

学位論文要旨

氏名: 江草 真由美

題目: 植物病原菌 *Alternaria alternata* の感染に対する宿主植物の誘導抵抗性機構
Induced resistance in host plants to the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*

植物は、常に病害虫による攻撃にさらされており、それに対抗するため様々な防御機構を発達させてきた。この防御反応系は、プログラム細胞死の一種である過敏感細胞死、ファイトアレキシン生産などを含む。また、局所的・全身的に誘導される防御応答（局部および全身獲得抵抗性）も知られている。一方、潜在的な植物病原微生物の病原菌への進化は、宿主植物の防御応答系を制御する病原性因子の獲得に依存している。*Alternaria alternata* 菌群は宿主特異的毒素（HSTs）生産能を獲得し、病原菌への進化を遂げた necrotrophic 病原菌を含む。このような毒素に依存した necrotrophic 病原菌と植物の相互作用における、宿主抵抗反応機構には不明な点が多い。そこで本研究では、HST生産菌である *A. alternata* を毒素生産性 necrotrophic 病原菌のモデルとして、宿主植物における誘導抵抗性の分子機構を解析した。

1. トマトにおける *A. alternata* 感染に対する誘導抵抗性

A. alternata tomato pathotype（トマトアルターナリア茎枯病菌、以下、茎枯病菌）は宿主特異的AAL毒素生産に依存して宿主植物の防御機構を抑制し、感受性トマト品種への感染を成立させる。*A. alternata* 感染に対する宿主の誘導抵抗性機構を、茎枯病菌-トマトの系を用いて解析した。

茎枯病菌の孢子接種は感受性トマト葉に壊死病斑を誘導するが、非病原性 *A. alternata* を前接種した後に茎枯病菌を接種すると、病斑形成が顕著に抑制された。病斑形成抑制は非病原性 *A. alternata* の孢子発芽液（SGF）の前処理によっても観察された。SGFの茎枯病菌に対する抗菌活性は認められず、SGF前処理トマト葉上では侵入菌糸形成が抑制されるため、病斑形成の抑制にはトマトにおける誘導抵抗反応が関与している可能性が示唆された。

植物抵抗性誘導において、サリチル酸（SA）あるいはジャスモン酸（JA）が関与するシグナル伝達系の役割が明らかとなっているため、本誘導抵抗性におけるこれらのシグナル伝達経路の関与について調査した。トマト葉へSAあるいはJA誘導體であるメチルジャスモン酸（MeJA）を前処理後、茎枯病菌を接種したが、病斑形成および侵入菌糸形成の抑制は観察されなかった。また、一般的なSA、MeJAシグナル伝達経路のマーカー遺伝子であるPR1とプロテインアーゼインヒビター遺伝子の発現は、非病原性 *A. alternata* 接種によって顕著に上昇しなかった。さらにSA、JAシグナル変異体トマトへの非病原性 *A. alternata* 接種による菌の感染は誘導されなかった。以上の結果より、病原性 *A. alternata* に対する誘導抵抗性には、SAおよびJAシグナル伝達経路が重要ではなく、未知の抵抗反応機構が関与している可能性が示唆された。

A. alternata 感染に対する抵抗反応に関与する遺伝子群の同定のため、サプレッション・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション(SSH)法による解析を試みた。その結果、総計177の遺伝子が得られ、そのうち143クローンが抵抗性関連などの既知遺伝子との相同性を示した。これらのうち任意に選択した遺伝子クローンについて、*A. alternata* 感染時におけるトマト葉中での発現をリアルタイムPCR法により定量解析した結果、非病原性 *A. alternata* 感染に応答した遺伝子の発現上昇が確認された。

以上の結果より、*A. alternata* 感染に対するトマトにおける誘導抵抗性の存在が明らかとなった。本抵

抗性には既知の抵抗性誘導シグナル伝達経路であるSAおよびJA経路は重要ではないことが明らかとなり、*A. alternata*感染に対する抵抗性関連候補遺伝子群が同定された。

2. ニホンナシにおける*A. alternata*感染に対する誘導抵抗性

A. alternata Japanese pear pathotype (ナシ黒斑病菌、以下、黒斑病菌)は宿主特異的AK毒素を生産し、毒素に依存して宿主植物の防御機構を抑制することにより、感受性ニホンナシ品種への感染を成立させる。*A. alternata*に対する宿主植物の抵抗反応誘導機構を黒斑病菌-ナシの系を用いて解析した。

黒斑病菌の孢子接種により感受性ナシ葉に壊死病斑が形成される。しかし、非病原性*A. alternata*の前接種あるいは非病原性*A. alternata*のSGF前処理後に黒斑病菌を接種すると病斑形成が顕著に抑制され、非病原性*A. alternata*によるニホンナシにおける抵抗性誘導が認められた。

本誘導抵抗性に、SAあるいはJAに依存する抵抗性誘導シグナル伝達系が関与しているか調査するため、ナシ葉へSAあるいはMeJAを前処理し、続いて黒斑病菌を接種した。その結果、SAおよびMeJAによる病斑形成および侵入菌糸形成抑制は観察されず、*A. alternata*感染に対する誘導抵抗性には、SAおよびJAシグナル伝達経路に依存しない、未知の抵抗性誘導機構が関与することが示唆された。

*A. alternata*感染時に特異的に発現するニホンナシ抵抗性関連遺伝子群の同定のため、SSH法による解析を試みた。その結果、総計307の候補遺伝子が得られ、そのうち206クローンが抵抗性関連などの既知遺伝子と相同性を示した。これらのうち任意に選択した遺伝子クローンについて、*A. alternata*感染におけるニホンナシ葉中での発現をリアルタイムPCR法により定量解析した結果、非病原性*A. alternata*感染に応答した遺伝子の発現上昇が確認された。

以上の結果より、*A. alternata*感染に対するニホンナシにおける誘導抵抗性の存在が確認された。本抵抗性におけるシグナル伝達には、SAおよびJA経路は重要ではないことが示唆され、*A. alternata*感染に対する抵抗性関連候補遺伝子群が同定された。

3. *A. alternata*感染におけるジャスモン酸シグナルの役割

JAが関与するシグナル伝達経路は、一般的に*Botrytis cinerea*などのnecrotrophic病原菌に対する宿主植物の抵抗性に重要であることが知られている。一方、毒素に依存したnecrotrophic病原菌の感染に対するJAシグナリングの関与は明らかでない。そこで、AAL毒素依存necrotrophic病原菌である茎枯病菌と宿主トマトを用い、病原菌感染におけるJAシグナル伝達経路の関与について解析した。

トマトのJA合成変異体*def1*に茎枯病菌を接種すると、病斑形成が野生型トマトと比較して減少した。そこでMeJAとともに*def1*に茎枯病菌を接種したところ、*def1*上の壊死病斑形成および菌の伸展量が野生型トマトと同程度まで回復した。しかしながら、茎枯病菌の感染初期段階に重要な侵入菌糸形成については、変異体および野生型トマト、あるいはMeJAの添加による影響は観察されなかった。以上の結果より、JAは茎枯病菌の感染を助長することが明らかとなった。

さらにJAの作用が菌側あるいは宿主植物側にあるのかを調査した。MeJA存在下における茎枯病菌の成長および毒素生産を調査した結果、これらに対する促進効果は観察されなかった。次に、*def1*変異体、あるいはMeJA存在下でのトマトのAAL毒素感受性を調査したが、毒素に対する反応に変化はなかった。これらの結果は、JAによる茎枯病菌の感染促進効果が菌への直接的な作用ではないこと、またAAL毒素作用と関連していないことを示している。すなわち、JAの存在が茎枯病菌感染初期の侵入菌糸形成あるいはAAL毒素作用に依存せずに、病斑形成および菌伸展を促進する結果から、茎枯病菌の感染後期において、菌感染の促進に関わるJAシグナリング機構が存在することが示唆された。

以上の結果より、従来報告されているnecrotrophic病原菌への抵抗反応におけるJAシグナル伝達系の役割とは異なり、毒素依存necrotrophic病原菌である*A. alternata*においては、JAは宿主感受性応答に関与していることが新たに明らかとなった。