う皮層感染ができるのは宿主であるアブラナ科植物に限定される。このことなどからアブラナ科植物に特徴的であるこのオーキシン生合成経路の根こぶ形成への関与が注目されてきた (LUDWIG-MÜLLER, 1999)。実際に、根こぶ病罹病性品種への感染でのみ IMG 含量の増加が認められたことや、根こぶ形成時の Myrosinase (IMG から IAN の反応に関与) 遺伝子の発現や Nitrilase (NIT: IAN から IAA の反応に関与) 活性の上昇が報告されている (LUDWIG-MÜLLER et al., 1997; GRISIC et al., 1999)。筆者らもこの経路に着目し、ハクサイから 4 種類の NIT 遺伝子を単離し、*BrNIT2* と名付けた遺伝子の発現が、根こぶで上昇していることを明らかとした (ANDO et al., 2008)。同様に、カブにおいても *BrNIT-T1* の発現が根こぶで上昇していることが報告されている (ISHIKAWA et al., 2007)。両者はアミノ酸レベルで 1 残基しか変わらず、オルソログであると考えられる。しかし、この発現上昇は根こぶ形成の比較的後期にのみ検出されることから、感染初期には別の経路が関与している可能性が考えられる。NIT については、シロイヌナズナにおいてアンチセンス RNA により発現を抑制すると根こぶ形成が遅延するという報告 (NEUHAUS et al., 2000) もあり、この経路が根こぶ形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、筆者らは他のオーキシン生合成経路の関与についても検討を行った。オーキシンは IAOx や Indole-3-pyruvic acid (IPyA) を経て Indole-3-acetaldehyde (IAald) から Aldehyde oxidase (AO) によって産生される経路も提唱されている (図-1)。筆者らはハクサイ根こぶ形成時に発現が上昇する AO 遺伝子 (*BrAO1*) を単離し、さらに活性染色法によって根こぶでの AO 活性

の上昇を報告した (ANDO et al., 2006)。BrAO1 は根こぶ病菌の未熟な変形体が侵入した宿主組織で特に強く発現していることから、根こぶ形成初期のオーキシン産生に関与している可能性が高い。しかし、シロイヌナズナのマイクロアレイ解析ではこれに相当する AO 遺伝子の発現上昇は認められず (SIEMENS et al., 2006)、植物種によって異なる可能性がある。

このほか、オーキシンは植物体内において配糖体やアミノ酸などの結合体として蓄積しており、このオーキシンプールからの供給も生体内での活性型オーキシン含量の調節に大きな役割を果たしている。根こぶ形成時のこれらの関与について、IAA-aspartate の hydrolase 活性が上昇していることが報告されており (LUDWIG-MÜLLER et al., 1996)、その役割が研究されている。

### III NIT 遺伝子の選択的転写開始と P<sub>nit2int2</sub> の発見

根こぶ形成時のオーキシンの異常産生に NIT が重要な役割を果たしている可能性が高いことは既に述べた。加えて筆者らはハクサイ根こぶで BrNIT2 遺伝子 (約 1.4 kb) の短い転写産物 (約 1.1 kb) が蓄積することを確認した (ANDO et al., 2008)。この転写産物にコードされる推定アミノ酸配列には NIT 活性に必須なアミノ酸残基が欠失しており、NIT 活性をもつタンパク質をコードしている可能性は低いと考えられる。ただし、その産物が完全長の NIT などと相互作用し、活性に影響を与える可能性が考えられるので、その機能についてはさらなる解析が必要である。

一方、この短い転写産物の産生機構の解析から、これが BrNIT2 遺伝子の第二イントロンから第三エクソンの間の複数の位置からの選択的転写開始によって産生されていることが示された。この現象は、アブラナ科植物の中で A ゲノムをもつ *B. rapa* (AA), *B. napus* (AACC), *B. juncea* (AABB) にのみ検出され、*B. oleracea* (CC), *B. nigra* (BB), *B. carinata* (BBCC) やシロイヌナズナでは検出されなかった。これらすべての植物種で根こぶ形成は確認されるので、この短い転写産物は根こぶ形成に必須な因子ではないと考えられるが、根こぶ形成時に特異的に認められることからその役割が注目される。

さらに、BrNIT2 の第二イントロンと第三エクソンの約半分を含む配列 (623 bp : P<sub>nit2int2</sub>) を GUS 遺伝子に連結してシロイヌナズナに導入したところ、P<sub>nit2int2</sub> が根こぶ形成時にプロモーター活性をもつことが明らかとなった (図-2)。P<sub>nit2int2</sub> のプロモーター活性は根こぶでの特異性が非常に高く、根こぶ以外では、薬の基部でわずか

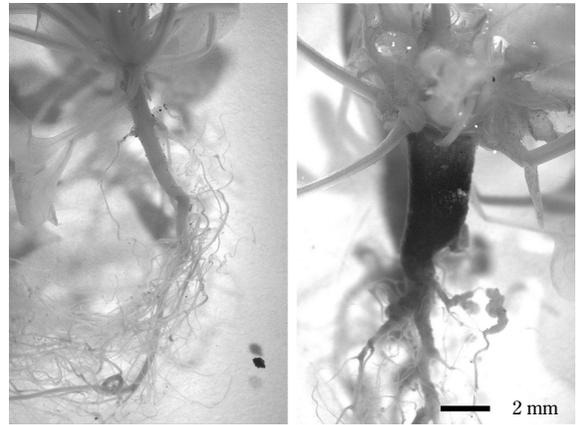


図-2 P<sub>nit2int2</sub> : GUS を導入したシロイヌナズナの質壁交換体 (播種後 35 日)  
(左) 非接種根, (右) 接種根 (接種後 21 日)。

に GUS 活性が検出されるのみであった。また、肥大した根こぶにおいて、根こぶ病菌の変形体の侵入した細胞で発現が確認されることから、その誘導に根こぶ病菌が直接的に関わっている可能性が高い。また、シロイヌナズナ自身には短い転写産物を蓄積する機構は存在しないにもかかわらず、外来の P<sub>nit2int2</sub> が機能したことから、P<sub>nit2int2</sub> の塩基配列中に根こぶ特異的に発現を制御する cis 因子が存在し、根こぶ病菌の感染により誘導された宿主由来の転写因子、あるいは根こぶ病菌のエフェクター様因子の影響によって活性化されていることが推測される。根こぶ病における宿主-病原菌間相互作用に関しては、マイクロアレイやプロテオーム解析などにより宿主の遺伝子発現などが感染により大きく影響を受けることが示されてきたが (DEVOS et al., 2006 ; SIEMENS et al., 2006)、実際に病原菌がどのように宿主の遺伝子発現を制御しているかについて、現在のところ全く知見がない状況である。P<sub>nit2int2</sub> の転写制御の解析がこれを解明する一つの突破口になるのではないかと期待される。

### IV 宿主の植物ホルモン生合成系および P<sub>nit2int2</sub> を利用した抵抗性育種の可能性

根こぶ形成、すなわち根こぶ病の「発病」は、宿主の植物ホルモン生合成系などが、根こぶ病菌の感染により多角的に影響を受け、ホメオスタシスが崩された結果、引き起こされていると考えられる。そこで根こぶ病抵抗性育種の一つとして、この異常な植物ホルモン産生を遺伝子組換え技術によって抑制することで根こぶ形成を阻害する手法が考えられる。この方法は、防御応答遺伝子やそれらを制御する転写因子の導入によって病害応答を

高める一般的な手法とは違い、「発病」のメカニズムを逆に利用した新たな戦略として期待できる。さらに、この手法では、外来性の抗菌性タンパク質や抗菌性物質などを産生させるのとは異なることから、食品としての安心に配慮した手法であるともいえる。

しかし、留意しなければならない点も多い。すなわち、①植物ホルモンの生合成や代謝が多角的に影響を受けていることから、一つの経路だけを止めても効果が小さい可能性があること、②安易に植物ホルモン生合成系を操作することはその多面的効果により望ましくない表現型を誘導する可能性が高いことなどである。これまでに、シロイヌナズナの *NIT* 遺伝子のアンチセンス RNA 導入株での根こぶ形成の遅延 (NEUHAUS et al., 2000) や、*CKX* 遺伝子の過剰発現による根こぶ形成の抑制 (SIEMENS et al., 2007) が報告されている。しかし、前者ではおそらく①の理由により完全に根こぶ形成を抑制できず、後者では②の理由により植物体自体が矮化してしまう (WERNER et al., 2003) など、実用化には課題も残されている。このような問題を解決するために必要なものの一つとして、感染部位特異的に植物ホルモン産生を制御するための根こぶ特異的プロモーターが挙げられる。この目的に合致したプロモーターは現在のところ *P<sub>nit2int2</sub>* のみである。*P<sub>nit2int2</sub>* を利用し、*NIT*、*AO*、*CKX* 等の機能遺伝子をうまく制御できれば、作物の有する形質を損なわずに根こぶ病抵抗性を付与することができると期待される。

また、一般的に、遺伝子組換え技術を用いた病害抵抗性の付与には、植物体自身への負担を軽減させるため、感染部位、あるいは感染時特異的に病害応答を強化させることが望ましい。この目的にも *P<sub>nit2int2</sub>* は適合しており、根こぶ病抵抗性を付与するため、感染部位特異的な抵抗性反応の誘導などに応用できると考えられる。

## おわりに

前章までに述べたように、近年の分子生物学的手法を用いた解析により根こぶ形成過程における植物ホルモン生合成を中心とした宿主-病原菌間相互作用が徐々にではあるが明らかにされつつある。本稿で紹介した研究に加え、生物または環境ストレス応答にかかわる植物ホルモン、特にジャスモン酸やアブシジン酸の根こぶ形成への関与も示唆されており、それぞれがどのようにクロストークしているのかは、今後非常に興味深いところである。また現在利用されている根こぶ病抵抗性品種において、長い年月をかけて育成した品種が、導入後数年で新たな病原性レースの出現によって抵抗性がブレイクされることもあり、深刻な問題となっている。根こぶ病菌感染時の、植物ホルモンの生合成系に関する知見の集積と *P<sub>nit2int2</sub>* の発見は、このような現状を打破するうえで大きな可能性を含んでいるものである。今後さらに根こぶ形成過程における宿主-病原菌相互作用のメカニズムに対する理解を深め、応用につなげていくことが将来的な根こぶ病防除に必須であると考えられる。

## 引用文献

- 1) ANDO, S. et al. (2005): *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **67**: 59 ~ 67.
- 2) ——— et al. (2006): *Mol. Plant Pathol.* **7**: 223 ~ 234.
- 3) ——— et al. (2008): *Plant Mol. Biol.* **68**: 557 ~ 569.
- 4) DEVOS, S. et al. (2005): *New Phytol.* **166**: 241 ~ 250.
- 5) ——— et al. (2006): *Mol. Plant-Micobe Intract.* **19**: 1431 ~ 1443.
- 6) GRISIC, S. et al. (1999): *Physiol. Plant.* **105**: 521 ~ 531.
- 7) ISHIKAWA, T. et al. (2007): *Mol. Plant Pathol.* **8**: 623 ~ 637.
- 8) LUDWIG-MÜLLER, J. et al. (1996): *Physiol. Plant.* **97**: 627 ~ 634.
- 9) ——— et al. (1997): *Phytochemistry* **44**: 407 ~ 414.
- 10) ——— (1999): *J. Plant Dis. Prot.* **106**: 109 ~ 127.
- 11) ——— (2008): *Eur. J. Plant Pathol.* **121**: 291 ~ 302.
- 12) NEUHAUS, K. et al. (2000): *J. Plant Physiol.* **156**: 756 ~ 761.
- 13) SIEMENS, J. et al. (2006): *Mol. Plant-Micobe Intract.* **19**: 480 ~ 494.
- 14) WERNER, T. et al. (2003): *Plant Cell* **15**: 2532 ~ 2550.