

氏名	こだま もといちろう 児玉 基 一 朗
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	乙第40号
学位授与年月日	平成16年 3月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	植物病原糸状菌の感染成立過程における宿主特異的毒素の役割に関する研究
学位論文審査委員	(主査) 尾谷 浩 (副査) 荒瀬 榮 田中秀平 中島廣光 田邊賢二

学位論文の内容の要旨

植物病原菌は特定の植物「種」あるいは「品種」などを選択的に侵害し、その寄生性には明確で高度の特異性がある。この宿主の決定様式に関し、病原菌側から宿主識別のためのシグナルの放出があり、それに対して受容的に応答せざるを得ない仕組みを持った植物のみが病原菌に侵害されるという植物感染の基本的モデルが提唱されている。現在までに、化学的実体の明らかとなった宿主識別シグナルは数多くないが、病原菌によって生産される宿主特異的毒素 (HST) はその代表的化合物の一つである。本研究は、「なぜ植物病が発生するか？」という植物病理学領域における根本的命題に解答を与えるため、病原性決定因子とも呼ぶべき HST をキーワードにして検討を進めたものである。論文では、植物/微生物相互作用を包括的に理解するために、HST が介在する植物病を化学的、植物生理学的、細胞生物学および分子遺伝学的に幅広い視点から俯瞰することを試みた。

「新規宿主特異的毒素の探索と生物活性」

タバコ赤星病菌 (*A. alternata tobacco pathotype*) が、培養液および孢子発芽液中に HST (AT 毒素と命名) を生産することを見出し、各種クロマトグラフィー法を用いて毒素を純化した。AT 毒素は、宿主プロトプラストに対し選択的に作用し、また、葉組織の酸素消費速度を増大させた。本菌の宿主である *Nicotiana* 属植物はいずれも毒素感受性であり、孢子発芽液中に毒素生産の認められた菌株のみが赤星病を引き起こした。さらに、タバコ葉に非病原菌株の孢子を微量の毒素溶液とともに接種するとこの菌株も感染するようになった。以上の結果より、AT 毒素は *Nicotiana* 属植物に対する赤星病菌の病原性決定因子であると考えた。AT 毒素によって引き起こされた宿主細胞内の変性を、電子顕微鏡および画像解析装置を用いて検討し、ミトコンドリアが AT 毒素の標的器官であると結論した。

「宿主特異的毒素の検出および定量法の開発」

トマトアルターナリア茎枯病菌 (茎枯病菌) が生産する AL 毒素を題材として、蛍光誘導体化と

HPLC を組み合わせた迅速高感度な検出定量法を開発した。本法により、茎枯病菌胞子発芽時における毒素の放出を確認した。また、抗 AL 毒素ポリクローナル抗体の作成と、イムノアッセイ法による毒素の検出定量法を確立した。毒素分子中の遊離アミノ基を利用してキャリアー蛋白質（コレラ毒素）と結合させ、マウスにおいて毒素抗体の誘導生産に成功した。CI-ELISA の結果より、毒素検出限界値は 30ng/ml であった。

「宿主特異的毒素の生理活性および病理学的意義」

形質転換法によりハイグロマイシン B 抵抗性遺伝子 (*hygB*) を導入したマーカー菌株と、イムノアッセイによる毒素定量法を組み合わせて、罹病トマト組織内における茎枯病菌の動向と AL 毒素生産を検討した。その結果、接種後初期の段階では、感受性と抵抗性品種における菌および毒素の分布には大差がなかった。しかし、接種後期においては、感受性品種においてのみ、菌と毒素の広範囲にわたる分布が認められた。以上より、非親和性関係においては、菌は接種部位近辺に封じ込められるが、親和性では、菌は植物体内に進展し毒素を生産することにより、最終的に植物体を枯死させると考えられた。さらに、黒色酵母 *Exophiala spinifera* 由来の AL 毒素解毒（代謝）酵素遺伝子 (*ESPI*) を茎枯病菌において発現させることによって、毒素生産能欠損菌株を作出した。接種試験の結果、*ESP1* 形質転換体では病斑形成の減少が認められ、AL 毒素が茎枯病菌／トマトの系において病原性因子として機能していることが証明された。

また、毒素の培養細胞に対する作用を検討した。トマト培養細胞の生存率を検定する手法として、MTT の還元反応を利用した細胞活性の評価法を確立した。毒素処理により、感受性品種培養細胞においてのみ生存率の低下が認められ、トマト品種の毒素反応性は培養細胞においても安定に維持されていることが明らかとなった。一方、各品種カルスを毒素培地上で長期間培養した場合、培養細胞の増殖は毒素により感受性および抵抗性品種ともに阻害された。以上の結果より、毒素は感受性品種細胞に対してのみ特異的に細胞死を誘起するが、細胞増殖の阻害には非特異的作用を示すことが明らかとなった。

「宿主特異的毒素生産菌に対する植物抵抗反応」

非病原性 *A. alternata* の二十世紀ナシ葉上での感染行動をナシ黒斑病菌と比較すると、菌の胞子発芽および付着器形成過程までは大差がない。しかしその後、非病原菌においては侵入菌糸形成が阻害され、結果として感染は成立しない。この感染阻害に関わる化合物のナシ葉における誘導および抽出、純化条件を検討し、最終的にポリフェノールの一種である 3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-DCQ) を同定した。本化合物は、従来種々の植物において抵抗反応の主要因であると報告されているファイトアレキシン類など抗菌性化合物と異なり、胞子発芽、菌糸伸長などに対するいわゆる抗菌活性は低いにもかかわらず、菌の侵入菌糸形成のみを阻害するという、きわめて興味深い特性を示す。そのため本化合物を従来のファイトアレキシン類などと区別するため「感染阻害物質（因子）(Infection-inhibiting factor、IIF)」と命名した。

「植物病原系状菌における宿主特異的毒素生産の分子遺伝学的解析」

トウモロコシごま葉枯れ病菌 (*C. heterostrophus* race T) の病原性と宿主特異的 T 毒素生産能は、*Tbx1* 遺伝子座によって支配されている。遺伝子タギングあるいは変異原処理によって取得した各種 *Tbx1*-変異株について、交配、ヘテロカリオン形成、さらに、CHEF 電気泳動法と染色体特異的 RFLP マーカーを用いた核型分析による解析を行った。その結果、変異株においては、*Tbx1* 遺伝子座近傍に染色体の欠失が生じており、染色体間の相互転座が認められた。さらに、これまで単一の遺伝子座と

考えられていた *Tox1* が、実際には、異なる染色体上に位置する少なくとも二つの遺伝子座であるという事実を証明した。

以上の研究結果から、AT 毒素に関しては毒素が HST の条件をすべて満たすことを証明し、*A. alternata* 病原菌の HST として新たに記載した。AL 毒素に関しては、HST 作用の基本概念に従い毒素の病理学的重要性を指摘し、毒素の病原性決定因子、宿主識別因子としての立場を強化した。また、*Cochliobolus* 属 HST 生産菌をモデルとして、毒素生産の分子遺伝学的解析を進め成果を得た。さらに、植物／微生物相互作用研究の大きな柱でもある植物側の病害抵抗性機構に関しても、新たな生物活性を有する抵抗反応関連化合物「感染阻害物質」の同定に成功し、応用研究への道を開いた。このような研究の発展と共に、HST に依存した植物病害における宿主／寄生者相互関係のメカニズムといった基礎的問題の解決だけでなく、農業生態系における栽培作物と病原菌の生態的相互依存性の基本概念に基づく新たな病害防除戦略の構想も生まれるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

自然界では多数の潜在的病原糸状菌が植物と絶えず遭遇しているにもかかわらず、実際に特定の植物種に感染し病気を引き起こすことの出来る菌の種類はごく限られている。このような特異的寄生性の発現機構に関しては、最初に病原菌側からある種のシグナル因子の提供があり、それに対して受容的に応答せざるを得ない植物のみが病原菌に侵害されると考えられている。本研究は、病原シグナル因子としての宿主特異的毒素 (host-specific toxin、HST) に焦点を絞り、代表的な HST 生産菌である *Alternaria* および *Cochliobolus* 属菌を題材として、植物病の発生機構解明を目指したものである。

新規の病原シグナル因子の探索は、植物／微生物相互作用を解析するための第一歩である。タバコ赤星病菌が生産する新規の HST (AT 毒素と命名) を発見し、各種クロマトグラフィーを用いて毒素を純化した。HST の備えるべき条件としては、①毒素作用の宿主特異性、②宿主の毒素耐性度と病害抵抗性の相関、③病原菌の毒素生成能と病原性の相関、④孢子発芽時の毒素放出、および⑤放出毒素による菌受容化の5つを挙げることができる。AT 毒素がこれら全ての条件を満たすことを疑問の余地なく証明し、毒素の病原性決定因子としての役割を解明した。

HST の感染場面における病理学的意義を解明するためには、毒素の選択的かつ高感度検出法の開発が必須である。トマトアルターナリア茎枯病菌が生産する AL 毒素の検出は、従来バイオアッセイ法が主流であったが、感度および再現性の点で問題があった。本研究では、OPA による蛍光誘導体化と HPLC を組み合わせた迅速高感度な化学的定量法、さらに、コレラ毒素をキャリアー蛋白質として誘導調製した抗 AL 毒素ポリクローナル抗体によるイムノアッセイ法を確立した。

罹病植物体内 (*in planta*) における病原菌と HST の動向を調査することは、実際の感染場面における毒素の重要性を証明するために必要である。しかし、*in planta* における菌と毒素の特異的検出は困難であるため、これまでに証明された例は皆無に近い。本研究では、薬剤耐性遺伝子を導入したマーカー菌株と、イムノアッセイを組み合わせ、罹病トマト組織内における茎枯病菌の動向と AL 毒素生産を検討した。その結果、非親和性関係において菌は接種部位近辺に封じ込められるが、親和性では、菌は植物体内に進展し毒素を生産することにより、最終的に植物体を枯死させると結論した。さらに、黒色酵母由来の AL 毒素解毒酵素遺伝子 (*ESPI*) を茎枯病菌において発現させることによって、毒素

生産能欠損菌株を作出した。*ESPI* 形質転換体では病斑形成の減少が認められ、本毒素が病原性因子として機能していることを証明した。

また、AL 毒素の植物生理学的作用に関して、本毒素が感受性トマト葉の呼吸および光合成機能を阻害することを見出した。さらに、MTT の還元反応を利用した細胞活性の評価法を確立し、トマト培養細胞に対する毒素作用を検討した結果、毒素は感受性品種細胞に対してのみ特異的に細胞死を誘起するが、細胞増殖の阻害には非特異的作用を示すという新事実を明らかにした。これは、従来の HST 研究では着目されていなかった抵抗性細胞における毒素作用に光を当てた結論として評価される。

一方、HST が介在する植物／微生物相互作用において、宿主植物の病害抵抗反応はこれまで明らかではなかった。ここでは、ナシ黒斑病菌と二十世紀ナシを題材として、植物抵抗反応の化学的実態を解明した。非病原性 *A. alternata* の感染に伴いナシ葉中で生産される「感染阻害物質（因子）」を見出し、本化合物がポリフェノール的一种である 3,5-dicaffeoylquinic acid であると同定した。現在、本化合物は植物病理学の一般的教科書にも記載されるほど重要性が広く認識されている。

最後に、HST 生産の分子機構を解明するため、モデル病原菌であるトウモロコシごま葉枯病菌を用いて、HST 生合成遺伝子座 (*Tox1*)、すなわち病原性遺伝子座を解析した。交配、ヘテロカリオン形成、PFGE と染色体特異的 RFLP マーカーを用いた核型分析などを組み合わせた解析の結果、毒素非生産（非病原性）変異株においては、*Tox1* 遺伝子座近傍に染色体の欠失、また相互転座が生じていることを明らかにした。さらに、これまで単一の遺伝子座と考えられていた *Tox1* が、実際には、異なる染色体上に位置する少なくとも二つの遺伝子座であるという予想外の実事実を証明した。

以上のように、本論文は、病原シグナル因子としての HST に着目し、植物／微生物相互作用を化学的、植物生理学的、細胞生物学的および分子遺伝学的に広範な観点から総合的に解析したものである。得られた成果は、植物病原菌の感染機構の統一的理解に貢献するばかりでなく、新たな病害防除戦略の確立という応用面からも高く評価でき、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。