

モデル植物トマト：マイクロトムを用いた 病害研究の現状と今後の展望

東北大学大学院 ^{たか}高 ^{はし}橋 ^{ひで}英 ^き樹
山形大学農学部 ^は長 ^せ谷 ^{しゅう}修
北海道農業研究センター ^{たけ}竹 ^{なか}中 ^{しげ}重 ^{ひと}仁

はじめに

モデル生物とは生物学とその周辺分野において、普遍的な生命現象の研究に用いられる生物のことである。モデル生物は、研究対象となる生命現象が観察しやすいこと、生活環が早く、栽培や系統化が容易であること等の生物学的利点をもつことが重要である。研究対象として好適な生物が選ばれることにより、研究の進行が格段に変わることよく知られている。植物科学においては、シロイヌナズナ、イネ等がモデル植物とされ、それらの全ゲノムが解読されたことにより、植物の生命現象に関する分子レベルでの解析が飛躍的に進んだ。また、両植物から得られたゲノム情報は農学上重要な様々な研究にも大きく寄与してきた。しかしながら、植物と病害虫の相互作用の視点から見ると、例えばある病原体による病害が農業上問題となるのは、特定の植物種に限られる場合が多いことから、イネ科やアブラナ科以外の主要作物におけるモデル植物の重要性が高まってきている。

I ナス科のモデル植物としてのマイクロトム

ジャガイモ、トマト、ナス、ピーマン、トウガラシ等を含むナス科植物では、トマト（ゲノムサイズ約950Mb）のゲノム解読が、国際コンソーシアム方式 [International Solanaceae Genomics Project (SOL)] により2003年に開始されており、参加国が12本の染色体を分担して解読が進められている (http://www.sgn.cornell.edu/help/about/tomato_sequencing.pl)。さらに、SOLに対応する形で、日本国内ではJapanese-SOL (J-SOL) が結成され (<http://www.kazusa.or.jp/jsol/>)、トマトのゲノム情報を有効に活用すると同時に、かずさDNA研究所と筑波大学が中心となって、マイクロトム (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) という矮性ト

マト品種を用いて、ナス科ゲノム研究のための基盤整備が進んでいる。マイクロトム (SCOTT and HARBAUGH, 1989) は、背丈が低く (高さ10～20 cm)、小さなポットでの栽培や密植栽培が可能であり、ライフサイクルが短く (播種から果実成熟まで70～90日)、室内 (人工気象器) での栽培に適していて自家受粉が可能である。また、アグロバクテリウムによる形質転換が容易で、Ac/Ds系を利用したトランスポゾンタギングによる突然変異体の作出もなされている (MEISSNER et al., 1997; 2000; EMMANUEL and LEVY, 2002)。このような理由から、J-SOLはマイクロトムを材料として、ESTクローンの塩基配列解読とcDNAマクロアレイの作製、完全長cDNAの構築とその塩基配列の解読 (KaFTom, <http://www.pgb.kazusa.or.jp/kaftom/>)、ESTのデータベース (MiBASE, <http://www.kazusa.or.jp/jsol/microtom/indexj.html>) の作製、変異体の作製と配布 (<http://tomato.nbrp.jp/indexJa.htm>) といったトマトゲノム研究のための研究基盤整備を進めている。このJ-SOLの活動は、ナス科植物の生物学的基盤研究だけではなく、植物病理学研究にも多くの情報を提供してくれると考えられる。

II 病原体感染に対するマイクロトムの 応答

トマトに対する病害は、栽培トマトでは糸状菌、細菌、ウイルス、線虫、ウイロイド等の病原体の感染により約70種類が報告されている (ARIE et al., 2007)。マイクロトムについては、J-SOLとの関連で2005年に日本の植物病理学分野の研究グループによる植物病理版コンソーシアムが生まれ、16種類の病原体 (糸状菌8種、細菌5種、ウイルス3種) に対する応答について解析が行われた (TAKAHASHI et al., 2005)。糸状菌については、*Athelia rolfsii*, *Botryotinia fuckeliana*, *Oidium* sp., *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum* をマイクロトムに接種したところ、典型的な病徴を生じ、多数の分生胞子の形成が認められた。しかしながら、*Alternaria alternata*, *Corynespora cassicola* および *Fusarium oxysporum* に対し

Micro-Tom as a Model Tomato Plant : Current Status of Disease Research using Micro-Tom and its Future Prospect. By Hideki TAKAHASHI, Shu HASE and Shigehito TAKENAKA

(キーワード：青枯病、モデル植物、誘導抵抗性、*Pythium oligandrum*, *Ralstonia solanacearum*)

では、他のトマト品種と比較してマイクロトムは強～中程度の抵抗性が認められた。細菌については、*Ralstonia solanacearum* 17 isolates および *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 と biovar 2 を用いたマイクロトムへの接種試験において、青枯症状の発生とクラウンゴール形成がそれぞれ確認された。一方、*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. s.* pv. *tabaci*, *P. s.* pv. *glycinea* を、それぞれマイクロトムに噴霧接種したところ、*P. s.* pv. *tomato* の接種により黄色斑点の形成が認められたものの、いずれの場合も、罹病性のトマト品種と比較して細菌の増殖は低く抑えられていた。ウイルスに関しては、*Tomato mosaic virus*, *Tomato aspermy virus*, *Cucumber mosaic virus* の3種類を用いた接種試験を行い、すべてのウイルスで全身感染することが確認された。以上より、マイクロトムは、トマトの重要病害の原因となる多くの病原体に対して罹病性を示し、さらに一部の病原体に対しては、過敏反応や非宿主抵抗性が観察されることが明らかになった。これらの知見は、マイクロトムを新たな材料とすることにより、ゲノム研究情報を有効に活用して病原体と宿主の相互作用を詳細に解明できる可能性を示している (SHIBATA, 2005)。

III マイクロトムを活用した生物防除微生物 資材の基盤研究

生物防除微生物として知られている *Pythium oligandrum* (PO) は卵菌綱に属する非病原性の土壤生息菌であり、テンサイ苗立枯病 (VESELY, 1977), ピーマン半身萎凋病 (AL-RAWAHI and HANCOCK, 1997), オオムギ brown rot (DAVANLOU et al., 1999) 等多くの土壤病害に対して抑制効果がある。PO は菌間寄生性や、根圏域で栄養と生息域を占める能力が高い特性を有することから、病害抑制は主として病原菌に対する直接的な拮抗作用によるものと考えられてきた。その後、トマトやテンサイなどを用いた実験から、PO は、植物に作用して病害抵抗性を誘導するエリシター分子として、卵菌綱のエリシチンと類似した構造をもつ糖タンパク質 CWP (2種類の糖タンパク質 POD1, POD2 を含む) を有していることが明らかとなった (TAKAHASHI et al., 2003 ; 2006)。マイクロトムの根に PO または CWP を処理した後に青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) を接種すると、蒸留水を処理したコントロールと比較して、青枯症状が認められず、細菌の増殖が抑制されていた (HASE et al., 2006 ; 図-1)。これは、PO が生産する CWP エリシターにより、マイクロトムに病害抵抗性 (誘導抵抗性 : Induced resistance) が誘導されたためと考えられた。

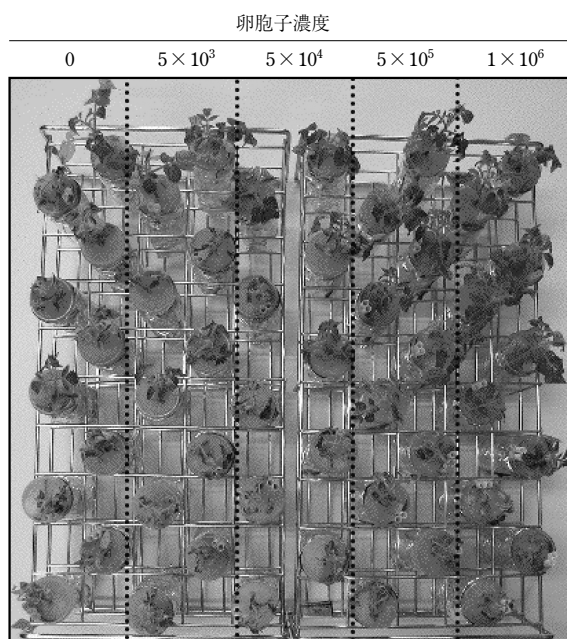


図-1 PO 処理マイクロトムにおける青枯病抵抗性の誘導
マイクロトムの根を PO 菌胞子懸濁液に 24 時間浸漬した。4 日間栽培後、 1×10^6 cfu/ml の青枯病菌を断根接種し、発病を観察した。青枯病菌接種後 6 日目の写真を示す。

さらに、CWP はトマト以外にも、テンサイ、コムギ、ジャガイモ、シロイヌナズナ、イネ等の多くの植物に抵抗性誘導活性を示すことがこれまでに明らかとなっている (TAKAHASHI et al., 2003 ; KAWAMURA et al., 2009)。

次に、マイクロトムの cDNA (11,520 クローン) がスポットされたアレイを用いて、PO 処理による抵抗性誘導時にどのような遺伝子が発現変動するのかを網羅的に解析した (TAKAHASHI et al., 2006)。その結果、発現量が増加した遺伝子は防御やストレスに応答する遺伝子、糖代謝やアミノ酸代謝に関与する遺伝子、ファイトアレキシン合成等の 2 次代謝にかかわる遺伝子などが含まれていた。また、ジャスモン酸 (JA) の合成に関与する Alleneoxide synthase と lipoxygenase, JA 誘導性の転写因子 (*JERF1*, NAC 転写因子 *JR2* と MYC 転写因子 *JR3*), エチレン (ET) のレセプターホモログ (*ETR4*), ET 応答性の転写因子 (*ERF2*), 塩基性 PR タンパク質の遺伝子発現が上昇しているのが特徴的であった。特に、ET の生合成に関連して発現が上昇することが明らかになっている β -シアノアラニン合成酵素遺伝子 (CAS) と、JA シグナル伝達系に関与している RING-H2 finger 型 E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子 (*LeATL6*) は、CWP 処

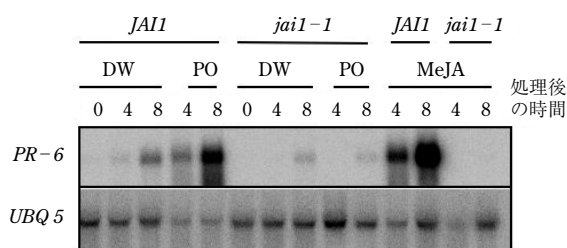


図-2 PO 処理した野生型およびジャスモン酸非感受性変異体マイクロトムにおけるジャスモン酸誘導性 *PR-6* 遺伝子の発現

野生型マイクロトム (*JAI1*) およびジャスモン酸非感受性変異体マイクロトム (*jai1-1*) の根を、PO と蒸留水 (DW) にそれぞれ浸漬し、4 および 8 時間後における *PR-6* の発現をノザン解析した。さらに、メチルジャスモン酸を根に処理したコントロール (MeJA) を同様に解析した。また、内部標準としてユビキチン 5 遺伝子 (*UBQ 5*) の発現を合わせて解析した。PO 処理した野生型マイクロトムでは MeJA 処理と同様に *PR-6* の発現が誘導されたが、ジャスモン酸非感受性である *jai1-1* 変異体では PO 処理でも *PR-6* の発現が誘導されない。

理で 10 倍以上発現が誘導された (TAKAHASHI et al., 2006; HONDO et al., 2007)。

さらに、PO による誘導抵抗性における JA および ET シグナル伝達系の関与について、マイクロトム変異体を用いてさらに解析を進めた。PO をマイクロトムの根に処理すると JA 誘導性の防御遺伝子 *PR-6* (Proteinase inhibitor II) の発現は顕著に上昇するが、JA 非感受性変異体のマイクロトム変異体である *jai1-1* (Li et al., 2004) では誘導されなかった (図-2)。また、PO を処理した *jai1-1* 変異体は青枯病菌に対する抵抗性も誘導されなかったため、PO による抵抗性誘導の発現には、JA シグナル伝達系の活性化が必要であることが明らかとなった (HASE et al., 2008)。さらに、PO あるいは CWP を根に処理したマイクロトムでは、ET 量が処理後数時間で一過的に上昇し、*ETR4*, *ERF2*, 塩基性 *PR* 遺伝子 (*PR-2b*, *PR-3b*, *PR-5b*) の発現量が増加することもノザン解析により明らかとなった (HASE et al., 2006)。一方、PO を処理したトマトにおいて SA 誘導性の *PR* 遺伝子の発現は認められず、SA の蓄積量の有意な増加も認められなかった。以上の結果から、PO による抵抗性誘導には JA と ET のシグナル伝達系の活性化が深くかかわっていることが明らかとなった。生物防除微生物資材に

よる誘導抵抗性の分子機構の解明に、マイクロトムが活用された研究事例である。

おわりに

ナス科植物のトマトは、双子葉植物の中でモデル植物として利用されているシロイヌナズナやミヤコグサとは進化的に離れた位置にあり、EST 解析から約 30% の発現遺伝子が、アラビドプシスのものとは異なることが明らかになっている。例えば果実の形成など、シロイヌナズナのゲノム情報からは得られない情報が、トマトのゲノムには存在していることになる。さらに、マイクロトムでは、変異誘発系統や cDNA クローンなどのリソースの整備とデータベースの構築が精力的に行われている。また、マイクロトム以外にも、矮性トマトとして品種レジナの種子が(株)サカタから販売されており、マイクロトムと同様にモデル植物として手軽に実験に供試することができる。今後、マイクロトムを中心とした矮性トマト品種の利用が、微生物とナス科植物の相互作用の解明に大きく貢献するものと期待される。

謝辞 マイクロトムを活用した生物防除微生物資材の基盤研究の事例として挙げた PO による誘導抵抗性に関する研究は、生物系特定産業機構技術研究支援センターの異分野融合研究支援事業によって実施した。また、網羅的遺伝子発現解析には、ナス科ゲノム研究日本コンソーシアムより配布いただいた cDNA アレイを供試した。ここに感謝の意を表したい。

引用文献

- 1) AL-RAWAHI, A. K. and J. G. HANCOCK (1997): *Phytopathology* **87**: 951 ~ 959.
- 2) ARIE, T. et al. (2007): *Plant Biotech.* **24**: 135 ~ 147.
- 3) DAVANLOU, M. et al. (1999): *Plant Pathol.* **48**: 352 ~ 359.
- 4) EMMANUEL, E. and A. A. LEVY (2002): *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 112 ~ 117.
- 5) HASE, S. et al. (2006): *Plant Pathol.* **55**: 537 ~ 543.
- 6) ——— et al. (2008): *ibid.* **57**: 870 ~ 876.
- 7) HONDO, D. et al. (2007): *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**: 72 ~ 81.
- 8) KAWAMURA, Y. et al. (2009): *Plant Cell Physiol.* **50**: 924 ~ 934.
- 9) LI, L. et al. (2004): *Plant Cell* **16**: 126 ~ 143.
- 10) MEISSNER, R. et al. (1997): *Plant J.* **12**: 1465 ~ 1472.
- 11) ——— et al. (2000): *ibid.* **22**: 265 ~ 74.
- 12) SCOTT, J. W. and B. K. HARRAUGH (1989): *Florida Agr. Expt. Sta. Circ.* **370**: 1 ~ 6.
- 13) SHIBATA, D. (2005): *J. Gen. Plant Pathol.* **71**: 1 ~ 7.
- 14) TAKAHASHI, H. et al. (2005): *ibid.* **71**: 8 ~ 22.
- 15) ——— et al. (2006): *Phytopathology* **96**: 908 ~ 916.
- 16) TAKENAKA, S. et al. (2003): *ibid.* **93**: 1228 ~ 1232.
- 17) ——— et al. (2006): *Mol. Plant Pathol.* **7**: 325 ~ 339.
- 18) VESELY, D. (1977): *Phytopathol. Z.* **90**: 113 ~ 115.