

植物病害研究のフロンタライン -病原体との熱き闘い-

Frontline of Plant Disease Research
-Battle against Pathogens-

植物感染生理談話会論文集 (第 55 号)

Proceedings of 55th PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium

September 1-3, 2021

Online, Miyazaki

日本植物病理学会

令和 3 年度植物感染生理談話会

Published annually by Plant-Microbe Interactions Symposium,
the Phytopathological Society of Japan (PSJ)

ISSN 1345-8086

植物病害研究のフロンライン -病原体との熱き闘い-

Frontline of Plant Disease Research
- Battle against Pathogens-

植物感染生理談話会論文集（第 55 号）

Proceedings of 55th PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium

September 1-3, 2021

Online, Miyazaki

日本植物病理学会

令和 3 年度植物感染生理談話会

Published annually by Plant-Microbe Interactions Symposium,
the Phytopathological Society of Japan (PSJ)

はじめに

一昨年に第55回植物感染生理談話会事務局を引き継いだ際、新型コロナウイルスの存在はおろか、世界中がこれほどまで未曾有のパンデミックに見舞われるとは想像すらしていなかった。たった1種類の病原性ウイルスの出現によって、それまでの世界のあらゆる日常とおびただしい人命が失われ、全人類の叡智をもってしても完全克服には程遠い状況が続いている。驚異的な速さで新規開発されたワクチンの国内接種と東京2020オリンピック・パラリンピックの開催準備が進む中、一縷の望みをかけて当談話会の現地開催準備を進めたが、新型コロナウイルス感染症は拡大の一途を辿り、ついに当談話会始まって以来のweb開催を決断するに至った。

現地開催する予定であった九州地域は農業が盛んであり、地理的・気候的にも新しい植物病害が発生しやすい。そこで、「植物病害研究のフロントライン－病原体との熱き闘い－」というテーマのもとで、植物病理学はもとより、植物生理学の分野からも精力的な研究活動を進められている研究者をお招きし、最新の話題提供をお願いした。今回のテーマを決めるにあたり、フロントラインという言葉には2つの意味を込めさせて頂いた。一つは九州という開催地の地域性であり、もう一つは研究の最前線である。今回は植物免疫研究の世界的トップランナーである津田賢一先生と植物の発熱のしくみに関する第一人者である稲葉靖子先生を特別講師としてお招きし、さらに国内外のフロントラインで活躍する11名の気鋭の講師陣に微生物と植物の相互作用や病原体の病理学的・生態学的特徴などについて、2つのフロントラインから最新の研究成果・情報を話題提供して頂く。

病原体が感染するしくみ、植物が病気になるしくみ、そして病原体そのもののしくみを深く理解することは病害と病原体の制圧に必要不可欠である。植物保護科学分野は人類が現在直面している新型コロナウイルスとの闘いに感染生理学、免疫学、疫学、診断、防疫などの面において共通概念が多いと感じている。病害防除による食糧生産の安定化は間違いなくコロナ禍に苦しむ全世界の社会情勢の安定化と平和に結びつく。当談話会の参加者が世界のフロントラインに位置する研究者の話題提供により植物－微生物間相互作用の理解を深め、植物病害防除研究展開に新たなヒントを得ることを切に願う。

研究の展開には発想の転換と同じ志を持ち合わせた者同士の交流の場が欠かせない。例年であれば当談話会への参加が困難であった参加者もおられるであろう。コロナ禍をきっかけとした今回のweb開催が植物感染生理学分野のフロントラインを実感・共有できる場になることを祈念する。

目 次

I. 一般講演 1

- ビフィズス菌とキサントモナス属細菌に共通して認められる
ユニークな糖鎖分解酵素群…………… 1
中村正幸・藤田清貴・岩井 久
(鹿児島大学農学部)
- モデル生物カイコの植物病理学における利用…………… 9
飯山和弘
(九州大学大学院農学研究院)
- カンキツグリーンング病原細菌における生存戦略…………… 22
藤原和樹*・藤川貴史*
(農業・食品産業技術総合研究機構植物防疫研究部門)
- ウイルス、アザミウマ類および植物の相互作用の解明と
それを活用した防除技術開発…………… 30
富高保弘*・櫻井民人*・安部洋**
(*農業・食品産業技術総合研究機構植物防疫研究部門,
**理化学研究所バイオリソースセンター)
- タマネギベと病との闘い
～卵胞子の生態に関して新たに分かったこと～…………… 39
渡邊幸子
(佐賀県農業技術防除センター)
- 植物免疫を調節する病原体サプレッサーと内生サプレッサー…………… 49
豊田 和弘*,**,***・Aprilia Nur Fitrianti**・Mai Thanh Luan**・
川崎 達弘**・門田日陽里***・椎葉紀香***・伊藤千晶**・長谷川晴香***・
白石友紀****
(*岡山大学学術研究院環境生命科学学域, **岡山大学大学院環境生命
科学研究科, ***岡山大学農学部, ****岡山県生物科学研究所)

植物と病原菌の相互作用におけるファイトアレキシシンの役割…………… 59
竹本大吾*・黒柳輝彦*・柴田裕介*・Abriel Bulasag*・水野邑里*・大津美奈
*,**・今野沙弥香*・Soriya Rin*・Maurizio Camagna*・田中愛子*・
佐藤育男*・千葉壮太郎*・川北一人*・小鹿 一*
(*名古屋大学大学院生命農学研究科, **現所属 奈良先端科学
技術大学院大学先端科学技術研究科)

青枯病菌のクオラムセンシングシグナル伝達機構…………… 74
曳地康史*・竹村知夏*・寺澤夕貴*・井上加奈子**・木場章範*・
大西浩平*・甲斐建次***
(*高知大学農林海洋科学部, **大阪大学超高压電子顕微鏡センター,
***大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

II. 特別講演

Plant interactions with pathogenic and commensal bacteria…………… 85
Kenichi Tsuda (Huazhong Agricultural University)

発熱性を持つソテツの再発見と発熱植物研究の新展開…………… 88
稲葉靖子*,**・佐藤光彦***
(*宮崎大学, **東北大学大学院生命科学研究科,
***かずさ DNA 研究所先端研究開発部)

III. 一般講演 2

古典遺伝学的アプローチによるいもち病菌の病原性変異機構の解明…………… 91
草場基章
(佐賀大学農学部)

病原ウイルス探索のいま - 潜在性ウイルスの感染生理 -…………… 102
関根健太郎
(琉球大学農学部)

ニンクウイルスの宿主適応戦略を逆手にとったウイルス駆逐作戦…………… 112
Hangil Kim・増田税
(北海道大学大学院農学研究院)

ビフィズス菌とキサントモナス属細菌に共通して認められる ユニークな糖鎖分解酵素群

中村正幸・藤田清貴・岩井 久

Nakamura, M., Fujita, K., and Iwai, H.

Unique glycolytic enzymes present in *Bifidobacterium* spp. and *Xanthomonas* spp. in common

Abstract

We clarified the functions of three uncharacterized enzymes, *xcv2724*, *xcv2728*, and *xcv2729*, in *Xanthomonas euvesicatoria*, the causal agent of bacterial spot of tomato and pepper. The genes corresponding to the three enzymes are homologs of *hypBA1*, *hypBA2*, and *hypAA* from *Bifidobacterium longum* and are unique to *Xanthomonas* spp. among plant pathogenic bacteria. We revealed that they degrade the arabinofurano-oligosaccharides present on hydroxyproline (Hyp)-rich glycoproteins (HRGPs) such as extensin and solanaceous lectins in plant cell walls. These enzymes work coordinately to degrade the oligosaccharides. First, XeHypAA (XCV2728), belonging to the glycoside hydrolase (GH) 43 family, releases L-arabinose from L-arabinofuranose (Araf)- α 1,3-Araf- β 1,2-Araf- β 1,2-Araf- β -Hyp (Ara₄-Hyp), cleaving its α 1,3 bond; second, XeHypBA2 (XCV2729), belonging to the GH121 family, releases the disaccharide Araf- β 1,2-Araf from Araf- β 1,2-Araf- β 1,2-Araf- β -Hyp (Ara₃-Hyp); finally, XeHypBA1 (XCV2724), belonging to GH family 127, releases L-arabinose from Araf- β -Hyp (Ara-Hyp). In summary, the main oligosaccharide structure of Ara₄-Hyp on the HRGPs is degraded to Ara₃-Hyp, then to Ara-Hyp, and finally to Ara monosaccharides by the action of these three enzymes. HRGPs containing oligosaccharide substrates have been reported to contribute to plant defense, and interestingly, the promoter region of the operon (*xehypBA2* and *xehypAA*) contains the PIP-box. We then analyzed the expression level of the operon gene in hrp-inducing medium and in plants and constructed gene-deletion mutants. However, although the operon was evidently upregulated by HrpX, three single-gene deletion mutants (Δ *xehypBA1*, Δ *xehypBA2*, Δ *xehypAA*) and even a triple-gene deletion mutant (Δ *xehypBA1-BA2-AA*) remained pathogenic, suggesting that these three enzymes are not involved in the pathogenicity of *X. euvesicatoria*. In this review, we discuss the meaning of existence of these enzymes in *Xanthomonas* spp. and bifidobacteria.

Key words: *Xanthomonas*, sugar chain, arabinofuranosidase, hydroxyproline-rich glycoproteins

鹿児島大学農学部 Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890-0065, Japan

はじめに

腸内細菌であるビフィズス菌は、他の微生物に存在しないユニークな糖代謝酵素を多く持つ新規酵素の宝庫である。そのビフィズス菌から、当大学の藤田らにより、アラビノオリゴ糖鎖(アラビノースが 2~4 個結合)を特異的に分解する新規の酵素群が発見された (Fujita *et al.*, 2011, 2012, 2014)。本酵素群は、3つの酵素 (HypAA, HypBA2, HypBA1) から成り、協調的に働くことでアラビノオリゴ糖鎖を単糖のアラビノース(Ara)に分解する。非常に興味深いことに、本酵素群のオルソログが、植物病原細菌では *Xanthomonas* 属細菌にのみ存在しており、また、基質となるアラビノオリゴ糖鎖構造は、自然界では、植物細胞壁に存在する糖タンパク質のエクステンシンとナス科レクチンにのみ認められる(図 1)。これら糖タンパク質は、病害抵抗生に関わっていることが知られており、特にエクステンシンは、抵抗性誘導の際、細胞壁を強化し、木部組織や師部組織に蓄積することで、病原体侵入のバリアになるとされている (Benhamou *et al.*, 1990; Showalter, 1993; Balaji and Smart, 2012; Otulak-Kozieł *et al.*, 2018)。また、エクステンシンを高発現させたシロイヌナズナでは、細菌の侵入抑制効果が高まったことも報告されている (Wei and Shirsat, 2006)。

以上のバックグラウンドを考慮すると、当然 *Xanthomonas* 属細菌の保持するこれら酵素群と病原性との関わりに期待が高まる。そこで、我々は、トマト斑点病細菌 (*X. euvesicatoria* 以下 Xe) 由来の各酵素の組み換えタンパク質を作成し、ビフィズス菌との機能比較を行なった (Nakamura *et al.*, 2018)。また、各酵素遺伝子の発現解析および破壊株を作出し、病原性との関わりを調査した。本稿では、これまで得られた結果を基に、ビフィズス菌と *Xanthomonas* 属細菌におけるこれら酵素群の存在意義について考察する。

1. アラビノオリゴ糖鎖構造

基質となるアラビノオリゴ糖鎖(β -L-アラビノフラノシド結合)は、植物細胞壁に存在するエクステンシンとナス科レクチンにのみ認められる。エクステンシンとナス科レクチンは、hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGP) と呼ばれる糖タンパク質で、ヒドロキシプロリン (Hyp) を豊富に含んでいる (図 1) (Ashford *et al.*, 1982; Akiyama *et al.*, 1980)。アラビノオリゴ糖鎖は、この Hyp 残基に結合しており、アラビノース (Ara) が 3つ β 1,2 結合した Ara₃-Hyp と、その非還元末端にもう 1つのアラビノースが α 1,3 結合した Ara₄-Hyp が主に存在しており、双子葉植物の場合、Ara₄-Hyp が、Hyp 残基の 33%~75% に結合している (Lampert and Miller, 1971)。 β -アラビノオリゴ糖鎖は、植物に広く分布しているにも関わらず、その分解酵素の存在は、ビフィズス菌で見つかるまでは、全く知られていなかった。

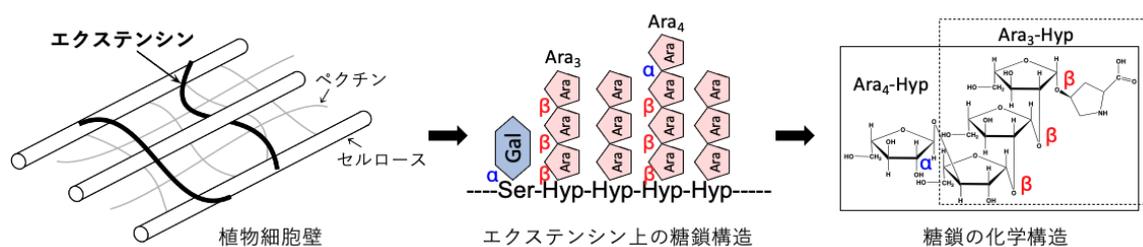


図 1 エクステンシンとアラビノオリゴ糖鎖の構造。Ara, アラビノース; Gal, ガラクトース; Hyp, ヒドロキシプロリン; Ser, セリン。

2. ゲノム上に存在する *hypAA*, *hypBA2*, *hypBA1* の遺伝子クラスター

ビフィズス菌と Xe のゲノムマップを図 2 に示す。ビフィズス菌のゲノム上には、3 つの酵素遺伝子がタンデムに存在し、*hypBA2* と *hypAA* はオペロンを構成している。同じように、Xe のゲノム上でも、*hypBA2* と *hypAA* はオペロンを構成し、*hypBA1* は、その下流に位置している。また、Xe の *hypBA2-hypAA* オペロンのプロモーター領域には、HrpX のシスエレメントである PIP-box 配列 (Fenselau and Bonas, 1995; Koebnik et al., 2006) が認められる。さらに興味深い点として、*HypBA2-HypAA* オペロンに隣接して、プロテアーゼと予想される遺伝子 (*xcv2726*, *xcv7277*) が位置しており、モチーフ検索を行うと、HRGP に豊富に含まれるプロリンを認識して切断するプロテアーゼのモチーフが認められる。

2-1. HypAA (α -L-arabinofranosidase) の機能

HypAA は GH43 ドメインを有しており、*Ara*₄-Hyp の非還元末端に存在する α -L-Ara 残基を切断することで、*Ara* と *Ara*₃-Hyp に分解する働きを持っている。

本酵素は、 α -L-Ara 残基の α 1, 3 結合構造を特異的に認識するため、*Ara*₃-Hyp や *Ara*₂-Hyp には全く作用しない。これは、ビフィズス菌と同じ働きであるが、大きく異なる点は、ビフィズス菌由来 HypAA は、シグナルペプチドに加え、C 末端側に膜アンカリング領域が存在していることから、細胞膜に結合した状態で、菌体表層に局在しているが、Xe 由来 HypAA には、シグナルペプチドは存在するものの、アンカリング領域はなく、細胞外へと完全に分泌される。

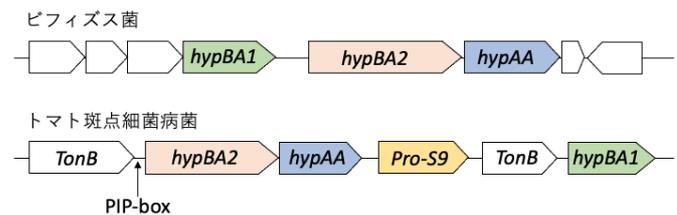


図 2 酵素群の遺伝子マップ

2-2. HypBA2(β -L-arabinobiosidase)の機能

HypBA2 は、*Ara*₃-Hyp に特異的に作用し、 β -*Ara*₂ を遊離する非常にユニークな働きがある。*Ara*₄-Hyp や *Ara*₂-Hyp には作用しない。本酵素は、 β -アラビノオリゴ糖鎖の β -アラビノフラノシド結合を切断する新規の酵素であり、CAZy 糖質加水分解酵素の新たな GH121 ファミリーとして登録されている (Fujita et al., 2011)。こちらも、ビフィズス菌と同じ働きであるが、HypAA 同様に、ビフィズス菌由来 HypBA2 には、シグナルペプチドと膜アンカリング領域が存在しているのに対し、Xe 由来には、シグナルペプチドのみである。

2-3. HypBA1(β -L-arabinofranosidase)の機能

HypBA1 は、機能未知の糖質分解酵素である Pfam DUF1680 ドメインを含んでおり、新規の DH127 ファミリーに登録されたものである (Fujita et al., 2014)。Xe 由来 HypBA1 の機能を解析したところ、特に *Ara*-Hyp に対し良く作用し、単糖の *Ara* を遊離した。*Ara*₂-Hyp と β -*Ara*₂ にはごく僅かに作用し、*Ara*₄-Hyp と *Ara*₃-Hyp には全く作用しなかった。ビフィズス菌由来 HypBA1 は、*Ara*₃-Hyp、*Ara*₂-Hyp、*Ara*-Hyp、 β -*Ara*₂ に作用し、Xe とは基質特異性に違いが見られた。また、ビフィズス菌由来には、シグナルペプチ

ドと膜アンカリングは存在せず、内分泌であることから、HypBA2 により遊離された β -Ara₂ を体内に取り込んだ後に、単糖 Ara に分解する役割を担っていると考えられる。一方、Xe 由来には、シグナルペプチドが存在していることから、HypAA と HypBA2 同様に細胞外へ分泌される。

2-4. Xe における HypAA, HypBA2, HypBA1 の協調的作用

上記に述べたそれぞれの酵素の機能を総合すると、以下の様な基質分解の流れが考えられる(図 3)。アラビノオリゴ糖鎖の中で最も含量の高い、Ara₄-Hyp に対し HypAA が作用することで、Ara₃-Hyp が残り、続いてその Ara₃-Hyp に対し HypBA2 が作用することで、Ara-Hyp が残る。最後に、Ara-Hyp に対し HypBA1 が作用することで、HRGP 上の全てのアラビノースが遊離される。このように、3 つの酵素による協調的な働きにより、HRGP 上のアラビノースは全て遊離されることになる。

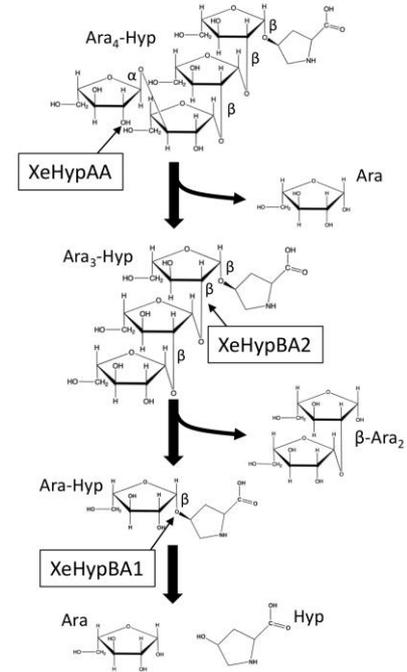
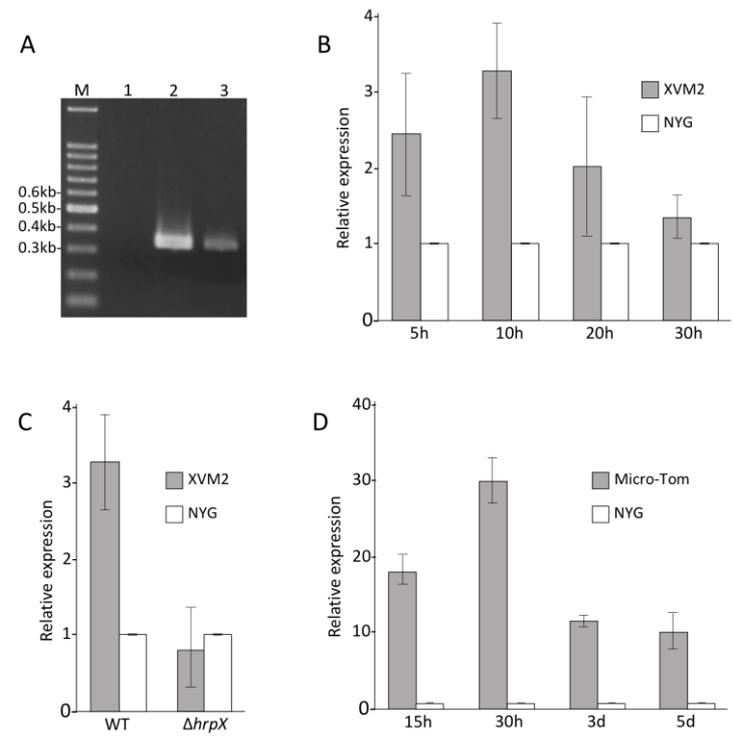


図 3 各酵素による基質分解の流れ

3. Xe 由来 *hypAA*, *hypBA2*, *hypBA1* の遺伝子発現解析

hypBA2-hypAA オペロンのプロモーター領域には、HrpX の結合する PIP-bxo 配列(TTCGCN15-TTCGC)が存在する。そこで、*hrp* 誘導培地(XVM2)および Micro-Tom を用いて、発現解析を行なった(図 4)。その結果、XVM2 では、培養 10 時間後に最も高い発現が認められ(図 4B)、*hrpX* の発現ピークと一致していた(データは示していない)。一方、 Δ *hrpX* 株での発現誘導は認められなかった(図 4C)。



認められなかった(図 4C)。Micro-Tom においても、接種 15 時間後には発現の誘導が認められ、30 時間後には最も高い発現が確認できた(図 4D)。以上の結果から、*hypBA2-hypAA* オペロンは、HrpX により制御されていると考えられた。*hypBA1* のプロモーター領域には、PIP-bxo 配列は、認められないものの、*hypBA2-hypAA* オペロンと同じような発現パターンを示し、HrpX により、直接あ

図 4 *hypBA2-hypAA* オペロンの発現解析

RT-PCR, mRNA (レーン 1); gDNA(レーン 2); cDNA(レーン 3) (A)。qRT-PCR, NYG および XVM2 における野生株(B); Δ *hrpX* 株(C); Micro-Tom における野生株(D)。

るは間接的に制御されていることが示唆された(データは示していない)。

4. Xe 由来 *hypAA*, *hypBA2*, *hypBA1* の遺伝子破壊

当然ここまで来れば、病原性との関わりが期待される。そこで、それぞれの遺伝子を単独で破壊した $\Delta xehypBA1$ 、 $\Delta xehypBA2$ 、 $\Delta xehypAA$ 株およびこれら 3 遺伝子を同時破壊した $\Delta xehypBA1-BA2-AA$ 株を作出し、Micro-Tom への接種を行なった。その結果、残念ながら期待に反し、いずれの破壊株も野生株と変わらない病原性を示した(図 5)。

5. ビフィズス菌および Xe における *hypAA*, *hypBA2*, *hypBA1* の存在意義 (図 6)

まず、ビフィズス菌におけるこれら酵素遺伝子群の存在意義としては、腸内での優先的な炭素源獲得が考えられる。腸内細菌には、ビフィズス菌以外に、*Bacteroides*、*Salmonella*、*Clostridium*、*Escherichia* 属細菌などが存在するが、いずれの腸内細菌にもこれら酵素群の遺伝子クラスターは認められない。よって、腸内に届いた植物繊維に含まれるアラビノオリゴ糖鎖は、ビフィズス菌が優先的に分解できることになる。また、

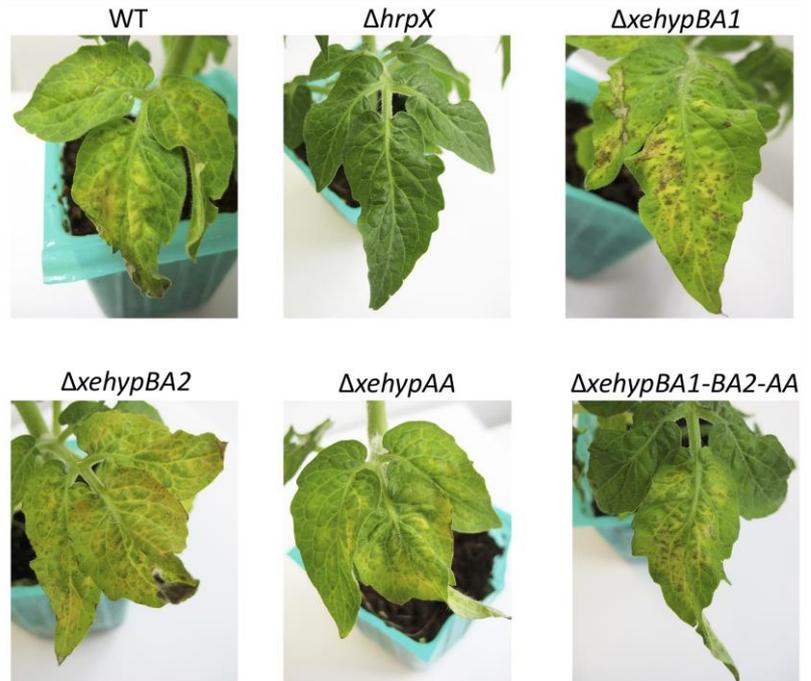


図 5 遺伝子破壊株の Micro-Tom への接種試験

ビフィズス菌由来 HypAA および HypBA2 には、C 末端側に、アンカーが存在しており、菌体表層に局在していることから、菌体周辺に存在するアラビノオリゴ糖鎖を分解することで、遊離糖を直ちに体内に取り込むことができる。ビフィズス菌は、アラビノースをグルコースと同程度に資化することができることから、ビフィズス菌にとってのこれら酵素群は、腸内での優位な炭素源獲得に大きく貢献していると考えられる。そのため現在、プレバイオティクスの観点からも研究が進められている。

では、*Xanthomonas* 属細菌におけるこれら酵素遺伝子群の存在意義は何であろうか。現在データベース上に *Xanthomonas* 属細菌の内、18 種のゲノム情報が公開されているが、その全てにこの酵素遺伝子群が保存されている。ビフィズス菌(*Bifidobacterium* 属)の場合、一部の *B. longum* に認められ、その亜種や他の *B. breve*、*B. bifidum*、*B. pseudolongum* などには認められない。またそれ以外の細菌では、一部の放線菌に認められるだけである。この様に、特に *Xanthomonas* 属細菌に広く保存されていることを考えると、これらの酵素遺伝子群は、*Xanthomonas* 属細菌が元々保持していたのではないかと予想される。例えば、紅藻類が細胞壁に含む多糖類のポルフィランは、海洋細菌の *Zobellia galactanivorans* が保持する酵素により分解されるが、その酵素遺伝子が、日

本人の腸内に存在する *Bacteroides plebeius* にも存在している (Hahemann *et al.*, 2010)。他国の菌株には存在していないのである。つまり、海藻を良く食べる日本人の腸内で、過去に *Z. galactanivorans* から *B. plebeius* へとその酵素遺伝子が水平伝搬したと考えられている。もしかすると、同じような事がビフィズス菌と *Xanthomonas* 属細菌の間でも、ヒトの腸内で (*Xanthomonas* 属細菌感染の野菜を食べたこと) で起きたのかもしれない。

基質となるアラビノオリゴ糖鎖は、自然界では、植物細胞壁に存在するエクステンシンとナス科レクチンにみに認められ、これらの HRGP は、植物の抵抗性にも関わっている。Xe 由来 HypAA、HypBA2、HypBA1 は、ビフィズス菌と同様に、協調的に働くことにより、HRGP の Hyp 上に位置するアラビノオリゴ糖鎖を単糖にまで分解する。しかし、ビフィズス菌と大きく異なる点は、いずれの酵素にもアンカーは存在せず、全て外分泌される点である。また、*Xanthomonas* 属細菌には、アラビノースを資化できる種は少なく、Xe も資化できない種の 1 つである。これらを考え合わせると、*Xanthomonas* 属細菌はこれら酵素群を炭素源獲得のために保持しているわけではなく、抵抗性に関与する HRGP を破壊する目的で持っているかのように思える。事実、*hypBA2-hypAA* オペロンが HrpX により制御されている。さらに、これら酵素遺伝子のクラスター中には、プロリンを認識して切断するプロテアーゼもコードされている。糖タンパク質は、糖鎖が分解されると構造的に不安定になり、プロテアーゼにより容易に分解されるようになることを考えると、*Xanthomonas* 属細菌の持つこれらすべての酵素群は、HRGP の糖鎖からタンパク質までをターゲットにしたものであることがうかがえる。しかしながら、Xe の各酵素遺伝子の破壊株では、病原性への影響が全く認められなかった。その結果を支持するように、実は、プロリンを認識するペプチダーゼの遺伝子は、コード領域内に終始コドンが挿入されていることが判明し、偽遺伝子化していることが分かった。これらの結果から考えられることは、おそらく本酵素群は、Xe の病原性(力) 遺伝子として働いていた時代があったものの、現在は、宿主との共進化の中でもはや無用な存在になってしまったのかもしれない。

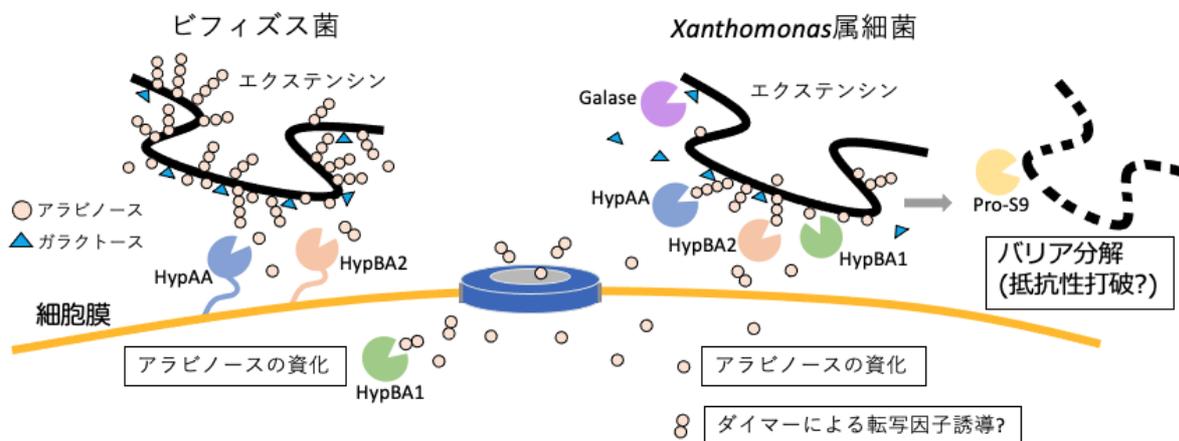


図 6 本酵素群のビフィズス菌および *Xanthomonas* 属細菌における役割とは？

おわりに

残念ながら、これまでの研究では *Xanthomonas* 属細菌に保存されているこれら酵素群が、病原性(力)に関わっている証拠は見つかっていない。しかしながら、これだけのバックグラウンドがあることを考えると、全く関わっていないと結論付けるのは拙速かもしれない。正直な気持ち、ここで止めるには未練がある。そんな折、ウリに感染する褐斑病細菌(*X. cucurbitae*)のゲノム情報が公開された。早速調べたところ、予想通り本酵素群をコードする遺伝子は保存されていた(図7)。それに加え、同クラスター内に、 α -galactosidase と思われる遺伝子もコードされていた。HRGP上に存在する糖鎖は、Hyp(ヒドロキシプロリン)上のアラビノオリゴ糖鎖だけでなく、Hypと必ず一緒に存在するSer(セリン)上に、 α 結合したガラクトースが位置している。常に、このガラクトースの存在が気になっており、ガラクトースをSerから遊離する酵素が存在しないものかと思っていたところに、褐斑病細菌の遺伝子マップを見たときには、もしやまだ、菌種と宿主の組み合わせによっては、病原性(力)に関わっているものもが存在するのではという期待が出てきた。さらに、本細菌には、*hypBA1*が2つコードされており(他種では1つのみ)、それらの相同性は70%であることから、それぞれ異なる機能を持っている可能性もある。また、プロリンを認識するペプチダーゼの配列を見たところ、フレームシフトも起きていない。もう1つ付け加えるなら、本細菌は、アラビノースを資化できる種でもある。もちろんこれまでと同じ様に病原性に関わっていない可能性も十分あるが、少しばかりの期待を胸に、褐斑病細菌の解析までは完遂しようと思っている。

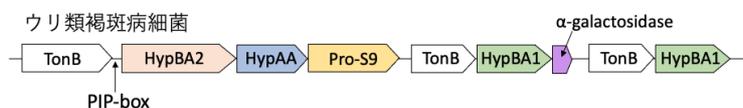


図7 ウリ類褐斑病細菌(*X. cucurbitae*)のゲノムマップ

謝辞

菌株を分譲していただいた元九州大学農学部教授 土屋健一博士に感謝の意を申し上げます。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金の支援を受けて実施した。

引用文献

- Akiyama, Y., Mori, M. and Kato, K. (1980) ^{13}C -NMR analysis of hydroxyproline arabinosides from *Nicotiana tabacum*. *Agric. Biol. Chem.* 44: 2487-2489.
- Ashford, D., Desai, N.N., Allen, A.K., Neuberger, A., O'Neill, M.A. and Selvendran, R.R. (1982) Structural studies of the carbohydrate moieties of lectins from potato (*Solanum tuberosum*) tubers and thorn-apple (*Datura stramonium*) seeds. *Biochem. J.* 201: 199-208.
- Balaji, V. and Smart, C.D. (2012) Over-expression of *snakin-2* and extensin-like protein genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *Transgenic Res.* 21: 23-37.
- Benhamou, N., Mazau, D. and Esquerre-Tugaye, M.T. (1990) Immunocytochemical localization of hydroxyproline-rich glycoproteins in tomato root cells

- infected by a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*: study of a compatible interaction. Mol. plant Pathol. 80: 163–173.
- Showalter, A.M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. Plant Cell 5:9-23.
- Fenselau, S. and Bonas, U. (1995) Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. Mol. Plant Microbe Interact. 8: 845–854.
- Fujita, K., Kitahara, K. and Suganuma, T. (2012) Functional analysis of degradative enzymes for hydroxyproline-linked β -L-arabinofuranosides in *Bifidobacterium longum*. Trends Glycosci. Glycotechnol. 24: 215–224.
- Fujita, K., Sakamoto, S., Ono, Y., Wakao, M., Suda, Y., Kitahara, K. and Suganuma, T. (2011) Molecular Cloning and characterization of a beta-L-arabinobiosidase in *Bifidobacterium longum* that belongs to a novel glycoside hydrolase family. J. Biol. Chem. 286: 5143–5150.
- Fujita, K., Takashi, Y., Obuchi, E., Kitahara, K. and Suganuma, T. (2014) Characterization of a novel β -L-arabinofuranosidase in *Bifidobacterium longum*: functional elucidation of a DUF1680 protein family member. J. Biol. Chem. 289: 5240–5249.
- Hehemann, J.H., Correc, G., Barbeyron, T., Helbert, W., Czjzek, M. and Michel, G. (2010) Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. Nature 464: 908–912.
- Koebnik, R., KruÈger, A., Thieme, F., Urban, A. and Bonas, U. (2006) Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes: J. Bacteriol. 188: 7652–7660.
- Lampert, D.T.A and Miller, D.H. (1971) Hydroxyproline arabinosides in the plant kingdom. Plant Physiol. 48:454-456.
- Nakamura, M., Yasukawa, Y., Furusawa, A., Fuchiwaki, T., Honda, T., Okamura, Y., Fujita, K. and Iwai, H. (2018) Functional characterization of unique enzymes in *Xanthomonas euvesicatoria* related to degradation of arabinofuranoligosaccharides on hydroxyproline-rich glycoproteins. PLOS One 13 (8): e0201982
- Otulak-Kozieł, K., Kozieł, E., and Lockhart, B.E.L. (2018). Plant cell wall dynamics in compatible and incompatible potato response to infection caused by Potato Virus Y (PVYNTN). Int. J. Mol. Sci. 19:862.
- Wei, G. and Shirsat AH. (2006) Extensin over-expression in *Arabidopsis* limits pathogen invasiveness. Mol. Plant Pathol. 7: 579–592.

モデル生物カイコの植物病理学における利用

飯山和弘

Iiyama, K.

Use of silkworm larvae, *Bombyx mori*, as an animal model in plant pathology

Abstract

Microorganisms that can infect both the plant and animal kingdoms are called cross-kingdom pathogens. It has been demonstrated that not only mammalian species but also non-mammalian species are also useful as infection models. Here, the studies concerning an entomopathogenic bacterium, *Serratia liquefaciens* will be introduced, and the usefulness of silkworm as an infection model is also proposed. A strain of *S. liquefaciens* isolated from an antlion was highly virulent against silkworm. Serralysin-like metalloproteases were secreted into the culture filtrate of the strain, and purified protein caused lethal effect. However, inoculation test using protease-deficient mutants ascertained that the proteases were not major virulence factor. Subsequently transposon library was created to search virulence-related gene, and four virulence-decreased mutants were screened from the library. Flanking sequence analysis indicated that transposons were inserted into the lipopolysaccharide (LPS) biosynthetic genes. Interestingly, survival ratios of the mutants was dramatically decreased in intact horse serum, but not in heat-inactivated serum. These results suggested that complement system was activated in the intact serum, and membrane attack complex was formed, resulting in decreased survival ratios. Since the complement system is triggered by bacterial recognition, LPS might inhibit molecular interaction by modifying the bacterial surface. Although complete complement system is not known in insect, it was shown that several C-type lectins bind to the bacterial surface, and trigger the innate immunity. In plant, recognition is the first step in pathogen-plant interaction, therefore, LPS structure, especially O-antigen may important characteristics for virulence in pathogenic bacteria. Although *S. liquefaciens* is not plant pathogenic bacteria, LPS-deficient strains in this study will be applicable to the research for plant host-microorganism interaction. Such study will contribute understanding of common response in plants and animals against compatible/incompatible microorganisms. In addition, research on infection mechanisms of cross-kingdom pathogens will be also promoted. For these studies, silkworm will be one of the useful animal models.

Key words: model organism, silkworm, virulence, cross-kingdom pathogen, lipopolysaccharide

九州大学大学院農学研究院 Faculty of Agriculture, Kyusyu University, 744 Motoooka, Nishiku, Fukuoka, 819-0395, JAPAN

はじめに

病原微生物の宿主範囲はさまざまであり、単一の生物種に限られる狭宿主性のものから、多数の種に感染する広宿主性まで多岐にわたる。宿主範囲が植物界や動物界といった界の内部に止まらず、双方の生物種に感染性を示す微生物は、特に **Cross-kingdom pathogen** と呼ばれ、病原性機構や宿主との相互作用、生態系における影響などを焦点にした研究が展開されている (van Baarlen *et al.*, 2007)。この中には、古くから植物病原として知られている *Pantoea*、*Burkholderia* 属細菌や、動物の病原である *Pseudomonas*、*Salmonella*、*Serratia*、*Enterobacter*、*Enterococcus* 属細菌などが含まれる (Kirzinger *et al.*, 2011)。

日和見感染菌であり、院内感染の原因菌として知られる緑膿菌 *P. aeruginosa* には植物に病原性を示す菌株が存在する。マウスの全層熱傷接種モデルにおいて致死作用を示す UCBPP-PA14 株は、葉への注入接種法によりシロイヌナズナのエコタイプ *Llagostera* や *Columbia* に軟腐症状を誘導する (Rahme *et al.*, 1995)。

緑膿菌は多くの病原力因子を産生することが知られている。II型分泌機構で分泌されるエクソトキシン A (ExoA) は主要な外毒素の一つで、ジフテリア毒素と同様に動物細胞のタンパク質合成に必須なペプチド鎖伸長因子 2 を ADP リボシル化することにより不活化し、タンパク質合成を阻害する (Iglewski and Kabat, 1975)。III型分泌機構で分泌されるエクソエンザイム S (ExoS) も同様に、ADP リボシルトランスフェラーゼ活性を有し、GTP 結合タンパク質などを標的分子とする (Rocha *et al.*, 2003)。さらに、エラスターゼ A (LasA)、エラスターゼ B (LasB)、プロテアーゼ IV (PrpL)、アルカリプロテアーゼ (AprA) などのプロテアーゼ群、エクソトキシン U (ExoU)、エクソトキシン T (ExoT)、エクソトキシン Y (ExoY) などの外毒素群、細胞膜のリン脂質分解により細胞溶解活性を持つホスホリパーゼ C (PlcH または PlcS) など多数のタンパク質分子が緑膿菌の動物に対する病原性に寄与することが示されている (Bleves *et al.*, 2010)。

また低分子化合物においては、フェナジン化合物であるピオシアニンや蛍光性シデロホアのピオベルジン、バイオサーファクタント (生物性界面活性剤) のラムノリピドが病原性に深く関与するとされている (Jurado-Martín *et al.*, 2021)。ピオシアニンは NAD(P)H から電子を受け取り還元型ピオシアニンとなり、酸素と反応することによって活性酸素種の過酸化水素やスーパーオキシドを生成する。ラムノリピドは swarming 運動や気道上皮細胞の早期浸潤に関与することが明らかにされている。

Rahme *et al.* (1995) は、動物において同定された病原力因子が植物においても機能するかを明らかにする目的で、緑膿菌 UCBPP-PA14 株の *exoA* および *plcS* 変異株を作出した。これら変異株は、シロイヌナズナに対する病原力が減少したことから、植物においても病原性に寄与すると考えられた。

一方、植物に対する病原性関連遺伝子として *gacA* が知られる。*GacA* は *P. fluorescens* (synonym, *P. protegens*) CHA0 においてピオルテオリン *pyoluteorin*、2,4-ジアセチルフロログルシノール 2,4-diacetylphloroglucinol、シアン化水素等の抗菌性を示す二次代謝化合物の産生に関与する調節因子 (global antibiotic and cyanide control) として最初に同定された (Laville *et al.*, 1992)。その後 *P. syringae* pv. *syringae* B728a および変異株を用いた解析によって、*gacA* は病斑形成、プロテアーゼ産生およびシリリングマイシン産生に関与し、

重要な病原性関連遺伝子であることが示された (Rich *et al.*, 1994)。

UCBPP-PA14 株をマウスに接種したときの致死率は、約 77% (22 個体中 17 個体) であった。これに対し *gacA* 変異株接種区では全く死亡個体が認められなかった。そのため、*gacA* は植物のみならず動物に対する病原性においても重要な役割を担っていると考えられた (Rahme *et al.*, 1995)。緑膿菌の植物に対する病原性は一部の菌株に限られ、本細菌種に普遍的な表現型とは言い難いが、植物および動物の双方に病原性を示す細菌種の存在および病原力因子の共通性を明確に示した意義は大きいといえる。

病原細菌の感染研究において、人と同じ哺乳類であるマウスが最も頻繁に使われているが、無脊椎動物も多く使用されている。例えば線形動物のセンチュウ *Caenorhabditis elegans*、昆虫のキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*、ハチミツガ *Galleria mellonella*、カイコ *Bombyx mori* などがよく知られている。

哺乳類動物である人への病原性を研究するにあたり、同じく哺乳類であるマウスが最も適したモデル生物種であることに恐らく疑いはないであろう。しかし、マウスは、飼育に要する面積や飼育費用が高いという短所がある。また移動性が高く、自然界でも生存できることから、高度な逃亡防止策を講じる必要がある。特に遺伝子変異株を用いた病原性試験の多くは遺伝子組換え実験に該当し、適切な設備が重要である。また実験生物としての哺乳類動物の使用は倫理的に高度な配慮が必要とされる。以上の理由から、日常から哺乳類動物を使用しない研究者にとって、マウスを用いた感染実験は極めて敷居が高いものである。

このような現状において、センチュウ、キイロショウジョウバエ、ハチミツガ、カイコなどは飼育し易く、専門外の研究者が比較的容易に使用できる感染モデル生物である。もちろんこれらのモデル生物においても、マウスと同様な短所を有しているものがある。例えば、キイロショウジョウバエやハチミツガは移動性が高く、生物的隔離という点ではマウスとさほど変わりがないであろう。研究の内容によっては、センチュウやキイロショウジョウバエは小さすぎるという場合もあるかもしれない。しかし別の研究においては、その小ささが長所となることもある。全ての生物には感染モデルとして一長一短あり、それぞれの研究内容に合致したモデル生物を選定することが最も重要である。

我々はこれまで、カイコを感染モデル生物として用いてきた。カイコは、チョウ目 (鱗翅目) カイコガ科に属する昆虫であり、野外には生息していない。野生種のクワコ *B. mandarina* を家畜化したものであり、幼虫が作る繭から絹糸をとる目的で、品種改良を重ねてきた昆虫である。カイコと人類との長く、深い関わりから生み出されたといえるカイコの形質はモデル生物としての長所につながっている。例えば、カイコは餌を求めて長距離移動を行うことができず、人から桑葉を与えられなければ生きていけない。また多くのカイコ成虫は翅が小さく、飛翔能力を欠いている。このような野外での生存能力の低さや移動性の低さは生物隔離における大きな利点である。

さらに研究室内の飼育においては以下の点で使い勝手がよい。まずは、絹糸をとるために実際に使用されている実用品種の卵 (蚕種) が比較的安価で販売されていることである。販売されている蚕種は休眠卵であり、浸酸処理によって人工的に休眠を打破することができる。そのため、年間を通じて実験に供することができる。

またカイコの餌は桑葉であるが、人工飼料が製造・販売されており、通年飼育を可能としている。カイコの大きさは品種によって大きく異なるが、使用している実用品種の場合、4 齢幼虫において 4～5 cm 程度であり、手に持って接種するには手頃の大きさである (Fig. 1)。

他の特筆すべき形質として、共食いをしないことがある。絹糸生産性を向上させるために高密度で飼育されてきたカイコは、同種他個体を捕食することはない。もし共食いする動物種を大量飼育する場合は、個別飼育する必要があり、飼育や給餌に多くの時間を割くことになるであろう。

我々は、カイコなどのモデル生物を使い、*P. aeruginosa*、*S. liquefaciens*、*Enterobacter* sp.、*Paenibacillus popilliae* などの病原性に関する研究をこれまで実施してきた (Iiyama *et al.*, 2007, 2008, 2015, 2018; Chieda *et al.*, 2011; Morishita *et al.*, 2019)。今回は *S. liquefaciens* を用いた研究例を紹介するとともに、カイコの植物病理学における利用を提案することで、話題提供としたい。



Fig. 1. Mass rearing of *B. mori* larvae using artificial diet and inoculation of bacterial suspension into the haemocoel

1. ウスバカゲロウの幼虫から分離した細菌

ウスバカゲロウの幼虫は、乾燥した砂地に営巣、すり鉢状の落とし穴を作り、落ち込む昆虫などの体液を吸汁する。体液吸汁の前に胃液と唾液とから成る消化液を注入し、獲物を麻痺および外部消化する。Yoshida *et al.* (2001) は、本種幼虫の外部消化液から分離した *E. aerogenes* の GroEL 様タンパク質が殺虫活性を有することを報告した。シャペロンタンパク質である GroEL は、不安定なタンパク質中間体などの正しい高次構造の形成 (フォールディング) に寄与している。GroEL は ATP の存在下で、補助因子として機能する GroES と複合体を形成する。この複合体内で変性タンパク質のフォールディングが進行すると考えられている。「良い」タンパク質の印象が強い GroEL が毒素として機能するのは驚きであった。さ

さらに、外部消化液からは殺虫性 *Bacillus cereus* や *S. marcescens* などの細菌も分離され、ウスバカゲロウなどの昆虫種は有用なバイオリソースの宝庫であると考えられた。

我々は福岡県内でウスバカゲロウの幼虫を採集し、外部消化液からグラム陰性細菌をターゲットとして、MacConkey II 培地を用いて細菌の分離を実施した (Egami *et al.*, 2009)。各種生理試験の結果から、*S. liquefaciens*、*E. cloacae* および *Salmonella–Escherichia/Shigella* 近縁種が分離されたことが明らかになった。

これら菌株をカイコの血体腔内に注入接種したところ、*S. liquefaciens* を接種した個体だけが 24 時間以内に全て致死し、本菌は強い殺虫活性を有していることが明らかになった (Fig. 2)。またワモンゴキブリ *Periplaneta americana* に対しても同様に致死効果を

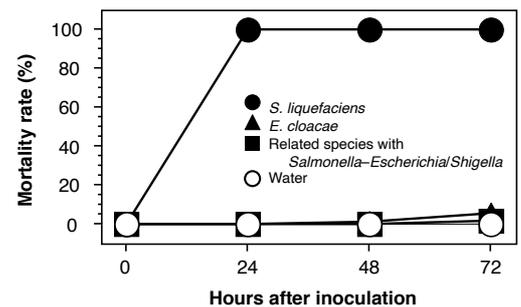


Fig. 2. Virulence of the bacterial groups from antlion against *B. mori* larvae

Approximately 10^5 cells of each isolate were inoculated into the hemocoel of *B. mori* larvae. Five larvae were injected and three replicates per trial were performed. Percentage of mortality was monitored every 24 h after inoculation. Values are expressed as mean values standard error of the group.

示した。

E. cloacae はトウガラシに病原性を示したり (García-González *et al.*, 2018)、バナナに共生し、黒シガトカ病に生物的防除活性を示したり (Macedo-Raygoza *et al.*, 2019) と植物との関連が深い。そのため、ウスバカゲロウから分離した *E. cloacae* が植物に及ぼす影響について検討する必要がある。

2. 人工培地に分泌される殺虫成分の精製

S. liquefaciens Kuo1-1 の培養上清をカイコ血腔内に注入したところ、やはり殺虫活性を示した。そのため殺虫成分が菌体外に分泌されていると考え、その精製を試みた。

透析膜の透過性、耐熱性などの予備的検討から本成分はタンパク質であると推察された。そこで、タンパク質の一般的な精製方法である硫酸アンモニウム沈殿、イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって、殺虫性タンパク質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において 48 kDa の単一バンドとなるまで精製した。

この精製タンパク質はプロテアーゼ活性を有していた。実際 *S. liquefaciens* Kuo1-1 は、大量のプロテアーゼを菌体外に分泌していた

(Fig. 3)。そこで *S. liquefaciens* Kuo1-1 のナリジキシン酸耐性変異株である FK01 の培養上清をカゼインゼイモグラフィーに供試したところ、48 kDa だけでなく、52 kDa のプロテアーゼ活性バンドが検出された。両バンドともセリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼの阻害剤による活性低下は認められず、EDTA 処理によってのみ阻害されたため、金属プロテアーゼであることが示された (Fig. 4)。

以上の結果を踏まえ、液体培地中に分泌されていた殺虫活性タンパク質はセラリシン様プロテアーゼであると考えられた (Miyata *et al.*, 1970a, 1970b)。

次にセラリシン様プロテアーゼの保存領域を足がかりに、48 kDa および 52 kDa のセラリシン様プロテアーゼ遺伝子をクローニングし、それぞれ *ser1* および *ser2* とした (甲斐原ら, 2010; Kaibara *et al.*, 2012)。Ser1、Ser2 とともに、セラリシンファミリーに特徴的な亜鉛結合モチーフ HEXXHXUGUXH、メチオニンターン SXMXY、グリシンリッチリピート GGXGXD を有していた。さらにカルボキシル末端は ABC トランスポーター配列 DXXX であり、I 型分泌機構で菌体外に分泌されることが考えられた。

セラリシン様プロテアーゼは、*Serratia* 属だけでなく、*Pseudomonas* 属細菌そして *Dickeya* 属細菌や *Pectobacterium* 属細菌などの植物病原細菌も産生することが知られて

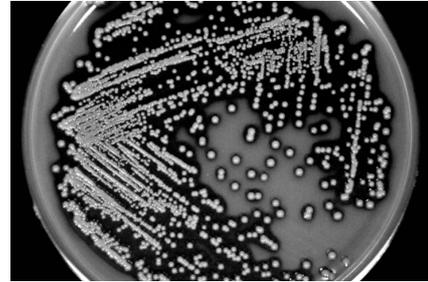


Fig. 3. Protease production by *S. liquefaciens* Kuo1-1 isolated from antlion

The strain was streaked on LB medium containing 2% skimmed milk, and the plate was incubated at 30°C for 2 days.

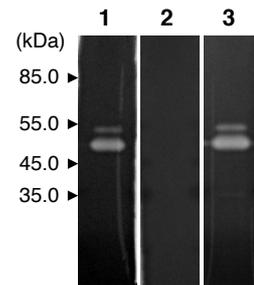


Fig. 4. Effect of protease inhibitors on the proteolytic profile of *S. liquefaciens* FK01, nalidixic acid resistant mutant of Kuo1-1

In the casein zymography, the gels were treated with buffers containing EDTA, metalloprotease inhibitor (gel 2), or inhibitor cocktail for serine and cysteine proteases (gel 3). As control, the gel was treated without inhibitor (gel 1).

いる。セラリシン様プロテアーゼを保持する生物学的意義について、基質特異性などの酵素学的特徴を元に検討する必要がある。

3. プロテアーゼ欠損変異株の作出および病原性

常法により FK01 を親株として、*ser1* 破壊株 (FK02)、*ser2* 破壊株 (FK03) および両遺伝子破壊株 (FK04) を作出した (Kaibara *et al.*, 2012)。これら変異株に加えて、それぞれの相補株を作出し (Fig. 5)、カイコを用いた病原性検定を実施したところ、変異株において顕著な病原力の低下は認められなかった。そのためセラリシン様プロテアーゼは、本菌の病原性発現において補助的な役割を担っている可能性は残されるが、主要な病原力因子は別に存在すると考えられた。人工培地中で検出された生理活性物質が、必ずしも宿主内で同様に産生され、機能するわけではないという好例であった。

植物病原細菌のセラリシン様プロテアーゼは、植物の細胞壁成分や宿主免疫関連分子の分解を通して、病原性に寄与することが推定されているが、まだ明らかではなく (Figaj *et al.*, 2019)、残された課題である。

4. トランスポゾンライブラリーの構築、病原力低下変異株の選抜およびゲノム解析

我々は無作為な変異株集団を得るために、FK01 株のトランスポゾンライブラリーを構築した (Rossignol *et al.*, 2001; 平ら, 2014; Taira *et al.*, 2016)。約 1500 変異株をカイコに針接種し、24 時間以内に致死させなかった 4 変異株 (ET0234, ET0373, ET0418, ET0964) を選抜した。トランスポゾン NKBOR 内の配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析により、ゲノム内への 1 箇所挿入であると考えられた (Fig. 6CD)。

次に FK01 の全ゲノム解析を実施した (Taira *et al.*, 2014)。Velvet (Zerbino *et al.*, 2008) による配列再構築 (アセンブリー) の結果、49 コンティグ (28 スキャフォールド) となり、コンティグ総長は約 5.28 Mb (GC 含量 55.8%) であった。N50 および N90 はそれぞれ、3.04 Mb および 296 kb となった。MiGAP (Sugawara *et al.*, 2009) によるアノテーションの結果、タンパク質をコードする遺伝子が 4884 と予測された。

S. liquefaciens ATCC 27592^T の完全ゲノム配列 (Nicholson *et al.*, 2013) に、長い順に 7 つの FK01 スキャフォールドをマッピングしたところ、ほぼ全ての領域を網羅しており、高精度のドラフト配列が得られた (Fig. 6B)。

トランスポゾンが挿入された周辺領域の塩基配列から、破壊された遺伝子を特定した。ET0373 において、トランスポゾンは *waaL* に挿入されていた (Fig. 6A)。*waaL* はリポ多糖 (LPS) 生合成関連遺伝子であり、O 抗原をリポド A コアに繋げる (Fig. 7) O 抗原リガーゼをコードしている (Feldman *et al.*, 2005)。*hldD-waaF-waaC-wabK-waaL-wabM* はオペロン構造であることが予測され、*waaL* の下流に位置する *wabM* も極性効果により発現していないと考えられる。*wabM* は *Klebsiella pneumoniae* では外部コア (outer core) の

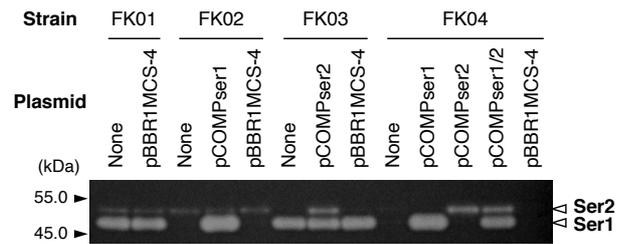


Fig. 5. Casein zymography of *S. liquefaciens* FK01 and its derivatives

FK02, FK03, and FK04 were *Ser1*-, *Ser2*, and *Ser1/Ser2*- deficient mutant, respectively. pCOMP*ser1*, pCOMP*ser2*, and pCOMP*ser1/2* were pBBR1MCS-4 containing *ser1*, *ser2*, and both genes, respectively, for complementation.

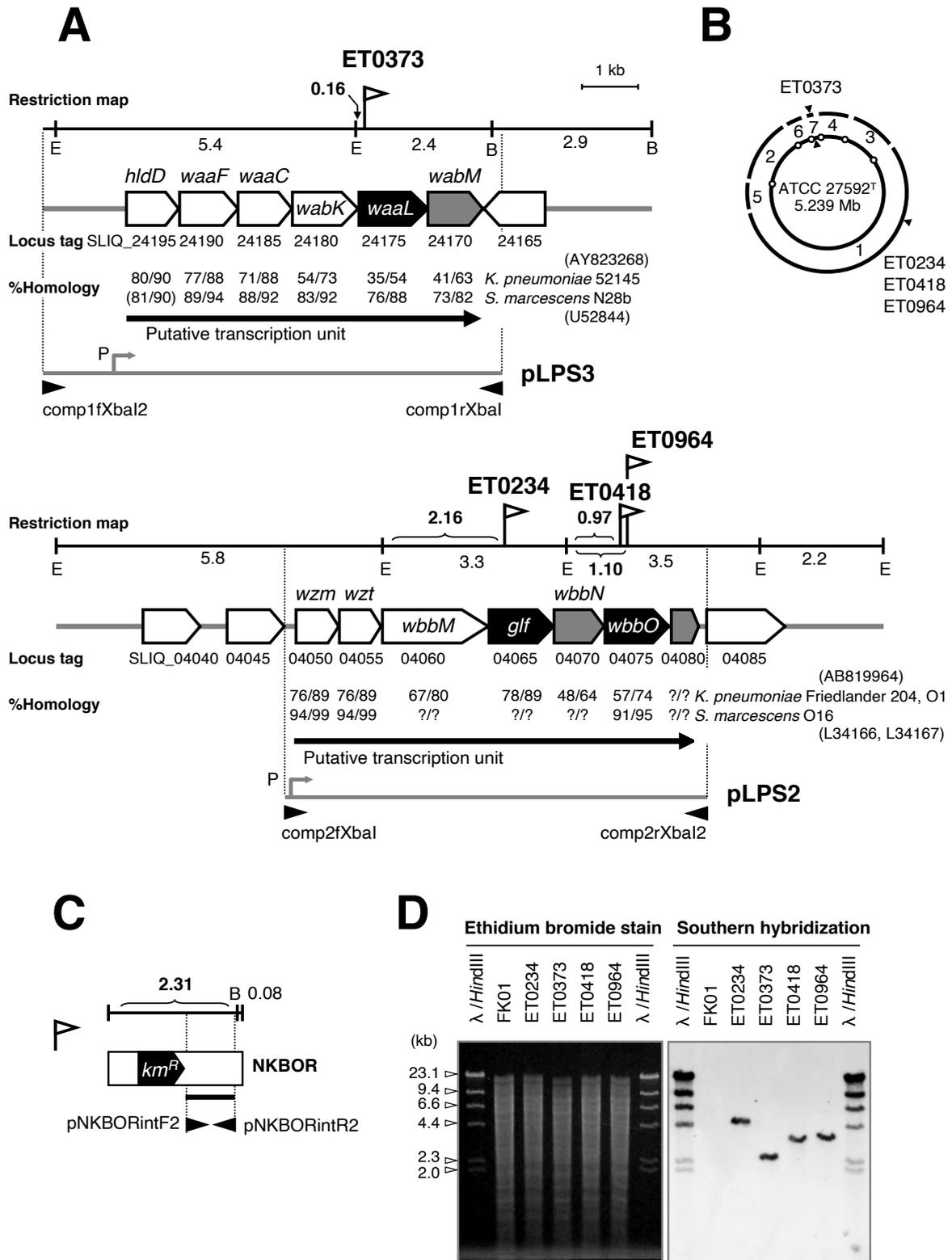


Fig. 6. Physical maps of the transposon insertion site in mutant strains originating from *S. liquefaciens* FK01 (A); comparison of the genomes of ATCC 27592 and FK01; physical map of NKBOR (C); and Southern hybridization (D)

Insertion sites and orientation of NKBOR are shown on restriction maps as flags (A). On the restriction maps, "E" and "B" mean fragments in kb for *EcoRI* and *Bam*HI sites, respectively. Homology percentages (identities/positives) of the corresponding genes of *K. pneumoniae* (strains 52145 or Friedlander 204) and *S. marcescens* (strains N28b or O16) with those of *S. liquefaciens* FK01 are shown. Question marks are indicated for corresponding genes that were not sequenced. Arrows indicate putative transcription units predicted by the FGENESB program. Closed triangles mean primers for the construction of the complemented plasmid (A) and probe preparation (C). Predicted promoters are shown as "P" in panel A. In panel B, scaffolds 1–7 of the FK01 draft genome (BAZB01000000, outer gapped circle) were arranged against the complete genome sequence of ATCC 27592 (CP006252, inner circle). The numbers between circles indicate scaffold names. Small open circles on the inner circle indicate ribosomal RNA gene regions. Arrowheads indicate transposon insertion sites. The results of Southern hybridization are shown in panel D.

合成に関与し、グルコース残基を付加する糖転移酵素である (Regué *et al.*, 2005)。

その他の病原力低下変異株 (ET0234、ET0418、ET0964) において、トランスポゾン は全て同一の予測 オペロン (*wzm-wzt-wbbM-glf-wbbN-wbbO*-

SLIQ_04080) 内に挿入されていた (Fig. 6A)。ET0234 においては *glf* 内へ、また ET0418 および ET0964 では *wbbO* への挿入が確認された。やはり極性効果によって、その下流の遺伝子の発現は阻害されていると考えられた。*glf*、*wbbN* および *wbbO* も糖転移酵素遺伝子であり、O 抗原の一種である D-ガラクトサン I の生合成に関与している (Guan *et al.*, 2001; Kos and Whitfield, 2010)。

これらの知見に基づき、病原力が低下したトランスポゾン変異株は全て LPS 変異株であると考えられる。これら変異株に当該オペロンを相補したところ、ET0373 においては部分的に、その他の変異株においては FK01 と同程度にまで病原力が回復した (Fig. 8)。今回は、多コピーのプラスミドによって相補したため、導入した遺伝子が複数存在することになる。そのため遺伝子量効果によって ET0373 の相補株においては部分的な回復にとどまった可能性がある。

興味深いことに、*waaL* は *S. liquefaciens* ATCC 27592^T に相同遺伝子が存在していた (ローカスタグ M495_24230) が、*glf* や *wbbO* 相同遺伝子は無かった (Fig. 6B)。そのため ATCC 27592^T は O 抗原が D-ガラクトサン I である LPS を持たず、FK01 とは血清型が異なると考えられる。むしろ FK01 は D-ガラクトサン I を持つ *K. pneumoniae* 血清型 O1 や *S. marcescens* 血清型 O16 と血清学的には近縁であると推察された (Szabo *et al.*, 1995)。*K. pneumoniae* において、O1 型 LPS は病原力に寄与することが示されている (Hsieh *et al.*, 2012)。今後、*S. liquefaciens* においても血清型と病原力との関連について検討する必要

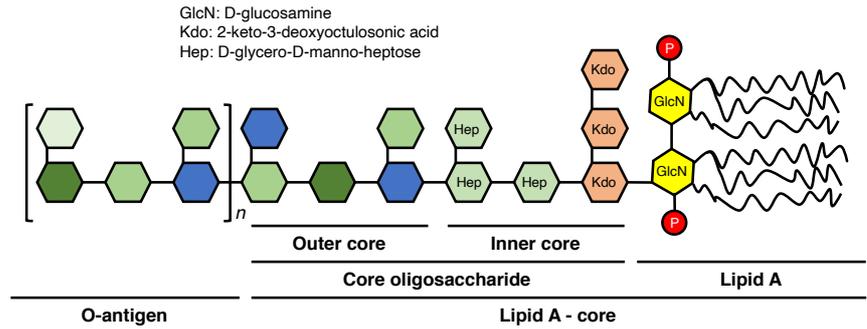


Fig. 7. Schematic of the basic structure of lipopolysaccharide. Adapted from Maeshima and Fernandez (2013).

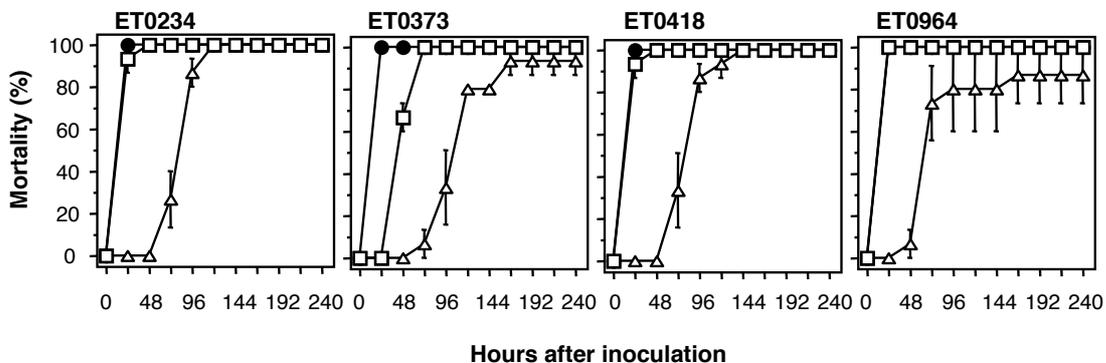


Fig. 8. Virulence of transposon mutants against *B. mori*

Cells (10^4) were injected into the hemocoel of five 4th instar larvae. FK01 (parent strain), transposon mutants, and complemented strains are shown as closed circles, triangles, and squares, respectively. For comparison, the result of FK01 is shown in all graphs (100% mortality at 24 h after inoculation). Plots indicate averages \pm standard errors ($n = 3$)

がある。

ゲノム解析が終了した植物病原性細菌においては、D-ガラクトン I 生合成遺伝子が存在しないことが、相同性検索によって示された。このことは、植物病原細菌全般において、D-ガラクトン I を O 抗原とする LPS が存在しないことを意味するわけではないが、主要な O 抗原ではないのかもしれない。D-ガラクトン I 生合成遺伝子の導入が病原性に及ぼす影響を検討することは興味深い。

5. 正常ウマ血清中における生存率

LPS は内毒素とも呼ばれ、さまざまな生理活性を有する。オートクレーブ加熱死菌においても、LPS は菌体から遊離したり、熱変性したりしない。そこで FK01 の LPS 変異株、相補株の加熱死菌をカイコ血体腔内に接種したが、いずれも致死効果は認められなかった。そのため、LPS が直接的に殺虫活性を発揮するわけではないと考えられた。

そこでカイコ血体腔における、*S. liquefaciens* と宿主の免疫関連分子との相互作用を推定するために、正常ウマ血清を用いた生存試験を実施した。なお、用いた正常ウマ血清には、*S. liquefaciens* と反応する抗体は存在していないことを凝集反応により確認した。

無処理あるいは 56°C、30 分間の非働化処理した血清と細菌懸濁液を混合し、37°C で 1 時間保温し、希釈平板法によって生菌数を算出した。血清の代わりにリン酸緩衝生理食塩水を用いた場合の生菌数に対する比率を生存率とした (Fig. 9)。

無処理の血清を用いた場合 (Fig. 9 黒カラム)、変異株において生存率の低下が認められた (空ベクター pBBRmKO2)。また生存率は当該オペロンのプラスミド相補 (pLPS2 または pLPS3) によって完全に回復した。生存率の低下の程度は変異株によって大きく異なり、*waal* 変異株である ET0373 において特に顕著であった。D-ガラクトン I の生合成変異株と推察されるその他の変異株においては、トランスポゾンの挿入位置によって生存率が異なっていた。オペロンの上流領域への挿入が認められた ET0234 は、より下流領域に挿入された ET0418 や ET0964 よりも生存率の低下が見られた。このことは、ET0418 や ET0964 の O 抗原は完全ではないものの、部分的な機能を発揮することを示唆している。一方、非働化血清 (Fig. 9 白カラム) を用いた場合、生存率の低下は確認されなかった。非働化処理は、血清中に含まれる補体を不活化することから、LPS は補体反応による殺菌作用を克服する機能を有すると考えられる。

補体経路は、最終的に第 5 ~ 9 成分 (C5b、C6~C9) により細胞侵襲複合体 (MAC, Membrane attack complex) を形成し、細菌細胞膜に孔を形成し、殺菌する (Fig. 10)。第 3 成分 (C3) が補体経路の中心的な酵素であり、C3 の活性化 (C3→C3b) に至るまで異

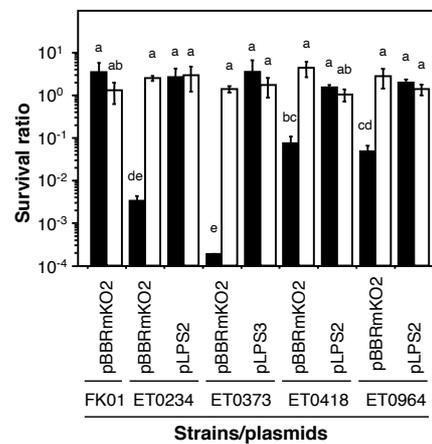


Fig. 9. Survival ratios of transposon mutant strains after co-incubation with normal horse normal serum.

Closed and open columns indicate intact and heat-inactivated serum. Columns indicate averages \pm standard errors ($n = 3$). Identical letters above the columns are not significantly different according to Tukey's honestly significant difference test ($p = 0.05$).

なる3つの異なる経路が知られている。

古典的経路 (Classical pathway) においては、抗体と抗原とが結合した免疫複合体を起点とする活性化経路であるが、今回は特異的抗体を含まない正常血清であり、本経路ではない。残り2つはレクチン経路 (Lectin pathway) および別経路 (Alternative pathway) である。

高分子炭水化合物およびリポド A などの細菌表面構造はそれぞれ、レクチン経路および別経路の標的分子となりうる (Corbett *et al.*, 2010)。LPS 変異株における生存率の低下は、レクチンまたは別経路による捕体系によって MAC が引き起こされた結果であり、O 抗原はその初期反応を阻害し、生存率の向上に寄与していると推察された。

完全な補体系は昆虫では知られていないが、カルシウム依存性レクチン (C 型レクチン) は昆虫の自然免疫に寄与していることが知られている (Watanabe *et al.*, 2006)。カイコゲノム中には 21 個の C 型レクチン遺伝子が予測されており (Tanaka *et al.*, 2008), Bm-LBP (Koizumi *et al.*, 1997, 1999)、immulectin (Kim *et al.*, 2003; Takase *et al.*, 2009) および BmMBP (Watanabe *et al.*, 2006) の 3 種 C 型レクチンの機能解析がなされている。

特に Bm-LBP は、LPS のリポド A 部分に結合し、この結合は D-ガラクトサン I によって阻害される。この場合、自然免疫反応は引き起こされないか、遅延する (Koizumi *et al.*, 1997)。そのためカイコにおいてもレクチン分子による異物認識に端を発する自然免疫が感染防御に重要な役割を担っていると考えられる。一方、病原体から見れば、被認識分子であるリポド A を O 抗原で修飾あるいは隠蔽することによって認識阻害を引き起こし、感染をより優位に成立させていると推察される。

植物においても異物認識が抵抗性発現の重要な初期応答であり、病原体の表面構造は被認識分子となる。実際、植物病原細菌においても、LPS と病原性との関連は以前から論じられてきた (Erbs *et al.*, 2010)。またピアス病の病原菌である *Xylella fastidiosa* においては、O 抗原が植物による認識を遅延させることが示されている (Rapicavoli *et al.*, 2018)。

S. liquefaciens は植物に対して病原性を示さないが、親株や LPS 変異株を植物葉に注入したときの宿主応答の差異を比較することにより LPS の重要性を明らかにできるだろう。また、病原体を検出する技術として、血清学的手法は古くから用いられてきた。グラム陰性細菌において、LPS の O 抗原は、その名の通り主要な抗原である。病原体の血清学的検出という応用研究の過程で蓄積された情報は、宿主-病原体相互作用の解明という基礎的研究の基盤になり、今後も推進すべき研究領域であろう。これらの研究を通

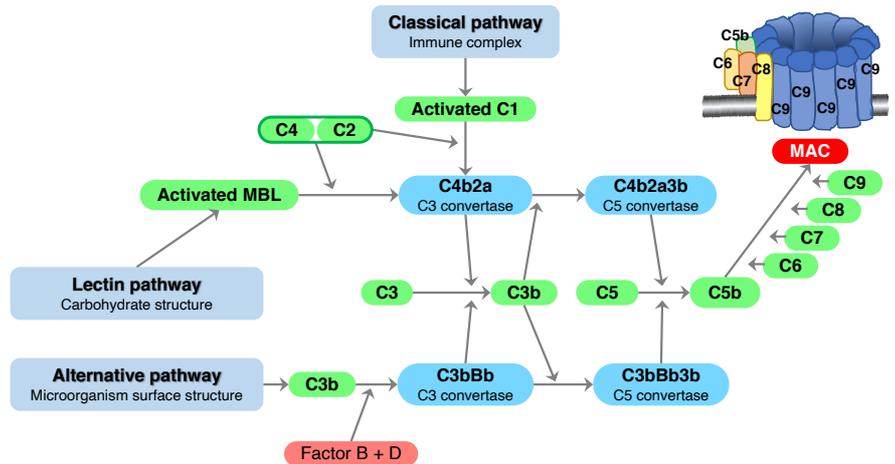


Fig. 10. Complement activation pathways. Adapted from Rother *et al.* (2007)

して、動物および植物の自然免疫の共通性や Cross-kingdom pathogen に関する知見が深まるのではないだろうか。またそのような研究において、動物モデルとして「使いやすい」カイコを活用できるものとする。

おわりに

本発表では、微生物の植物宿主と動物宿主に対する共通の病原性発現機構における研究について、感染モデル生物であるカイコの利活用を提案した。この他に、植物病理学におけるカイコの重要な活用例として、生物的防除素材の安全性試験が挙げられる。多数の候補株の安全性試験において哺乳類を用いて実施するのは困難である。病原細菌の哺乳類とカイコへの病原性との間に相関があるため、我々は土壌から分離した生物的防除素材の候補菌株の安全性試験にカイコを使用している（井上ら，2021）。

植物病理学を専門とする研究室にとって、哺乳類を使った動物実験は手軽にできるものではないだろう。研究過程において、動物実験の必要性が出た時に、カイコを使えないだろうか、と一考していただければ幸いである。

引用文献

- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P., Filloux, A. and Voulhoux, R. (2010) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int. J. Med. Microbiol.* 300: 534-543.
- Chieda, Y., Iiyama, K., Lee, J.M., Kusakabe, T., Yasunaga-Aoki, C. and Shimizu, S. (2011) Virulence of an exotoxin A-deficient strain of *Pseudomonas aeruginosa* toward the silkworm, *Bombyx mori*. *Microb. Pathog.* 51: 407-414.
- Corbett, D., Hudson, T. and Roberts, I.S. (2010) In Prokaryotic cell wall compounds: structure and biochemistry (Helmut, K., Harald, C. and Ajit, V. eds.), pp. 111-132, Springer Berlin, Heidelberg.
- Egami, I., Iiyama, K., Zhang, P., Chieda, Y., Ino, N., Hasegawa, K., Lee, J.M., Kusakabe, T., Yasunaga-Aoki, C. and Shimizu, S. (2009). Insecticidal bacterium isolated from an ant lion larva from Munakata, Japan. *J. Appl. Entomol.* 133: 117-124.
- Erbs, G., Molinaro, A., Dow, J.M. and Newman, M.A. (2010) Lipopolysaccharides and plant innate immunity. *Subcell Biochem.* 53: 387-403.
- Feldman, M.F., Wacker, M., Hernandez, M., Hitchen, P.G., Marolda, C.L., Kowarik, M., Morris, H.R., Dell, A., Valvano, M.A. and Aebi, M. (2005) Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 3016-3021.
- Figaj D, Ambroziak P, Przepiora T and Skorko-Glonek J. (2019) The role of proteases in the virulence of plant pathogenic bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 672.
- García-González, T., Sáenz-Hidalgo, H.K., Silva-Rojas, H.V., Morales-Nieto, C., Vancheva, T., Koebnik, R. and Ávila-Quezada, G.D. (2018) *Enterobacter cloacae*, an emerging plant-pathogenic bacterium affecting chili pepper seedlings. *Plant Pathol. J.* 34: 1-10.
- Guan, S., Clarke, A.J. and Whitfield, C. (2001) Functional analysis of the galactosyltransferases required for biosynthesis of D-galactan I, a component of the lipopolysaccharide O1 antigen of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 183: 3318-3327.
- Hsieh, P.F., Lin, T.L., Yang, F.L., Wu, M.C., Pan, Y.J., Wu, S.H. and Wang, J.T. (2012) Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess. *PLoS One* 7: e33155.
- Iglewski, B.H. and Kabat, D. (1975) NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 2284-2288.
- Iiyama, K., Chieda, Y., Lee, J.M., Kusakabe, T., Yasunaga-Aoki, C. and Shimizu, S. (2007) Effect of superoxide dismutase gene inactivation on virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the silkworm, *Bombyx*

- mori*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 1569-1575.
- Iiyama, K., Chieda, Y., Lee, J.M., Kusakabe, T., Yasunaga-Aoki, C. and Shimizu, S. (2008) Virulence of phospholipase C mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 against the silkworm, *Bombyx mori*. Insect. Biotechnol. Sericol. 77: 115-120.
- Iiyama, K., Takahashi, E., Lee, J.M., Mon, H., Morishita, M., Kusakabe, T. and Yasunaga-Aoki, C. (2017) Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 364.
- Iiyama, K., Mon, H., Mori, K., Mitsudome, T., Lee, J.M., Kusakabe, T., Tashiro, K., Asano, S. and Yasunaga-Aoki, C. (2015) Characterization of KfrA proteins encoded by a plasmid of *Paenibacillus popilliae* ATCC 14706^T. Meta Gene 4: 29-44.
- 井上朋美・朝隈萌恵・今村桃華・矢野和孝・松元 賢・土屋健一・飯山和弘・堀田光生・古屋成人 (2021) ショウガ科作物青枯病の発病を抑制する蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の分類学的位置付け. 令和3年度日本植物病理学会大会講演要旨集 p83.
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M. and McClean, S. (2021) *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. Int. J. Mol. Sci. 22: 3128.
- 甲斐原布紗子・飯山和弘・青木智佐・清水 進 (2010) *Serratia liquefaciens* セラリシン様メタロプロテアーゼ遺伝子 *ser1* のクローニング. Entomotech 34: 25-27.
- Kaibara, F., Iiyama, K., Chieda, Y., Lee, J.M., Kusakabe, T., Yasunaga-Aoki, C. and Shimizu, S. (2012) Construction of serralysin-like metalloprotease-deficient mutants of *Serratia liquefaciens* and their virulence in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect. Biotechnol. Sericol. 81: 55-61.
- Kim, S.R., Lee, K.S., Kim, I., Kang, S.W., Nho, S.K., Sohn, H.D. and Jin, B.R. (2003) cDNA sequence of a novel immunectin homologue from the silkworm, *Bombyx mori*. Int. J. Ind. Entomol. 6: 99-102.
- Kirzinger, M.W., Nadarasah, G. and Stavrinides, J. (2011) Insights into cross-kingdom plant pathogenic bacteria. Genes (Basel) 2: 980-997.
- Koizumi, N., Morozumi, A., Imamura, M., Tanaka, E., Iwahana, H. and Sato, R. (1997) Lipopolysaccharide-binding proteins and their involvement in the bacterial clearance from the hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. Eur. J. Biochem. 248: 217-224.
- Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H. and Sato, R. (1999) The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. FEBS Lett. 443: 139-143.
- Kos, V. and Whitfield, C. (2010) A membrane-located glycosyltransferase complex required for biosynthesis of the D-galactan I lipopolysaccharide O antigen in *Klebsiella pneumoniae*. J. Biol. Chem. 285: 19668-19687.
- Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Défago, G. and Haas, D. (1992) Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 1562-1566.
- Macedo-Raygoza, G.M., Valdez-Salas, B., Prado, F.M., Prieto, K.R., Yamaguchi, L.F., Kato, M.J., Canto-Canché, B.B., Carrillo-Beltrán, M., Di Mascio, P., White, J.F. and Beltrán-García, M.J. (2019) *Enterobacter cloacae*, an endophyte that establishes a nutrient-transfer symbiosis with banana plants and protects against the black sigatoka pathogen. Front. Microbiol. 10: 804.
- Maeshima, N. and Fernandez, R.C. (2013) Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3: 3.
- Miyata, K., Maejima, K., Tomoda, K. and Isono, M. (1970a) *Serratia* protease Part I. Purification and general properties of the enzyme. Agri. Biol. Chem. 34: 310-318.
- Miyata, K., Tomoda, K. and Isono, M. (1970b) *Serratia* protease Part III. Characteristics of the enzyme as metalloenzyme. Agri. Biol. Chem. 35: 460-467.
- Morishita, M., Masuda, A., Mon, H., Lee, J.M., Kusakabe, T., Tashiro, K., Yasunaga-Aoki, C. and Iiyama, K. (2019) Identification of an insecticidal toxin produced by *Enterobacter* sp. strain 532 isolated from diseased *Bombyx mori* silkworms. FEMS Microbiol. Lett. 366.
- Nicholson, W.L., Leonard, M.T., Fajardo-Cavazos, P., Panayotova, N., Farmerie, W.G., Triplett, E.W. and Schuerger, A.C. (2013) Complete genome sequence of *Serratia liquefaciens* strain ATCC 27592. Genome Announc.

1: e00548-13.

- Rapicavoli, J.N., Blanco-Ulate, B., Muszyński, A., Figueroa-Balderas, R., Morales-Cruz, A., Azadi, P., Dobruchowska, J.M., Castro, C., Cantu, D. and Roper, M.C. (2018) Lipopolysaccharide O-antigen delays plant innate immune recognition of *Xylella fastidiosa*. *Nat. Commun.* 9: 390.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G. and Ausubel, F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899-1902.
- Regué, M., Izquierdo, L., Fresno, S., Piqué, N., Corsaro, M.M., Naldi, T., De Castro, C., Waidelich, D., Merino, S. and Tomás, J.M. (2005) A second outer-core region in *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 187: 4198-4206.
- Rich, J.J., Kinscherf, T.G., Kitten, T. and Willis, D.K. (1994) Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 176: 7468-7475.
- Rocha, C.L., Coburn, J., Rucks, E.A. and Olson, J.C. (2003) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect. Immun.* 71: 5296-5305.
- Rossignol, M., Basset, A., Espeli, O. and Boccard, F. (2001) NKBOR, a mini-Tn10-based transposon for random insertion in the chromosome of Gram-negative bacteria and the rapid recovery of sequences flanking the insertion sites in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 152: 481-485.
- Rother, R.P., Rollins, S.A., Mojcik, C.F., Brodsky, R.A. and Bell, L. (2007) Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat. Biotechnol.* 25: 1256-1264.
- Sugawara, H., Ohya, A., Mori, H. and Kurokawa, K. (2009) Microbial genome annotation pipeline (MiGAP) for diverse users, abstr S-001, p 1-2. 20th Int. Conf. Genome Informatics, Kanagawa, Japan.
- Szabo, M., Bronner, D. and Whitfield, C. (1995) Relationships between *rfb* gene clusters required for biosynthesis of identical D-galactose-containing O antigens in *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 and *Serratia marcescens* serotype O16. *J. Bacteriol.* 177: 1544-1553.
- 平 詠里加・大埜勝寛・飯山和弘, 青木智佐・李 在萬・日下部宜宏 (2014) プラスミド pNKBORmob を用いた *Serratia liquefaciens* の効率的なトランスポゾン変異株の作出. *Entomotech* 38: 17-20.
- Taira, E., Iiyama, K., Mon, H., Mori, K., Akasaka, T., Tashiro, K., Yasunaga-Aoki, C., Lee, J.M. and Kusakabe, T. (2014) Draft genome sequence of entomopathogenic *Serratia liquefaciens* strain FK01. *Genome Announc.* 2: e00609-14.
- Taira, E., Mon, H., Lee, J.M., Kusakabe, T., Yasunaga-Aoki, C. and Iiyama, K. (2016) Virulence of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Serratia liquefaciens* toward the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotechnol. Sericology* 5: 7-14.
- Takase, H., Watanabe, A., Yoshizawa, Y., Kitami, M. and Sato, R. (2009) Identification and comparative analysis of three novel C-type lectins from the silkworm with functional implications in pathogen recognition. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 789-800.
- Tanaka, H., Ishibashi, J., Fujita, K., Nakajima, Y., Sagisaka, A., Tomimoto, K., Suzuki, N., Yoshiyama, M., Kaneko, Y., Iwasaki, T., Sunagawa, T., Yamaji, K., Asaoka, A., Mita, K. and Yamakawa, M. (2008) A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 1087-1110.
- van Baarlen, P., van Belkum, A., Summerbell, R.C., Crous, P.W. and Thomma, B.P. (2007) Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 239-277.
- Watanabe, A., Miyazawa, S., Kitami, M., Tabunoki, H., Ueda, K. and Sato, R. (2006) Characterization of a novel C-type lectin, *Bombyx mori* multibinding protein, from the *B. mori* hemolymph: mechanism of wide-range microorganism recognition and role in immunity. *J. Immunol.*, 177: 4594-4604.
- Yoshida, N., Oeda, K., Watanabe, E., Mikami, T., Fukita, Y., Nishimura, K., Komai, K. and Matsuda, K. (2001) Protein function. Chaperonin turned insect toxin. *Nature* 411: 44.
- Zerbino, D.R. and Birney, E. (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18: 821-829.

カンキツグリーニング病原細菌における生存戦略

藤原和樹*・藤川貴史*

Fujiwara, K., and Fujikawa, T.

Survival Strategies of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrus plants

Abstract

Many phytopathogenic bacteria enter the host through wounds and stomata and exhibit pathogenicity by colonizing the intercellular spaces and xylem vessels. In contrast, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), which causes citrus greening disease, infects only the phloem. The pathogen has no ability to diffuse themselves and are not transmitted to new hosts except by direct contact with the phloem. On the other hand, when the infection of CLAs is established, the plant suffers from the failure of translocation of nutrients and the reduction of immune functions, resulting in the malformation and discoloration of the tissues in citrus plants. There is no effective treatment to date for the disease. Recently, many studies have made a significant progress in understanding the pathogenicity of CLAs and development of citrus greening disease. This article introduces new insights into the potential role of CLAs pathogenicity and molecular mechanisms behind development of citrus greening disease.

Key words: Citrus greening disease, *Candidatus Liberibacter*, pathogenesis

はじめに

多くの植物病原細菌が宿主の傷口や気孔から侵入し、細胞間隙や導管部で増殖しながら病原性を発揮する。これに対して、カンキツグリーニング病菌は篩部に感染し、植物体内でも外界から隔離された環境でのみ生存できる。自身では拡散する能力は無く、篩部に直接接触する以外に新たな宿主には伝搬されない。一方で、カンキツグリーニング病菌の感染が成立すると、植物では栄養成分の転流不全や免疫や応答機能の低下などが起こり、目視でも確認できるような組織の奇形や変色などの生育不全が認められ、やがて枯死する。これまでに有効な治療法が無いため、カンキツの「不治の病」とされてきた。最近、カンキツグリーニング病菌の病原性に関する基盤的研究が盛んに展開され、宿主—カンキツグリーニング病菌間の相互作用について理解が深まっている。本話題では、カンキツグリーニング病菌の感染生理について、これまでの海外の研究動向もふまえて紹介する。

*農業・食品産業技術総合研究機構植物防疫研究部門 Institute for Plant Protection, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba, Japan, 2-1-18 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8666, JAPAN

1. カンキツグリーニング病とは

カンキツグリーニング病は、1919年に中国で初めて発見され、発病したカンキツ樹の様子が「黄色い龍」のように見えたことから、中国語の英語綴りで Huanglongbing : HLB (黄龍病) と名付けられた (Graca, 1991)。1925年には、福建省の長山地区と越春地区において、本病による果実の成熟不良が観察された (Lin, 1956)。その後、1929年に南アフリカで発生したことを機に、果実の成熟不良による緑色の着果状態を表す “greening” と呼ばれるようになった (Su, 1998)。本病は、生理障害と間違われることが多く、しばしば発生国により呼び名が異なっていたが、現在では Huanglongbing もしくは Citrus greening disease で表記されることが一般的である。本病の発生地域は、世界中で拡大の一途をたどっており、2021年時点で、アメリカや中南米など世界中のカンキツ主要産地を中心に 64 カ国で発生、または発生の疑いがあるとされている。我が国では、沖縄県全域と鹿児島県の奄美群島の一部 (徳之島、沖永良部島、与論島) において、本病の発生が確認されている (Iwanami, 2021)。

カンキツグリーニング病は、篩部に局在するカンキツグリーニング病菌によって引き起こされ、病原体として *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas)、*Ca. L. africanus* (CLaf)、および *Ca. L. americanus* (CLam) の 3 種が知られている (Bove, 2006)。これらのうち、CLas が主要な病原体として南北アメリカやアジアで蔓延している。カンキツグリーニング病菌は、体長わずか 3 ミリメートルのミカンキジラミ (*Diaphorina citri*) が篩部を吸汁する際に虫媒伝搬される (Bove, 2006)。また、感染樹の接ぎ木により、篩部組織の直接的な接触を介しても伝搬される。カンキツグリーニング病に感染すると、無病徴の潜伏期間を経て、葉が黄化し、樹勢の低下により低木や小枝が形成され、果実が未熟化する。感染が重篤化すると、激しい落葉や、季節に関係なく花芽が開花される “flushing”、さらには根の生育抑制が生じ、最終的には枯死する。一方で、亜鉛やマグネシウムといった栄養素の欠乏症と非常に似ているため、本病に特有の病徴を見極めるのが非常に難しいことが知られている。

2. カンキツグリーニング病菌の細菌学的特性

CLas は、ゲノムサイズが約 1300 kbp と小さく、主要な代謝経路を大きく欠損している (Duan et al., 2009; Katoh et al., 2014; Zheng et al., 2015)。CLas と近縁である α -プロテオバクテリア網の細菌群と比較すると、CLas は糖類、脂肪酸、アミノ酸、および二次代謝産物の代謝に関与するほとんどの遺伝子を保有していない。一方で、糖類、脂肪酸、芳香族アミノ酸、ヒスチジン、システインなどのアミノ酸類を人工的に補うことで、*in vitro* での増殖性が向上する (Fujiwara et al., 2018)。また、CLas はゲノム中に ATP トランスロカーゼをコードする遺伝子を保有しており、CLas が宿主のエネルギーを利用し生存していることが示唆されている (Vahling et al., 2010)。そのため、CLas は自身に必要な養分を自らの力では産生できないものの、“エナジーパラサイト”として宿主に依存することで生存を可能にしていると考えられている。

3. 病原細菌の病原性と植物免疫応答

植物病原細菌に対する植物の免疫応答は、リポ多糖や鞭毛構成タンパク質であるフラジ

ェリンなど細菌種間によく保存された分子パターン Microbe/Pathogen Associated Molecular Patterns (MAMPs/PAMPs)を認識することで誘発され、MAMPs-Triggered Immunity (MTI)と呼ばれる。加えて、植物の持つ受容体 disease resistance (R)タンパク質が感染時に病原細菌が植物細胞内に分泌するエフェクタータンパク質を認識することにより活性化する免疫応答が存在し、Effector-triggered immunity (ETI)と呼ばれる。この2つの免疫応答の連携により、潜在的な病原細菌や非病原性の細菌に対しては PTI により広範囲に感染を抑制し、エフェクターを持つ毒性の高い病原細菌に対しては ETI により感染を抑制する。さらに、植物で PTI や ETI が誘発されると、全身獲得抵抗性 (SAR) の活性化につながる防御シグナル伝達経路が活性化する (Jones and Dangl., 2006)。PTI や RTI、SAR の活性化においてサリチル酸 (SA)とその誘導体は、多くの植物種の防御応答において中心的な役割を担っている (An and Mou, 2011; Vlot et al., 2009)。

3-1. カンキツグリーニング病菌の MAMPs/PAMPs

CLas は、植物免疫応答の活性化と SA 合成を誘導する潜在的な PAMPs を保有している (Duan et al., 2009)。これまでに、CLas のフラジェリンタンパク質に起因する PTI が実験的に確認されている (Zou et al., 2012)。Fla タンパク質の植物体における一過性発現は、タバコ植物において細胞死やカロース沈着、植物免疫応答に関連する *BAK 1* と *SGT 1* 遺伝子のアップレギュレーションを誘導する。従って、CLas のフラジェリンは PAMP として作用し、CLas に対する宿主の免疫系を活性化することが示唆されている (Duan et al., 2009; Zou et al., 2012)。一方で、ペプチドグリカンやリポ多糖などの他の PAMPs については、CLas における PTI 誘導との関連は未だ不明である。CLas は、篩部に感染することに特化し、植物の免疫応答を回避する戦略として PTI 誘導を低減させることで、宿主内部での生存を可能にしてきたと推察される。

3-2. カンキツグリーニング病菌の病原性

細菌は、様々な分泌・透過装置を保持しており、外部環境への適応や病原性の発揮に利用されている。細胞内外に分泌される分子のうち、宿主に移行し生理機能や免疫を攪乱する因子はエフェクターと呼ばれる (Jones and Dangl, 2006)。CLas は、病原性に関与するエフェクタータンパク質を送達する分泌系を保有しているが、他の多くの植物病原細菌とは異なり、宿主細胞へのエフェクター移行を促進する *injectisome* である III 型分泌系をコードしていない (Duan et al., 2009)。一方で、CLas は細胞からタンパク質を Sec トランスロコン依存的に細胞外へ分泌する一般的な Sec 分泌系を保有している (Natale et al., 2008)。

CLas は複数の Sec 依存的エフェクター (SDE) をコードしており、いくつかは宿主であるカンキツや媒介虫ミカンキジラミの体内で発現していることが知られている (Thapa et al., 2020)。このうち、*SDE 1* 遺伝子 (CLIBASIA_05315)は宿主で高発現しており、CLas の病原性に深く関与すると考えられている。宿主における CLas 感染と発病に関して、SDE 1 は宿主のパパイン様システインプロテアーゼ (PLCP) の酵素活性を阻害することが実験的に明らかとなっている (Clark et al., 2018)。SDE 1 を発現したトランスジェニックカンキツは、

CLas に対する過敏性応答 (HR) を引き起こす (Clark et al., 2020)。また、タバコ植物を用いた SDE1 タンパク質の一過性発現により、葉の黄化症状やクロロシス、さらにデンプン蓄積の誘導が認められている (Pitino et al., 2018)。PLCP は、植物の病原菌に対する防御応答に関与する主要な役割を担っていることが知られている (Misas-Villamil et al., 2016)。従って、SDE1 の PLCP 活性阻害は、カンキツグリーンング病の発病に寄与していると考えられている。

4. カンキツグリーンング病と老化症状

カンキツグリーンング病に感染したカンキツでは、特有の黄化症状やクロロシスを示すものの、栄養欠乏や老化状態の葉と非常に似ている。植物は、低栄養状態またはストレス下において若い組織に栄養を再配分する生存戦略として、成熟した組織の老化を開始するとされている (Killingbeck, 1996)。植物の老化に関連する *SRGI* 遺伝子や *SENI* 遺伝子は、感染カンキツでは健全カンキツよりも高い発現量を示し (Liao and Burns, 2012; Fu et al., 2016)、*SAG* 遺伝子の発現量は、*SDE 1* 遺伝子の発現量の増加に伴い増加する (Clark et al., 2020)。興味深いことに、いくつかの PLCP は植物の老化に関与する (Liao and Burns 2012)。また、*Arabidopsis thaliana* における *SAG12* は、PLCP をコードし、老化プロセス下の窒素分配を補助する役割が示されている (James et al., 2018)。加えて、SDE1 の作用は、新葉での活性は低く、成育が進んだ葉では活性が高い (Clark et al., 2020)。従って、CLas の感染による葉の黄化症状の発生は、植物の生育年齢に依存し、SDE 1 による PLCP 活性阻害を介した細胞老化プロセスへの関与が推察される。

5. 病原細菌のサリチル酸分解作用による植物免疫応答の抑制

病原細菌は植物の免疫応答を巧みに回避する手段を獲得し感染を成立させる。*Pseudomonas* 属、*Ralstonia* 属、*Bacillus* 属、*Agrobacterium* 属、*Rhizobium* 属、*Sinorhizobium* 属、*Burkholderia* 属などの多くの病原細菌は、ゲノム中に SA を代謝する SA ヒドロキシラーゼをコードする遺伝子を保有している。SA ヒドロキシラーゼは、フラビントタンパク質モノオキシゲナーゼであり、ナフトレン分解経路の構成酵素の一つである。SA ヒドロキシラーゼは、ナフトレン分解能を保有する *Pseudomonas putida* や *P. stutzeri*、*Burkholderia cepacia* で詳しく研究されている (You et al., 1990; Bosch et al., 1999)。これらの細菌では、SA はナフトレンの分解中間体として生産され、SA ヒドロキシラーゼによってカテコールに変換される。トマト青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は植物 SA を分解して、自身を植物免疫応答から保護し、また宿主に対するその病原性を増強することが報告されている (Lowe-Power et al., 2016)。

CLas が感染した宿主では、SA 経路の活性化が誘導される (Nehela et al., 2018)。CLas は宿主の免疫応答を回避する手段として、SA ヒドロキシラーゼをコードする *SahA* 遺伝子 (CLIBASIA_00255) を獲得しており、SA を代謝することで免疫応答を回避していると考えられている (Li et al., 2017)。さらに、SA 存在下で病害抵抗性に関与する pathogenesis-related (PR) タンパク質の発現が優位に低減する。感染樹にカンキツかいよう病菌 *Xanthomonas citri*

を接種すると、健全カンキツとくらべて菌密度が増加する (Li et al., 2017)。一方で、CLas の SA 分解活性を上回り、SA が高濃度で蓄積されていることも知られている (Nehela et al., 2018)。CLas の感染に起因する SA 経路の活性化と不活性化のバランス関係については、感染初期と後期での違いが示唆されている (Li et al., 2017; Clark et al., 2020)。CLas 感染初期では、長期間の無病徴感染が発生することが知られており、この期間において CLas は SA 経路を不活性化することで、宿主体内で定着や増殖を可能にしていると考えられている。対照的に、感染が進むにつれて SA 経路が恒常的に活性化した状態となり、カンキツかいよう病菌を接種しても病斑は進展しない。すなわち、CLas は植物の免疫系が活性化した状態でも感染を成立させ生存している。これについては、CLas が生息する組織部位で部分的に SA 経路を不活性化することで、免疫応答を回避していると推察される。CLas 感染と SA 不活性化との関連については、更なる解析が必要ではあるが、CLas は SA を直接制御し、植物の免疫応答を回避することで、感染を成立させていると考えられている。

おわりに

カンキツグリーンング病を引き起こす CLas の病原性は、植物組織を積極的に破壊するのではなく、植物の免疫応答を攪乱し、また逆に生理作用を巧みに利用することで、植物の篩部という内部組織への感染を可能にしている。CLas は、生存に必須の養分を自身では産生できないため、宿主の養分に大きく依存している。この宿主依存的な特性により宿主との相互作用が行なわれる結果、カンキツグリーンング病が発生する。特徴的な病徴としては、葉の黄化症状や篩部でのデンプン蓄積が挙げられ、これらが CLas エフェクター SDE 1 の作用に起因していることが明らかとなってきた。特に、SDE1 エフェクターの標的である PLCP は、植物の免疫応答の獲得だけでなく、細胞の老化制御に深く関与している。CLas の感染により宿主の養分が吸収され、細胞の老化や生育異常が発生することは、CLas の異名である“エネルギーパラサイト”を象徴する生理異常現象であると言える。

宿主の免疫応答機構では、CLas の感染により PTI や ETI、SAR が誘導される。植物の免疫系を制御する SA は、CLas の感染により蓄積が誘導される。一方で、CLas が直接 SA を制御することで免疫応答を回避していること、また宿主の異なる生育ステージで SDE1 の活性に違いがあることも明らかになっている。これは、カンキツグリーンング病菌が宿主体内で長期間にわたり潜伏状態にあることや、宿主での感染部位が偏在する原因となっていると考えられる。

植物が病原体を認識して植物免疫応答を能動的に誘導することを、病原体の視点で捉えると、病原体によって免疫応答を受動的に誘導させられているとも考えられる。カンキツグリーンング病が発病すると、SA が恒常的に高濃度で蓄積され、免疫系が活性化した状態になる。一見、宿主が CLas を排除している状態にあると考えられるが、仮に CLas が好んで免疫系を誘導していたら、宿主は異常状態を引き起こされていることになる。実際に、植物免疫応答の誘発下であっても、CLas は宿主体中で増殖し、病徴も展開する。今後は、CLas の生化学的性状、植物ホルモンのクロストーク、さらには他のエフェクター因子の働きに着目して研究を展開することで、カンキツグリーンング病の感染生理について、

さらに理解を深めることができると考える。将来的には、病原体の生化学的な特性や毒性機序に基づいたカンキツグリーンング病の治療方法の開発に期待がもたれる。

謝辞

本研究の一部は、イノベーション創出強化研究推進事業（01004A）の支援を受けて実施した。

引用文献

- An, C., and Mou, Z. (2011) Salicylic acid and its function in plant immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 53:412-428.
- Bosch, R., Moore, E. R. B., García-Valdés, E., and Pieper, D. H. (1999) NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J. Bacteriol.* 181:2315-2322.
- Bove, J. M. (2006) Huanglongbing: A destructive newly emerging century old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88:7-37.
- Clark, K., Franco, J. Y., Schwizer, S., Pang, Z., Hawara, E., and Liebrand, T. W. H. (2018) An effector from the Huanglongbing-associated pathogen targets citrus proteases. *Nature Commun.* 9:1718.
- Clark, J. K., Pang, Z., Trinh, J., Wang, N., and Ma, W. (2020) Sec-Delivered Effector 1 (SDE1) of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Promotes Citrus Huanglongbing. *MPMI.* 33:1394-1404.
- Duan, Y., Zhou, L., Hall, D. G., Li, W., Doddapaneni, H., Lin, H., Liu, L., Vahling, C. M., Gabriel, D. W., Williams, K. P., Dickerman, A., Sun, Y., and Gottwald, T. (2009) Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ obtained through metagenomics. *MPMI.* 22:1011-1020.
- Fu, S., Shao, J., Zhou, C., and Hartung, J. S. (2016) Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and two strains of Citrus Tristeza Virus. *BMC Genomics.* 17:349.
- Fujiwara, K., Iwanami, T., and Fujikawa, T. (2018) Alterations of *Candidatus Liberibacter asiaticus*-Associated Microbiota Decrease Survival of *Ca. L. asiaticus* in *in vitro* Assays. *Front. Microbiol.* 9:3089.
- Graca, J.V. (1991) Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:109-136.
- James, M., Poret, M., Masclaux-Daubresse, C., Marmagne, A., Coquet, L., Jouenne, T., Chan, P., Trouverie, J., and Etienne, P. (2018) SAG12, a major cysteine protease involved in nitrogen allocation during senescence for seed production in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 59:2052-2063.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006) The plant immune system. *Nature.* 444:323-329.
- Iwanami, T. (2021) Occurrence and Control of Citrus Greening (Huangkingbing, HLB) in Japan. *JARQ.* in press.

- Katoh, H., Miyata, S., Inoue, H., and Iwanami, T. (2014) Unique features of a Japanese ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ strain revealed by whole genome sequencing. *PLoS One* 9:e106109.
- Killingbeck, K. T. (1996) Nutrients in senesced leaves: Keys to the search for potential resorption and resorption proficiency. *Ecology*. 77:1716-1727.
- Li, J., Pang, Z., Trivedi, P., Zhou, X., Ying, X., Jia, H., and Wang, N. (2017) ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Encodes a Functional Salicylic Acid (SA) Hydroxylase That Degrades SA to Suppress Plant Defenses. *MPMI*. 30:620-630.
- Liao, H. L., and Burns, J. K. (2012) Gene expression in *Citrus sinensis* fruit tissues harvested from huanglongbing-infected trees: Comparison with girdled fruit. *J. Exp. Bot.* 63:3307-3319.
- Lin, K. H. (1956) Observation of yellow shoot on citrus. *Acta Phytophylacica Sinica*. 2:237-242.
- Lowe-Power, T. M., Jacobs, J. M., Ailloud, F., Fochs, B., Prior, P., and Allen, C. (2016) Degradation of the plant defense signal salicylic acid protects *Ralstonia solanacearum* from toxicity and enhances virulence on tobacco. *MBio* 7:e00656-16.
- Misas-Villamil, J. C., Hoorn, R. A. and Doehlemann, G. (2016) Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. *New Phytol.* 212:902–907.
- Nehela, Y., Hijaz, F., Elzaawely, A. A., El-Zahaby, H. M., Killiny, N. (2018) Citrus phytohormonal response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* and its vector *Diaphorina citri*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 102:24-35.
- Natale, P., Brüser, T., and Driessen, A. J. M. (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1778:1735-1756.
- Su, H. J. (1998) Epidemiological review on citrus greening and viral diseases of citrus and banana with reference to disease free nursery system. *Horti. Sci. (Prague)*. 34:159-166.
- Thapa, S. P., De Francesco, A., Trinh, J., Gurung, F. B., Pang, Z., Vidalakis, G., Wang, N., Ancona, V., Ma, W., and Coaker, G. (2020) Genome-wide analyses of *Liberibacter* species provides insights into evolution, phylogenetic relationships, and virulence factors. *Mol. Plant Pathol.* 21:716-731.
- Vahling, C. M., Duan, Y., and Lin, H. (2010) Characterization of an ATP Translocase Identified in the Destructive Plant Pathogen “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *J. Bacteriol.* 192:834-840.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., and Klessig, D. F. (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:177-206.
- You, I. S., Murray, R. I., Jollie, D., and Gunsalus, I. C. (1990) Purification and characterization of salicylate hydroxylase from *Pseudomonas putida* PpG7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169:1049-1054.
- Zheng, Z., Deng, X., and Chen, J. (2015) Whole-genome sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from Guangdong, China. *Genome Announc.* 2:e00273-14.
- Zou, H., Gowda, S., Zhou, L., Hajeri, S., Chen, G., and Duan, Y. (2012) The destructive citrus pathogen, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ encodes a functional flagellin characteristic of a

pathogen-associated molecular pattern. PLoS One 7:e46447.

ウイルス、アザミウマ類および植物の相互作用の解明と それを活用した防除技術開発

富高保弘*・櫻井民人*・安部洋**

Tomitaka, Y., Sakurai, T. and Abe, H.

Elucidation of interactions among viruses, thrips, and plants and development of control methods based on the interaction

Abstract

Most of plant viruses are transmitted by insects such as aphids, whiteflies, and thrips. Viruses induce chemical and physical changes in the host to efficiently transmit from plant to plant. *Tomato spotted wilt orthotospovirus* (TSWV) causes necrotic yellow and necrosis diseases of vegetables including tomatoes and green peppers, and to flowers such as chrysanthemum and dahlia, and causes economic damage, yield loss, and loss of quality. TSWV is transmitted in a circulative and propagative manner by thrips such as western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*). TSWV has been controlled using the virus resistance genes of the cultivars and by controlling the vector using insecticides. However, the emergence of TSWV that can no longer be controlled using the resistance gene of the cultivars and the development of resistance to insecticides by thrips is a serious problem worldwide. To develop a novel way to control thrips and TSWV, we analyzed the mechanism of the interaction mechanism among virus, insect, and plant. Our results showed that jasmonate (JA) plays an important role in a plant's response and resistance to thrips, and that the JA-regulated plant defense has a negative impact on the performance and preference of thrips. Moreover, the salicylic acid (SA)-regulated plant defense was activated by TSWV infection. On the contrary, the level of JA-regulated plant defense by thrips feeding on TSWV-infected plant was lower. Therefore, our findings revealed that the crosstalk between SA and JA plays an important role in the attractiveness of TSWV-infected plants for western flower thrips. In addition, the attractiveness of TSWV infected plant was still observed on the plant infecting with non-thrips transmitted TSWV, indicating that the transmissibility of TSWV by thrips is not associated with the preference of vector thrips. To develop the novel control method for the thrips and TSWV, we conducted push-pull assay by using TSWV-infected plant and Methyl Jasmonate (MeJA). The results showed that most of the thrips were moved from MeJA-treated plants to TSWV-infected plants. The results also suggested that TSWV-infected plant and MeJA were useful for attractant and repellent for thrips, respectively. However, application of MeJA inhibit plant growth. We therefore chose prohydro-jasmone (PDJ) as repellents for practical use in the field. As the results, the number of the thrips in on PDJ-treated plants were decrease than that of healthy plants. In this presentation, we also introduce the effects of application of PDJ against thrips and other insects.

Key words: orthotospovirus, thrips, attraction, repellent

* 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 植物防疫研究部門

** 国立研究開発法人 理化学研究所バイオリソースセンター

はじめに

農作物に病気を引き起こす植物ウイルスの大部分は、感染と生存を媒介者に依存している (Whitfield et al. 2015)。植物ウイルスを媒介する最大の種類は昆虫であり、最もよく知られている植物ウイルスの媒介昆虫は、アブラムシ類、アザミウマ類、ヨコバイ類、ウンカ類およびコナジラミ類である。ウイルスは、植物から植物への感染を効率的に行うために、感染した宿主植物に化学的および物理的変化を誘導することで、媒介者と宿主の相互作用に影響を及ぼしている (Eigenbrode et al. 2002, Hurd 2003, Belliure et al. 2005)。さらに、植物ウイルスは、媒介昆虫の摂食嗜好性や摂食行動を変化させて伝染効率を高めることで、効率的に拡散できると考えられている (Stafford et al. 2011, Ingwell et al. 2012, Shrestha et al. 2012, Moreno-Delafuente et al. 2013)。

オルトトスポウイルスは、トスポウイルス科オルトトスポウイルス属に分類され、基本的にアザミウマの幼虫によって獲得され、循環、増殖型で媒介される (German et al. 1992)。本ウイルスは、直径約 80~110 nm の球状のエンベロープを有するビリオンを有し、3つの一本鎖 RNA 分節(L、M、および S)から構成されている (Murphy et al., 1995, Jones 2005, Whitfield et al. 2005, Germen et al. 1992) (図 1)。それら分節ゲノムには、細胞間移行タンパク質 (NSm)、RNA サイレンシングサプレッサー活性を有する非構造タンパク質 (NSs)、ヌクレオカプシドタンパク質 (N)、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRP) および膜タンパク質 (G_N/G_C) がコードされている。また、本ウイルスはヌクレオカプシドタンパク質のアミノ酸配列の系統樹に基づいて、Asia と Americas という 2つの主要なグループに分けられる (Pappu et al. 2009)。

オルトトスポウイルスの媒介虫であるアザミウマ類は世界中に広く分布しており、6000 種以上が知られている。そのうち約 1% のアザミウマ類が農業生産に被害をもたらしていると考えられている (He et al. 2020)。

アザミウマ類は、花粉食性、葉食性のような異なる摂食タイプに分類される。我が国においてオルトトスポウイルスを媒介する主要なアザミウマ類は、ミカンキイロアザミウマ (*Frankliniella occidentalis*)、ヒラズハナアザミウマ (*Frankliniella intosa*)、ネギアザミウマ (*Thrips tabaci*)、ミナミキイロアザミウマ (*Thrips palmi*) が知られ、前者 2 種は花粉食性、後者 2 種は葉食性である。

オルトトスポウイルスのうち、世界的に農作物への被害が大きいウイルスとして、トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*, TSWV) とメロン黄化えそウイルス (*Melon yellow spot orthotospovirus*, MYSV) がある。TSWV は、オルトトスポウイルス属のタイプ種であり Americas グループに属し、主にミカンキイロアザミウマによって媒介され、世界中においてトマトやピーマンなどのナス科作物などに感染して黄化えそ病を引き起こし、収量の減少や枯死に至らしめることもある。一方、MYSV は Asia グループ

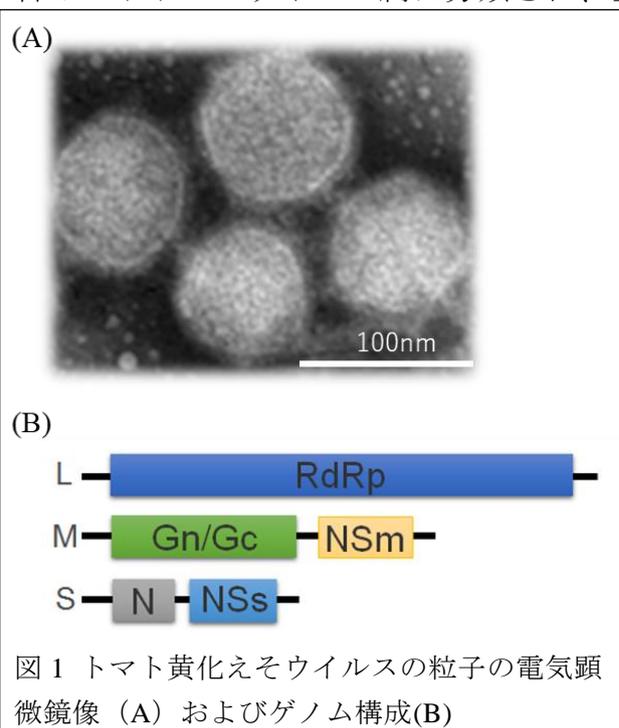


図 1 トマト黄化えそウイルスの粒子の電気顕微鏡像 (A) およびゲノム構成(B)

プに属し、主にミナミキイロアザミウマによって媒介され、キュウリやメロンなどのウリ科作物に感染して黄化えそ病を引き起こし、収量の減少を招いている。

これまでに TSWV と MYSV による農作物の被害の大きさだけでなく、循環・増殖型の媒介様式やゲノムの特徴も合わさり、それらのウイルスは基礎および応用研究の対象として着目され研究が行われてきた。特に、TSWV については、ウイルス自体としての興味だけでなく、植物あるいはアザミウマ類との 2 者間相互作用についても着目され、多くの研究が行われてきた。その後、TSWV、アザミウマ類および植物との 3 者間の相互作用についても着目され、TSWV が感染したピーマンでは非感染植物と比べて、より効率的にミカンキイロアザミウマが誘引されるなどの報告がされてきた (Maris et al. 2004)。一方、我々はウイルス、アザミウマ類および植物の相互作用について着目し、TSWV や MYSV 等のウイルス感染やアザミウマ類による食害に対する植物の応答やアザミウマ類の行動について解析を行ってきた。また、それらの現象をもとに、新たなアザミウマ類およびオルトトスポウイルスの防除技術開発も手掛けてきている。本稿では、ウイルス、アザミウマ類および植物間の相互作用によるウイルスとアザミウマ類の巧みな生存戦略について紹介するとともに、その生物間相互作用を利用したアザミウマ類およびウイルス病の防除技術についても紹介したい。

1. ウイルス、アザミウマ類および植物の相互作用

1.1 アザミウマ類と植物の相互作用

アザミウマ類はウイルスを媒介するだけでなく、それ自身による食害が作物の成長や収量の低下を招くために、農業生産にとって最も重要な害虫の 1 つである。植物の恒常的かつ誘導的な防御応答が植食性昆虫に対する免疫を誘導することが報告されてきたが (Kessler and Baldwin 2002, Howe and Jander 2008, Howe and Schaller 2008)、これまでに植物の分子、代謝および生理学レベルでの研究は、鱗翅目の幼虫 (毛虫) とアブラムシの食害に対する反応に焦点を当てられているだけであった。さらに、毛虫は咀嚼型という様式で植物を食害するが、対照的にアザミウマ類、コナジラミ類やアブラムシ類などの吸汁型の様式で食害する昆虫が宿主植物に機械的な損傷を与えるのは稀であるために、ほとんど解析されてきていなかった。そこで、アザミウマ類に対する植物の防御応答を解析した。シロイヌナズナ (col) を用いて、ミカンキイロアザミウマの食害によって応答する防御関連遺伝子を解析したところ、ジャスモン酸関連遺伝子である VSP2 および CHIB 遺伝子の発現上昇が認められた (Abe et al. 2008)。また、シロイヌナズナのコロナチン非感受性 (coil-1) 変異体を用いてアザミウマによる食害を解析したところ、食害痕が増加することが明らかとなった。一方、ジャスモン酸メチルを処理した col では、ミカンキイロアザミウマによる食害痕が減少した (図 2)。したがって、ミカ

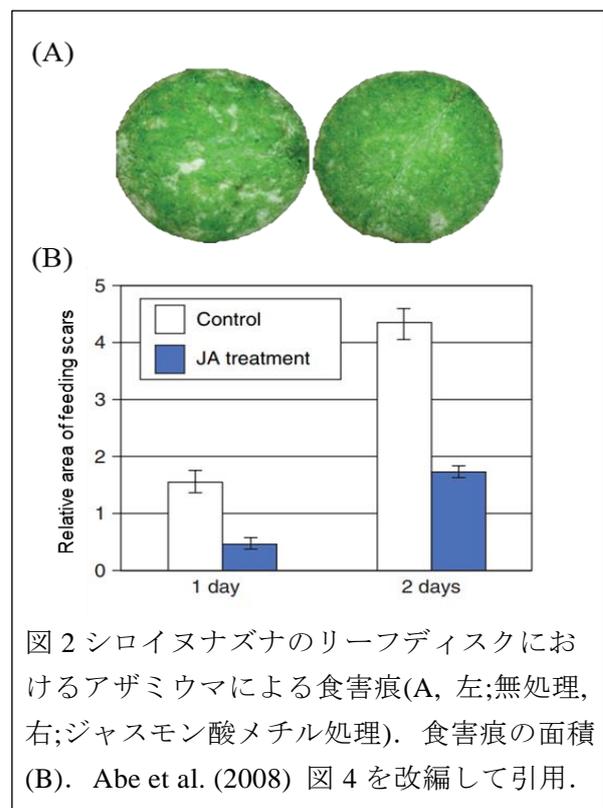


図 2 シロイヌナズナのリーフディスクにおけるアザミウマによる食害痕(A, 左;無処理, 右;ジャスモン酸メチル処理). 食害痕の面積 (B). Abe et al. (2008) 図 4 を改編して引用。

ンキイロアザミウマに対する植物の防御応答には、ジャスモン酸が重要な役割を果たしているということが明らかとなった。これらの結果により、植物は吸汁性の微小昆虫の食害に対しても、毛虫等の咀嚼性害虫に対する応答と同様の反応で防御していることが示された。

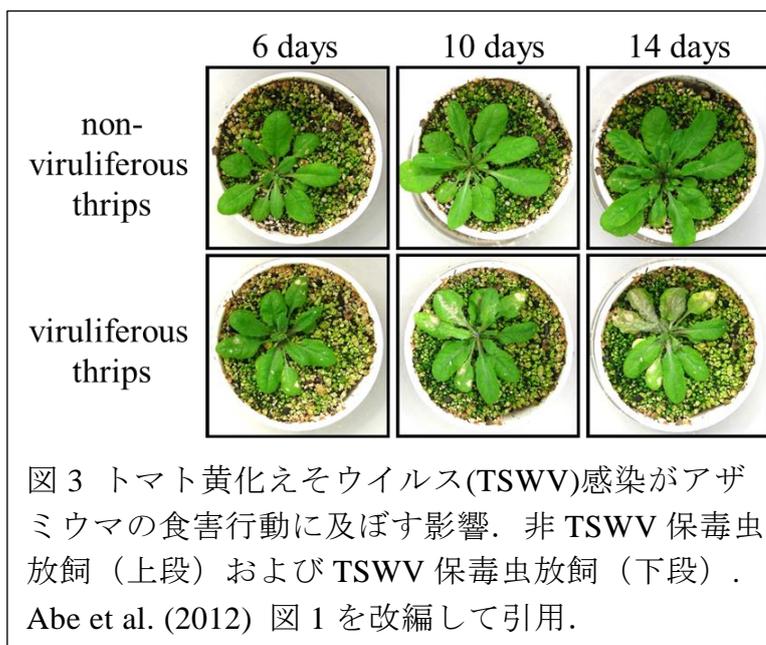
1-2. ウイルス感染がアザミウマ類の行動に及ぼす影響

TSWV は、植物とアザミウマ類の両方に感染することができる。そのため、TSWV の直接的なアザミウマ類への影響と植物を介した間接的なアザミウマ類への影響の両側面から解析が行われてきた。直接的な影響としては、TSWV 保毒虫では非保毒虫と比較して、繁殖成功率が高いことも報告されている(Ogada et al. 2013)。一方、間接的な影響としては、TSWV 感染植物にアザミウマ類が誘引されるとともに、感染植物体上で孵化したアザミウマ類は発育が促進されることが明らかになっている(Maris et al. 2004, Shalileh et al. 2016)。このように、TSWV 感染によるアザミウマ類への正の影響が多く報告されてきている。上述したようにミカンキイロアザミウマが植物を加害した際には、ジャスモン酸を介した防御応答が働き、アザミウマを忌避することが明らかとなっていたが、TSWV 感染植物では、その忌避効果がキャンセルされアザミウマ類が誘引されるということが示唆された。まず初めにシロイヌナズナを用いて TSWV 感染株におけるアザミウマ類の行動を解析した。

TSWV が感染したピーマンでは非染植物と比べて、ミカンキイロアザミウマが高率的に誘引されることが報告されてきたが(Maris et al. 2004)、そのメカニズムについては謎であった。そこで TSWV、ミカンキイロアザミウマおよびシロイヌナズナを用いて、TSWV 感染植物のミカンキイロアザミウマに対する誘引性を解析するとともに、その作用機作を解析した。

TSWV を保毒させたミカンキイロアザミウマ (TSWV 保毒虫) と保毒させていないミカンキイロアザミウマ (TSWV 非保毒虫) をシロイヌナズナ (Colombia) に放飼し、食害痕を経日的に観察した。その結果、TSWV 保毒虫を放飼した植物では日数の経過とともに食害痕が増加した (図 3)。さらに、TSWV 保毒虫を放飼したシロイヌナズナでは、TSWV 非保毒虫を放飼した場合と比べて、次世代の幼虫数が有意に増加した。これは、アザミウマ類の視点で考えると、TSWV 感染植物を加害することによって、個体群の増加に有利に働くと考えられる。一方、TSWV の視点から考えると、TSWV 感染植物にアザミウマ類の幼虫が多く寄生することによって、保毒虫の割合が増加し、アザミウマ類を介して自身の分散の機会を増加させていると考えられる。すなわち、TSWV とミカンキイロアザミウマは win-win の関係にあると推察された。

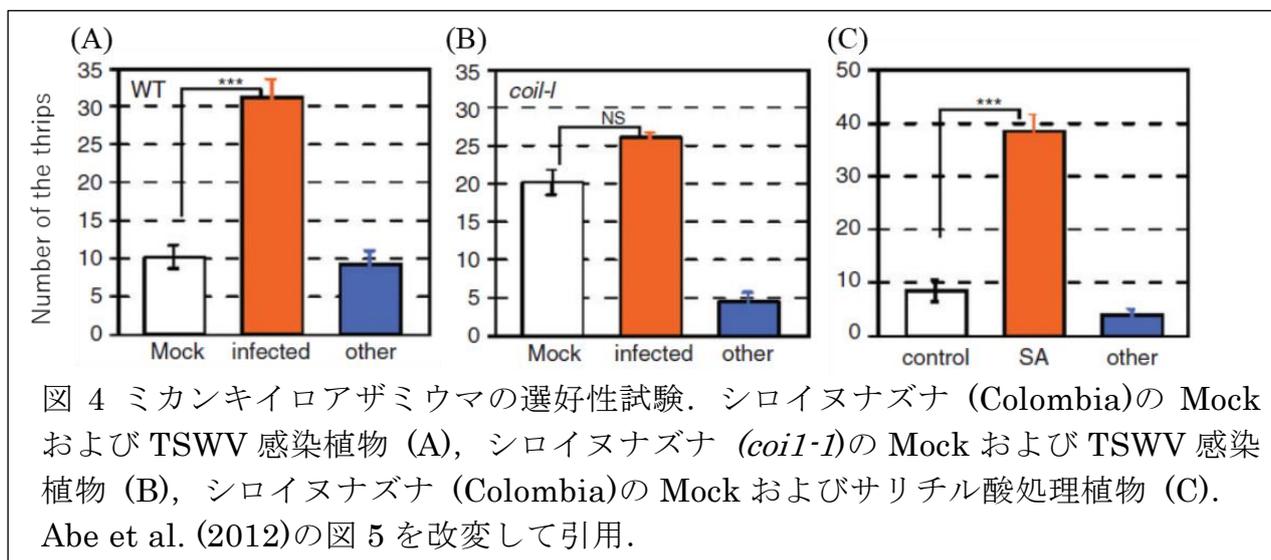
これまでに TSWV、ミカンキイロアザミウマと植物の相互作用には多くの研究の蓄積があるが、MYSV、ミナミキイロアザミウマと植物の相互作用については少なかった。



そこで我々は TSWV、ミカンキイロアザミウマおよび植物間で認められた現象が、異なる遺伝系統に属する MYSV、ミナミキイロアザミウマおよび植物においても適用されるか否かに興味を抱いた。キュウリを用いてミナミキイロアザミウマに対する MYSV の直接的および間接的な影響を解析した。その結果、MYSV 保毒虫は非保毒虫と比べて、すべての発育ステージにおいて差が認められなかった。また、MYSV 感染キュウリに対するミナミキイロアザミウマの誘引性も認められなかった (Adachi et al. 2020)。したがって、ウイルス感染によるアザミウマ類の行動は、ウイルス種、アザミウマ種および植物の組合せによって異なることが示された。これはウイルスおよびアザミウマ種によって拡大戦略が異なることを示唆している。

1-3. ウイルス感染植物に対するアザミウマ類の誘引性の作用機作

TSWV 感染植物に、アザミウマ類が誘引されることは Maris et al. (2004) だけでなく、我々の試験においても明らかとなった。そこで、その作用機作について解析した。初めに、TSWV が感染したシロイヌナズナおよびミカンキイロアザミウマによる食害を受けたシロイヌナズナの防御応答を解析した。TSWV 感染植物ではサリチル酸(SA)シグナル伝達経路の指標遺伝子 (*BGL2* および *PR1*) の発現上昇が認められた。一方、ミカンキイロアザミウマによる食害を受けた植物ではジャスモン酸(JA)シグナル伝達経路の指標遺伝子 (*LOX2* および *VSP2*) の発現上昇が認められた。また、ミカンキイロアザミウマによる食害を受けた TSWV 感染植物では、SA により JA を介した防御応答が抑制され、ミカンキイロアザミウマが誘引されることが明らかとなった。さらに、*coi1-1* 植物を用いたミカンキイロアザミウマの選好性では、誘引効果が失われ、サリチル酸を処理した植物では誘引効果が認められた (図 4)。したがって、植物の SA と JA のクロストークがミカンキイロアザミウマに対する植物の誘引性に重要であることが解明された。



1-4. 非虫媒伝染性ウイルスとアザミウマ類の相互作用

これまでの結果から、TSWV が植物に感染することによるミカンキイロアザミウマの誘引性は、ウイルスと媒介者の両者にとって生存に有利に働いていると考えられた。一方、それらのウイルスと媒介者は特異的な関係を有しているかどうかに興味を持たれた。そこで、ミカンキイロアザミウマの誘引効果における TSWV とミカンキイロアザミウマの相互作用の効果を解析するため、TSWV を植物に接種継代して単一病斑分離を繰り返

し、アザミウマ類で媒介されない TSWV 変異株 (非虫媒性 TSWV) を作出した。初めに、非虫媒性 TSWV 感染植物に対するミカンキイロアザミウマの食害を解析した。その結果、野生型 TSWV 感染植物と同等の食害痕の面積が認められた。さらに、ミカンキイロアザミウマに対する非虫媒性 TSWV 感染植物の誘引性を解析した結果、野生型 TSWV 感染植物と同等にミカンキイロアザミウマを誘引した。次に、非虫媒性 TSWV 感染に対する植物の防御応答を解析したところ、*BGL2* および *PR1* 遺伝子の発現上昇が認められ、野生型 TSWV と同様に植物の SA と JA のクロストークがミカンキイロアザミウマに対する誘引性に関与すると考えられた。したがって、ミカンキイロアザミウマに対する TSWV 感染植物の誘引性には、TSWV とミカンキイロアザミウマの相互作用ではなく、TSWV と植物の相互作用が重要な役割を果たしていることが解明された。なお、本解析において、非媒介 TSWV の遺伝子配列を解読したところ、*Gn/Gc* 遺伝子に多くの変異が認められたことから、それらの変異が TSWV の虫媒介性の欠失に関与していることが推察された。したがって、ウイルスの虫媒能と媒介虫の誘引効果に特異的な関係はないと推察された。

2. ジャスモン酸類を用いたアザミウマおよびオルトトスポウイルスの防御技術の開発

2-1. ジャスモン酸メチル処理植物とウイルス感染植物を用いた push-pull 法によるアザミウマ類の行動制御

近年、アザミウマ類などのウイルス媒介虫の化学農薬に対する抵抗性が発達し、防除が困難となっており、世界的な問題となっている (Jensen 2000)。一方、生物の行動を利用した害虫の行動制御法のひとつとして push-pull 法が知られている。push は害虫に対する忌避効果を、pull は誘引効果を示している。本法を使用することによって、それぞれ単独で使用するよりも、より強く害虫の行動を制御できる方法である (Pickett et al. 2014)。我々のウイルス、アザミウマ類および植物の相互作用の研究から、ジャスモン酸の忌避効果とウイルス感染植物の誘引効果を利用して push-pull 法によるアザミウマ類の行動制御技術が構築できると考えられた。そこで、モデルケースとして *Datura stramonium* を用いて TSWV 感染植物とジャスモン酸メチルを用いて、ミカンキイロアザミウマの行動制御について解析した。試験は、ガラスハウスの中央に健全植物あるいは

ジャスモン酸処理植物を配置し、その周囲に健全植物あるいは TSWV 感染植物を配置させる合計 4 通りの組み合わせでの区を設置して実施した。次に、中央の植物にミカンキイロアザミウマを放飼したの

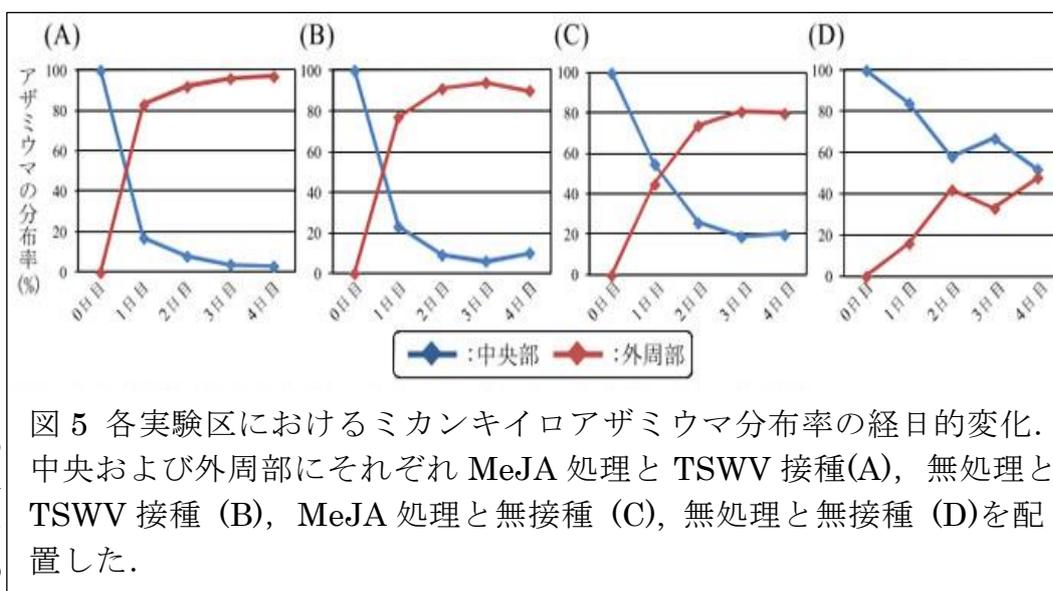


図 5 各実験区におけるミカンキイロアザミウマ分布率の経日的変化。中央および外周部にそれぞれ MeJA 処理と TSWV 接種(A)、無処理と TSWV 接種 (B)、MeJA 処理と無接種 (C)、無処理と無接種 (D)を配置した。

ち、中央および周囲の植物体上のアザミウマ数を計数した。その結果、中央の植物にジャスモン酸メチル(MeJA)を処理し、周囲の植物に TSWV を接種した場合に、最も多くのアザミウマが周囲の株に移動した (図 5)。したがって、TSWV 感染植物と MeJA を用いた push-pull 法はアザミウマ類の行動制御法として有用であることが示された (津田ら、2012)。

2-2. プロヒドロジャスモンを用いたアザミウマ類およびオルトトスポウウイルスの防除

MeJA を処理した植物はミカンキイロアザミウマを忌避することが明らかとなった。しかしながら、MeJA を処理した植物では、生育が極端に抑制されることが明らかとなった。そこで、MeJA よりも植物の生育抑制効果が小さく、アザミウマ類に対する忌避効果を有する物質として、ジャスモン酸の類縁体であるプロヒドロジャスモン (PDJ) の利用が考案された。これまでに PDJ を主成分とする植物成長調整剤、プロヒドロジャスモン液剤 (商品名: ジャスモメート液剤) が上市されており、リンゴなどの果皮の着色促進に利用されていた。そこで、トマトのアザミウマ類を対象とした本剤の利用を目的として研究が進められたところ、本剤を植物に散布することによって、アザミウマ類に対する忌避効果が発揮され、無処理と比較してアザミウマ類の密度が低減することが明らかとなり (図 6) (安部ら、2017)、トマト・ミニトマトのアザミウマ類を対象として農薬登録がなされた。さらに、ピーマンやキュウリなどの野菜類や花き類のアザミウマ類に対する効果や線虫類に対する効果についても解析し、それら作物への本剤の適用拡大について研究が進められている。

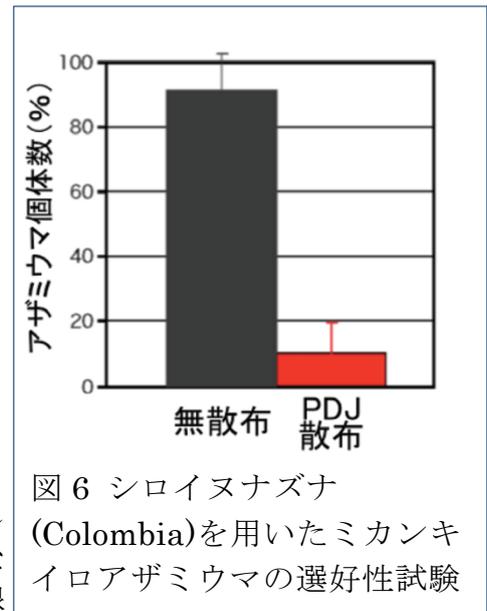


図 6 シロイヌナズナ (Colombia)を用いたミカンキイロアザミウマの選好性試験

おわりに

本稿では、ウイルス、アザミウマ類および植物の相互作用について紹介した。近年、ウイルス、媒介虫および植物の 3 者間の相互作用に関する研究が数多く報告され、ウイルス感染がその媒介虫を誘引するだけでなく、様々な害虫の行動にも影響することが明らかとなり、自然界において多様な生物種が複雑に相互作用しながら生態系が構築されていると考えられている。今後、3 者間の相互作用に関する研究が深化するだけでなく、複数種の生物が織りなす生態系に焦点を当てた研究も発展すると思われる。

オルトトスポウウイルスに関する研究は、これまでに本ウイルスを含めた植物のネガティブセンスの RNA ウイルスの逆遺伝学的手法がなかったために、遺伝子の機能解析は、変異株の作出やリアソータントの作出によって行われてきた (Sin et al. 2005, Tomitaka et al. 2015)。一方、最近、Feng et al. (2020) はマイナス鎖の植物ウイルスでは初めて TSWV の感染性クローンの構築に成功した。これによって、オルトトスポウウイルスのウイルスそのものの研究に加え、アザミウマ類および植物との相互作用の研究の新たな時代が到来し、オルトトスポウウイルス、アザミウマ類および植物の相互作用の研究が、さらに発展していくと思われる。

世界中で化学農薬に対して抵抗性を発達させた害虫の発生が問題となっているなかで、近年、新たな資材の開発とそれを用いた防除法が注目されている。我が国においても、トマト黄化葉巻ウイルスを媒介するコナジラミ類の対策としてグリセリン酢酸脂肪酸エステル乳剤（商品名：ベミデタッチ）が上市されるなど、新たな資材が開発されてきている（Kashima et al. 2015）。本稿で紹介したプロヒドロジャスモンを主成分とするジャスモメート液剤についても最近トマトのアザミウマ類を対象として農薬として登録された。今後は、アブラムシ類やダニ類などウイルス媒介虫に対しても忌避剤が開発、利用されることにより、環境に配慮した持続可能な媒介虫およびウイルス病防除の実現が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始温かく熱心なご指導を頂いた法政大学津田新哉教授（元農研機構中央農業研究センター）に心より感謝の意を表します。また、有意義なご意見等をいただいた農研機構植物防疫研究部門の安達修平博士、久保田健嗣博士、松下陽介博士に感謝申し上げます。また、実験材料の提供などをいただいた理化学研究所バイオリソースセンターの小林正智博士ならびに研究室の諸氏に感謝いたします。本研究成果の一部は、生物系特定産業技術研究支援センターイノベーション創出強化研究推進事業02018C「世界初の制虫技術の確立！害虫忌避力評価システムに基づき野菜・花き類の地上部・地下部を同時に防除」により実施されました。ここに記して、心より感謝の意を表します。

引用文献

- Abe H, Ohnishi J, Narusaka M, Seo S, Narusaka Y, Tsuda S et al.: Function of jasmonate in response and tolerance of Arabidopsis to thrips feeding. *Plant Cell Physiol.*, 2008, 49, 68-80.
- Abe H, Tomitaka Y, Shimoda T, Seo S, Sakurai T, Kugimiya S et al.: Antagonistic plant defense system regulated by phytohormones assists interactions among vector insect, thrips and a tospovirus. *Plant Cell Physiol.*, 2012, 53, 204-212.
- 安部洋, 櫻井民人, 大矢武志, 松浦昌平, 富高保弘, 浅見忠男ら: アザミウマと植物の生物間相互作用とその応用. *植物の生長調節*, 2017, 52, 39-43.
- Adachi-F S, Tomitaka Y, Sakurai T.: Effects of *melon yellow spot orthotospovirus* infection on the preference and developmental traits of melon thrips, *Thrips palmi*, in cucumber. 2020, PLOS ONE, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233722>.
- Belliure B, Janssen A, Maris PC, Peters D, Sabelos MW.: Herbivore arthropods benefit from vectoring plantviruses. *Ecol. Lett.*, 2005, 8, 70-79
- Eigenbrode SD, Ding H, Shiel P, Berger PH.: Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector. *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proc Biol Sci.*, 2002, 269, 455-460.
- Feng M, Chenga R, Chena M, Guoa R, Lia L, Fenga Z et al.: Rescue of *tomato spotted wilt virus* entirely from complementary DNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2020, 117, 1181-1190.
- German TL, Ullman DE, Moyer JW.: Tospoviruses—diagnosis, molecular-biology, phylogeny, and vector relationships. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1992, 30, 315-348.
- He Z, Guo J-F, Reitz SR, Lei Z-R, Wu S-Y.: A global invasion by the thrip, *Frankliniella occidentalis*: Current virus vector status and its management. *Insect Sci.*, 2020, 27, 626-645.
- Howe GA, Jander G.: Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008, 59, 41-66.

- Howe GA, Schaller A.: Direct defenses in plants and their induction by wounding and insect herbivores. In *Induced Plant Resistance to Herbivory* Edited by: Schaller A. New York, Springer, 2008, 7-29.
- Hurd H.: Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annu. Rev. Entomol.* 2003; 48: 141–61. 25.
- Ingwell LL, Eigenbrode SD, Bosque-Perez NA.: Plantviruses alter insect behavior to enhance their spread. *Sci. Rep.*, 2012, 2, 578.
- Jones DR.: Plant viruses transmitted by thrips. *Eur J Plant Pathol.*, 2005, 113, 119-157.
- Jensen SE.: Insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Integr. Pest Manage. Rev.*, 5, 131-146.
- Kessler A, Baldwin IT.: Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, 53, 299-328.
- Kashima T, Kitamura T, Takeda M, Yoshida K, Arimoto Y.: Acetylated glyceride: A novel repellent which interferes with *tomato yellow leaf curl virus* acquisition and its transmission by *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Crop Prot.*, 75, 144-150.
- Maris PC, Joosten NN, Goldbach RW, Peters D.: *Tomato spotted wilt virus* infection improves host suitability for its vector *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology*, 2004, 94, 706-711.
- Moreno-Delafuente A, Garzo E, Moreno A, Fereres A.: A plant virus manipulates the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. *PLOS ONE*, 2013, 8, e61543.
- Murphy FA.: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol.*, 1995, 140, 391-392.
- Ogada PA, Maiss E, Poehling HM.: Influence of tomato spotted wilt virus on performance and behaviour of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*). *J. Appl. Entomol.*, 2013, 137, 488-498.
- Pappu HR, Jones RA, Jain RK.: Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Res.*, 2009, 141, 219-236.
- Pickett JA, Christine MW, Charles AOM, Zeyaur RK.: Push-pull farming systems. *Curr. Opinion in Biotechnol.*, 2014, 26, 125-132.
- 津田新哉, 櫻井民人, 富高保弘, 安部洋, 小林正智.: 植物ホルモン関連物質を処理した忌避植物と植物ウイルスを接種したおとり植物の植栽配置による微小害虫アザミウマ類制御技術, 2012, 特許第 5954702 号.
- Stafford CA, Walker GP, Ullman DE.: Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011, 108, 9350-9355.
- Shrestha A, Srinivasan R, Riley DG, Culbreath AK.: Direct and indirect effects of a thrips-transmitted Tospovirus on the preference and fitness of its vector, *Frankliniella fusca*. *Entomol. Exp. Appl.*, 2012, 145, 260-271.
- Sin SH, McNulty BC, Kennedy GG, Moyer JW.: Viral genetic determinants for thrips transmission of *Tomato spotted wilt virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 5168-5173.
- Shalileh S, Ogada PA, Moualeu DP, Poehling HM.: Manipulation of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by *Tomato spotted wilt virus* (Tospovirus) via the host plant nutrients to enhance its transmission and spread. *Environ. Entomol.*, 2016, 45, 1235.
- Tomitaka Y, Abe H, Sakurai T, Tsuda S.: Preference of the vector thrips *Frankliniella occidentalis* for plants infected with thrips-non-transmissible *Tomato spotted wilt virus*. *J. Appl. Entomol.*, 2015, 139, 250-259.
- Whitfield AE, Ullman DE, German TL.: Tospovirus-thrips interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2005, 43, 459-489.
- Whitfield AE, Falk BW, Rotenberg D.: Insect vector-mediated transmission of plant viruses, *Virology*, 2015, 478, 278-289.

タマネギべと病との闘い

～卵胞子の生態に関して新たに分かったこと～

渡邊 幸子*

Watanabe, S.

Control of onion downy mildew caused by *Peronospora destructor*

～Recent advances in the studies of the basic biology of oospores～

Abstract

This study investigated the possible role of *Peronospora destructor* oospores in the soil as a primary source of onion downy mildew epidemics. Oospores were extracted from the debris of diseased leaves stored outside during the summer season. The resulting oospore suspensions containing fine leaf debris were used for the germination and inoculation experiments in the laboratory. Germination of oospores buried in the soil in cups using membrane filters occurred at approximately 0.5-1.0% rate. The oospore suspensions were buried into artificial culture soil in cups at depths of 2–3 cm or 5.5 cm (near the bottom of the cup) before sowing onion seeds. After raising these plants in cups placed in a growth chamber at 15 °C for more than 40 days, some of the plants showed leaf chlorosis and distortion. The presence of *P. destructor* in symptomatic plants was confirmed by histological observation and species-specific PCR. Thus, we have experimentally demonstrated that the belowground inoculum of *P. destructor* containing germinable oospores causes primary infection. In the belowground part of these diseased plants, intercellular hyphal growth and oospore formation were detected extensively only in specific roots that had grown to the depth of inoculum; these roots were considered to be the primary site of soil-borne infection. In the field experiments, we have also confirmed that *P. destructor* infection of onion plants could be induced by sowing onion seeds or by planting seedlings into soil containing oospore-bearing refuse from mildewed onions.

Key Words: onion downy mildew, *Peronospora destructor*, primary infection, oospore germination, belowground infection.

* 佐賀県農業技術防除センター Saga Prefectural Agriculture Technological Support Center, Kawasoe, Saga, Saga, 840-2205, JAPAN.

はじめに

タマネギべと病は、卵菌類の *Peronospora destructor* によって引き起こされ、世界各国のタマネギに発生する重要病害である。タマネギの作付面積が北海道に次いで全国第2位の佐賀県では、秋播きの作型で、早晚性の異なる品種を組み合わせた栽培が盛んであるが、近年、べと病が多発生傾向にある。特に、本病が大発生した2016年産タマネギでは、中晩生品種を中心に甚大な被害を受け、記録的な不作となった(善・菖蒲, 2017)。

タマネギべと病の的確な発生予察、防除を行ううえでは、本病菌の生態解明を進める必要がある。本病菌は、卵胞子によって一次伝染し、分生胞子によって二次伝染すると考えられているが、特に卵胞子の生態には不明な点が多い。例えば、卵胞子の発芽については、Mckay (1957) や高橋ら (1958) が確認しているものの、その後60年間余り、再現の報告がない。また、いずれも、水中での発芽観察が主であり、より圃場条件に近い土中での発芽データの報告はない。さらに、卵胞子の接種系については、Jones (1897) や塩飽・松尾 (1972) が、卵胞子を含む本病の罹病残渣をすき込んだ土壌でタマネギを育成して、べと病の発病を報告しているものの、実験室内で卵胞子を人工的に接種してタマネギを安定的に発病させることに関しては、これまでのところ明確な報告事例がないようである。

このように、卵胞子の生態に関する基礎的な知見が不足している中、圃場における第一次伝染の実態や、その後の発病消長についても不明な点が残されている。そこで、本講演では、佐賀県農業試験研究センターにおいて行ったこれらに関する試験研究で得られた、いくつかの新たな知見について紹介する。なお、本稿は、渡邊・菖蒲 (2019) をもとに、追加の情報を加筆したものである。

1. 卵胞子の生存期間

Mckay (1957) は、アイルランドの野外でタマネギべと病罹病残渣を保管し、そこから定期的に卵胞子を抽出して、発芽状況を調べた。その結果、卵胞子の生存期間は、最大で25年間に及ぶことを報告している。このように、耐久体である本病菌卵胞子は、長期間の生存が可能とされているが、日本国内における実態は不明である。

そこで、2018年5月に佐賀県内のタマネギ栽培圃場から、べと病によって枯死した葉を採取し、各種条件で保管した。その後、保管した枯死葉から定期的に卵胞子

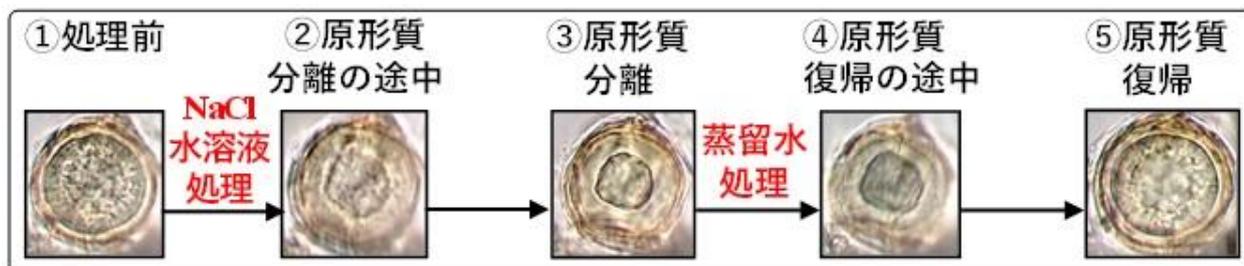


図1. 高張液中での「原形質分離と復帰」を指標とした卵胞子の生死判別

塩化ナトリウム(NaCl)水溶液中で原形質分離が誘導され(①~③)、かつ、蒸留水処理によって原形質復帰した(③~⑤)タマネギべと病菌卵胞子。

を抽出した。抽出法はエンドウベと病菌の手法 (Van der Gaag and Frinking, 1996) を参考にしたが、葉をミルサーで破砕すると卵胞子の生存率が低下することが予備調査で明らかになったことから (データ略)、本研究では葉は人力によって破砕した (後述の卵胞子の発芽試験、接種試験についても同様)。卵胞子の生存率は、ハウレンソウベと病菌における「原形質分離と復帰」を指標とした手法 (Kunjeti *et al.*, 2016) で調べた。すなわち、塩化ナトリウム水溶液中で原形質分離が誘導され、かつ、蒸留水処理によって原形質復帰したものを (図 1)、生存卵胞子として調査した。

その結果、「5°Cや15°Cで恒温 (乾燥) 保管」した卵胞子の生存率は、半年経過しても全く低下しなかった一方で、「室温保管」「野外地表面静置」「土中埋設」の卵胞子の生存率は、春～秋にかけて大きく低下した (図 2)。乾燥保管では生存率が低下しない一方で、土中で保管した卵胞子の生存率が約半年で大きく低下した点は、エンドウベと病菌卵胞子における生存率の推移 (Van der Gaag and Frinking, 1997a) とほぼ一致した。本研究における野外でのタマネギベと病菌卵胞子の生存期間は、Mckay (1957) の報告より短い可能性が高いが、単年の試験であるので、今後も再現性を確認する必要がある。なお、草場・川邑 (2019) も、「原形質分離」を指標とした卵胞子の生存率推移の調査を 2017 年に行っており、土壌中への埋設によって、30 週間後までに生存率が大きく低下することを報告している。

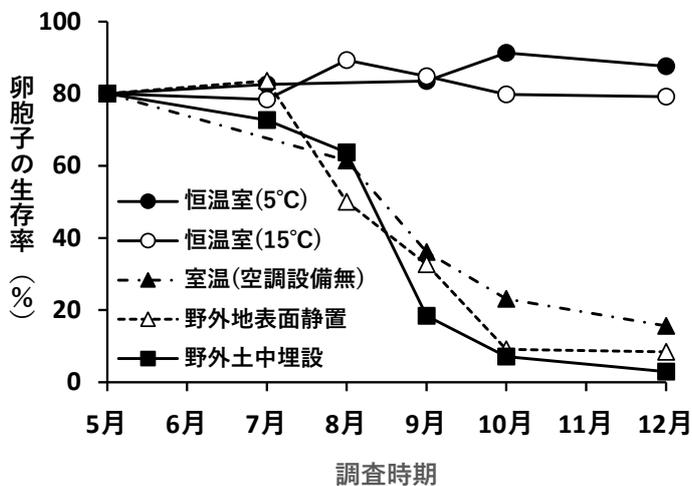


図 2. タマネギベと病菌の卵胞子の生存率の推移 (2018 年)

各月のサンプルの調査日は異なる (例えば 9 月の調査日は 5°C 保管が 18 日、15°C 保管が 10 日)。5 月の卵胞子抽出時だけ粉碎機 (ミルサー) を使用したが、その後の実験で粉碎機によって生存率が約 20% 低下することが判明した。よって 5 月の生存率は、この点を考慮して補正した。なお、5 月は、室内保管区の調査しか行っていないが、これを各区共通の試験開始時の生存率とみなして図示した。

2. 卵胞子の発芽と感染能力

Mckay (1957) は、前述の野外で保管したタマネギベと病罹病残渣 (時間経過とともに微生物分解等により粉状に変化) から卵胞子を抽出し、発芽状況を調べた。その結果、少なくとも 2~3 年、多くは 4 年以上保管した残渣から抽出した卵胞子において、発芽を確認した。このことから、卵胞子が感染能力を獲得するには、4 年以上の成熟期間が必要であると考察している。

本研究では、前述の 2018 年 5 月に野外の地表面付近に静置したタマネギベと病罹病残渣 (時間経過とともに黒化し、粉状に変化) から、同年の 7 月に卵胞子を抽出した。さらに、ソルガムベと病菌卵胞子の発芽調査手法 (Pratt, 1978) を参考とし、卵胞子をメンブレンフィルターで挟み、カップの底付近の内面に貼り付けると

ともに（接種）、カップ内に人工培土を充填し、タマネギを播種し、15℃恒温条件で管理した（試験 1）。その結果、8 月には卵胞子の発芽と考えられる現象を確認した（図 3）。メンブレンフィルター内には約 500～1000 個の卵胞子が滴下されており、そのうちの少なくとも 5 個以上の卵胞子について、発芽と考えられる現象を確認したため、発芽率は 0.5～1%程度と考えられる。さらに、9 月にはカップ内で生育した本葉 1～2 葉期のタマネギ苗 16 株のうち 4 株が、葉の黄化・湾曲症状を呈してべと病を発病した（表 1）。これらの症状は、圃場での一次感染株の症状（Yarwood, 1943; 高津ら, 1957; 出水, 1963）と一致していた。なお、病徴を示した苗の組織内に *P. destructor* が存在することは、種特異的 PCR による検出（Fujiwara *et al.*, 2021）と、高湿度条件下でのべと病菌の分生胞子形成等により確認した（データ略）。

一方、卵胞子の無接種区では、発病しなかった（表 1）。9 月には、前述の罹病残渣から取り出した卵胞子の抽出液をカップ内の底付近に灌注（接種）し、人工培土を充填してタマネギを播種し、15℃恒温条件で管理した（試験 2）。その結果、11 月にはカップ内で生育した本葉 1～2 葉期のタマネギ苗 35 株のうち 8 株が、発病した（表 1、図 4）。

このように、本研究において、タマネギべと病菌の卵胞子液の接種により、実験室内で一次感染および発病を再現することに、初めて成功した。他のべと病菌では、ポピーべと病（Montes-Borrego *et al.*, 2009）、エンドウべと病（Van der Gaag and Frinking, 1997b）、ソラマメべと病（Van der Gaag and Frinking, 1997c）、ソルガムべと病（Schuh *et al.* 1987）、トウジンビエべと病（Shetty *et al.*, 2016）において、罹病残渣や汚染土を地下部の接種源として、制御条件下での発病を再現したと報告されている。

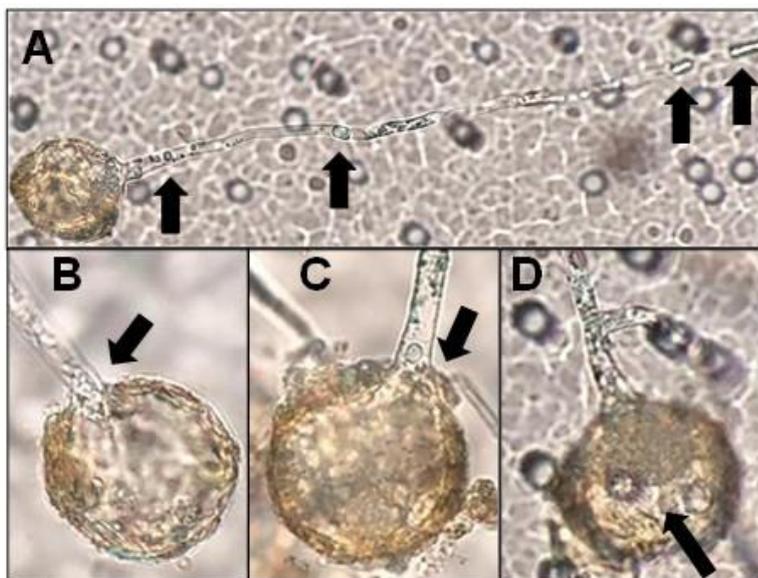


図 3. タマネギべと病菌卵胞子の発芽と考えられる現象

各矢印は、べと病菌の卵胞子発芽の特徴（Pratt, 1978）を示す。

A: 古い発芽管は、細胞質が途切れ途切れとなり、数珠状の形状を有する。

B、C: 発芽管は、卵胞子内部から卵胞子壁を貫通する。

D: 細胞質が発芽管に流れ出すにつれ、発芽管の反対側の卵胞子内部から、空洞化が進行する。

なお、A、D に小さく丸く写っているものは、メンブレンフィルターに空いている 8μm 径の円筒状孔。

表1. 卵胞子の接種、発芽観察、発病調査の概要 (2018年夏～秋)

試験 (接種)	卵胞子液の接種			タマネギ 播種・ 管理温度	卵胞子の発芽 (接種後日数)	苗の発病 (初発日の 接種後日数)	
	タマネギ罹病 葉の管理 ^{注1)}	卵胞子抽出 および接種	接種方法				接種位置 (地表面下)
1 (有)	5/21～ 7/30野外	7/30	メンブレン ^{注2)}	2～3cm	15℃	○ ^{注4)} (19日)	○ (50日)
1 (無)	—	—	—	—	15℃	—	×
2 (有)	5/21～ 9/26野外	9/26	灌注 ^{注3)}	5.5cm	15℃	未調査	○ ^{注5)} (41日)

注 1) 5/21 に、タマネギ圃場からべと病で枯死した葉を採取し、野外地表面に静置(図 3 の△に対応)。
 注 2) メンブレンフィルターで挟み、土壤中に接種。注 3) 卵胞子抽出液を灌注。注 4) 回収したメンブレンフィルターに残存していた卵胞子を調査し、発芽と考えられる現象を確認(図 3)。注 5) 図 4 参照。

これらの室内試験とは別に、タマネギ圃場からべと病によって枯死した葉を 2017 年春に採取し、同年春にタマネギ栽培歴がない別の圃場にすき込み、その圃場で秋からタマネギ栽培を開始したところ、初年目の栽培 (2017 年冬～2018 年春) から一次感染株が発生した (データ略)。以上のことから、佐賀県においては、春に野外で形成されたタマネギべと病菌卵胞子は、秋にかけて生存率が大きく低下する一方で (図 2)、一部は夏～秋に感染能力を有した状態で (表 1)、当年のうちに一次伝染源になると考えられた。この点は、Mckay (1957) の報告 (感染能力の獲得には 4 年以上必要) とは異なった。

なお、Van der Gaag and Frinking (1997d) は、エンドウべと病菌卵胞子において、実験室で保管した乾燥葉上の卵胞子は発芽せず、野外の自然条件下で保管した卵胞子が発芽することを確認している。そのうえで、卵胞子が発芽および感染能力を獲得するには、一定期間の自然風化 (暴露) が必要であると考察している。Jang and Saffeulla (1990) も、ダイコンべと病菌卵胞子において、罹病葉中に形成されて間もない新しい卵胞子に比べて、1 年間野外で保管した罹病葉中の卵胞子では、感染能力が高まることを確認している。Mckay (1957) や筆者も、野外の自然条件下で保管したタマネギべと病罹病残渣から卵胞子を抽出し、発芽試験や接種試験に用いている。

罹病残渣の保存条件と、そこから抽出した卵胞子を接種した場合のタマネギの感染・発病との関係については、今後も追試を行っていく予定である。

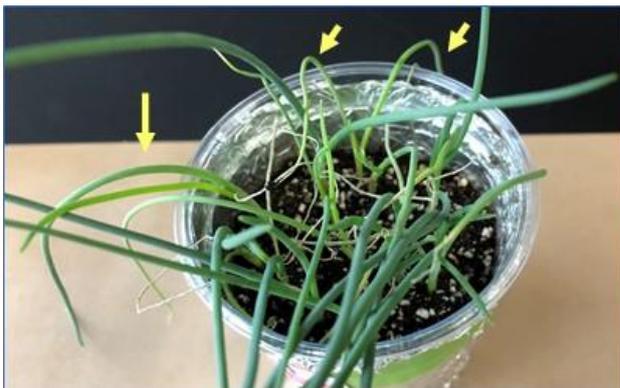


図 4. タマネギべと病菌卵胞子の土壌接種により発病したタマネギの幼苗

矢印で示した部分では、葉が黄化し湾曲するべと病特有の症状を示した。

3. 卵胞子の形成

タマネギべと病菌は、罹病したタマネギの組織内に卵胞子を形成する。高橋ら（1958）は、収穫期の枯死葉で卵胞子の形成が顕著であると報告しており、事実、佐賀県内のタマネギ圃場でも同様の現象が広く観察されている。一方で、Mckay（1957）は、タマネギの苗（young plants）の段階でも葉に卵胞子が形成されるとした。また、塩飽・松尾（1972）は、卵胞子が越年罹病株（一次感染株）の葉だけでなく、褐変した根の一部にも少量形成されると報告している。

本研究において、前述の人工培土を用いた卵胞子の接種試験（表1の試験2に準じ、土壌中に灌注）を、2018年秋～冬に繰り返し行ったところ、いずれの試験でも、本葉1～2葉期の苗の一部が発病し、各発病苗の葉と根の組織内には、菌糸の伸長とともに、多数の卵胞子が観察された（図5）。また、成熟した卵胞子だけでなく、受精中の卵胞子や、蔵卵器内で形成途中の卵胞子も高頻度で確認されたことから、これらの卵胞子は、発病苗の組織内で新たに形成されたと考えられた。卵胞子の形成は、地上部では、子葉と第1葉の基部付近に顕著に認められた。地下部では、一部の根に特異的かつ豊富に認められた。なお、卵胞子が形成された根に褐変等の症状はなく、見かけ上は健全であり（図5）、塩飽・松尾（1972）の報告と異なった。古田・井手（2021）の最近の研究では、筆者らと同様の手法による人工培土を用いた卵胞子の接種試験で、タマネギ苗を経時的に調査した結果、地上部よりも根で先行して卵胞子が形成されたとしている。この点については、本研究で、卵胞子が一部の根に特異的かつ豊富に形成された点と合わせて、「その伝染源としての役割」や「卵胞子のタマネギへの侵入経路との関連性」等、様々な観点から今後も検討が必要である。

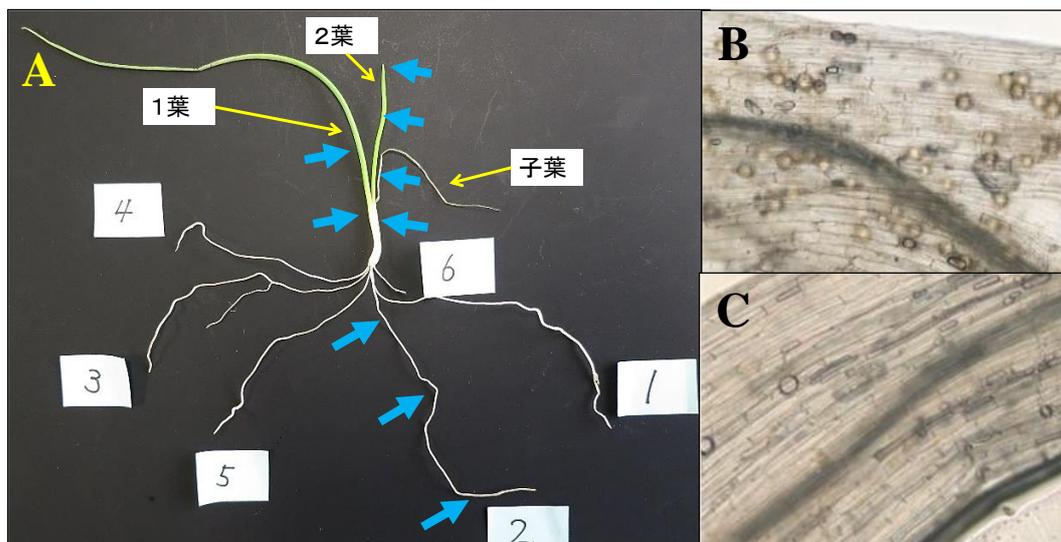


図5. タマネギべと病菌卵胞子の土壌接種によって発病した株に形成された卵胞子

- A: 卵胞子を接種した人工培土で育苗し、べと病を発病した株。青色矢印は、卵胞子の形成を確認した部位を示す。
- B: 卵胞子が形成された根（Aの根2）
- C: 卵胞子が形成されていない根（Aの根4）

4. 苗床での第一次伝染とその後の発病状況

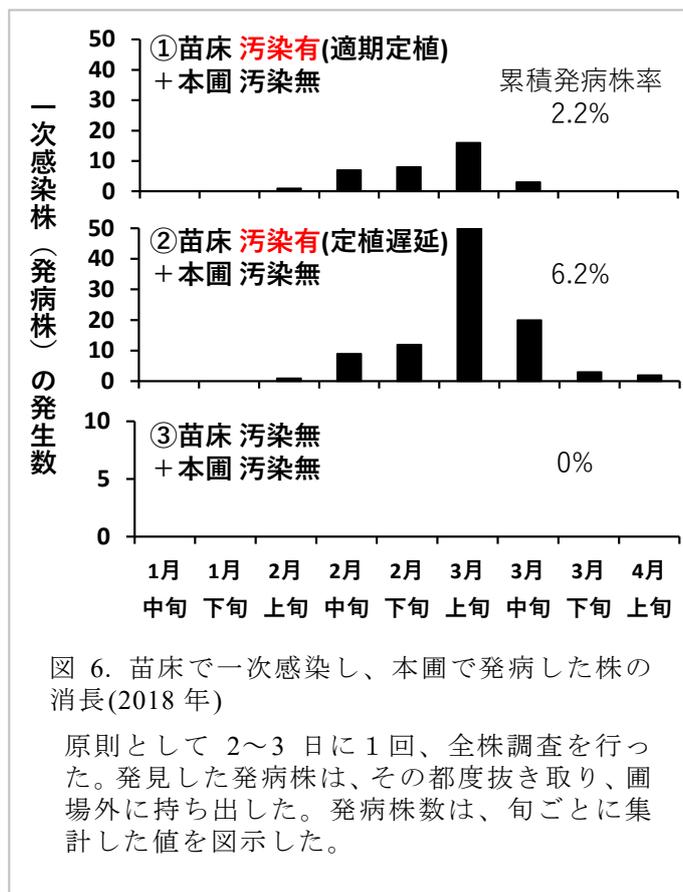
タマネギべと病菌卵孢子による苗床での第一次伝染に関しては、育苗期間中に感染した株の多くは、本圃に定植後、年を越してから発病することが知られている。一次感染株（発病株）は、葉身が黄化・湾曲した全身症状を呈する。発病時期や症状の特徴から、「越年罹病株」「全身感染症状株」などとも呼ばれる。条件が整うと、一次感染株（発病株）上に分生胞子が多数形成され、これが重要な二次伝染源となる。

このように、苗床での感染から発病に至るおおまかな経過は明らかにされているものの、苗床感染による発病時期の詳細や、育苗期間と発病との関係は不明である。そこで、本研究では 2017 年春に、べと病に罹病したタマネギ収穫残渣を苗床予定地にすき込み、その後、タマネギを播種して育苗した。さらに、育苗日数を変えて、クリーンな本圃に定植し、苗床感染株の発病状況を調査した（表 2）。

表2. 苗床感染を想定した試験の概要

試験区	感染場所	苗床 (2017年)				本圃 (2017~18年)		
		5-6月 罹病残渣 すき込み	播種 (品種)	育苗 期間	育苗 方法	5-6月 罹病残渣 すき込み	定植	株数
① 苗床感染 (適期定植)	苗床	○	9/28 (ターザン)	60日	地床	×	11/27	1,580
② 苗床感染 (定植遅延)				78日			12/15	1,572
③ 無感染	無し	×	9/27 (ターザン)	61日	高設棚(購入培土)	×	11/27	469

その結果、慣行の育苗期間である 60 日育苗区（適期定植）では 2018 年 2～3 月に、78 日育苗区（定植遅延）では同年 2～4 月に、本圃において断続的に、一次感染株（越年罹病株）が発生した（図 6）。発病株は、60 日育苗区より 78 日育苗区の方が多かった（図 6）。一方で、苗床に罹病残渣をすき込まない対照区では、全く発病しなかった。以上のことから、苗床で感染した苗をクリーンな本圃に定植した場合、翌年 2～4 月に断続的に発病すること、育苗期間が長引くと（定植遅延）、苗床での感染リスクが高まり、その後のべと病の発生が多く、発病期間も長引くことが明らかになった。ただし、この事例は、あくまでも 2018 年産タマネギでの結果であり、気象条件が異なる複数年次での評価が必要である。



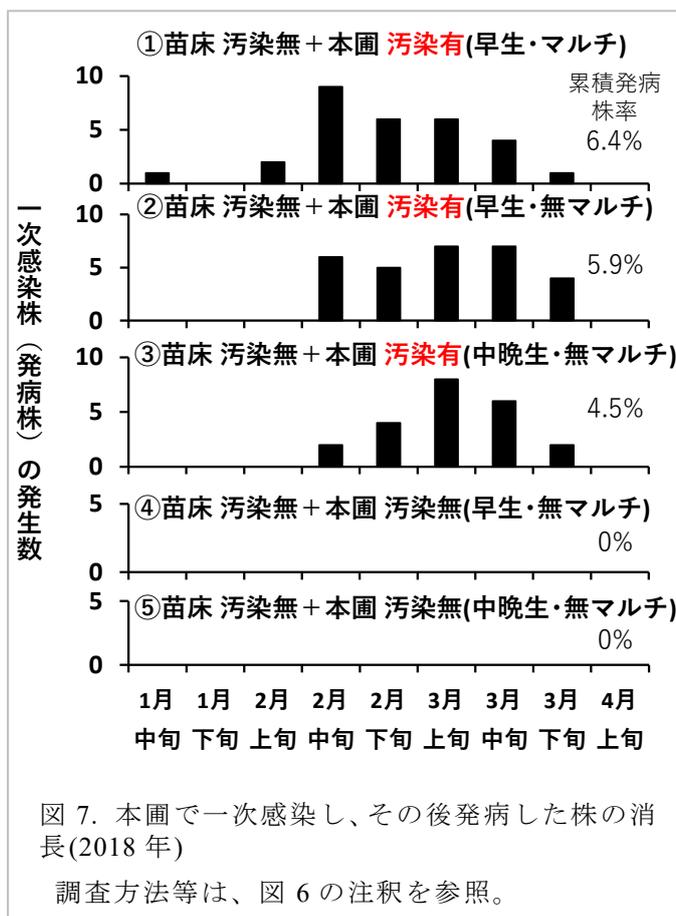
5. 本圃での第一次伝染とその後の発病状況

タマネギベと病菌卵胞子による第一次伝染は、苗床だけでなく、定植後の本圃でも起こると考えられてきた。しかし、その科学的根拠は、過去に行われた小規模なポット試験のみで、実態については不明な点が多い。そこで、2017年春に、べと病に罹病したタマネギ収穫残渣を本圃予定地にすき込み、健全苗を定植して、発病状況を調査した(表3)。また、本県のタマネギ栽培においては、早生品種はマルチ栽培、中晩生品種は無マルチ栽培が主体であるが、本圃でのマルチ被覆の有無が一次感染株の発生に及ぼす影響を調べた。

表3. 本圃感染を想定した試験の概要

試験区	感染場所	苗床 (2017年)				本圃 (2017~18年)				
		播種	品種	育苗期間	育苗方法	5-6月 罹病残渣 すき込み	11月 マルチ 被覆	定植	株数	
① 本圃感染(早生・マルチ)	本圃	9/22	七宝早生 7号	60日	高設セル (購入 培土)	○	有り	11/21	454	
② 本圃感染(早生・無マルチ)							無し			492
③ 本圃感染(中晩生・無マルチ)							無し			492
④ 無感染(早生・無マルチ)	無し	9/22	七宝早生 7号	60日		×	無し	11/21	401	
⑤ 無感染(中晩生・無マルチ)							無し			469

その結果、本圃汚染区では、2018年1~3月に一次感染株(越年罹病株)が発生した(図7)。一方で、罹病残渣のすき込みがない対照区では、一次感染株は全く発生しなかった。また、本圃汚染区では、マルチ被覆の有無にかかわらず、一次感染株が発生した(図7)。なお、2015~16年、16~17年に行った試験でも、同様の結果が得られた(データ略、試験は早生品種のみで実施)。以上のことから、本病の第一次伝染は、定植前の苗床だけでなく、定植後の本圃においても、マルチ被覆の有無にかかわらず起こることが実証された。これにより、本病の発生歴のある本圃では、圃場のローテーションや夏期の湛水、定植直後の薬剤散布といった、一次伝染対策の必要性が裏付けられた。



おわりに

タマネギべと病菌は、絶対寄生菌で、人工培養できない。このことが、本病菌の生態解明の障壁の一つとなってきた。今回の研究で、実験室内での卵胞子の土壌接種により、卵胞子の発芽と、タマネギでの一次感染を再現することが可能となった。これが一つの契機となり、今後、卵胞子からタマネギへの侵入経路の詳細や、一次伝染に適した気象条件などの未解明な部分についても、理解が進むことが期待される。そうして得られる知見の集積が、新たな発生予察法や防除法の創出につながっていけば幸いである。

謝辞

本研究の遂行に当たり有益なご助言をいただいた、佐賀大学農学部准教授の草場基章博士、農研機構の藤原和樹博士、田代暢哉博士に厚くお礼申し上げます。また、本研究にご協力いただいた、佐賀県農業試験研究センター 病害虫・有機農業研究担当および農業技術防除センターの職員の皆様に感謝申し上げます。なお、本研究は、生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）」の支援を受けて行った。

引用文献

- 出水忠夫 (1963) タマネギべと病の流行機作ならびに治病に関する研究 大阪農試研報 4: 1-95.
- Fujiwara, K., Inoue, H., Sonoda, R., Kusaba, M., Tashiro, N., and Miyasaka, A. (2021). PCR detection of the onion downy mildew pathogen, *Peronospora destructor* from symptomless onion seedlings and soils. Plant Dis. Advance online publication. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1095-RE>
- 古田明子・井手洋一 (2021). タマネギべと病の一次伝染の卵胞子形成は地上部よりも根で先行する 日植病報 87: 印刷中
- Jang, P., and Safeulla, K.M. (1990). Production and viability of *Peronospora parasitica* in radish. Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Science). 100: 117-122.
- Jones, L.R. (1897). The onion mildew. Vermont Agricultural Experiment Station Annual Report 10:61-62.
- Kunjetti S. G., Anchieta A., Subbarao K. V., Koike S. T. and Klosterman S. J. (2016). Plasmolysis and vital staining reveal viable oospores of *Peronospora effusa* in spinach seed lots. Plant Dis. 100: 59-65.
- 草場基章・川邑菜々美 (2019). タマネギべと病菌卵胞子の土壌中における生存率の推移 九病虫研究会報 65: 5-10
- Mckay, R. (1957). The longevity of the oospores of onion downy mildew. Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society 27: 295-307.

- Montes-Borrego, M., Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A., Muñoz-Ledesma, F.J., and Jiménez-Díaz, R.M. (2009). Role of oospores as primary inoculum for epidemics of downy mildew caused by *Peronospora arborescens* in opium poppy crops in Spain. *Plant Pathology* 58: 1092–1103.
- Pratt, R.G. (1978). Germination of oospores of *Sclerospora sorghi* in the presence of growing roots of host and nonhost plants. *Ecology and Epidemiology* 68: 1606-1613.
- Schuh, W., Jeger, M.J., and Frederiksen, R.A. (1987). The influence of soil temperature, soil moisture, soil texture, and inoculum density on the incidence of sorghum downy mildew. *Phytopathology* 77: 125–128.
- 塩飽邦子・松尾綾男 (1972). タマネギベと病菌の生活環における卵胞子の役割について 兵農研報 20 : 97-100.
- 高橋 実・田中 寛・大石親男 (1958). 玉葱露菌病に関する研究 (第 1 報) 卵胞子の形成並に発芽 日植病報 23: 117-120.
- 高津 覚・遠山 明・西村十郎 (1957). 玉葱露菌病に関する研究 第 1 集. 兵庫農試研報 5: 1-36.
- タマネギベと病防除対策マニュアル (佐賀県農業試験研究センターホームページ)
<http://www.pref.saga.lg.jp/kiji00370267/index.html>
- Van der Gaag, D. J. and Frinking, H. D. (1996). Extraction from plant tissue and germination of oospores of *Peronospora viciae* f.sp. pisi. *Journal of Phytopathology* 144: 57-62.
- Van der Gaag, D. J. and Frinking, H. D. (1997a): Survival characteristics of oospore populations of *Peronospora viciae* f.sp. pisi in soil. *Plant Pathology* 46: 978-988.
- Van der Gaag, D.J., and Frinking, H.D. (1997b). Extraction of oospores of *Peronospora viciae* from soil. *Plant Pathology* 46: 675–679.
- Van der Gaag, D.J., and Frinking, H.D. (1997c). The infection court of faba bean seedlings for oospores of *Peronospora viciae* f. sp. fabae in soil. *Journal of Phytopathology* 145: 257–260.
- Van der Gaag, D. J. and Frinking, H. D. (1997d): Survival, germinability, and infectivity of oospores of *Peronospora viciae* f.sp. fabae. *Journal of Phytopathology* 145: 153-157.
- 渡邊幸子・菖蒲信一郎 (2019). タマネギベと病の第一次伝染に関する最近の研究 植物防疫 73: 363-369
- Yarwood, D. E. (1943). Onion downy mildew. *Hilgardia* 14: 595-691.
- 善正二郎・菖蒲信一郎 (2017). 2016 年の佐賀県におけるタマネギベと病の発生状況と今後の防除対策について 植物防疫 71: 264-267.

植物免疫を調節する病原体サプレッサーと内生サプレッサー

豊田 和弘^{1,2,3*}・Aprilia Nur Fitrianti²・Mai Thanh Luan²・川崎 達弘²・門田日陽里³・
椎葉 紀香³・伊藤 千晶²・長谷川晴香³・白石 友紀⁴

ABSTRACT

TOYODA, K.^{1,2,3*}, APRILIA, N.F.², MAI, T.L.², KAWASAKI, T.², MONDEN, H.³, SHIIBA, N.³, ITOH, C.², HASEGAWA, H.³ and SHIRAISHI, T.⁴ (2021). Regulation of plant immunity by pathogen- and plant-derived suppressors.

In 1992 we determined the chemical structures of two suppressors, suppressins A and B, which are secreted by *Mycosphaerella pinodes* (syn. *Peyronellaea pinodes*), a causal agent of Mycosphaerella blight on pea. According to the "zigzag model" proposed by Jones and Dangl (2006), both suppressins are considered to be host-specific effectors for avoiding/suppressing the host's pattern-triggered immunity (PTI). In our separate study to investigate the origin of the suppressors, we isolated similar constituent(s) from healthy leaves of Arabidopsis plants and identified a CEP peptide as one of possible candidates for endogenous suppressor. Exogenous CEP peptide inhibits or delays elicitor/MAMP-induced defense responses in Arabidopsis, promoting disease susceptibility even against non-adapted fungal and bacterial pathogens. In this chapter, we present our recent advances in research on pathogen- and plant-derived suppressors and, especially, propose new possibilities of CEP-mediated regulation of plant immunity.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, c-terminally encoded peptide (CEP), defense suppression, disease susceptibility, endogenous suppressor, pattern-triggered immunity (PTI), suppressor

1. はじめに

病原体による宿主植物への侵入と定着は、植物が備える基礎的抵抗性の効果的な抑制に依存する。この10年余り、細胞膜のパターン認識レセプターを起点とするパターン誘導性免疫 (PTI) の研究は急速に進み、これと並行して様々な病原体から宿主植物による認識を回避したり、下流のシグナル伝達系を阻害 (攪乱) するエフェクター分子が明らかとな

1 岡山大学学術研究院環境生命科学学域 Research Institute of Environmental and Life Science, Okayama University (*Corresponding author: pisatin@okayama-u.ac.jp)

2 岡山大学大学院環境生命科学研究科 Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University

3 岡山大学農学部 Faculty of Agriculture, Okayama University

4 岡山県生物科学研究所 Research Institute of Biological Sciences, Okayama

ってきた。従来の培養ろ液などからの分離・精製に基づいた探索とは別に、現在では公開データを使った *in silico* 解析，あるいは取得したゲノム情報や RNA-seq データなどから絞り込んだ候補遺伝子を解析するなど多様なアプローチが行われるようになってきている。このような解析では，宿主特異的毒素やサプレッサーのような罹病性反応（防御応答の抑制，壊死の誘導，不適応型菌に対する感染誘導など）を指標として精製が行われた場合とは異なり，病原体の侵入ステージに応じた複数のエフェクターの存在とそれらの役割を明らかにすることが期待される。こうした中，著者らはエンドウ褐紋病菌 *Mycosphaerella pinodes* をモデルとして，同菌が分泌する2種のサプレッサーの構造を決定し，それらの宿主植物における作用点と，影響を受けるシグナル伝達経路や防御応答について解析を進めてきた (Shiraishi *et al.*, 1997; Toyoda *et al.*, 2011, 2016)。一方で，サプレッサーの起源に迫る課題として，エンドウを始めとする複数の植物種の健全葉から類似成分（模倣分子）を分離することに成功し，これを内生サプレッサー（endogenous suppressor）と称している (Nasu *et al.*, 1992)。今回は，病原体および植物由来のサプレッサーに関する研究についての最近の成果を紹介するとともに，著者らが考える内生サプレッサーを介した植物免疫の新たな調節機構についても触れてみたい。

2. エンドウ褐紋病菌が分泌するサプレッサー

1978年，エンドウ褐紋病菌の柄孢子発芽液の中から宿主植物（エンドウ）のファイトアレキシン（ピサチン）生成を抑制する物質を発見し，本因子を抵抗性抑制因子（サプレッサー）と名付けた (Shiraishi *et al.*, 1978)。当時，サプレッサーの作用については，エリシターの構造の一部が切り出され，その生成物による拮抗の結果という見方もあったが，80年代後半から，同菌が生産する2種のサプレッサー（図1a; Shiraishi *et al.*, 1992）とエリシターの構造の一部が決定された (Matsubara and Kuroda, 1987)。エリシター (Glc-Man-Man 糖鎖がタンパク質のセリン残基に *O*-グルコシド結合した分子量約 70 kDa の糖タンパク質) で前処理したエンドウ葉には後接種した同菌による感染は著しく抑制されるが，サプレッサーとの混合処理下には通常のように感染する。他方で，エンドウ褐紋病菌の自然宿主を含む 13 種のマメ科植物に対する病原性と，それらに対するサプレッサーの感染誘導作用

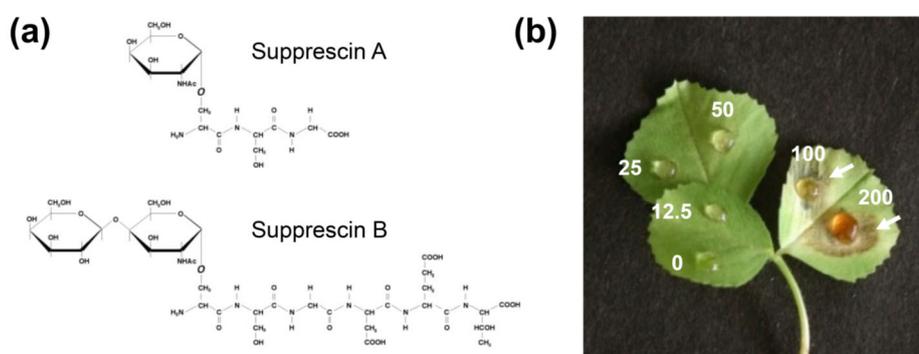


図1. エンドウ褐紋病菌が分泌するサプレッサーの構造 (a) とモデル宿主 *Medicago truncatula* 上でのキク花腐病菌 *Mycosphaerella ligulicola*（不適応型病原菌）に対する感染誘導作用 (b)。写真は接種後6日目に撮影し，数字は処理したサプレッサーの濃度（ $\mu\text{g/ml}$ ）を示す。

が調べられ、サブレッサーが作用する植物種は褐紋病菌の宿主範囲と完全に一致することが確かめられた (表 1, 図 1 b; Oku *et al.*, 1980; Toyoda *et al.*, 2013). また, 柄胞子を水に懸濁し, 発芽液に含まれるエリシターとサブレッサーの生成パターンについても詳しく調べられ, サブレッサーの生産 (分泌) がエリシターのそれより先行していることから, 褐紋病菌はサブレッサーを生産することによって宿主植物による認識を回避して感染を図っているとの考えに至った (Shiraishi *et al.*, 1997). 事実, エリシターで処理されたエンドウでは, ピサチンの生合成が転写レベルから急速に活性化されるのに対し, サブレッサーの共存下には著しく抑制 (遅延) される (Yamada *et al.*, 1989). また, ピサチン生産以外にも PR-タンパク質 (キチナーゼ, β -1,3-グルカナーゼ) の活性化 (Yoshioka *et al.*, 1992) や, ピサチンとは異なる抗菌性物質 (感染阻害物質) の生成 (Yamamoto *et al.*, 1986) など複数の防御応答がサブレッサーの共存下では抑制 (遅延) される (表 2; Shiraishi *et al.*, 1997; Toyoda *et al.*, 2011, 2016). 興味深いことに, 褐紋病菌が生産するサブレッサーは, ササゲやダイズなどの非宿主植物には効果はなく, 逆にエリシターとして作用する (Amano *et al.*, 1997, 2013; Yoshioka *et al.*, 1992). このように, サブレッサーの作用には厳密な特異性があり, さらにエリシターの構造との類似性がみられないことから, その作用はエリシターの作用部位 (受容体) に対する拮抗の結果ではなく, 褐紋病菌による宿主感染への重要な寄生戦略であることを示している. 現在, Jones and Dangl (2006) が提案している「ジグザグモデル」に当てはめれば, 本因子はパターン誘導性免疫を回避するための宿主特異的エフェクターであり, ETS (Effector-triggered susceptibility) を担うものである.

表 1. エンドウ褐紋病菌の各種マメ科植物に対する病原性ならびに同菌から分離したサブレッサーの不応型病原菌に対する感染誘導作用

植物種	和名	エンドウ褐紋病菌の病原性 ^a	ナシ黒斑病菌の病原性 ^b	エンドウ褐紋病菌から分離したサブレッサーとともに接種した場合のナシ黒斑病菌の病原性 ^c
<i>Pisum sativum</i>	エンドウ	++++	-	++++
<i>Trifolium pratense</i>	赤クローバー	+	-	+
<i>T. repens</i>	白クローバー	-	-	-
<i>Lotus japonicus</i>	ミヤコグサ	-	-	-
<i>Millettia japonica</i>	ナツフジ	++	-	++
<i>Lespedeza buergeri</i>	キハギ	++	-	++
<i>L. bicolor</i>	ヤマハギ	-	-	-
<i>Medicago sativa</i>	アルファルファ	+	-	+
<i>M. truncatula</i>	タルウマゴヤシ	+++	-	+++
<i>Glycine max</i>	ダイズ	-	-	-
<i>Vicia faba</i>	ソラマメ	-	-	-
<i>Arachis hypogaea</i>	ラッカセイ	-	-	-
<i>Vigna sinensis</i>	ササゲ	-	-	-

a 褐紋病菌はエンドウ以外にも赤クローバー, ナツフジ, キハギ, アルファルファおよびタルウマゴヤシに病原性を示す. 表内には接種後 4 日目の侵入菌糸の伸展を - ~ ++++ で示している.

b ナシ黒斑病菌は表内のいずれの植物種にも感染しない.

c ナシ黒斑病菌の分生胞子を褐紋病菌から調製したサブレッサー (50 μ g/ml) とともに接種すると, 同菌が病原性を示す 6 種の植物で感染誘導作用が認められた.

3. サプレッシンAおよびBの宿主特異的な作用機構

細胞内エネルギー通貨として知られるアデノシン3リン酸 (ATP) は、細胞膜に存在する H^+ 輸送性 ATPase によって利用され、この反応が生命活動の維持に必須であることは周知の事実である。しかし著者のグループは、植物細胞の外側 (細胞壁) に細胞膜 ATPase とは明らかに異なる (分子量, 基質特異性, 至適 pH, カチオン要求性など) ATP 加水分解酵素を見出した (Kiba *et al.*, 1995, 1996a). その後、暗所生育したエンドウ芽生えの細胞壁から精製を試み、同酵素が NTP/NDPase (EC3.6.1.5; NTP diphosphohydrolase) であることを明らかにした (Kiba *et al.*, 2006a). 興味深いことに、精製酵素や組換えタンパク質 (PsAPY1) の活性は病原菌由来のエリシターの処理で活性化し、逆にサプレッサーで著しく阻害された (Kawahara *et al.*, 2003; Kiba *et al.*, 1996a, 2006a;). 細胞壁に存在する NTP/NDPase はエンドウだけでなく、ササゲ、インゲンやダイズにも認められ (Kiba *et al.*, 1995), 現在ではエクト型 ATPase (ecto-ATPase/apyrase) と呼ばれる細胞外酵素である。細胞外 ATP が介するシグナル伝達において重要なモジュレーターとしてもよく知られている (Clark *et al.*, 2021).

著者らが調べた限り、褐紋病菌のサプレッサーはエンドウの活性は阻害するが、非宿主植物 (ササゲ, インゲン, ダイズ) の活性は阻害しない (Kiba *et al.*, 1995). このことは、褐紋病菌が宿主の細胞表層にあるエクト型 ATPase (PsAPY1) を標的とし、同酵素の宿主特異的な阻害が防御応答の抑制と関連していることを示している (Shiraishi *et al.*, 1997; Toyoda *et al.*, 2011, 2016). 事実、組換え PsAPY1 タンパク質とビオチン標識したエリシターおよびサプレッサーを用いた結合アッセイから、それぞれの PsAPY1 に対する結合部位は異なっており、サプレッサーに対する K_d 値はエリシターよりも約3倍高いことが示された (Kiba *et al.*, 2006b). この結果は、著者らの様々な *in vivo* および *in vitro* での解析において、サプレッサーの作用が常に優位に現れることを説明するものであり、サプレッサーがエリシターと共存する実際の感染現場で効果的なエフェクターとして働くことを意味している。以上に基づくと、PsAPY1 は細胞表層での病原菌由来の代謝産物との直接的な相互作用 (結合) を通して防御応答を開始する 1 スイッチであり、宿主に適応した褐紋病菌はこれを標的とするサプレッサーを積極的に分泌しているということになる。実際、ササゲ由来の組換えタンパク質 (VsNTPase1) で調べた限り、例外はあるが、カビ以外にも細菌由来の MAMP (フラジェリン, ゲノム DNA など) の処理で ATPase 活性が促進されることが明らかとなっている (Takahashi *et al.*, 2006).

なお、紙面の都合上、PsAPY1 を介するエリシターシグナルの伝達機構と褐紋病菌サプレッサーによる宿主特異的な制御機構の詳細については著者らの総説 (豊田ら, 2014; Toyoda *et al.*, 2011, 2016) を参照されたい。

4. 内生サプレッサーの発見

褐紋病菌のサプレッサーの起源についての研究を進める中で、健全な植物体 (エンドウ) から類似物質 (模倣分子) の有無について調べ、褐紋病菌のサプレッサーと同じ (類似の) 作用をもつ物質を分離した (Nasu *et al.*, 1992). これを受けて、植物が構成的に備え、自身の免疫を抑制できる物質を「内生サプレッサー (endogenous suppressor)」と呼ぶことを提唱した。実際に、エンドウからの精製標品は褐紋病菌のサプレッサーと同じようにエンド

ウの ATPase を抑制し、エリシター/MAMP で誘導される防御応答を阻害する (表 2; Nasu *et al.*, 1992; 1995). また, 同物質で処理されたエンドウ葉は本来感染しない不適応型菌による感染を許して発病する. 類似の物質はオオムギの健全葉の磨砕液中にも見出され, これです処理したオオムギ葉にはうどんこ病菌の親和性レースだけでなく, 非親和性レースによる感染が促進される (Shiraishi *et al.*, 1989).

表 2. エンドウ褐紋病菌ならびにその宿主植物から分離したサブレッサーの作用

シグナル伝達・応答	褐紋病菌サブレッサー	内生サブレッサー	文献
細胞壁 ATPase	阻害	ND	Kawahara <i>et al.</i> , 2003; Kiba <i>et al.</i> , 1995, 1996a, 2006a,b
細胞膜 ATPase	阻害	阻害	Amano <i>et al.</i> , 1995; Kato <i>et al.</i> , 1993; Nasu <i>et al.</i> , 1992; Shiraishi <i>et al.</i> , 1991, 1992; Yoshioka <i>et al.</i> , 1990, 1992
活性酸素種 (ROS) の生成	阻害	ND	Amano <i>et al.</i> , 2013; Kiba <i>et al.</i> , 1996b, 1997; Suzuki <i>et al.</i> , 2017; Toyoda <i>et al.</i> , 2012
Na ⁺ /K ⁺ の流出, 細胞外アルカリ化	阻害	阻害	Amano <i>et al.</i> , 1997, 2013; Toyoda <i>et al.</i> , 2013
ポリホスホイノシチド代謝系	阻害	ND	Toyoda <i>et al.</i> , 1992, 1993
MBP のリン酸化 (MAP キナーゼ活性)	阻害	ND	Uppalapati <i>et al.</i> , 2004
感染阻害物質の生成・蓄積	阻害	ND	Yamamoto <i>et al.</i> , 1986
PAL, CHS-mRNA の蓄積	3 時間遅延	3 時間遅延	Nasu <i>et al.</i> , 1992; Toyoda <i>et al.</i> , 2013; Yamada <i>et al.</i> , 1989; Yoshioka <i>et al.</i> , 1992
PAL の活性化	3~6 時間遅延	3~6 時間遅延	Nasu <i>et al.</i> , 1992; Yamada <i>et al.</i> , 1989
ファイトアレキシンの生成・蓄積	6~9 時間遅延	6~9 時間遅延	Nasu <i>et al.</i> , 1992; Shiraishi <i>et al.</i> , 1978; Toyoda <i>et al.</i> , 2013; Yamada <i>et al.</i> , 1989
キチナーゼの活性化	6~9 時間遅延	6~9 時間遅延	Nasu <i>et al.</i> , 1995; Yoshioka <i>et al.</i> , 1992
β-1,3-グルカナーゼの活性化	6~9 時間遅延	6~9 時間遅延	Nasu <i>et al.</i> , 1995; Yoshioka <i>et al.</i> , 1992
不適応型菌に対する感染誘導作用	有	有	Nasu <i>et al.</i> , 1995; Oku <i>et al.</i> , 1980; Toyoda <i>et al.</i> , 2013

内生サブレッサーの推定される役割としては, 過剰な防御応答を抑制し, 「成長」と「防御」のトレードオフを最適化することが挙げられる. しかし, 健全な植物体が多数の微生物による感染を許して罹病化するわけではないので, 通常は極めて低濃度で存在 (局在) するか, あるいは受容体 (作用点) が発現していないと考えるのが妥当である. このような考えに基づいて, 著者らはシロイヌナズナ (Columbia-0) からの内生サブレッサーの精製に挑み, 2020 年に不適応型菌に対する感染誘導作用をもち, かつパターン誘導性免疫を抑制する物質の単離に成功した (Mai *et al.*, 2020). 興味深いことに, 部分精製標品とともに不適応型菌をシロイヌナズナ葉 (野生型 Col-0) に接種すると, 通常ではみられない病斑形成が観察され, さらにジャスモン酸やサリチル酸を介したシグナル伝達系の欠損植物体ではより激しい病徴が現れるようになった (図 2). この結果は, 内生サブレッサーが不適応型菌に対して最初の障壁となるパターン誘導性免疫を効果的に抑制していることを示している. 事実, 内生サブレッサーで処理した植物体では, パターン誘導性免疫の指標となる ROS バーストや PTI 関連遺伝子の発現は著しく抑制された (Mai *et al.*, 2020).

その後活性画分のさらなる精製と特徴づけが進められ, 分子量 3,000 Da 以下で熱およびプロネース K 耐性を有し, ニンヒドリン反応とビウレット反応に陽性の活性成分を HPLC で単一のピークとして精製した (Mai *et al.*, 2020). 驚いたことに, 同精製標品の MS/MS 解析から, これが c-terminally encoded peptide 5 (CEP5) のフラグメントであるこ

とが明らかとなった (Mai *et al.*, 2020). CEP5 は, 106 アミノ酸からなる前駆体から C 末端側の 15 アミノ酸が切り出された短鎖のペプチドであり, 植物の成長に必須な窒素獲得のためのシグナル伝達に関連する全身移動性のホルモン様分子である (Ohyama *et al.*, 2008; Tabata *et al.*, 2014). そこで, 同定したフラグメントと成熟型 CEP5 を合成し, これらの不適応型菌に対する感染誘導と防御応答の抑制活性について調べたところ, 処理された植物体は不適応型菌 (糸状菌および細菌) に感受性になるとともに, いずれの合成ペプチドも精製標品と同じように flg22 誘導性の免疫応答 (ROS 生成, MAPK 活性化やカロース合成など) を抑制することが明らかとなった (Aprilia, N.F. *et al.*, in prep.). CEP5 によるパターン誘導性免疫の抑制については, flg22 以外にもキチンオリゴ糖, elf18, PGN, LPS や傷害関連分子パターンである Pep1 でも認めている. したがって, CEP5 はそれぞれの受容体の下流にある共通の因子 (プロセス) に影響し, 免疫応答の誘導のタイミングや強度を調整しているのではないかと予想している. 実際に調べた限り, CEP5 遺伝子は通常低レベルで発現しているが, flg22 などの MAMP の処理に反応して誘導される.

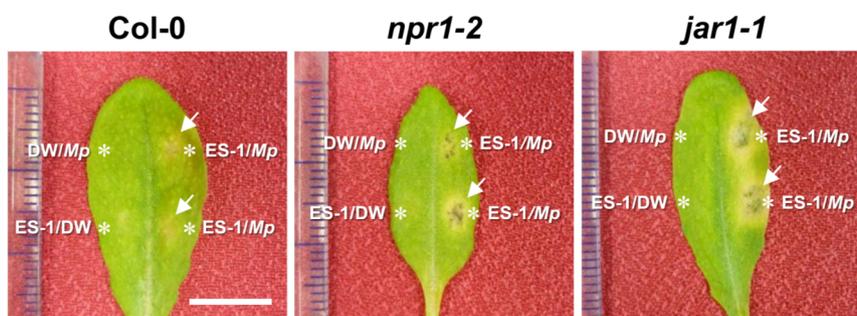


図 2. シロイヌナズナ Col-0 の健全葉から分離した内生サプレッサーの不適応型菌に対する感染誘導作用. シロイヌナズナに病原性のないエンドウ褐紋病菌 (Mp) の分生胞子を水 (DW) または内生サプレッサーの部分精製標品 (ES-1; 10 mg/ml) とともに 4 週齢の野生型 Col-0, *npr1-2* および *jar1-1* 植物体に接種した (*). 内生サプレッサーとともに接種された Col-0 葉には病徴が現れるが, *npr1-2* および *jar1-1* では激しい病徴が観察された. 写真は接種後 4 日目の様子を示す. バー=1 cm.

5. 内生サプレッサーの受容体は？

窒素要求シグナル伝達における CEP ペプチドの受容体については, 名古屋大学の松林教授らグループによって 2 種の LRR 型キナーゼ (CEPR1/2) が明らかにされている (Tabata *et al.*, 2014). そこで, これらの単独・二重変異体 (Nossen-0 バックグラウンド) を使って, flg22 誘導性の ROS 生成について調べたところ, CEP5 は遺伝子型に関係なく抑制した (Aprilia, N.F. *et al.*, in prep.). 同様に, 異なる変異アリル *cepr1-3* (Col-0) でも調べたが, 抑制作用は遺伝子変異に影響されなかった. このことから, CEP ペプチドを介した免疫抑制は窒素要求のシグナル伝達経路とは独立しており, CEPR1/2 と異なる未知の受容体が関連しているものと考えられた. 実際, 窒素要求と免疫抑制にそれぞれ必要とされる CEP ペプチドの濃度域は大きく異なっており, それらが別々の受容体で調節されていることは間違いない. つまり, それぞれが必要とする生体内濃度や受容体の発現様式の違いが CEP ペプチドの多面的な役割を可能にしているのではないかと今のところ推測している.

6. 最後に

病原体サプレッサーの「模倣分子」として発見された内生サプレッサーは当初、植物にとって不利（不要）であり、その生物的意義について懐疑的な見方が多かった。しかし今回紹介したように、植物が構成的に備える内生サプレッサーが生育に欠くことができない窒素獲得のための全身シグナル伝達を担うペプチドホルモンと同じであることが明らかとなった。今後、*CEP* 遺伝子欠損個体（過剰発現個体）などを使って詳細に解析を進めていく必要があるが、もしそれらが同一分子で行われているとすれば、「成長」と「防御」のトレードオフの仕組みの謎に迫ることはさほど困難でないのではないかと考えている。さらに無理をして推し測れば、宿主植物に適応した病原体は、侵入や定着を図るために宿主体内の内生サプレッサーを利用していることも考えられなくもない。

近年、解析技術が急速に進歩し、病原体と宿主植物の双方向からの研究が可能となった。こうした中、植物に感染し発病させる線虫や病原細菌の分泌成分（ゲノム）の中に、宿主植物が備え、自身の形態形成を調節するペプチドホルモンの模倣分子が含まれている例がいくつか報告されている (Eves-van den Akker *et al.*, 2016; Pruitt *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2011)。著者らは病原体の模倣分子を宿主植物へ探し求めたが、上記の研究は宿主植物の模倣分子を病原体に見出した例になる。「鶏が先か、卵が先か」という因果性のジレンマの議論は敢えて避けた上で、病原体のすべてとは思わないが、一部は宿主植物の野生祖先種やその近縁種からこれらが構成的に備える免疫抑制因子（内生サプレッサー）を何らかの形で獲得して、現在のように適応できるようになったとも考えられなくはない。病原体のゲノム解析や、それらの比較ゲノム解析を通して、宿主植物種と病原体に共通して保存されている遺伝子や模倣分子についての解析が一層進められることを期待している。

謝辞

本研究は、岡山大学植物病理学研究室の多くの修了・卒業生との共同研究の成果である。また、研究の一部は独立行政法人日本学術振興会・科学研究費助成事業（21K05597）の支援で実施された。なお、本研究で使用したシロイヌナズナ変異体 (*cepr1-1*, *cepr2-1* および *cepr1-1 cepr2-1*) は、名古屋大学大学院理学研究科・松林嘉克教授らが理化学研究所バイオリソース研究センター（BRC）に寄託したものであり、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、同センターから提供を受けた。ここに記して深謝したい。

引用文献

- Amano, M., Toyoda, K., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (1995). H⁺-translocating activity in proteoliposomes reconstituted with pea plasma membrane ATPase and its inhibition by fungal suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 61:369-375.
- Amano, M., Toyoda, K., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (1997). Association between ion fluxes and defense responses in pea and cowpea tissues. *Plant Cell Physiol.* 38:698-706.
- Amano, M., Toyoda, K., Kiba, A., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. (2013). Plant cell walls as suppliers of potassium and sodium ions for induced resistance in pea (*Pisum sativum* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *J. Gen. Plant Pathol.* 79:12-17.
- Clark, G., Brown, K.A., Tripathy, M.K. and Roux, S. (2021). Recent advances clarifying the

- structure and function of plant apyrases (nucleoside triphosphate diphosphohydrolases). *Int. J. Mol. Sci.* 22:3283.
- Eves-van den Akker, S., Lilley, C.J., Yusup, H.B., Jones, J.T. and Urwin, P.E. (2016). Functional c-terminally encoded peptide (CEP) plant hormone domains evolved de novo in the plant parasite *Rotylenchulus reniformis*. *Mol. Plant Pathol.* 17:1265-1275.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kato, T., Shiraishi, T., Toyoda, K., Saitoh, K., Satoh, Y., Tahara, M., Yamada, T. and Oku, H. (1993). Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes by fungal suppressors from *Mycosphaerella pinodes* and their peptide moieties. *Plant Cell Physiol.* 34:439-445.
- Kawahara, T., Toyoda, K., Kiba, A., Miura, A., Ohgawara, T., Yamamoto, M., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. (2003). Cloning and characterization of pea apyrases: Involvement of *PsAPY1* in response to signal molecules from the pea pathogen *Mycosphaerella pinodes*. *J. Gen. Plant Pathol.* 69:33-38.
- Kiba, A., Toyoda, K., Yamada, T., Ichinose, Y., Shiraishi, T. (1995). Specific inhibition of cell wall-bound ATPases by fungal suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 36:809-817.
- Kiba, A., Toyoda, K., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (1996a). Specific response of partially purified cell wall-bound ATPases to fungal suppressor. *Plant Cell Physiol.* 37:207-214.
- Kiba, A., Toyoda, K., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (1996b). Species-specific suppression of superoxide-anion generation on surfaces of pea leaves by the suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 62:508-512.
- Kiba, A., Miyake, C., Toyoda, K., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (1997). Superoxide generation in extracts from isolated plant cell walls is regulated by fungal signal molecules. *Phytopathology* 87:846-852.
- Kiba, A., Ohgawara, T., Toyoda, K., Inoue-Ozaki, M., Takeda, T., Rao, U.S., Kato, T., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. (2006a). A binding protein for fungal signal molecules in the cell wall of *Pisum sativum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:228-237.
- Kiba, A., Toyoda, K., Yoshioka, K., Tsujimura, K., Takahashi, H., Ichinose, Y., Takeda, T., Kato, T. and Shiraishi, T. (2006b). A pea NTPase, PsAPY1, recognizes signal molecules from microorganisms. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:238-246.
- Mai, T.L., Kawasaki, T., Aprilia, N.F., Phuong, L.T., Shiokawa, T., Tada, H., Matsui, H., Noutoshi, Y., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T. and Toyoda, K. (2020). Endogenous suppressor(s) in *Arabidopsis thaliana*. *J. Gen. Plant Pathol.* 86:100-106.
- Matsubara, M. and Kuroda, H. (1987). The structure and physiological activity of glycoprotein secreted from conidia of *Mycosphaerella pinodes* II. *Chem. Pharm. Bull.* 35:249-255.
- Nasu, K., Shiraishi, T., Yoshioka, H., Hori, N., Ichinose, Y., Yamada, T. and Oku, H. (1992). An endogenous suppressor of the defense response in *Pisum sativum*. *Plant Cell Physiol.* 33:617-626.
- Nasu, K., Yoshioka, H., Ichinose, Y., Yamada, T., Oku, H. and Shiraishi, T. (1995). Suppression of

- the activation of chitinase and β -1,3-glucanase in pea epicotyls by endogenous suppressor from *Pisum sativum*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 61:13-17.
- Ohyama, K., Ogawa, M. and Matsubayashi, K. (2008). Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by *in silico* gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *Plant J.* 55:152-160.
- Oku, H., Shiraishi, T., Ouchi, S., Ishiura, M. and Matueda, R. (1980). A new determinant of pathogenicity in plant disease. *Naturwissenschaften* 67:310-311.
- Pruitt, R.N., Joe, A., Xhang, W., Feng, W., Stewart, V., Schwessinger, B., Dinneny, J.R. and Ronald, P.C. (2017). A microbially derived tyrosine-sulfated peptide mimics a plant peptide hormone. *New Phytol.* 215:725-736.
- Shiraishi, T., Oku, H., Yamashita, M. and Ouchi, S. (1978). Elicitor and suppressor of pisatin induction in spore germination fluid of pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 44:659-665.
- Shiraishi, T., Miyazaki, T., Yamada, T., Oku, H. and Ouchi, S. (1989). Infection enhancing factor for *Erysiphe graminis* prepared from healthy barley seedlings. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 55:357-360.
- Shiraishi, T., Araki, M., Yoshioka, H., Kobayashi, I., Yamada, T., Ichinose, Y., Kunoh, H. and Oku, H. (1991). Inhibition of ATPase activity in pea plasma membrane *in situ* by a suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 37:1067-1075.
- Shiraishi, T., Saitoh, K., Kim, H.M., Kato, T., Tahara, M., Oku, H., Yamada, T. and Ichinose, Y. (1992). Two suppressors, suppressins A and B, secreted by a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 33:663-667.
- Shiraishi, T., Yamada, T., Ichinose, Y., Kiba, A. and Toyoda, K. (1997). The role of suppressors in determining host-parasite specificities in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 172:55-93.
- Suzuki, T., Maeda, A., Hirose, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T. and Toyoda, K. (2017). Ultrastructural and cytological studies on *Mycosphaerella pinodes* infection of the model legume *Medicago truncatula*. *Front. Plant Sci.* 8:1132.
- Tabata, R., Sumida, K., Yoshii, T., Ohyama, K., Shinohara, H. and Matsubayashi, Y. (2014). Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* 346:343-346.
- Takahashi, H., Toyoda, K., Hirakawa, Y., Morishita, K., Kato, T., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. (2006). Localization and responsiveness of a cowpea apyrase VsNTPase1 to phytopathogenic microorganisms. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:143-151.
- Toyoda, K., Shiraishi, T., Yoshioka, H., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1992). Regulation of polyphosphoinositide metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 33:445-452.
- Toyoda, K., Shiraishi, T., Ichinose, Y., Yamada, T. and Oku, H. (1993). Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiol.* 34:729-735.
- Toyoda, K., Kawamoto, Y., Kawanishi, Y., Niwa, M., Takahashi, H., Suzuki, T., Kasai, T., Takahara,

- H., Amano, M., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. (2011). Suppression of defense — The role of fungal suppressors in conditioning plant susceptibility. *In* Genome-enabled analysis of plant–pathogen interactions (Wolpert, T., Shiraishi, T., Collmer, A., Akimitsu, K. and Glazebrook, J. eds.). pp 139-147, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Toyoda, K., Yasunaga, E., Niwa, M., Ohwatari, Y., Nakashima, A., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. (2012). H₂O₂ production by copper amine oxidase, a component of the ecto-apyrase (ATPase)-containing protein complex(es) in the pea cell wall, is regulated by an elicitor and a suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *J. Gen. Plant Pathol.* 78:311-315.
- Toyoda, K., Ikeda, S., Morikawa, J., Hirose, M., Maeda, A., Suzuki, T., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. (2013). The *Medicago truncatula*–*Mycosphaerella pinodes* interaction: a new pathosystem for dissecting fungal-suppressor-mediated disease susceptibility in plants. *J. Gen. Plant Pathol.* 79:1-11.
- 豊田和弘・田中佳織・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀 (2014). 植物細胞壁における病原体認識・情報伝達・応答のダイナミズム. *日植病報* 80:146-151.
- Toyoda, K., Yao, S., Takagi, M., Uchioki, M., Miki, M., Tanaka, K., Suzuki, T., Amano, M., Kiba, A., Kato, T., Takahashi, H., Ishiga, Y., Matsui, H., Noutoshi, Y., Yamamoto, M., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. (2016). The plant cell wall as a site for molecular contacts in fungal pathogenesis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 95:44-49.
- Uppalapati, S.R., Toyoda, K., Ishiga, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. (2004). Differential regulation of MBP kinases by a glycoprotein elicitor and a polypeptide suppressor from *Mycosphaerella pinodes* in pea. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64:17-25.
- Wang, J., Replogle, A., Hussey, R., Baum, T., Wang, X., Davis, E.L. and Mitchum, M.G. (2011). Identification of potential host plant mimics of CLAVATA3/ESR (CLE)-like peptides from the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Mol. Plant Pathol.* 12:177-186.
- Yamada, T., Hashimoto, H., Shiraishi, T. and Oku, H. (1989). Suppression of pisatin, phenylalanine ammonia-lyase mRNA, and chalcone synthase mRNA accumulation by a putative pathogenicity factor from the fungus *Mycosphaerella pinodes*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2:256-261.
- Yamamoto, Y., Oku, H., Shiraishi, T., Ouchi, S. and Koshizawa, K. (1986). Non-specific induction of pisatin and local resistance in pea leaves by elicitors from *Mycosphaerella pinodes*, *M. melonis* and *M. ligulicola* and effect of suppressor from *M. pinodes*. *J. Phytopathol.* 117:136-143.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1990). Suppression of pisatin production and ATPase activity in pea plasma membranes by orthovanadate, verapamil and a suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 31:1139-1146.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Nasu, K., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1992). Suppression of the activation of chitinase and β -1,3-glucanase in pea epicotyls by orthovanadate and a suppressor elicitor from *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 58:405-410.

植物と病原菌の相互作用におけるファイトアレキシンの役割

竹本大吾*・黒柳輝彦*・柴田裕介*・Abriel Bulasag*・水野邑里*・大津美奈**・
今野沙弥香*・Soriya Rin*・Maurizio Camagna*・田中愛子*・佐藤育男*・
千葉壮太郎*・川北一人*・小鹿 一*

Takemoto, D., Kuroyanagi, T., Shibata, Y., Bulasag, A., Mizuno, Y., Ohtsu, M.,
Imano, S., Rin, S., Camagna, M., Tanaka, A., Sato, I.,
Chiba, S., Kawakita, K. and Ojika, M.

Role of Phytoalexins in Plant-Pathogen Interactions

Abstract

Phytoalexins are antimicrobial secondary metabolites produced in plants during the induction of plant disease resistance. Phytoalexins are produced by host plants at optimal timing and concentrations in response to pathogen attack and contribute to plant disease resistance by accumulated in plant cells or being secreted extracellularly. Many of these phytoalexins are thought to exert their antimicrobial activity by targeting the cell walls or membranes of pathogens, but their mechanisms of action are still largely unknown. It is known that many plant pathogens have the ability to metabolize (detoxify) phytoalexins produced by host plants. To investigate the resistance mechanisms of Solanaceae plants to potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*, we performed virus-induced gene silencing (VIGS)-based screening to identify the genes involved in the resistance of *Nicotiana benthamiana* to *P. infestans*. Most of the genes isolated from *N. benthamiana* as essential genes for resistance against *P. infestans* were genes for enzymes directly involved in the biosynthesis of sesquiterpenoid phytoalexin, capsidiol, or factors that regulate the expression of enzyme genes. This result indicates that phytoalexins play a central role in non-host resistance to *P. infestans* in *N. benthamiana*. In this article, we will review our analyses of genes involved in phytoalexin production in Solanaceae plants. We also introduce our recent studies on the metabolism of phytoalexins by gray mold pathogen *Botrytis cinerea*.

Key words: *Botrytis cinerea*, capsidiol, *Nicotiana benthamiana*, *Phytophthora infestans*, potato, rishitin

* 名古屋大学 大学院生命農学研究科 Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya, 464-8601, Japan

** 現所属 奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Nara, 630-0192, Japan

はじめに

植物が環境中の微生物、病原菌に対して示す抵抗性は、侵入前抵抗性と侵入後抵抗性に大別される。侵入前抵抗性のうち、植物が本来備えている構造や成分による抵抗性は静的抵抗性と呼ばれ、クチクラや細胞壁の厚さ、硬さおよび疎水的環境といった物理的障壁と、フェノール類、配糖体（サポニン）、有機硫黄化合物など、病原菌の攻撃を受ける前から植物体内外に存在する低分子の抗菌性物質（いわゆるファイトアンティシピン）による化学的障壁からなる（Morrissey and Osbourn, 1999）。一方、動的な侵入前抵抗性として、侵入に対する障壁として働くパピラの形成（Vance and Scherwood, 1977）、抗菌物質の局所的な分泌などがある（Lipka *et al.*, 2005）。侵入後抵抗性には、PRタンパク質の生産、抗菌物質（ファイトアレキシン）の生産誘導と蓄積（Dixon *et al.*, 2001）および過敏感細胞死の誘導（Ebel and Mithöfer, 1998; Goodman and Novacky, 1994）などが挙げられる。病原菌（微生物）の感染を抑制する主要な要因は、植物と病原菌の組み合わせにより様々であり、侵入前と侵入後抵抗性を明確に区別できない場合もある。

動的抵抗性が誘導される過程において、植物体内で生成される抗菌性の二次代謝産物はファイトアレキシンと総称されており（Müller and Börger 1940）、これまでに様々な植物種から数百種の

多様な構造のファイトアレキシンが見出されている（Brooks and Watson, 1985、図1）。ファイトアレキシンは病原菌による攻撃に応答して、最適なタイミング、最適な濃度で宿主植物によって生成され、植物細胞中に蓄積あるいは細胞外に分泌

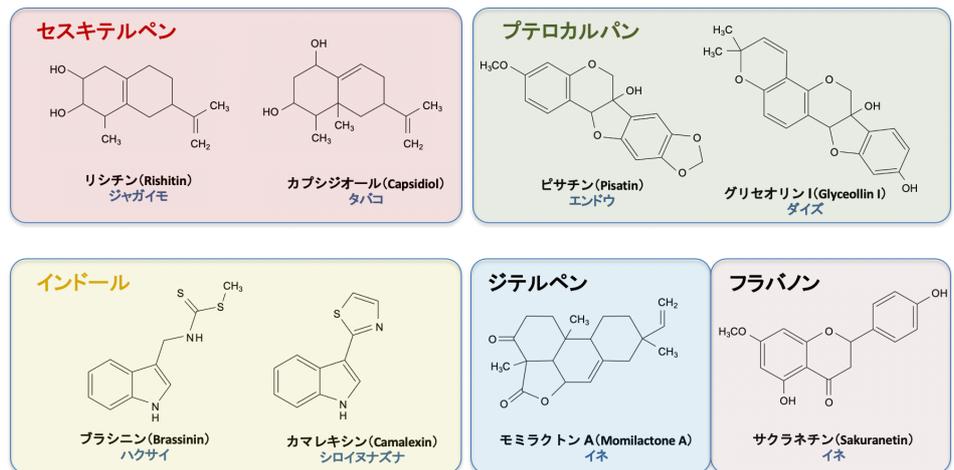


図 1. 植物が生産する多様なファイトアレキシン

されることで、植物の病害抵抗性に寄与している（Hammerschmidt and Dann, 1999）。これらファイトアレキシンの多くは、病原菌の細胞壁あるいは細胞膜を標的として抗菌性を発揮していると考えられているが、その作用機作は殆ど明らかになっていない。

一方で、多くの病原菌が宿主植物によって生成されるファイトアレキシンを代謝（解毒）する能力を持っていることが知られている（Pedras and Ahiahonu, 2005）。最もよく知られているファイトアレキシンの代謝酵素として、ピサチン脱メチル化酵素がある。ピサチンを生産するエンドウに対する病原菌の病原性とピサチン脱メチル化酵素の生成能に相関があることから、本酵素が病原菌の宿主範囲の決定因子であることが示されている（Coleman *et al.*, 2011）。また、1960年にピサチンの精製を報告したCruickshankが、50種の植物病原菌に対するピサチンの抗菌性を評価したところ、5種がピサチンに対する高い耐性を示し、その全てがエンドウの病原菌であった（Cruickshank, 1962）。これ

らの報告は、ファイトアレキシンに対する耐性は、病原菌が植物に感染するために基本的な性質として備えている能力（基本的親和性の要素）であることを示唆している。

著者らはこれまでに、ジャガイモの最重要病原菌であるジャガイモ疫病菌に対するナス科植物の抵抗性機構を明らかにするために、ナス科のモデル植物であるベンサミアナ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた抵抗性関連遺伝子のスクリーニングを行ってきた。その結果、疫病菌抵抗性が低下したベンサミアナから単離された原因遺伝子の多くが、ファイトアレキシンの生合成に直接関与する酵素遺伝子あるいは酵素遺伝子の発現を制御する因子をコードする遺伝子であった (表1)。このことは、現在では注目されることも少なくなったファイトアレキシンが、ベンサミアナの非宿主抵抗性に中心的な役割を担っていることを示唆した。

本稿では、著者らがこれまでに取り組んできたナス科植物のファイトアレキシン生成に関与する遺伝子群の解析について概説する。また後半では、最近取り組んでいる植物病原糸状菌、特に灰色かび病菌によるファイトアレキシンの代謝、耐性化機構の研究について紹介する。

1. ベンサミアナのジャガイモ疫病菌に対する抵抗性に必須な遺伝子群のスクリーニング

ベンサミアナは、アグロバクテリウムを介した遺伝子の一過的発現、ウイルス誘導型遺伝子サイレンシング (VIGS) などが容易に行えるため、逆遺伝学的なアプローチの研究のモデル生物として広く用いられている。一方で、研究例は多くはないものの、ランダムな遺伝子のサイレンシングを行えば順遺伝学的な研究 (つまり機能欠損株のスクリーニング) にも用いることが可能である。ベンサミアナは Allotetraploid (異質四倍体) であるため (Goodin *et al.*, 2008)、機能的に冗長な遺伝子を2コピー持っていることが多く、VIGSは相同遺伝子を同時に抑制できるという点でも有用である。

実験室で生育した幼齢のベンサミアナはジャガイモ疫病菌に対して感受性を示すが、成

表1. VIGS スクリーニングにより単離されたベンサミアナのジャガイモ疫病菌抵抗性に必須な遺伝子

Gene name	Gene product
Ethylene signaling and production	
<i>NbEIN2</i>	Ethylene insensitive 2 ^a
<i>NbSAMS1a</i>	S-adenosylmethionine synthetase ^b
<i>NbCGS1a</i>	Cystathionine gamma synthase ^b
<i>NbSAHH1a</i>	S-adenosylhomocysteine hydrolase ^b
<i>NbACO1a</i>	Aminocyclopropanecarboxylate oxidase ^b
<i>NbACO1b</i>	Aminocyclopropanecarboxylate oxidase ^b
<i>NbACO2a</i>	Aminocyclopropanecarboxylate oxidase ^b
Mevalonate pathway and capsidiol production	
<i>NbACAT1a</i>	Acetoacetyl-coenzyme A thiolase ^b
<i>NbHMGS1a</i>	Hydroxymethylglutaryl coenzyme A synthase ^b
<i>NbHMGR1</i>	Hydroxymethylglutaryl coenzyme A synthase ^b
<i>NbMVD1a</i>	Mevalonate 5-diphosphate decarboxylase ^b
<i>NbFPPS1a</i>	Farnesyl diphosphate synthase ^b
<i>NbEAS1a</i>	5- <i>epi</i> -aristolochene synthase ^a
<i>NbEAH</i>	5- <i>epi</i> -aristolochene dihydrogenase ^a
ABC transporter	
<i>NbABCG1a</i>	PDR-type ABC transporter ^b
<i>NbABCG1b</i>	PDR-type ABC transporter ^b
<i>NbABCG2a</i>	PDR-type ABC transporter ^b
<i>NbABCG2b</i>	PDR-type ABC transporter ^b
Nuclear-cytoplasmic transport	
<i>NbNup75</i>	Nucleoporin 75 ^c
<i>NbNup88</i>	Nucleoporin 88 ^c
<i>NbSeh1</i>	Sec13 homolog ^c
<i>NbNup160</i>	Nucleoporin 160 ^d
<i>NbRanBP1</i>	Ran binding protein 1 ^d
<i>NbRan1</i>	Ras-related nuclear protein 1 ^d
<i>NbRan2</i>	Ras-related nuclear protein 2 ^d
<i>NbXpo1</i>	Exportin 1 ^e
Plastidic isoprenoid pathway	
<i>NbGGPPS1</i>	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase ^a
Molecular chaperones	
<i>NbCRT3</i>	Calreticulin 3 ^f
<i>NbSGT1</i>	HSP90 co-chaperone ^g
<i>NbHSP90</i>	Heat shock protein 90 ^g
Function unknown	
<i>NbSAR8.2m</i>	Secretory peptide SAR8.2m ^h

^a Shibata *et al.*, 2010; ^b Shibata *et al.*, 2016; ^c Ohtsu *et al.*, 2014; ^d Mizuno *et al.*, 2019a; ^e Mizuno *et al.*, 2019b; ^f Matsukawa *et al.*, 2013; ^g Shibata *et al.*, 2011; ^h Imano *et al.*, unpublished.

熟化したベンサミアナは疫病菌抵抗性である (Shibata *et al.*, 2011)。ベンサミアナにジャガイモ疫病菌が自然感染した報告例はなく、本来のベンサミアナはジャガイモ疫病菌に対して非宿主抵抗性を持つ植物であると言える。この抵抗性に必須な遺伝子を単離するため、まずサイレンシングベクターにランダムなベンサミアナ遺伝子を挿入したライブラリを作成した。ベンサミアナの健全葉およびINF1エリシター (ジャガイモ疫病菌の分泌タンパク質) 処理葉から調製した平均断片長約 350 bpのcDNAを、サイレンシングベクターにクローニングした。このランダムなcDNA断片を含むサイレンシングベクターを用いて約3,000株のベンサミアナの遺伝子サイレンシング株を作出した。VIGSで誘導された植物の約15%は、矮化や部分的な黄化・白化などの著しい生育障害が見られた一方で、約2.5%の植物 (82系統) では、ジャガイモ疫病菌を接種した際の顕著な抵抗性の低下が認められた。これら82系統の植物から、疫病菌の抵抗性に関与する遺伝子の候補として33個のユニークな遺伝子が単離された。加えて、いくつかの既知の防御関連遺伝子やスクリーニングによって単離された遺伝子の関連因子についても、サイレンシング株を作出した。また、必要に応じて標的遺伝子以外のサイレンシング (いわゆるoff target effect) を誘導しないサイレンシング株を再度作出し、疫病菌抵抗性の低下が確認された標的遺伝子を、抵抗性関連遺伝子とした (表1, Shibata *et al.*, 2016)。

2. ベンサミアナのカプシジオールの生合成および分泌に関与する因子

1) メバロン酸経路およびファイトアレキシン生合成酵素遺伝子

メバロン酸経路は、全ての真核生物に保存されている主要な代謝経路であり、生体膜の構成成分であるステロールや多様なイソプレノイド由来の二次代謝産物の前駆体生成に関与する (Hartmann, 1998)。上記のスクリーニングにより、ベンサミアナの疫病菌抵抗性に必須な遺伝子として、メバロン酸経路の5つの酵素遺伝子が単離された (表1、図2)。ナス科の植物では、*Nicotiana* および *Capsicum* 属植物のカプシジオールや *Solanum* 属植物のリシチンなどの主要なセスキテルペノイドのファイトアレキシンは、メバロン酸経路を経由して生成される

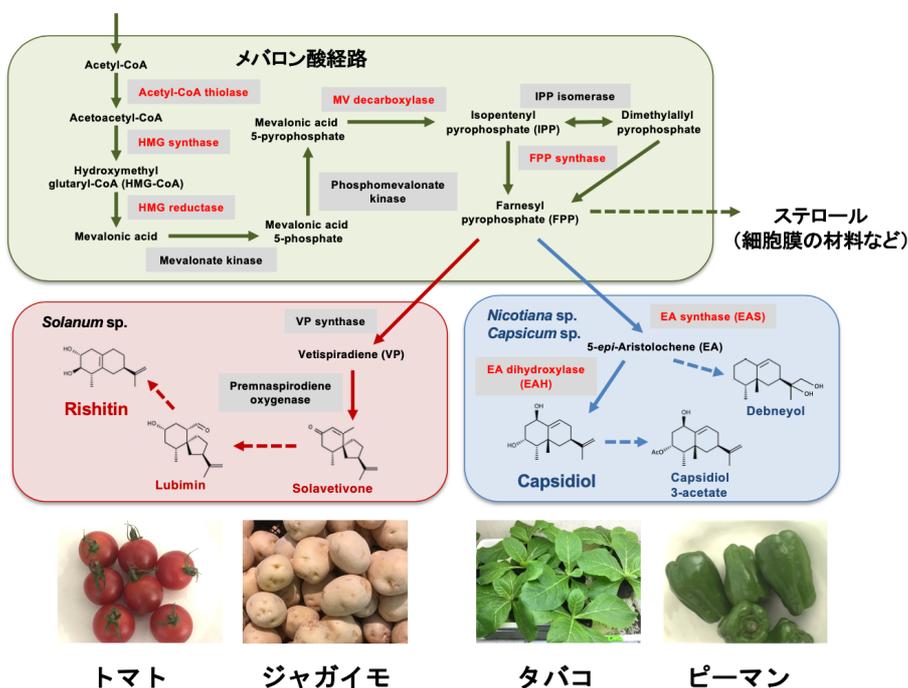


図2. ナス科植物のファイトアレキシン合成経路

Solanum 属植物は、リシチン、ルビミンなど、*Nicotiana* 属および *Capsicum* 属植物はカプシジオールを主なファイトアレキシンとして生産する。赤字の酵素遺伝子が、ベンサミアナのVIGSスクリーニングにより、ジャガイモ疫病菌抵抗性に必須な遺伝子として単離された。

(Bailey *et al.*, 1975; Katsui *et al.*, 1968、図2)。ベンサンミアナはメバロン酸経路の各酵素の遺伝子を複数持っており、INF1エリシターで処理すると一部の遺伝子発現が活性化され (Rin *et al.*, 2020)、カプシジオールの前駆体であるファルネシル2リン酸の生産が促進される。ベンサミアナはカプシジオールおよび関連するファイトアレキシン (デブネイオール、カプシジオール3-アセテート、図2) の生産に関与する酵素である5-*epi*-aristolochene synthase (EAS) および5-*epi*-aristolochene dihydroxylase (EAH) の遺伝子をそれぞれ10および6コピー持っており (Rin *et al.*, 2020)、これらは遺伝子重複によってコピー数が増えたと推定される。カプシジオール生産の最終反応を触媒する酵素の遺伝子が抑制された*NbEAH*サイレンシング株ではカプシジオールの生産が特異的に抑制され、疫病菌への抵抗性が低下した (Shibata *et al.*, 2010, 2016)。これらの結果は、ベンサミアナのジャガイモ疫病菌に対する非宿主抵抗性にカプシジオールが中心的な役割を担っていることを示している。

2) PDR型ABCトランスポーターによるカプシジオールの病原菌感染部位での分泌

ジャガイモ疫病菌は、主に宿主植物の表皮細胞の境目から侵入し、葉肉細胞の細胞間隙に入り込んで成長し、植物細胞内に吸器を形成する。植物が疫病菌の増殖を抑制するためには、植物細胞の細胞質で生産されたファイトアレキシンは細胞外に輸送される必要がある。VIGSスクリーニングにより、ベンサミアナの疫病菌抵抗性に必須な遺伝子として、PDR (多剤耐性) 型ABCトランスポーター*NbABCG1*および*NbABCG2*をコードする遺伝子が同定された (Shibata *et al.*, 2016)。ベンサミアナゲノムから見つかった17のABCG型トランスポーター遺伝子のうち、*NbABCG1*と*NbABCG2*の発現だけがINF1エリシターの処理によって上昇した。*NbABCG1*と*NbABCG2*の両方 (*NbABCG1/2*) をサイレンシングすると、細胞質から葉面へのカプシジオールの分泌が損なわれたことから、これらABCトランスポーターがカプシジオールの輸送体であることが示唆された。さらに、*NbABCG1/2*のタバコのオルソログである*NtPDR1*のATPase活性がカプシジオールによって活性化されることが示され、カプシジオールが*NtPDR1*により輸送されることが直接的に示されている (Pierman *et al.*, 2017)。GFP標識した*NbABCG1*および2は細胞膜で検出され、ジャガイモ疫病菌の侵

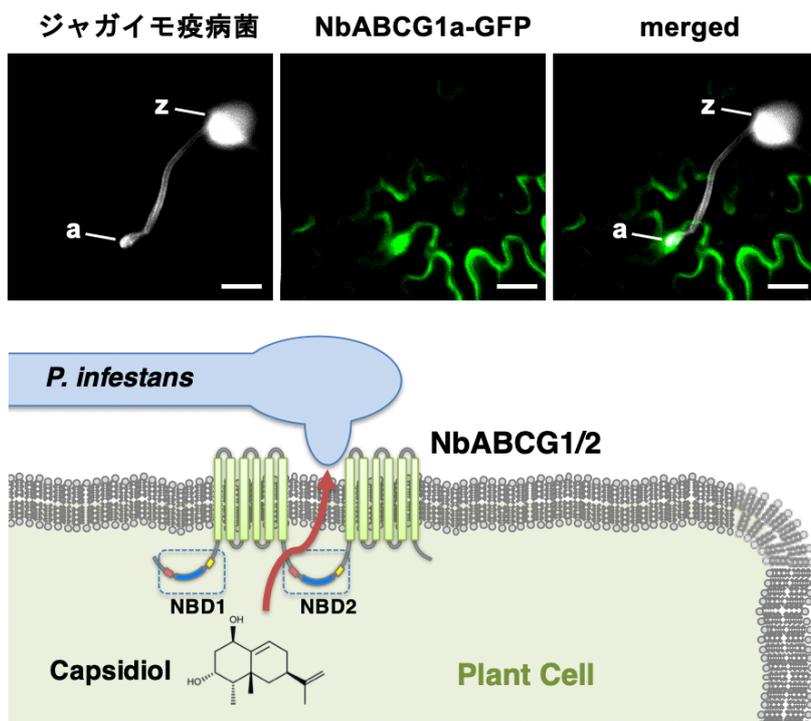


図3. カプシジオールのトランスポーター*NbABCG1a*のジャガイモ疫病菌侵入部位への局在 a, 付着器; z, 遊走子嚢

入時にはその侵入部位にGFP蛍光が局在化することから、NbABCG1/2が病原体の侵入部位での局所的なファイトアレキシン分泌に関与することが示唆されている (Shibata *et al.*, 2016、図3)。

3) ベンサミアナのジャガイモ疫病菌に侵入前抵抗性に関わる遺伝子群

ジャガイモ疫病菌のベンサミアナへの感染の試みの殆どは、表皮細胞層で阻止される (図4)。NbABCG1/2サイレンシング株では、ジャガイモ疫病菌の侵入率が有意に上昇したことから、これらのトランスポーターが侵入前の防御にも関与していることが示された。一方で、NbEAS遺伝子のサイレンシングによりカプシジオール生産を抑制しても、ジャガイモ疫病菌の侵入頻度

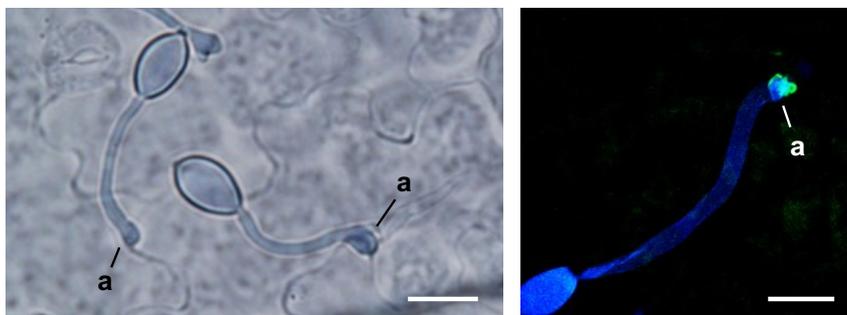


図4. 疫病菌のベンサミアナ表皮での感染行動

(左) ジャガイモ疫病菌はベンサミアナの表皮細胞の境目から侵入を試みる。(右) 付着器 (a) 直下でカロースの蓄積が認められる。菌糸 (青) はカリコフローホワイト、カロース (緑) はアニリンブルーで染色した。 Bars = 30 μm.

に影響はなかった (Shibata *et al.*, 2016)。以前の研究で、タバコにおけるNbABCG1/2のオルソログが、恒常的に産生される抗菌性ジテルペンであるスクラレオールの細胞外への分泌に関与することが報告されている

(Crouzet *et al.*, 2013)。そこで、ジテルペン合成に関与するゲラニルゲラニルピロリン酸合成酵素であるNbGGPPS遺伝子をサイレンシングしたところ、疫病菌の侵入率が上昇した (Shibata *et al.*, 2016)。したがって、NbABCG1/2は、ジテルペン輸送を介した侵入前抵抗性、およびカプシジオール輸送を介した侵入後抵抗性のいずれにも関与していることが示唆された。

4) フィトアレキシンの生産におけるエチレンを介したシグナル伝達的作用

VIGSスクリーニングで単離されたジャガイモ疫病菌抵抗性に必須な遺伝子には、エチレン生産に関連する6つの酵素遺伝子が含まれていた (表1)。また、エチレンのシグナル伝達因子であるNbEIN2のサイレンシング株では、カプシジオール生産が抑制され、ジャガイモ疫病菌に対する抵抗性も低下した。NbEASとNbEAHの発現はエチレン処理で上昇し、NbEIN2をサイレンシング

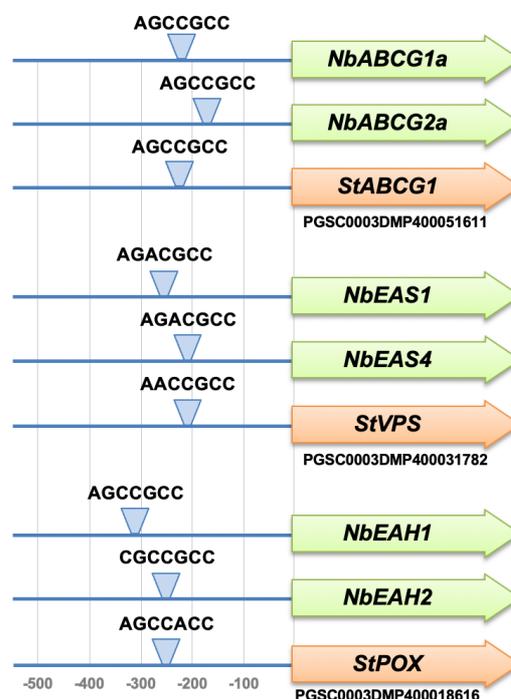


図5. ベンサミアナ (Nb) およびジャガイモ (St) のファイトアレキシン生産および分泌に関与する遺伝子のプロモーター領域に見出される GCC ボックス様の配列

すると低下した。さらに、メバロン酸経路のいくつかの遺伝子の発現もエチレン処理によって上昇することから、エチレンがベンサミアナのファイトアレキシン生成誘導を制御する植物ホルモンであることが示された。また、*NbEIN2*のサイレンシングにより、*NbABCG1/2*の発現も減少した (Ohtsu *et al.*, 2014; Shibata *et al.*, 2010, 2016)。*NbEAS*、*NbEAH*および*NbABCG1/2*のプロモーター領域には、エチレンに制御される遺伝子プロモーターの共通モチーフであるGCCボックスが確認された (伏見ら2015; Rin *et al.*, 2017; Takemoto *et al.*, 2018、図5)。同様に、ジャガイモのリシチン生成に参与する酵素遺伝子、*NbABCG1/2*のジャガイモのオルソログのプロモーター領域にもGCCボックス様の配列が認められることから (図5)、ジャガイモにおけるファイトアレキシンの生産・分泌の主要な制御因子もエチレンであると推定された。

5) 核-細胞質間輸送のファイトアレキシン生成誘導における役割

VIGSスクリーニングによって、核膜孔での核-細胞質間の輸送に関連する複数の因子の遺伝子が単離された (表1)。

*NbNup75*は、核膜孔の細胞質側と核側の両方に存在する核膜孔複合体の構成要素である (Kampmann and Blobel, 2009)。*NbNup75*の発現を抑制した植物では、エリシター処理によって誘導されるエチレン生産、メバロン酸経路の酵素遺伝子群、および*NbEAS*と*NbEAH*の発現誘導が抑制され、その結果カプシジオールの生産が著しく減少した (Ohtsu *et al.*, 2014)。

*NbNup75*サイレンシング株では、核質でのmRNAの異常な蓄積が観察されたことから、核から細胞質へのmRNAの輸出が防御反応の適切な活性化に重要なステップであると考えられる。また、低分子GTPaseの*NbRan1*、2および*Ran*結合タンパク質*NbRanBP1*、エクスポーチン*NbXpo1*など、核膜を介したタンパク質やRNA輸送の制御因子の遺伝子をサイレンシングした株においても、カプシジオールの産生が減少し、疫病菌抵抗性が低下することが示されている (Mizuno *et al.*, 2019a, 2019b、図6)。

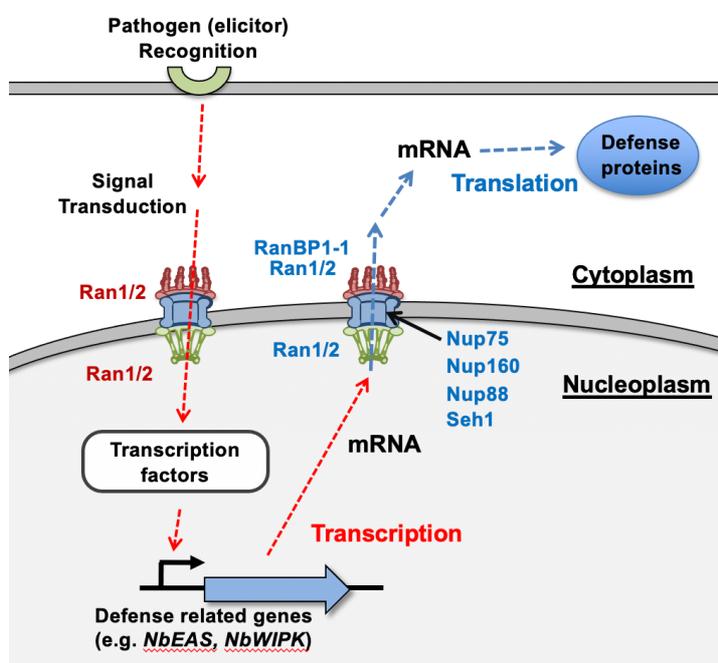


図 6. ベンサミアナの抵抗性誘導における核膜孔複合体を介した輸送機構の役割 (推定図)

6) 分泌タンパク質*NbSAR8.2m*

スクリーニングで得られたサイレンシング株の中で、最もジャガイモ疫病菌への抵抗性の低下が著しかった株では、機能未知の分泌タンパク質*NbSAR8.2m*をコードする遺伝子の発現が抑制されていた。*NbSAR8.2m*サイレンシング株に感染したジャガイモ疫病菌

は、ジャガイモへの感染時のように多数の吸器を形成し、感染が植物体全体に広がる（図7）。*sar8.2m*破壊株では、INF1エリター処理によるファイトアレキシン生産誘導に異常は認められないが、疫病菌感染時のファイトアレキシン生産は顕著に低下する（今野ら2018）。ベンサミアナ野生株に接種した場合と比較して、*sar8.2m*破壊株に感染している疫病菌では多くのエフェクター遺伝子の発現量が増加しており（今野ら2021）、恐らくその結果として、宿主のファイトアレキシン生産に関連する酵素遺伝子の発現が抑制されていた。このことから、SAR8.2mは疫病菌感染時のファイトアレキシン生産に必須な因子であると考えられるが、この分泌タンパク質がどのようにジャガイモ疫病菌に作用しているかは不明で、現在解析中である。



図7. *SAR8.2m* サイレンシング株のジャガイモ疫病菌接種による病徴 対照株では植物細胞死が認められるが、*SAR8.2m* サイレンシング株では多数の吸器 (h) 形成が観察される。Bars=40 μ m.

3. ジャガイモにおけるリシチン生合成および分解機構

ジャガイモ、トマト、ナスなどの *Solanum* 属の植物は、メバロン酸経路を介して生産されるファルネシル二リン酸を前駆体として、セスキテルペノイドであるルビミン、オキシルビミン、リシチンなどのファイトアレキシンを生産する。放射性同位元素を用いたトレーサー実験により、ソラベチボンとルビミンがリシチンの前駆体であることが明らかになっているが、これまでのところ、リシチン生成に関わる最初の2つの反応を触媒する酵素しか同定されていない（Back and Chappell, 1995; Stoessl and Stothers, 1983; Takahashi *et al.*, 2007）。

ソラベチボンからリシチンへの予測される中間体に基づいて、リシチン合成経路を触媒する酵素は4-6種類と推定している（図8）。

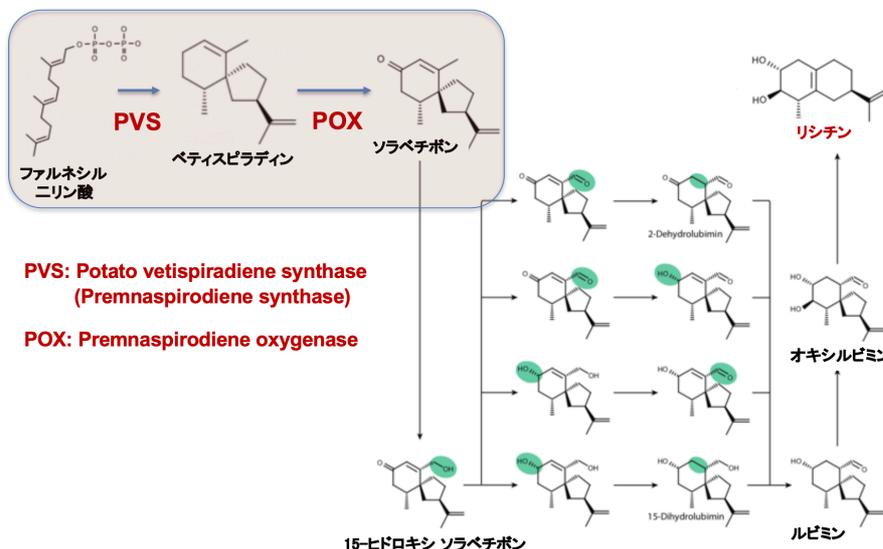


図8. ジャガイモにおけるリシチンの合成経路（推定）

一方で、ルビミンやリシチンなどは塊茎では蓄積するが、葉組織では検出されない（Rohwer *et al.*, 1987）。Yoshiokaら（2019）は、ジャガイモのファイトアレキシン生成の初発酵素であるPVSの遺伝子サイレンシング株の葉では、ジャガイモ疫病菌や夏疫病

菌への抵抗性が低下することを報告している。この結果は、ジャガイモ葉では、既知のファイトアレキシン以外のベティスピラジンを前駆体とする検出が困難な抗菌物質が生産されている可能性を示している。

1) リシチン生合成酵素遺伝子の単離の試み

ジャガイモ疫病菌由来の細胞壁成分エリシター (HWC) を処理したジャガイモ塊茎およびトマト果実のリシチン生産量を調査し、同じサンプルの RNAseq 解析を行うことで、リシチン生産量と相関する発現パターンを示す酵素遺伝子群をリシチン生合成酵素の候補遺伝子としてリスト化した (Camagna *et al.*, unpublished)。これら酵素の活性を検出するため、ベンサミアナ葉でのアグロバクテリウムを介した一過的発現系を用いた実験系を構築した。まず、前駆体であるファルネシル 2 リン酸の生産を誘導するため、INF1 エリシターを処理したところ、ベンサミアナの3種のファイトアレキシンの生成が認められた (図 9)。ベンサミアナ葉に前もって PVS を発現させると新たなピーク (構造未決定) が検出され、さらに PVS と POX を同時に発現させると、ソラベチボンが検出された (図 9)。この結果から、ジャガイモのファイトアレキシン生合成系の一部がベンサミアナ葉で再現できることが示された。そこで、RNAseq 解析で見出された候補遺伝子をさらに発現させて生合成系を解明することを目指しているが、現在まで新たな酵素遺伝子の単離には至っていない。一方で、本実験系を応用して、リシチンの解毒・代謝に関与するジャガイモ遺伝子が単離された。

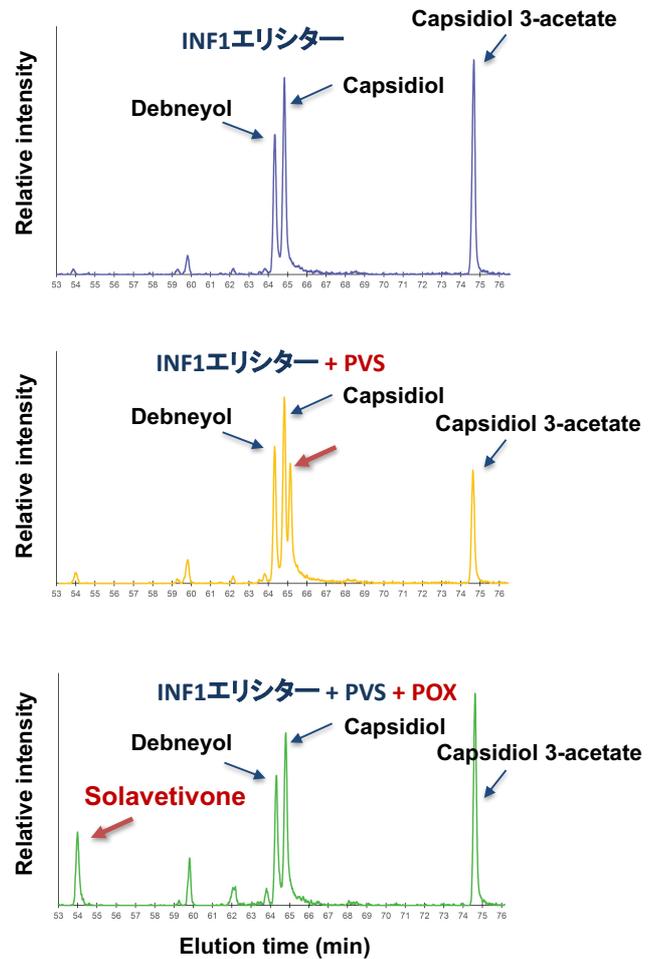


図 9. ベンサミアナでの一過的遺伝子発現系によるリシチン生合成経路の解明の試み

(上) ベンサミアナへの INF1 エリシター処理による3種類のファイトアレキシンの生産
 (中) ジャガイモ PVS 遺伝子の発現による新たなピーク (赤矢印)
 (下) PVS および POX の発現によるソラベチボンの生産。GCMS により検出。

2) リシチンの解毒化に関与するシトクロム P450 - SPH

ファイトアレキシンは病原菌だけではなく植物細胞に対しても毒性を示すことが知られており (Lyon, 1980; Polian *et al.*, 1997)、病原菌が排除された後に速やかに分解される必要がある。1970年代後半に、ジャガイモの健全組織においてリシチンがリシチン-M1 (13-hydroxyrishitin) に解毒代謝されることが報告されたが (Ishiguri *et al.*, 1978)、その代謝機構は長らく不明であった。ジャガイモ由来のシトクロム P450 (CYP762L) 遺伝子を

発現させたベンサミアナ葉にリシチンを注入したところ、速やかにリシチン-M1に変換された（図 10）。このシトクロム P450 は、リシチン前駆物質であるソラベチボン、ルビミンさらにはカ

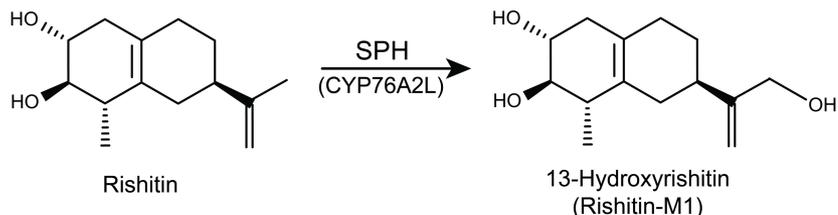


図 10. ジャガイモ SPH によるリシチンの代謝（解毒化）

プシジオールもヒドロキシル化することから、SPH（Sesquiterpenoid phytoalexins hydroxylase）と名付けた。*StSPH* 相同遺伝子はセスキテルペノイドの抗菌性物質を生産するトマト、ナス、タバコ、ピーマンなどナス科植物でのみ見いだされ、ゲノム重複によるコピー数の増加も認められた。以上の結果から、本酵素を介したファイトアレキシン解毒がナス科植物に共通した機構であることが示された（Camagna *et al.*, 2020）。

4. 病原糸状菌によるカプシジオールおよびリシチンの解毒・代謝

カプシジオールおよびリシチンが、植物病原性糸状菌および卵菌の生育をどの程度阻害するのかを明らかにするため、種々の病原菌にこれらファイトアレキシンを処理し、生育の阻害とファイトアレキシンの代謝能を調べた。その結果、ナス科植物から分離された病原糸状菌 8 種のうち、6 種がカプシジオールを、5 種がリシチンを代謝し、これら病原菌では 100 μM のカプシジオールあるいはリシチン処理による生育阻害は殆ど認められなかった。一方で、供試した 4 種の植物病原性卵菌（すべて *Phytophthora* 属菌）では、カプシジオールおよびリシチン代謝能は認められず、ファイトアレキシンによって生育が著しく阻害された（黒柳ら 2016）。この結果は、ファイトアレキシンの解毒化能が病原性糸状菌の基本的な能力として比較的広範な菌に獲得されているのに対して、*Phytophthora* 属菌ではファイトアレキシン生産の（エフェクターによる）抑制が必要であることを示している。供試した菌の中でも、多犯性の病原菌である灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* および菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* は、カプシジオールおよびリシチンの高い代謝能と耐性を示した。

5. 灰色かび病菌によるファイトアレキシンの分解および排出機構

灰色かび病菌は 1,400 種以上の植物への感染が知られている極めて多犯性の病原菌であり、様々なファイトアレキシンを解毒・代謝することが知られている（Elad *et al.*, 2016; Pedras and Ahiahou, 2005）。灰色かび病菌にカプシジオールあるいはリシチンを処理すると、これらのファイトアレキシンは速やかに代謝される。カプシジオールは、脱水素反応によりカプセノンに解毒化され（Ward and Stoessl, 1972）、さらに酸素添加反応により変換された。一方で、リシチ

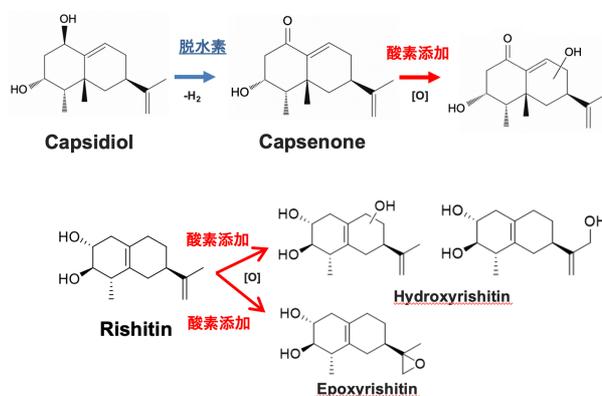


図 11. 灰色かび病菌によるカプシジオールおよびリシチンの解毒代謝

ンは（恐らく複数のシトクロム P450 による）酸素添加反応によって 3-4 種類の代謝物に変換された（図 11）。カプシジオールとリシチンは構造的に極めて類似しているにもかかわらず、代謝のプロセスは異なる。このような使い分けはどの様に行われているのだろうか？そこで、カプシジオール、リシチンおよびブドウのファイトアレキシンであるレスベラトロールを処理した灰色かび病菌の RNAseq 解析を行い、発現パターンを比較した。

灰色かび病菌は、約 12,000 の（タンパク質をコードした）遺伝子を持っているが、これらファイトアレキシンの処理によって顕著に発現誘導される（Log2 FC>2、P<0.05）遺伝子を調べたところ、それぞれの処理区で 20 数遺伝子が見出され、異なる処理区間で共通する遺伝子は少なかった（図 12、黒柳ら 2018）。この結果から、灰色かび病菌は異なるファイトアレキシンに応答して、違うセットの遺伝子群の発現を活性化することが示された。

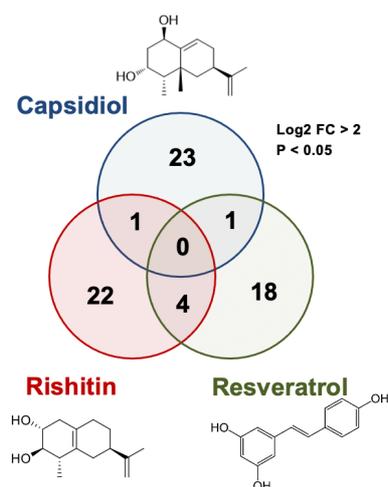


図 12. 異なるファイトアレキシンの処理で発現誘導される灰色かび病菌の遺伝子数の比較

1) 灰色かび病菌のカプシジオール解毒に関与する脱水素酵素 BcCPDH

カプシジオール処理によって最も顕著に発現誘導された灰色かび病菌の遺伝子は、Short chain dehydrogenase をコードしており、カプシジオール解毒化において脱水素反応（図 11）を担っていると推定された。この遺伝子をイネ科牧草の共生糸状菌 *Epichloë festucae*（エンドファイト）において異所発現したところ、本来カプシジオールに感受性のエンドファイトが耐性化し、カプシジオールを脱水素してカプセノンに代謝する能力を獲得した。そこで、この脱水素酵素を CPDH（Capsidiol dehydrogenase）と名付けた。灰色かび病菌の *cpdh* 破壊株を作出したところ、カプシジオールのカプセノンへの代謝能が失われ、カプシジオールを産生する植物への感染能が低下した（図 13、黒柳ら 2019）。灰色かび病菌を、20 科 54 種の植物に接種して *BcCPDH* 遺伝子の発現を調査したところ、本遺伝子はカプシジオールを生産する植物への感染時にのみ特異的に発現誘導されることが示された。

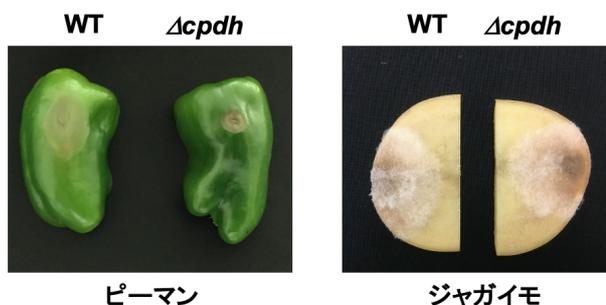


図 13. 灰色かび病菌 *cpdh* 破壊株のピーマン（カプシジオールを生産）への病原性の低下
ジャガイモへの病原性は野生株と同等であった。

2) 灰色かび病菌のリシチン耐性に関与する ABC トランスポーター BcatrB

リシチンおよびレスベラトロールに発現誘導される遺伝子として、ABC トランスポータをコードする *BcatrB* 遺伝子が単離された（図 14）。本遺伝子は、レスベラトロール、カマレキシンおよびフェニルピロール系殺菌剤に対する灰色かび病菌の耐性に関与することが既に報告されている（Schoonbeek *et al.*, 2001）。*BcatrB* のリシチン耐性における

機能は明らかではなかったため、*BcatrB* 遺伝子破壊株を作出し表現型の調査をしたところ、リシチンに対して感受性となり（図 14）、トマトにおける病原性も低下した一方で、ベンサミアナでの病徴に変化はなかった。この結果より、*BcatrB* はリシチンを生産する植物への病原性に関与することが示された。

灰色かび病菌を、13 科 21 種の植物に接種して *BcatrB* 遺伝子の発現を調査したところ、ジャガイモ以外にもアブラナ科およびマメ科植物への感染時に発現誘導が認められた。*BcatrB* 遺伝子の発現はアブラナ科およびマメ科植物由来のファイトアレキシン（ブラシニン、カマレキシン、メディカルピン）の処理によっても活性化した。一方で、*BcatrB* 遺伝子の発現はカプシジオール処理によって誘導されず、*BcatrB* 遺伝子破壊株のカプシジオール耐性は野生株と同等であった（Bulasag ら 2021）。以上の結果から、灰色かび病菌は植物の生産するファイトアレキシン（あるいはその抗菌活性）を認識して、適切な解毒化・耐性化機構を活性化していることが示唆された。

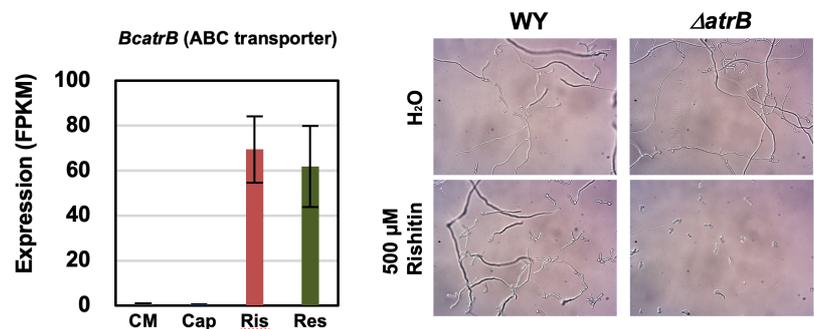


図 14. ABC トランスポータ遺伝子 *BcatrB* のリシチン耐性への役割
 (左) ファイトアレキシン処理時の *BcatrB* 遺伝子の発現誘導。
 (右) *BcatrB* 破壊株 ($\Delta atrB$) はリシチンへの耐性が低下する。

おわりに

植物が持つ微生物への抵抗性機構の重要性を評価するのは難しい。例えば、ある植物は、腐生菌、基本的親和性を持たない非適応型の植物病原菌、適応型の非親和性菌、軽度の病徴を示す病原菌など、様々な微生物と対峙しており、それぞれの微生物に対して有効な抵抗性の要素は異なる。研究の対象となる植物-病原菌の系は、病害の問題となる基本的親和性を持っている病原菌の異なる系統とその宿主植物の関係が扱われることが多く、ファイトアレキシン生産のような基本的な抵抗性機構はすでに打破されてしまい、両者の戦いの争点が別の要素に移っている場合も多いだろう。1960-70年代の植物病理学研究ではファイトアレキシンの単離と構造決定が盛んに行われたが、その植物-病原菌における重要性を明確に示した研究は、未だに限られている。

例えば、TMV を接種したタバコで真菌の細胞壁分解酵素であるキチナーゼやグルカナーゼの遺伝子発現が活性化されるように、植物の抵抗性応答誘導の全てが常に合理的であるわけではない（主となる病原菌の感染後の日和見感染に備えているとの説明もできるが）。また病原菌についても同様で、著者らがナス科植物以外の病原菌を用いてカプシジールやリシチンの分解活性を調べたところ、メロンつる割病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* がカプシジオールを分解し、ムギ類赤かび病菌 *F. graminearum* がリシチンを分解したうえでリシチン処理で生育がむしろ促進される（資化している）など、代謝能と病原性は必ずしも合理的に説明できない（黒柳ら 2016）。植物も病原菌もいつも有効とは限らないカードを維持することで、生き残りさらに発展する可能性を高めているのだろう。

謝辞

ベンサミアナの種子を分与いただいたオーストラリア国立大学のDavid A. Jones博士、INF1の発現ベクターを分与いただいたSainsbury LaboratoryのSophien Kamoun教授、サイレンシングベクターを分与いただいたケンブリッジ大学のDavid C. Baulcombe教授、合成リシチンを提供いただいた元北海道大学の村井章夫先生および元名古屋大学の道家紀志先生、菌株の提供をいただいた北海道大学の秋野聖之講師、北海道立総合研究機構の白井佳代研究主査、農研機構 遺伝資源センター (農業生物資源ジーンバンク)、中部大学の拓殖尚志教授、京都大学の高野義孝教授、三重県農業研究所の川上拓主査研究員、糸状菌の形質転換ベクターを分与いただいた元Massey大学のBarry Scott先生に深く御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり、名古屋大学の吉岡博文准教授、植物病理学研究室の皆様にご助言と御助力を頂きました。これらの方々に、ここに記して感謝の意を表します。本研究は、科学研究費補助金、住友財団-基礎科学研究助成の支援を受けて実施しました。

引用文献

- Back, K. and Chappell, J. (1975) Cloning and bacterial expression of a sesquiterpene cyclase from *Hyoscyamus muticus* and its molecular comparison to related terpene cyclases. *J. Biol. Chem.* 270: 7375-7381.
- Bailey, J.A., Burden, R.S. and Vincent, G.G. (1975) Capsidiol: An antifungal compound produced in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana clevelandii* following infection with tobacco necrosis virus. *Phytochemistry* 14: 597.
- Brooks, C.J.W. and Watson, D.G. (1985) Phytoalexins. *Nat. Prod. Rep.* 427-459.
- Bulasag Abriel・黒柳輝彦・鈴木孝征・佐藤育男・千葉壮太郎・小鹿 一・竹本大吾 (2021) 種々のファイトアレキシン処理により発現誘導される灰色かび病菌の ABC トランスポーター遺伝子 *BcatrB* の機能解析. 令和3年度日本植物病理学会関西部会 (講演要旨)
- Camagna, M., Ojika, M. and Takemoto, D. (2020) Detoxification of the solanaceous phytoalexins rishitin, lubimin, oxylubimin and solavetivone via a cytochrome P450 oxygenase. *Plant Signal. Behav.* 15: 1707348.
- Coleman, J.J., White, G.J., Rodriguez-Carres, M., and VanEtten, H.D. (2011) An ABC transporter and a cytochrome P450 of *Nectria haematococca* MPVI are virulence factors on pea and are the major tolerance mechanisms to the phytoalexin pisatin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 368-374.
- Crouzet, J., Roland, J., Peeters, E., Trombik, T., Ducos, E., Nader, J. and Boutry, M. (2013) NtPDR1, a plasma membrane ABC transporter from *Nicotiana tabacum*, is involved in diterpene transport. *Plant Mol. Biol.* 82: 181-192.
- Cruickshank, I.A.M. (1962) Studies on phytoalexins, IV. The antimicrobial spectrum of pisatin. *Aust. J. Biol. Sci.* 15: 147-159.
- Dixon, R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Ebel, J., and Mithöfer, A. (1998) Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* 206: 335-348.
- 伏見真由香・小鹿一・加藤新平・川北一人・竹本大吾 (2015) ベンサミアナタバコファイトアレキシン合成酵素遺伝子 *NbEAS* のプロモーター領域の解析. 平成27年度日本植物病理学会 (講演要旨) p91.
- Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A.M., and Stewart, A. (2016) Plant hosts of *Botrytis* spp. Pages 413-486 in: *Botrytis*-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. S. Fillinger and Y. Elad, eds. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland.
- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A. and Lommel, S.A. (2008) *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 1015-1026.
- Goodman, R.N. and Novacky, A.J. (1994) The hypersensitive reaction in plants to pathogens : a resistance phenomenon. APS Press, St Paul.

- Hammerschmidt, R. and Dann, E.K. (1999) The role of phytoalexins in plant protection. *Novartis Foundat. Symp.* 223: 175-190.
- Hartmann, M.A. (1998) Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* 3: 170-175.
- 今野沙弥香・近藤洋平・柴田裕介・近藤竜彦・佐藤育男・千葉壮太郎・景山幸二・川北一人・竹本大吾 (2018) ベンサミアナの分泌ペプチド SAR8.2 は遠縁な種々の *Phytophthora* 属菌に対する非宿主抵抗性に関与する. 平成 30 年度日本植物病理学会関西部会 (講演要旨) p32.
- 今野沙弥香・近藤洋平・柴田裕介・鈴木孝征・田中愛子・佐藤育男・千葉壮太郎・景山幸二・川北一人・竹本大吾 (2021) ベンサミアナの疫病菌抵抗性に必須な *SAR8.2m* 遺伝子の破壊株では疫病菌が効率的に宿主の抵抗性応答を抑制し感染を確立させる. 令和 3 年度植物病理学会 (講演要旨) p38.
- Ishiguri, Y., Tomiyama, K., Murai, A., Katsui, N. and Masamune, T. (1978) Toxicity of rishitin, rishitin-M-1 and rishitin-M-2 to *Phytophthora infestans* and potato tissue. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 44: 52-56.
- Katsui, N., Murai, A., Takasugi, M., Imaizumi, K. and Masamune, T. (1968) The structure of rishitin, a new antifungal compound from diseased potato tubers. *Chem. Commun.* 1: 43-44.
- Kampmann, M. and Blobel, G. (2009) Three-dimensional structure and flexibility of a membrane-coating module of the nuclear pore complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 782-788.
- 黒柳輝彦・小鹿 一・佐藤育男・千葉壮太郎・川北一人・竹本大吾 (2016) ナス科植物の産生するファイトアレキシンの植物病原性糸状菌による代謝の解析. 第16回糸状菌分子生物学コンファレンス (講演要旨) p90.
- 黒柳輝彦・小鹿 一・鈴木孝征・佐藤育男・千葉壮太郎・川北一人・竹本大吾 (2018) 灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* が植物由来の抗菌物質の解毒時に発現する遺伝子群の RNAseq 解析. 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス (講演要旨) p84.
- 黒柳輝彦・小鹿 一・鈴木孝征・佐藤育男・千葉壮太郎・川北一人・竹本大吾 (2019) 灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* が持つカプシジオール解毒酵素遺伝子 *BcCPDH* の単離と真菌における本遺伝子の分布の解析. 平成31年度日本植物病理学会 (講演要旨) p64.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S. and Schulze-Lefert P. (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science* 310: 1180-1183.
- Lyon, G.D. (1980) Evidence that the toxic effect of rishitin may be due to membrane damage. *J. Exp. Bot.* 37: 957-966.
- Mizuno, Y., Ohtsu, M., Shibata, Y., Tanaka, A., Camagna, M., Ojika, M., Mori, H., Sato, I., Chiba, S., Kawakita, K. and Takemoto, D. (2019a) *Nicotiana benthamiana* RanBP1-1 is involved in the induction of disease resistance via regulation of nuclear-cytoplasmic transport of small GTPase Ran. *Front. Plant Sci.* 2019 10: 222.
- Mizuno, Y., Imano, S., Camagna, M., Suzuki, T., Tanaka, A., Sato, I., Chiba, S., Kawakita, K. and Takemoto, D. (2019b) *Nicotiana benthamiana* exportin 1 is required for elicitor-induced phytoalexin production, cell death induction, and resistance against potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *J. Gen. Plant Pathol.* 85: 347-355.
- Morrissey, J.P. and Osbourn, A.E. (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 708-724.
- Müller, K.O. and Börger, H. (1940) Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora: Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Anst. Reichsanst.* 23: 189-231.
- Ohtsu, M., Shibata, Y., Ojika, M., Tamura, K., Hara-Nishimura, I., Mori, H., Kawakita, K. and Takemoto, D. (2014) Nucleoporin 75 is involved in the ethylene-mediated production of phytoalexin for the resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27: 1318-1330.

- Pedras, M.S. and Ahiahonu, P.W. (2005) Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry*. 66: 391-411.
- Pierman, B., Toussaint, F., Bertin, A., Lévy, D., Smargiasso, N., De Pauw, E. and Boutry, M. (2017) Activity of the purified plant ABC transporter NtPDR1 is stimulated by diterpenes and sesquiterpenes involved in constitutive and induced defenses. *J. Biol. Chem.* 292: 19491-19502.
- Polian, C., Coulomb, P.J., Lizzi, Y. and Coulomb, C. (1997) Membrane alteration of capsidiol-treated pepper leaf protoplasts. *C. R. Acad. Sci.* 320: 721-727.
- Rin, S., Mizuno, Y., Shibata, Y., Fushimi, M., Katou, S., Sato, I., Chiba, S., Kawakita, K. and Takemoto, D. (2017) EIN2-mediated signaling is involved in pre-invasion defense in *Nicotiana benthamiana* against potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. *Plant Signal. Behav.* 12 :e1300733.
- Rin, S., Imano, S., Camagna, M., Suzuki, T., Tanaka, A., Sato, I., Chiba, S., Kawakita, K. and Takemoto, D. (2020) Expression profiles of genes for enzymes involved in capsidiol production in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Plant Pathol.* 86: 340-349.
- Rohwer, F., Fritzscheier, K.H., Scheel, D. and Hahlbrock, K. (1987) Biochemical reactions of different tissues of potato (*Solanum tuberosum*) to zoospores or elicitors from *Phytophthora infestans*. *Planta* 170: 556-561.
- Shibata, Y., Kawakita, K. and Takemoto, D. (2010) Age-related resistance of *Nicotiana benthamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene- and salicylic acid-mediated signaling pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23: 1130-1142.
- Shibata, Y., Kawakita, K., and Takemoto, D. (2011). SGT1 and HSP90 are essential for age-related non-host resistance of *Nicotiana benthamiana* against the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 75: 120-128.
- Shibata, Y., Ojika, M., Sugiyama, A., Yazaki, K., Jones, D.A., Kawakita, K. and Takemoto, D. (2016) The full-size ABCG transporters Nb-ABCG1 and Nb-ABCG2 function in pre- and postinvasion defense against *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 28: 1163-1181.
- Schoonbeek, H., Del Sorbo, G., and De Waard, M.A. (2001) The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 14: 562-571.
- Stoessl, A. and Stothers, J.B. (1983) Biosynthesis of antifungal stress metabolites from potato: observation of hydride shifts via the “ β -hop” from incorporation of [2-²H₃,2-¹³C]acetate and ¹³Cmr^{1,2}. *Can. J. Chem.* 61: 1766-1770.
- Takahashi, S., Yeo, Y.S., Zhao, Y., O’Maille, P.E., Greenhagen, B.T., Noel, J.P., Coates, R.M. and Chappell, J. (2007) Functional characterization of premnaspirodiene oxygenase, a cytochrome P450 catalyzing regio- and stereo-specific hydroxylations of diverse sesquiterpene substrates. *J. Biol. Chem.* 282: 31744-31754.
- Takemoto, D., Shibata, Y., Ojika, M., Mizuno, Y., Imano, S., Ohtsu, M., Sato, I., Chiba, S., Kawakita, K., Rin, S. and Camagna, M. (2018) Resistance to *Phytophthora infestans*: exploring genes required for disease resistance in Solanaceae plants. *J. Gen. Plant Pathol.* 84: 312-320.
- Vance, C.P., and Sherwood, R.T. (1977) Lignified papilla formation as a mechanism for protection in reed canarygrass. *Physiol. Plant. Path.* 10: 247-256.
- Ward E.W.B. and Stoessl, A. (1972) Postinfectious inhibitors from plants. III. Detoxification of capsidiol, an antifungal compound from peppers. *Phytopathology* 62: 1186-1187.
- Yoshioka, M., Adachi, A., Sato, Y., Doke, N., Kondo, T. and Yoshioka, H. (2019) RNAi of the sesquiterpene cyclase gene for phytoalexin production impairs pre- and post-invasive resistance to potato blight pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 20: 907-922.

青枯病菌のクオラムセンシングシグナル伝達機構

曳地康史*・竹村知夏*・寺澤夕貴*・井上加奈子**・木場章範*・大西浩平*・甲斐建次***

Hikichi, Y., Takemura, C., Terazawa, Y., Inoue, K., Kiba, A., Ohnishi, K. and Kai, K.

Mechanisms of quorum sensing signalling cascade of *Ralstonia solanacearum* species complex

Abstract

The soil-borne Gram-negative beta-proteobacterium *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) causes a devastating bacterial wilt disease on over 250 plant species worldwide. An RSSC phylotype I strain, *R. pseudosolanacearum* strain OE1-1, produces methyl 3-hydroxymyristate (3-OH MAME) as a quorum sensing (QS) signal via the methyltransferase PhcB and secretes the chemical. The strain OE1-1 senses extracellular 3-OH MAME through the sensor histidine kinase PhcS, leading to the functional LysR family transcriptional regulator PhcA, which regulates QS-dependent genes responsible for the QS-dependent phenotypes including virulence. To elucidate the QS signalling cascade of strain OE1-1, we identified PhcK as a QS-related sensor histidine kinase, and PhcR and PhcQ as QS-related response regulators with a receiver domain and no DNA-binding domain. The transcriptome analysis with RNA sequencing of mutant with deletion of each of these genes showed that PhcK was involved in full expression of *phcA*, independently of extracellular 3-OH MAME content. PhcQ mainly contributed to the regulation of QS-dependent genes by functional PhcA, in which PhcR was partially involved, dependently on extracellular 3-OH MAME content. An outer membrane-located lectin LecM, and extracellularly secreted secondary metabolites, ralfuranone and major exopolysaccharide EPS I, are required for OE1-1 virulence. Their production is induced during QS. LecM affected the QS activation through the enhanced

* 高知大学農林海洋科学部 Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, 200 Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502, JAPAN.

** 大阪大学超高压電子顕微鏡センター Research Center for Ultra-High Voltage Electron Microscopy, Osaka University, Ibaraki, Osaka 567-0047, JAPAN

*** 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 599-8531, JAPAN.

stability of extracellular 3-OH MAME. In addition, ralfuranone and EPS I were associated with the feedback loop of regulation of QS-dependent genes. Overall, the integrated intracellular/intercellular signalling of OE1-1 cells via ralfuranone and EPS I, coupled with QS of which activity is dependently on LecM-mediated extracellular 3-OH MAME stability, contribute to the elaborate and tunable regulation of OE1-1 virulence.

Key words: *Ralstonia pseudosolanacearum*, quorum sensing, virulence

はじめに

多くのグラム陰性細菌は、クオラムセンシング (QS) シグナルを分泌し、細胞外に存在する QS シグナルを感知して、自らの細菌密度をはかり知る。そして、周囲の細菌密度の変化に応じて、細胞間情報伝達を行い、特定の遺伝子の発現を制御できる QS を用いて、行動を集合的に変化させて、病原性因子の産生・分泌やバイオフィルムの形成などを行う (Balteneck *et al.*, 2021; Ham, 2013)。グラム陰性細菌の QS シグナルとして、*N*-アシルホモセリンラクトン環と 4-18 の炭素鎖を有するアシルホモセリンラクトン (AHL) が最も有名である (Galloway *et al.*, 2011)。AHL 以外にも、*Xanthomonas campestris*、*Pseudomonas aeruginosa* および *Burkholderia cenocepacia* などにより拡散性シグナル因子 DSF が、*Vibrio harveyi* によりオートインデューサー 2 (AI-2) が、*P. aeruginosa* により 2-ヘプチル 3-ヒドロキシ-4-キノロン (PQS) が、*V. cholerae* や *V. harveyi* などによりコレラオートインデューサー 1 (CAI-1) が、QS シグナルとして産生される。これらの QS シグナルの構造は、細菌種に特徴的である。これまでに、植物病原細菌の病原力に関わる物質生産の QS による制御と、QS に関するシグナル伝達系の報告は数多くあるが、その全容が解明された事例はない。

土壌生息性のグラム陰性細菌である青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* species complex は、250 以上の植物種に萎凋症状をもたらし、世界の農業生産に甚大な被害を与えている (Mansfield *et al.*, 2012)。Phylotype I の青枯病菌 *R. pseudosolanacearum* OE1-1 株 (OE1-1) は、植物の根の根冠周辺の表皮細胞表面に付着後、皮層細胞の細胞間隙に侵入する。そして、皮層細胞を破壊し、その内部で増殖を行い、QS を起動して、細胞集団構造物であるマッシュルーム型バイオフィルム (mBF) を形成する (Inoue *et al.*, in preparation)。mBF の形成に伴い、青枯病菌は、病原性をプライミングする (Hayashi *et al.*, 2019a)。そのため、QS は、OE1-1 の病原力に不可欠なシグナル伝達系である (Hikichi *et al.*, 2017)。

1990-2000 年代に、phylotype IIA の青枯病菌 *R. solanacearum* AW1 株 (AW1) を用いて、QS 機構の解明が行われた (Schell, 2000)。AW1 は、メチルトランスフェラーゼである PhcB タンパク質 (PhcB) により産生した QS シグナル methyl 3-hydroxypalmitate (3-OH PAME) を分泌し、細胞内膜に局在するセンサーヒスチジンカイネース (SK) である PhcS タンパク質 (PhcS) を介して受容する (Flavier *et al.*, 1997)。Schell (2000) は、phcB 遺伝子 (*phcB*)、phcS 遺伝子 (*phcS*)、お

よび *phcB* と *phcS* とオペロンを形成し、リン酸基レシーバードメインを有するが DNA 結合ドメインを持たないレスポンスレギュレーター (RR) である PhcR タンパク質 (PhcR) をコードする *phcR* 遺伝子 (*phcR*) それぞれの欠損株 $\Delta phcB$ 、 $\Delta phcS$ および $\Delta phcR$ の、QS 起動時に誘導される主要な菌体外多糖 EPS I 産生量、および植物細胞壁分解酵素 Egl による endoglucanase 活性と Pme による pectin methyl esterase 活性の結果から、AW1 の QS シグナル伝達系を提案した。3-OH PAME を受容し、自己リン酸化した PhcS は、PhcS と 2 成分制御系を成す PhcR をリン酸化する。低細菌密度の AW1 では、リン酸化されていない PhcR は、LysR 型転写制御因子 PhcA タンパク質 (PhcA) に結合し、PhcA の機能を阻害する。一方、高細菌密度で QS が起動した AW1 では、リン酸化 PhcR は PhcA に結合できず、PhcA は転写制御因子として機能する。しかし、この Schell の提案の基になった研究 (Clough *et al.*, 1997) で、EPS I 産生量、endoglucanase 活性および pectin methyl esterase 活性が、 $\Delta phcB$ に比べて、 $\Delta phcR$ では有意に高く、Schell の提案には、矛盾が認められた。さらに、3-OH PAME 処理により、OE1-1 の QS 能に増大は認められなかった (Hikichi *et al.*, 2017)。

そこで、OE1-1 の QS シグナル伝達機構の解明を目的に、我々は、まず、OE1-1 が、QS シグナルとして、3-OH PAME ではなく、methyl 3-hydroxymyristate (3OH-MAME) を産生することと、青枯病菌菌株は、QS シグナルとして、3-OH PAME と 3OH-MAME のいずれかを産生することを明らかにした (Kai *et al.*, 2015)。そして、3-OH PAME と 3OH-MAME それぞれの産生系を解明した (Ujita *et al.*, 2019)。3-OH MAME のアナログ化合物の中から、OE1-1 の QS 能阻害活性のある PQI 化合物を選抜した (Yoshihara *et al.*, 2019)。この PQI 化合物を処理すると、トマト植物の青枯病発病が顕著に減少した。すなわち、QS は、OE1-1 の病原力の主幹シグナル系であり、青枯病防除のための格好の標的であることを明らかにした (Hikichi *et al.*, 2017)。さらに、PhcB と PhcS のアミノ酸配列を基にした青枯病菌菌株の系統解析から、3-OH PAME を産生する phylotype III の祖先種から、phylotype I、II および IV への分化が行われ、phylotype I と IV それぞれで 3-OH MAME 産生と受容の分化が行われたことを明らかにした (Kai *et al.*, 2015; Senuma *et al.*, 2020; Takemura *et al.*, submitted)。QS シグナルの産生と受容が、青枯病菌の病原力と分化に重要な位置づけであることは明らかとなったが、QS シグナル伝達系は未解明なままであった。そこで、OE1-1 のゲノム情報を基に、QS におけるシグナル伝達に不可欠な 2 成分制御系の SK と RR をコードすると推定された遺伝子それぞれの欠損株の中から、QS 能喪失株を選抜した。本稿では、RNA-sequencing (RNA-seq) を用いて、QS 能喪失株のトランスクリプトーム解析から得られた QS に依存した遺伝子の発現制御機構とともに、QS シグナル伝達系に関する新知見を紹介する。

1. QS 能喪失株の選抜

QS シグナル伝達系には、SK による QS シグナルの受容と自己リン酸化、そして、SK から RR へのリン酸基の伝達が重要である (Capra and Laub, 2012; Gao

and Stock, 2009)。そこで、ゲノム配列から SK をコードすると推定された 遺伝子それぞれの欠損株を OE1-1 から作製し、これら欠損株の QS 能として、QS 依存形質であるバイオフィーム形成能、EPS I 産生能、運動能 (swimming motility) および病原力を解析した。そして、RSc1351 遺伝子 (*phcK*) 欠損株 ($\Delta phcK$) の QS 能が、 $\Delta phcB$ と *phcA* 遺伝子 (*phcA*) 欠損株 ($\Delta phcA$) と同様に、OE1-1 と比較して、著しく低下することを見出した (図 1; Senuma *et al.*, 2020)。

DNA 結合ドメインを有さない RR をコードする *phcQ* 遺伝子 (*phcQ*) は、*phcB*、*phcS* および *phcR* とオペロンを構成する (Salanoubat *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2020)。 *phcQ* 欠損株 ($\Delta phcQ$) の QS 能は、 $\Delta phcA$ と同様に、OE1-1 と比較して顕著に低下した。一方、*phcR* 欠損により、QS 能は低下したが、その程度は、*phcA* 欠損と比べて低かった。さらに、トマト植物に根部浸漬接種を行うと、 $\Delta phcK$ と $\Delta phcQ$ は、 $\Delta phcA$ と同様に、導管への侵入能を失い、病原力を喪失した。一方、 $\Delta phcR$ は、導管への侵入能を維持し、OE1-1 とほぼ同等の病原力を示した。

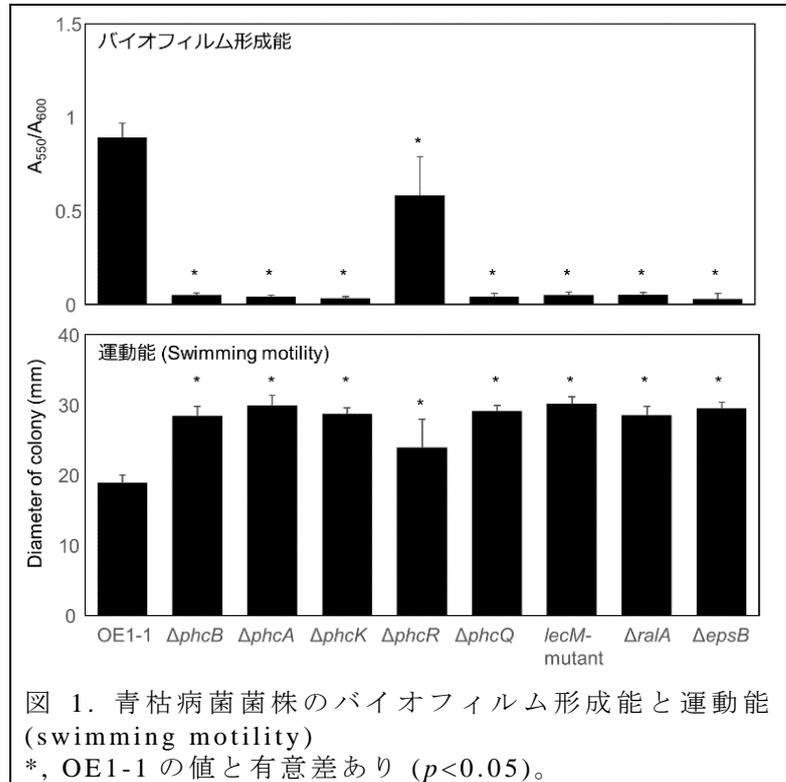


図 1. 青枯病菌菌株のバイオフィーム形成能と運動能 (swimming motility)
*, OE1-1 の値と有意差あり ($p < 0.05$).

2. PhcK は *phcA* の発現制御に関わる

OE1-1、 $\Delta phcB$ 、 $\Delta phcA$ および $\Delta phcK$ を 1/4×M63 培地で OD₆₀₀=0.3 まで培養し、抽出した RNA を用いて、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。OE1-1 で発現が認められた 4,304 遺伝子のリード数を基に、それぞれでの菌株での発現量の相対的比較値 $\log(\text{fold change})$ と false discovery rate (q 値) を R にて算出し、 q 値 < 0.05 で、 $2 < \log(\text{fold change})$ と $\log(\text{fold change}) < -2$ になった遺伝子それぞれを、OE1-1 と比較して有意に発現が上昇・低下すると判断した。OE1-1 と比較して、 $\Delta phcB$ と $\Delta phcA$ いずれもで、発現が有意に低下した 334 遺伝子を QS 誘導遺伝

表 1. 青枯病菌 OE1-1 株と比較して、変異株にて発現が有意に変化する遺伝子数

菌株	発現が低下した 遺伝子数(A)	発現が上昇した 遺伝子数(B)	(A)の中で QS誘導遺伝子数	(B)の中で QS抑制遺伝子数
$\Delta phcB$	358	163	334	151
$\Delta phcA$	388	204	334	151
$\Delta phcK$	434	187	332	144
$\Delta phcR$	101	67	81	40
$\Delta phcQ$	430	189	326	102
<i>lecM</i> -mutant	378	177	316	138
$\Delta ralA$	393	180	302	138
$\Delta epsB$	397	223	319	148

子と、発現が有意に上昇した 151 遺伝子を QS 抑制遺伝子とした (表 1)。QS 誘導遺伝子と QS 抑制遺伝子を QS 依存遺伝子と称する。 $\Delta phcA$ と $\Delta phcB$ における QS 依存遺伝子の $\log(\text{fold change})$ を x 軸と y 軸それぞれにプロットすると、高い正の相関 ($y=0.9365x+0.0492, r^2=0.9779$) を示した (図 2)。

OE1-1 と比較し、 $\Delta phcK$ では、434 遺伝子 (PhcK 誘導遺伝子) の発現が有意に減少し、187 遺伝子 (PhcK 抑制遺伝子) の発現が有意に上昇した (表 1; Senuma *et al.*, 2020)。332 個の PhcK 誘導遺伝子と 144 個の PhcK 抑制遺伝子それぞれが、QS 誘導遺伝子と QS 抑制遺伝子に含まれた。 $\Delta phcA$ と $\Delta phcK$ における、これら遺伝子の $\log(\text{fold change})$ を x 軸と y 軸それぞれにプロットすると、高い正の相関 ($y=0.9851x-0.0981; r^2=0.9862$) を示した (図 2)。

興味深いことに、PhcK 誘導遺伝子の中に、*phcA* が含まれた。qRT-PCR 解析による発現解析でも、*phcA* の発現は、OE1-1 と比較して、 $\Delta phcK$ で有意に低かった (図 3)。一方、*phcB* の発現に、*phcK* 欠損による影響は認められなかった。

OE1-1 において、*phcA* と同等の発現量を示し、その発現は QS に依存しない RSc0480 遺伝子のプロモータと *phcA* の ORF の融合 DNA を含むプラスミドによる $\Delta phcK$ の形質転換株 *phcA-comp\Delta phcK* の *phcA* 発現量と QS 能は、OE1-1 と同等になった (図 3)。0.1 μM 3-OH MAME 含有培地で培養すると、 $\Delta phcB$ と OE1-1 と同様に、*phcA-comp\Delta phcK* の QS 能が増したが、 $\Delta phcK$ の QS 能に変化は認められなかった。一方、培地への 3-OH MAME 添加の *phcA* 発現量への影響は、いずれの菌株でも認められなかった。

すなわち、QS に必要な *phcA* の発現に、PhcK が関与し、その制御は細胞外の 3-OH MAME 量に依存しないと考えられた。

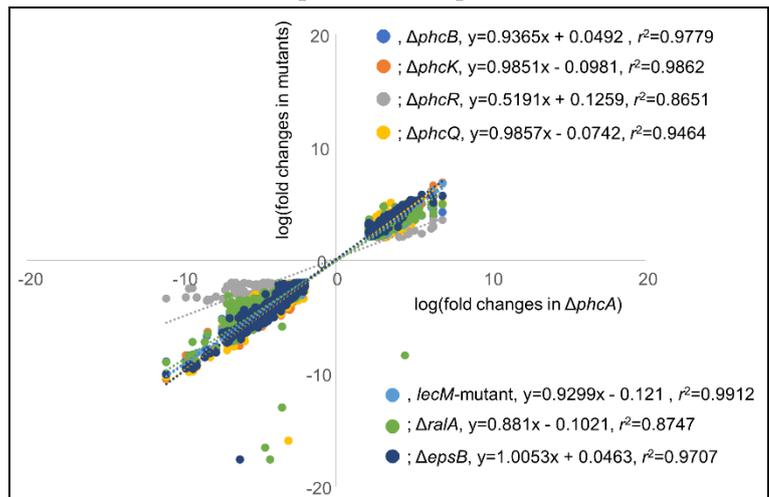


図 2. QS 能低下株で発現が有意に変化する QS 依存遺伝子の、 $\Delta phcA$ と QS 能低下株での発現量比較

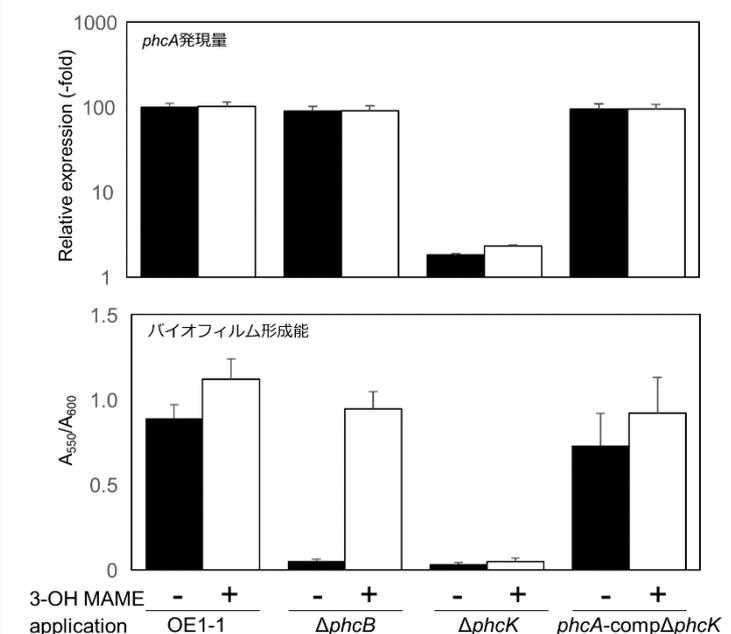


図 3. 0.1 μM 3-OH MAME 含有培地で培養した青枯病菌における qRT-PCR による *phcA* の発現量解析とバイオフィーム形成能解析

*; 3-OH MAME 無添加の値と有意差あり ($p < 0.05$)

3. PhcQ と PhcR は PhcA の機能化に関わる

1/4M63 培地で培養した $\Delta phcR$ と $\Delta phcQ$ から抽出した RNA を用いて、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。OE1-1 と比較して、 $\Delta phcQ$ では、430 遺伝子 (PhcQ 誘導遺伝子) の発現が有意に減少し、189 遺伝子 (PhcQ 抑制遺伝子) の発現が有意に上昇した (表 1; Takemura *et al.*, submitted)。PhcQ 誘導遺伝子と PhcQ 抑制遺伝子それぞれの中で、326 遺伝子 と 102 遺伝子が QS 誘導遺伝子と QS 抑制遺伝子に含まれた (表 1)。 $\Delta phcA$ と $\Delta phcQ$ おける、これら遺伝子の $\log(\text{fold change})$ を、x 軸と y 軸それぞれにプロットすると、高い正の相関 ($y=0.9857x-0.0742$; $r^2=0.9464$) を示した (図 2)。

一方、 $\Delta phcR$ では、OE1-1 と比較して、101 遺伝子 (PhcR 誘導遺伝子) の発現が有意に減少し、67 遺伝子 (PhcR 抑制遺伝子) の発現が有意に上昇した (表 1)。PhcR 誘導遺伝子および PhcR 抑制遺伝子それぞれの中で、81 遺伝子および 40 遺伝子が、QS 誘導遺伝子と PhcQ 誘導遺伝子、および QS 抑制遺伝子と PhcQ 抑制遺伝子に含まれた。 $\Delta phcA$ と $\Delta phcR$ おける、これら遺伝子の $\log(\text{fold change})$ を、x 軸と y 軸それぞれにプロットすると、正の相関 ($y=0.5191x+0.1259$; $r^2=0.8651$) を示した (図 2)。

3-OH MAME 含有培地で培養したところ、OE1-1 で認められた QS 能の増大が、 $\Delta phcQ$ と $\Delta phcR$ では認められなかった。PhcQ と PhcR は、リン酸基レシーバードメインを有するが DNA 結合ドメインを持たない RR なので、3-OH MAME 受容により、PhcS からリン酸基を受け取った PhcQ と PhcR は、QS に依存する遺伝子の PhcA による発現制御に関わると考えられた。すなわち、24.3% の QS 誘導遺伝子と 26.5% の QS 抑制遺伝子の PhcA による制御には PhcQ と PhcR を必要とし、73.4% の QS 誘導遺伝子と 41.1% の QS 抑制遺伝子の PhcA による制御には PhcQ を必要とすると考えられた。

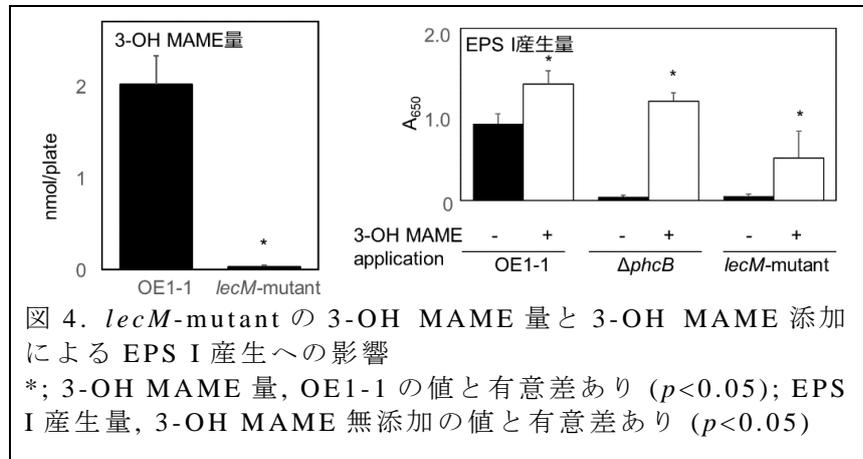
4. QS により産生が誘導される LecM は 3-OH MAME の細胞外安定性に関わる

青枯病菌細胞の外膜に局在すると推定されるレクチン LecM タンパク質 (LecM) をコードする *lecM* 遺伝子 (*lecM*) の発現は、低細菌密度時に、III 型分泌装置の構造タンパク質をコードする *hrp* 遺伝子群の転写制御因子 HrpG タンパク質により誘導される (Valls *et al.*, 2006)。そして、LecM は、植物細胞上への固着に関与するため、*lecM* 変異株 (*lecM*-mutant) は導管へ侵入することができず、病原力を喪失する (Mori *et al.*, 2016)。一方、高細菌密度になり、QS が起動すると、機能化 PhcA により、*hrpG* 遺伝子の発現が抑制される (Yoshimochi *et al.*, 2009)。一方、*lecM* の発現は、機能化 PhcA により誘導される (Mori *et al.*, 2016)。寒天培地上で形成されたコロニー形態から、*lecM*-mutant は菌体外多糖産生能が低下すると推察された。そこで、QS 能を測定したところ、*lecM* 変異により、QS 能が著しく低下した (Hayashi *et al.*, 2019a; 図 1)。1/4M63 培地で培養した *lecM*-mutant の RNA-seq によるトランスクリプトーム解析から、*lecM* 変異により、94.6% の QS 誘導遺伝子の発現が有意に低下し、91.4% の QS 抑制遺伝子の発現が有意に上昇することが明らかとなった (表 1)。 $\Delta phcA$ と *lecM*-mutant にお

ける、これら遺伝子の $\log(\text{fold change})$ を、x 軸と y 軸それぞれにプロットすると、高い正の相関 ($y=0.9299x-0.121$; $r^2=0.9912$) を示した。

興味深いことに、*lecM* 変異により、*phcB* を含む QS 関連遺伝子の発現に有意な変化は認められなかったが、細胞外の 3-OH MAME 含量が著しく低下した。

1.0 μ M 3-OH MAME 含有培地で培養したところ、OE1-1 と $\Delta phcB$ と同様に、*lecM* 変異株の EPS I 産生量が増加した (図 4)。すなわち、QS により産生が誘導される LecM は、細胞外の 3-OH MAME の物質安定性に関わり、OE1-1 の QS 能の活性化に関わると考えられた。



5. EPS I は、QS に依存する遺伝子の PhcA による発現制御に関わる

QS により産生が誘導される 2 次代謝物質である主要な菌体外多糖 EPS I は、青枯病菌の病原力因子であり、導管の閉塞に関わると考えられている (Genin and Denny, 2012)。一方、青枯病耐病性トマト植物は、EPS I を認識して、耐病性を示す (Milling *et al.*, 2011)。さらに、根を介して EPS I 産生能欠損株 ($\Delta epsB$) を青枯病感受性トマト植物に接種すると、 $\Delta epsB$ は導管へ侵入することができず、病原力を示さない。一方、導管へ直接接種すると、トマト植物は萎凋症状を呈する。そのため、EPS I は植物-青枯病菌相互作用に関わる因子であると推察される。興味深いことに、 $\Delta epsB$ の swimming motility は OE1-1 と比較して有意に増大した (図 1; Hayashi *et al.*, 2019b)。これまでに、EPS I の青枯病菌細胞間情報伝達に関わる役割は不明であった。そこで、1/4M63 培地で培養した $\Delta epsB$ の RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行ったところ、EPS I 産生能欠損により、95.5% の QS 誘導遺伝子の発現が有意に低下し、98.0% の QS 抑制遺伝子の発現が有意に上昇した (表 1)。 $\Delta phcA$ と $\Delta epsB$ における、これら遺伝子の $\log(\text{fold change})$ を、x 軸と y 軸それぞれにプロットすると、高い正の相関 ($y=1.0053x+0.0463$; $r^2=0.9707$) を示した (図 2)。さらに、*epsB* 欠損により、*phcB* を含む QS 関連遺伝子の発現に有意な変化は認められなかった。すなわち、QS により産生が誘導される EPS I は OE1-1 の細胞間シグナル伝達因子であり、その受容により、QS、とくに、PhcA による QS に依存する遺伝子の発現のフィードバック制御に関わると考えられた。

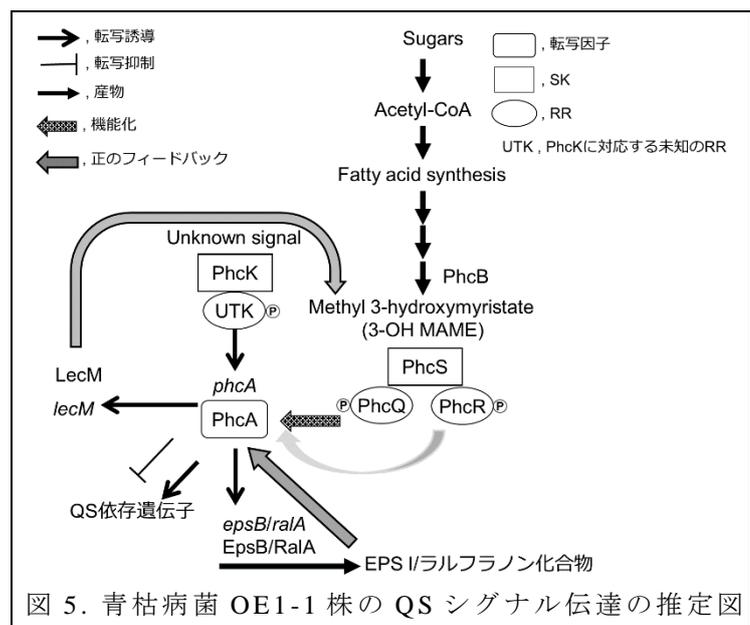
6. ラルフラノン は、QS に依存する遺伝子の PhcA による発現制御に関わる

青枯病菌の病原力に関わる、QS により産生が誘導される 2 次代謝物質として、ラルフラノンを同定した (Ishikawa *et al.*, 2019; Kai *et al.*, 2014)。Transaminase である RalD タンパク質と furanone synthase である RalA タンパ

ク質により産生されたラルフラノン I が、細胞外に分泌され、酵素的・非酵素的な酸化反応それぞれにより、ラルフラノン L、ラルフラノン J およびラルフラノン K、およびラルフラノン B を介してラルフラノン A が産生される (Kai *et al.*, 2016; Pauly *et al.*, 2013; Wackier *et al.*, 2011)。トマト葉実験系において、トマト細胞表面において増殖した OE1-1 は、マイクロコロニーを形成し、それらが融合して秩序だった細胞集団構造物である mBF を形成することを明らかにした (Mori *et al.*, 2016)。そして、トマト植物から抽出した細胞間隙液を用いた mBF 形成 *ex vivo* 系を用いて、マイクロコロニー形成は QS により抑制されることを明らかにした (Mori *et al.*, 2018a)。一方、ラルフラノンは、QS によるマイクロコロニー形成抑制を阻害することを明らかにした。さらに、ラルフラノン J とラルフラノン K は、マイクロコロニーの融合による mBF の成熟に不可欠であった。すなわち、ラルフラノンは、OE1-1 の増殖に伴う、病原力、とくに、mBF 形成に関わる細胞間情報伝達因子であると考えられた (Mori *et al.*, 2018a)。寒天培地上で形成されたコロニー形態から、ラルフラノン産生能喪失株 ($\Delta ralA$) は菌体外多糖産生能が低下すると推察された。さらに、QS 能喪失株と同様に、 $\Delta ralA$ は導管への侵入能を喪失し、病原力を喪失した。そこで、1/4M63 培地で培養した $\Delta ralA$ の RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行ったところ、 $\Delta ralA$ において、90.4% の QS 誘導遺伝子の発現が有意に低下し、91.4% の QS 抑制遺伝子の発現が有意に上昇した (Mori *et al.*, 2018b; 表 1)。 $\Delta phcA$ と $\Delta ralA$ における、これらの遺伝子の $\log(\text{fold change})$ を、x 軸と y 軸それぞれにプロットすると、正の相関 ($y=0.881x-0.1021$; $r^2=0.8747$) を示した (図 2)。さらに、*ralA* 変異により、QS 関連遺伝子の発現に有意な変化は認められなかった。すなわち、QS により産生が誘導されるラルフラノンは、OE1-1 の細胞間情報伝達因子であり、mBF 形成の制御に関わるとともに、QS に依存する遺伝子の PhcA による発現制御の正のフィードバックに関わると考えられた。

おわりに

今回紹介したエビデンスを基にした OE1-1 の QS シグナル伝達の推定図を図 5 に示した。OE1-1 の QS は、PhcK が関与する *phcA* 発現制御系と、PhcB により産生される 3-OH MAME 受容によりリン酸化される PhcQ と PhcR が関与する PhcA 機能化系により構成される。そして、PhcQ と PhcR それぞれが関与し機能化した PhcA により、QS に依存する遺伝子の発現が制御されることが考えられた。さらに、QS により産生が誘導される LecM による細胞



外の 3-OH MAME の安定性増強と、ラルフラノンと EPS I による機能化 PhcA による QS に依存する遺伝子の発現制御への正のフィードバック制御により、QS 能は相乗的に増加すると考えられた。RNA-seq での、QS 依存遺伝子のリード数を用いた heat map 解析を行い、作製した階層クラスター樹形図 (図 6) から、QS 依存遺伝子の発現制御に、PhcR が部分的に関与し、PhcQ が強く関与すると推察された。ラルフラノンと EPS I によるフィードバック制御と LecM による 3-OH MAME の安定性の付与による QS 能の相乗作用が、OE1-1 の高い QS 能を支えていると考えられた。その寄与度は、EPS I > LecM > ラルフラノンと推定された。

今後、PhcS による 3-OH MAME 受容機構とともに、PhcK が関与する *phcA* 発現制御機構を解明することで、OE1-1 の QS シグナル伝達系の全貌の解明につながると期待される。

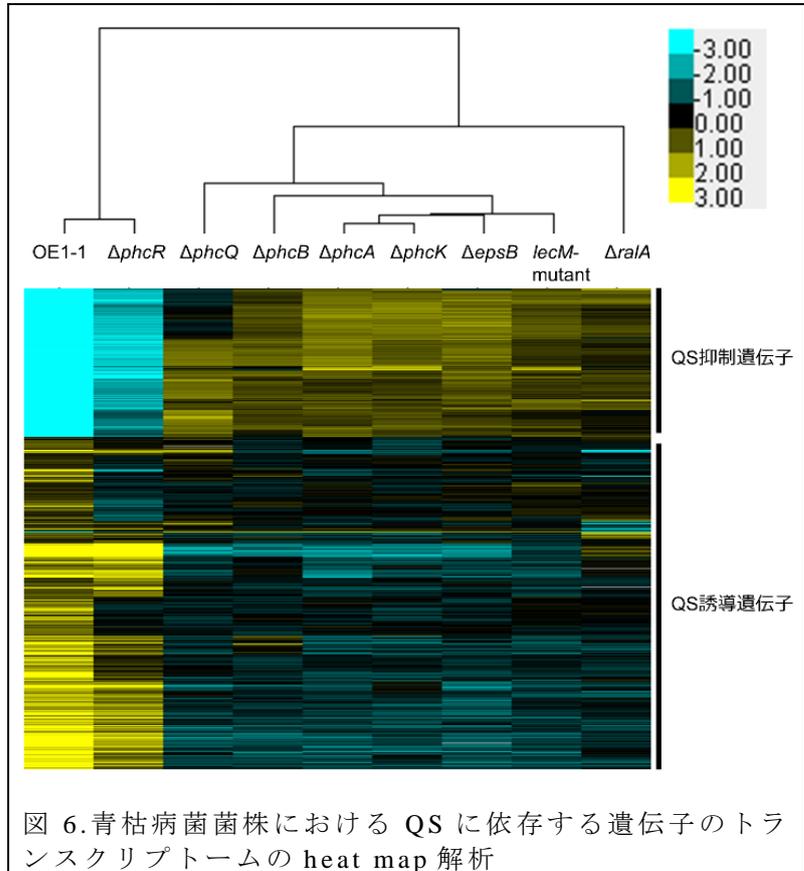


図 6. 青枯病菌菌株における QS に依存する遺伝子のトランスクリプトームの heat map 解析

謝辞

青枯病菌 OE1-1 株の病原機構の解明について、貴重な学生時代の時間を捧げた高知大学植物工学研究室と大阪府立大学生理活性物質化学研究グループの卒業生と共同研究を実施していただいた関係者諸氏に感謝いたします。トランスクリプトーム解析をご教授いただきました登達也博士、佐藤昌直博士および津田賢一博士にお礼申し上げます。本研究は、科学研究費補助金、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業、内閣府地方大学・地域産業創生交付金 (IoP が導く Next 次世代型施設園芸農業への進化)、(公財)発酵研究所、(公財)東洋食品研究所、(公財)日本科学協会および住友化学㈱からの助成を受けました。

引用文献

- Baltenneck, J., Reverchon, S. and Hommais, F. (2021) Quorum sensing regulation in phytopathogenic bacteria. *Microorganisms*, 9: 239.
- Capra, E.J. and Laub, M.T. (2012) Evolution of two-component signal transduction systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 66: 325–347.
- Clough, S.J., Lee, K.E., Schell, M.A. and Denny, T.P. (1997) A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanaceum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J. Bacteriol.* 179:

3639–3648.

- Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A. and Denny, T.P. (1997) Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 26: 251–259.
- Galloway WR, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M, Spring DR. (2011) Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev.* 12: 28-67.
- Gao, R. and Stock, A.M. (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 133–154.
- Genin, S. and Denny, T.P. (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50: 67–89.
- Ham, J.H. (2013) Intercellular and intracellular signaling systems that globally control the expression of virulence genes in plant pathogenic bacteria. *Mol. Plant Pathol.* 14: 308–322.
- Hayashi, K., Kai, K., Mori, Y., Ishikawa, S., Ujita, Y., Ohnishi, K *et al.* (2019a) Contribution of a lectin, LecM, to the quorum sensing signaling pathway of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Molecular Plant Pathology*, 20, 334–345.
- Hayashi, K., Senuma, W., Kai, K., Kiba, A., Ohnishi, K. and Hikichi, Y. (2019b). Major exopolysaccharide, EPS I, is associated with the feedback loop in the quorum sensing of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* 20: 1740–1747.
- Hikichi, Y., Mori, Y., Ishikawa, S., Hayashi, K., Ohnishi, K., Kiba, A *et al.* (2017) Regulation involved in colonization of intercellular spaces of host plants in *Ralstonia solanacearum*. *Front. Plant Sci.* 8: 967.
- Ishikawa, Y., Murai, Y., Sakata, M., Mori, S., Matsuo, S., Senuma, W. *et al.* (2019) Activation of ralfuranone/ralstonin production by plant sugars functions in the virulence of *Ralstonia solanacearum*. *ACS Chem. Biol.* 14: 1546–1555.
- Kai, K., Ohnishi, H., Kiba, A., Ohnishi, K. and Hikichi, Y. (2016) Studies on the biosynthesis of ralfuranones in *Ralstonia solanacearum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80: 440–444.
- Kai, K., Ohnishi, H., Mori, Y., Kiba, A., Ohnishi, K. and Hikichi, Y. (2014) Involvement of ralfuranone production in the virulence of *Ralstonia solanacearum* OE1-1. *ChemBioChem*, 15: 2590–2597.
- Kai, K., Ohnishi, H., Shimatani, M., Ishikawa, S., Mori, Y., Kiba, A. *et al.* (2015) Methyl 3-hydroxymyristate, a diffusible signal mediating *phc* quorum sensing in *Ralstonia solanacearum*. *ChemBioChem*, 16, 2309–2318.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P. *et al.* (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13: 614–629.
- Milling, A., Babujee, L. and Allen, C. (2011) *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants.

PLoS One, 6: e15853.

- Mori, M., Hosoi, Y., Ishikawa, S., Hayashi, K., Asai, Y., Ohnishi, H. *et al.* (2018a) Ralfuranones contribute to mushroom-type biofilm formation by *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* 19: 975-985.
- Mori, Y., Inoue, K., Ikeda, K., Nakayashiki, H., Higashimoto, C., Ohnishi, K. *et al.* (2016) The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. *Mol. Plant Pathol.* 17: 890-902.
- Mori, M., Ishikawa, S., Ohnishi, H., Shimatani, M., Morikawa, Y., Hayashi, K. *et al.* (2018b) Involvement of ralfuranones in the quorum sensing signaling pathway and virulence of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* 19: 454-463.
- Pauly, J., Spiteller, D., Linz, J., Jacobs, J., Allen, C., Nett, M. *et al.* (2013) Ralfuranone thioether production by the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *ChemBioChem*, 14: 2169-2178.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M. *et al.* (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, 415: 497-502.
- Schell, M.A. (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 263-292.
- Senuma, W., Takemura, C., Hayashi, K., Ishikawa, S., Kiba, A., Ohnishi, K. *et al.* (2020) The putative sensor histidine kinase PhcK is required for the full expression of *phcA* encoding the global transcriptional regulator to drive the quorum sensing circuit of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* 21: 1591-1605.
- Tang, M., Bouchez, O., Cruveiller, S., Masson-Boivin, C. and Capela, D. (2020) Modulation of quorum sensing as an adaptation to nodule cell infection during experimental evolution of legume symbionts. *mBio*, 1, e03129-19.
- Ujita, Y., Sakata, M., Yoshihara, A., Hikichi, Y. and Kai, K. (2019) Signal production and response specificity in the *phc* quorum sensing systems of *Ralstonia pseudosolanacearum* species complex. *ACS Chem. Biol.* 14: 2243-2251.
- Valls, M., Genin, S. and Boucher, C. (2006) Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* 2: e82.
- Wackler, B., Schneider, P., Jacobs, J.M., Pauly, J., Allen, C., Nett, M. *et al.* (2011) Ralfuranone biosynthesis in *Ralstonia solanacearum* suggests functional divergence in the quinone synthetase family of enzymes. *Chem. Biol.* 18: 354-360.
- Yoshihara, A., Shimatani, M., Sakata, M., Takemura, C., Senuma, W., Hikichi, Y. *et al.* (2020) Quorum sensing inhibition attenuates the virulence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* species complex. *ACS Chem. Biol.* 15: 3050-3059.
- Yoshimochi, T., Hikichi, Y., Kiba, A. and Ohnishi, K. (2009) The global virulence regulator PhcA negatively controls the *Ralstonia solanacearum* *hrp* regulatory cascade by repressing expression of the PrHIR signaling proteins. *J. Bacteriol.* 191:3424-3428.

Plant interactions with pathogenic and commensal bacteria

Kenichi Tsuda (津田賢一)

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Hubei Key Lab of Plant Pathology, Hubei Hongshan Laboratory, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China.

Introduction

Plants are colonized by commensal, beneficial, and pathogenic microbes such as bacteria that significantly affect plant growth and reproduction as well as environmental stress tolerance in nature and agricultural fields (Trivedi et al., 2020). Plants require bacterial colonization for their survival in nature (Durán et al., 2018), but ironically, some bacteria cause serious disease to plants (Nobori et al., 2018a), pointing to a dilemma that plants face. Therefore, the fundamental question is how plants engage with beneficial bacteria while at the same time restricting pathogenic bacteria. However, despite extensive studies into the molecular and genetic bases of plant immunity, we still lack fundamental knowledge of how plants affect bacterial metabolism to control their function and growth in plants (Nobori et al., 2018a). In addition, interactions between plants and each neighbouring microbial species are fundamental building blocks that collectively determine the structure and function of the plant microbiota contributing to plant health, but the molecular basis of such interactions is poorly characterized (Nobori and Tsuda, 2019).

Multidimensional regulatory landscape of plants and bacteria

We studied both plant and bacterial transcriptome and proteome responses during interaction with pathogenic and commensal bacteria in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Hillmer et al., 2017; Mine et al., 2018; Nobori et al., 2021, 2020, 2018b; Winkelmüller et al., 2021). These studies revealed that 1) mechanisms by which plants control bacterial metabolisms to regulate bacterial growth and behavior in plants. 2) qualitatively similar yet quantitatively different plant transcriptome responses including typical pattern-triggered immunity responses to pathogenic and commensal bacteria. 3) bacterial transcriptome responses in plants that are characteristic to pathogenic or commensal bacteria. 4) taxonomy-independent and strain-specific responses of commensal bacteria in plants. Furthermore, we characterized a set of plant immune responses to different commensal bacteria and found strain-specific elicitation of specific plant immune responses. Notably, we found that certain bacterial strains (isolated from healthy plants) caused disease on or killed plants deficient in a specific plant immune response but not wild-type plants. These results suggest that plants discriminate between different bacteria at the execution of plant immunity in addition to at the recognition of microbes. Moreover, the plant microbiota from healthy plants contain conditional, opportunistic pathogens which do not harm plants in a community context, providing an important clue how plants maintain healthy microbiota and their own health in nature.

Plant secreted proteases mediate antibacterial resistance and structure the plant microbiota

We uncovered that evolutionarily conserved plant proteases (SAP1/2) directly suppress the growth of the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* in *A. thaliana* (Wang et

al., 2019). Secretion of SAP1 and SAP2 into the apoplast, which is the site that is colonized by the pathogen, was required for its antibacterial activity. We found that SAP1 cleaves a highly conserved bacterial protein, MucD, thereby inhibiting bacterial growth. Overexpression of SAP1 increased resistance but did not trigger immune activation associated with plant growth retardation, pointing to the utility of secreted proteases as plant disease management. *mucD* shows strong signatures of purifying selection among bacteria. Notably, *mucD* sequences from *Pseudomonas*, often associated with plants in nature, were under positive selections at specific amino acid residues such as the one cleaved by SAP1, suggesting evolutionary pressure from plants on *mucD* and potential contribution of SAP1 to the structure and function of plant microbiota (Wang et al., 2019). Indeed, we found that wild-type, SAP1 overexpression, and *sap1 sap2* double mutant plants harboured distinct bacterial communities when grown in a natural soil, suggesting that these plant proteases act as a gateway for control of non-virulent and commensal as well as pathogenic bacterial proliferation. Supporting to this notion, we found that SAP overexpression enhanced plant growth while *sap1 sap2* mutation led to poor plant growth when they were grown in natural soil.

Perspective

We are beginning to comprehend how plants control diverse bacteria including beneficial and pathogenic bacteria as well as microbiota and how the plant microbiota contribute to plant health. To fully understand plant-microbe interactions in changing environments, we must take advantages of rich resources available for model plant species. However, at the same time, it is urgent to develop experimental systems for various plants including crops and vegetables in order to understand diversities and evolution of plant-microbe interactions and to contribute to sustainable agriculture. To this end, we are developing synthetic microbial communities and high-throughput plant phenotyping platforms that allow us to investigate dynamics of various crop growth and health affected by microbial communities. I envision that such analyses illuminate mechanisms underlying beneficial and detrimental effects of microbes (communities) on crop plants and effects of plants on the function of microbes, thereby contributing directly to agricultural practice.

Acknowledgements

I thank the current and past Tsuda lab members for their extraordinary contributions to our research. Further, I thank collaborators who have kindly helped our research in various ways. Our research was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Program No. 2662020ZKPY009), the Huazhong Agricultural University Scientific & Technological Self-innovation Foundation, Joint Funding of Huazhong Agricultural University and Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences (SZYJY2021007), the Max Planck Society, and German Research Foundation grants (SPP2125 and SFB670).

References

Durán, P., Thiergart, T., Garrido-Oter, R., Agler, M., Kemen, E., Schulze-Lefert, P., Hacquard, S., 2018. Microbial Interkingdom Interactions in Roots Promote Arabidopsis Survival. *Cell* 175, 973-983.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.020>

- Hillmer, R.A., Tsuda, K., Rallapalli, G., Asai, S., Truman, W., Papke, M.D., Sakakibara, H., Jones, J.D.G., Myers, C.L., Katagiri, F., 2017. The highly buffered Arabidopsis immune signaling network conceals the functions of its components. *PLoS Genet* 13, e1006639. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006639>
- Mine, A., Seyfferth, C., Kracher, B., Berens, M.L., Becker, D., Tsuda, K., 2018. The Defense Phytohormone Signaling Network Enables Rapid, High-Amplitude Transcriptional Reprogramming during Effector-Triggered Immunity. *Plant Cell* 30, 1199–1219. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00970>
- Nobori, T., Cao, Y., Entila, F., Dahms, E., Tsuda, Y., Garrido-Oter, R., Tsuda, K., 2021. Dissecting the co-transcriptome landscape of plants and microbiota members (preprint). *Plant Biology*. <https://doi.org/10.1101/2021.04.25.440543>
- Nobori, T., Mine, A., Tsuda, K., 2018a. Molecular networks in plant-pathogen holobiont. *FEBS Lett* 592, 1937–1953. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13071>
- Nobori, T., Tsuda, K., 2019. The plant immune system in heterogeneous environments. *Current Opinion in Plant Biology* 50, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.003>
- Nobori, T., Velásquez, A.C., Wu, J., Kvitko, B.H., Kremer, J.M., Wang, Y., He, S.Y., Tsuda, K., 2018b. Transcriptome landscape of a bacterial pathogen under plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, E3055–E3064. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800529115>
- Nobori, T., Wang, Y., Wu, J., Stolze, S.C., Tsuda, Y., Finkemeier, I., Nakagami, H., Tsuda, K., 2020. Multidimensional gene regulatory landscape of a bacterial pathogen in plants. *Nat Plants* 6, 883–896. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0690-7>
- Trivedi, P., Leach, J.E., Tringe, S.G., Sa, T., Singh, B.K., 2020. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat Rev Microbiol* 18, 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Wang, Y., Garrido-Oter, R., Wu, J., Winkelmüller, T.M., Agler, M., Colby, T., Nobori, T., Kemen, E., Tsuda, K., 2019. Site-specific cleavage of bacterial MucD by secreted proteases mediates antibacterial resistance in Arabidopsis. *Nat Commun* 10, 2853. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10793-x>
- Winkelmüller, T.M., Entila, F., Anver, S., Piasecka, A., Song, B., Dahms, E., Sakakibara, H., Gan, X., Kułak, K., Sawikowska, A., Krajewski, P., Tsiantis, M., Garrido-Oter, R., Fukushima, K., Schulze-Lefert, P., Laurent, S., Bednarek, P., Tsuda, K., 2021. Gene expression evolution in pattern-triggered immunity within Arabidopsis thaliana and across Brassicaceae species. *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab073>

発熱性を持つソテツの再発見と発熱植物研究の新展開

稲葉靖子***・佐藤光彦***

Inaba, Y., · Sato, MP.

*宮崎大学農学部 Department of Agricultural and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1 Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki 889-2192, Japan.

**東北大学大学院生命科学研究科 Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Sendai, Miyagi 980-8577, Japan.

***かずさ DNA 研究所先端研究開発部 Department of Frontier Research and Development, Kazusa DNA Research Institute, 2-6-7 Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan.

Mechanism underlying floral thermogenesis and its role in plant reproduction

はじめに

種子植物の花（花序や球果を含む）による発熱には、訪花昆虫の誘引や昆虫との相利共生等、種子植物の生殖機構に絡む主要な役割がある。一般的に、花の温度を外気温に対して 0.5°C 以上上昇させる能力を持つ植物のことを「発熱植物」と呼び、発熱能力の高い植物では、花の温度が外気温に対して 20°C 以上も上昇する。これまでに報告された発熱植物の中で、約半数は裸子植物のソテツ（ソテツ科とザミア科から成る）が占め、残りを占める被子植物の大部分はサトイモ科植物である。本講演では、発熱植物の中で、我が国にも自生するソテツ（*Cycas revoluta*）とサトイモ科植物ザゼンソウ（*Symplocarpus renifolius*）の研究を中心に、これまで明らかとされた知見（発熱分子機構、発熱の生理的意義等）を紹介して、最後に、発熱植物研究の今後の展望についても触れたい。

裸子植物ソテツ（*C. revoluta*）の発熱諸特性

日本に自生する *Cycas revoluta* という学名を持つソテツは、ソテツ科に属し、九州南部から沖縄諸島にかけて広く分布する。ソテツが発熱植物であることを最初に報告したのは、アメリカの植物学者ウィリアム・タングであり、彼は、約 40 種のソテツの花（正確には、球果）の温度を測定して、ザミア科に含まれる複数のソテツで、花の温度が外気温に対して 10°C 以上も上昇していることを発見した (Tang, 1987)。彼はこの論文の中で *C. revoluta* を含むソテツ科植物の発熱性についても検討したが、ザミア科に比べてソテツ科植物の発熱能力は微弱であると結論付けている。特に *C. revoluta* は、外気温に対して花の温度をわずか 1.6°C しか上昇していないことが報告され、その後、十分な検証はなされなかった。しかしながら、我々の調査から、本植物の雄花は、花の体温を外気温に対して最大で 11.5°C 、雌花は 8.3°C も上昇させる能力を持ち、両者とも花の体温は 10 日以上に渡り外気温より高く保たれることが明らかとなった。また、赤外線サーモグラフィにより雄花の発熱を熱画像として明瞭に捉えられることも確認できた (図 1)。さらに、雄花と雌花を、定温 (22°C)・暗条件で静置したところ、両者ともに自発的な発熱による体温の振動が観察され



図 1 *Plant Physiology* (2019 年 6 月号) の表紙

た。一連の実験から、*C. revoluta* の球果は、雄花・雌花ともに発熱性を備え、発熱能力が高いとされるザミア科ソテツと同程度の発熱能力を持つことが明らかとなった (Ito-Inaba et al., 2019)。

C. revoluta 雄花の発熱分子機構とミトコンドリア特性

シアン耐性呼吸酵素 (AOX) は、余剰エネルギー解消に役割を持つこと、発熱性を持つ被子植物の複数種において発現や活性が発熱組織で高いことから、植物の発熱に重要な役割を持つと考えられてきた。しかしながら、発熱性を持つ裸子植物ソテツでは、AOX と発熱との関連性に関して十分な検証が行われていなかった。

そこで我々は、*C. revoluta* 雄花を用いて、ソテツの発熱における AOX の役割を調べることにした。まず、雄花の主要組織である小孢子葉 (発熱組織) と小孢子のう (非発熱組織) から生化学的にミトコンドリア (Mt) を単離して、両組織間で AOX キャパシティの比較を行った。その結果、小孢子葉 Mt は、小孢子のう Mt に比べて、AOX 経路の働きが活発であることがわかった。イムノブロッティングによる解析でも、AOX タンパク質は、小孢子葉 Mt では検出されたが、小孢子のう Mt では検出されなかった。さらに、雄花で発現する 2 つの AOX 遺伝子 (*CrAOX1* および *CrAOX2*) の単離・同定を行い、qPCR 解析を行った結果、小孢子葉における *CrAOX1* の発現は、*CrAOX2* の発現に比べ、100 倍も高いことがわかった。以上の結果から、小孢子葉 Mt における *CrAOX1* を介した呼吸経路が、ソテツ雄花の発熱に役割を持つことが示唆された (Ito-Inaba et al., 2019)。

次に我々は、*C. revoluta* 雄花の小孢子葉と小孢子のうの細胞内構造を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察して、両者のミトコンドリア形態に違いがあるかを検討した²⁾。その結果、小孢子葉では、円形でマトリックス密度が一様のミトコンドリアが多数観察されたのに対し、小孢子のうでは、特定の形態を持つミトコンドリア集団は観察されなかった。また、小孢子葉では、断面積が 2 μm^2 以上の大きさを持つ巨大なミトコンドリアが、表皮において全体の 1 割程度観察されたが、類似のミトコンドリアは、小孢子のうでは観察されなかった (Ito-Inaba et al., 2019)。

サトイモ科発熱植物の発熱機構に関する研究

発熱性を持つサトイモ科植物は、これまでに 36 種程度の報告がある。我々は現在、複数のサトイモ科発熱植物にフォーカスした研究を推進しているが (図 2)、中でもザゼンソウ (*S. renifolius*) は、花序における安定した発熱を長期に渡り持続でき、植物の発熱を研究する上では優れた研究材料と考えている。ザゼンソウの発熱を最初に報告したのは、アメリカの植物学者ロジャー・ヌットソンであり、彼は本植物の発熱は低温により誘導され、呼吸を活発化して体温を上昇させることを見出している (Knutson, 1974)。

我々がザゼンソウ研究に着手した当時、AOX とは異なる機構で余剰エネルギー解消に役割を持つ脱共役蛋白質 (UCP) が、本植物の熱生産に寄与すると考えられていた。そこでまず、当時報告されていた 2 つの UCP アイソフォーム (SrUCPA/B) の解析を進め、発熱組織で主に発現しているのは SrUCPA であることを見出した (Ito-Inaba et al., 2008)。また、ザゼンソウ花序におけるミトコンドリアの形態的特徴



図 2 サトイモ科発熱植物
左から、クワズイモ (*Alocasia odora*)、フィロデンドロン (*Philodendron selloum*)、ザゼンソウ (*S. renifolius*)、ナベクラザゼンソウ (*S. nabekuraensis*)

を、花弁、めしべ、おしべの各組織において精査したところ、特に花弁では、発熱終了期に比べ、発熱期において、多くのミトコンドリアを含んでいた (Ito-Inaba et al., 2009a)。さらに、熱産生能力を持たない近縁種ミズバショウとの比較により、花序における AOX の働きはザゼンソウの方がより活発であることを明らかとした (Ito-Inaba et al., 2009b)。トランスクリプトーム解析では、発熱期の花で呼吸やミトコンドリア機能に関わる遺伝子の発現が高く、発熱を終えると、これらの遺伝子に代わりストレス応答や液胞代謝に関わる遺伝子の発現が上昇することを見出した (Ito-Inaba et al., 2012a; 2012b)。以上の結果から、ザゼンソウの熱産生には、AOX の働きに加えて、ミトコンドリアの量的効果や呼吸代謝に絡む遺伝子の発現が重要であることが示唆された。

おわりに

上記の研究により、裸子植物でも被子植物でも、生殖器官における熱産生には AOX を介した呼吸経路が主要な役割を持つことを明らかとし、当該器官に含まれるミトコンドリアの特徴的形態の一端の解明にも成功した。しかし一方で、AOX と植物の発熱との因果関係については今なお不明な点も多く、AOX 以外の分子が植物の発熱により直接的に関与する可能性は十分に考えられる。現在、ソテツとザゼンソウの双方において *de novo* RNA-seq の解析を進めており、興味深い分子が多数見いだされている。並行して、最近我々は、発熱植物から取り出した遺伝子をモデル植物に導入して、機能解析を行い得ることを示した (Ito-Inaba et al., 2016)。さらに、当該遺伝子を酵母や発熱植物から単離した細胞に導入して、機能解析を行う実験系も確立しつつある。今後は、これらの研究を粘り強く続け、得られた候補分子の中から、発熱誘導に関わる真の遺伝子を同定していきたいと考えている。

謝辞

本研究は、科学研究費補助金、先進ゲノム支援、内藤記念女性研究者研究助成金、稲盛財団、武田科学新興財団の支援を受けて実施した。

引用文献

- Ito-Inaba, Y., Sato, M., Sato, M.P., Kurayama, Y., Yamamoto, H., Ohata, M., Ogura, Y., Hayashi, T., Toyooka, K. and Inaba, T. (2019) Alternative Oxidase Capacity of Mitochondria in Microsporophylls May Function in Cycad Thermogenesis. *Plant Physiol.*, 180:743-756.
- Ito-Inaba, Y., Masuko-Suzuki, H., Maekawa, H., Watanabe, M. and Inaba, T. (2016) Characterization of two *PEBP* genes, *SrFT* and *SrMFT*, in thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *Sci. Rep.*, 6, article number: 29440.
- Ito-Inaba, Y., Hida, Y., Matsumura, H., Masuko, H., Yazu, F., Terauchi, R., Watanabe, M. and Inaba, T. (2012a) The gene expression landscape of thermogenic skunk cabbage suggests critical roles for mitochondrial and vacuolar metabolic pathways in the regulation of thermogenesis. *Plant Cell Environ.*, Vol. 35, 554-566.
- Ito-Inaba, Y., Masuko, H., Watanabe, M. and Inaba, T. (2012b) Isolation and gene expression analysis of a papain-type cysteine protease in thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 76, 1990-1992.
- Ito-Inaba, Y., Sato, M., Masuko, H., Hida, Y., Toyooka, K., Watanabe, M. and Inaba, T. (2009a) Developmental changes and organelle biogenesis in the reproductive organs of thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *J. Exp. Bot.*, 60: 3909-3922.
- Ito-Inaba, Y., Hida, Y. and Inaba, T. (2009b) What is critical for plant thermogenesis? Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages. *Planta*, Vol. 231, 121-130.
- Ito-Inaba, Y., Hida, Y., Ichikawa, M., Kato, Y. and Yamashita, T. (2008) Characterization of the plant uncoupling protein, SrUCPA, expressed in spadix mitochondria of the thermogenic skunk cabbage. *J. Exp. Bot.*, 59:995-1005.
- Knutson, R.M. (1974) Heat production and temperature regulation in eastern skunk cabbage. *Science*, Vol. 186, pp. 746-747.
- Tang, W. (1987) Heat production in cycad cones. *Bot Gaz*, Vol. 148, pp. 165-174.

古典遺伝学的アプローチによるいもち病菌の 病原性変異機構の解明

草場 基章

Kusaba, M.

The mechanism underlying pathogenic variation in *Pyricularia oryzae*
inferred from the classical genetics approach

Abstract

To access the genetic mechanism underlying pathogenic variation in *Pyricularia oryzae*, three avirulence (*Avr*) genes *AvrPik*, *AvrPiz* and *AvrPiz-t*, which caused the breakdown of resistance in rice cultivars in Japan in the 1960's, were identified in a cross between parental isolates 84R-62B and Y93-245c-2. Constructing a genetic map including the *Avr* genes and CHEF-Southern analysis of the parental isolates using selected markers from the map as probes could assign *AvrPiz* and *AvrPiz-t* to chromosomes 3 and 7 in Y93-245c-2, respectively. Surprisingly, *AvrPik* was assigned to a small and extra chromosome of 1.6 Mb in 84R-62B. Even more surprising, two *Avr* genes *AvrPikm* and *AvrPikp* in 84R-62B were also suggested to be located on the 1.6Mb chromosome since they were closely linked to *AvrPik*. To further characterize *AvrPik*, possessions of *Pex31* homologs in the genomes of parental isolates were examined. A gene family encoding secreted protein Pex31s in *P. oryzae* consists of five homologs, *Pex31-A* to *-E*. Among them, *Pex31-A* and *-D* are known to have *AvrPikm* activity and *AvrPik/AvrPikm/AvrPikp* activities, respectively. We identified *Pex31-A* and *-D* in the 1.6Mb chromosome of 84R-62B. These findings could clearly explain the linkage relationships among *AvrPik*, *AvrPikm* and *AvrPikp* and the chromosomal assignments of these three *Avr* genes. We also found the translocation of *Pex31-A* from the 1.6Mb chromosome to chromosome1 of Y93-245c-2 in the genome of a F₁ isolate from the cross between 84R-62B and Y93-245c-2. Another interesting finding in our study is

佐賀大学農学部 Faculty of Agriculture, Saga University, 1 Honjou-machi,
Saga, Saga, 840-8502, JAPAN

that the loss of the 1.6 Mb chromosome leading to pathogenicity mutation

was observed in subcultures of a F₁ progeny. This phenomenon may provide a new insight into the mechanisms generating pathogenic variation of this fungus.

Key words: rice blast, *Pyricularia oryzae*, supernumerary chromosomes, *Avr* gene, breakdown of resistance

はじめに

イネいもち病は子のう菌の一種 *Pyricularia oryzae* (以下、イネいもち病菌) により引き起こされるイネの重要病害として知られている。本病の防除に最も有効な手段の一つは抵抗性イネ品種の作付けである。一方、イネいもち病菌は極めて変異性が高く、新規に開発された抵抗性品種に対して病原性を獲得した変異レースが容易に生み出される。このようなレースの出現により、抵抗性品種が罹病性品種に転落する、所謂、抵抗性の崩壊が日本を含む世界各地でしばしば生じ問題となってきた。イネいもち病に対して永続的に効果を発揮する抵抗性品種の開発には本菌がレース変異を起こす遺伝的メカニズムの解明が必要となる。イネいもち病菌のレースがイネ品種に感染できる・できないといった病原性の特異性は **gene for gene theory** (Flor, 1955) で説明される非病原力遺伝子と抵抗性遺伝子の一対一対応により決定される (Silue *et al.*, 1992)。従って、本菌のレース変異は非病原力遺伝子の変異に起因すると考えることができる。本稿では日本における抵抗性崩壊に関与したイネいもち病菌の非病原力遺伝子について、筆者の研究室で行った古典遺伝学的アプローチによる遺伝解析を紹介する。また、我々が見出した非病原力遺伝子の新たな変異メカニズムについても解説する。

1. 日本で起こった抵抗性の崩壊

本題に入る前に研究の背景として日本で起こった抵抗性の崩壊について若干触れておきたい。戦後の食糧難の時代背景の下、日本では 1940 年代からコメ増産に向けた施策の一環としてイネいもち病抵抗性育種への本格的な取り組みが始まった。それにより、1960 年代までに中国などの外国稲の持ついもち病抵抗性遺伝子を導入した、クサブエ、テイネ、ユーカラなどの高度抵抗性品種が多数育成された (山崎・高坂, 1980)。これら品種は商業品種として生産圃場での作付けが始まった当初はいもち病に対して高い防除効果を示していた。ところが、作付け開始から数年後にはいもち病が多発するようになり、高度抵抗性品種から罹病性品種に転落する抵抗性崩壊が起きてしまった (山崎・高坂, 1980)。育成に 10 年以上を費やしたこれら抵抗性品種が数年で罹病化してしまった現象は当時の育種家達を大きく落胆させたと言われている。

2. 日本産イネいもち病菌レース判別イネ品種の有する抵抗性遺伝子に対応す

る非病原力遺伝子の同定

ある病原菌の菌株の所属レースの同定は、異なる抵抗性遺伝子をそれぞれ単独で保有する品種のセット（判別品種）に菌株を接種し、その菌株の品種特異的な病原性のパターンを調べることにより行われる。日本のイネいもち病菌に対しては表1に示す

12品種が判別品種として用いられている（Kiyosawa, 1984; Yamada *et al.*, 1976）。これら各品種の有する抵抗性遺伝子は上述の外国稲から日本の品種に導入されたものとなっている（Hayashi *et al.*, 1998; 井辺・松本, 1985; Kiyosawa, 1969）。著者の研究室では研究に着手するに当たり、これら判別品種が持つ抵抗性遺伝子に着目した。すなわ

ち、gene for gene theoryからは、抵抗性の崩壊に関わった非病原力遺伝子の同定はこれら判別品種の抵抗性遺伝子に対応するものをイネいもち病菌のゲノムから探せば良いことになる。一方、我々が研究を開始した当時、抵抗性遺伝子*Pita*に対応する非病原力遺伝子*AvrPita*のみが分子遺伝学的手法により同定されていたにすぎず（Jia *et al.* 2000）、各抵抗性遺伝子に対応する非病原力遺伝子は同定どころか本当に存在するのかさえ不明となっていた。これは、日本産イネいもち病菌の菌株間では交配が生じないため遺伝解析が不可能となっていたことに起因する。そこで、筆者の研究室では片親として稔性の高い中国産イネいもち病菌株Y93-245c-2を用い、日本産菌株84R-62Bとの交配系を確立した（表1）（Luo *et al.* 2002）。本交配系では、両親菌株間の病原性の違いからF₁世代の菌株集団では、*Pik*、*Pikm*、*Piz*、*Pita*、*Pita2*、*Pizt*、*Pikp*のそれぞれの抵抗性遺伝子に対して表現形質（非病原性・病原性）の遺伝分離を観察することができる（表1）。そこで、この中でも、特に、*Pik*、*Piz*、*Pizt*に対する遺伝分離に焦点を絞り解析を進めることにした（Luo *et al.* 2002; 2004; 2005）。各抵抗性遺伝子を有する関東51号、フクニシキ、とりで1号にF₁世代115株を接種したところ、各品種に対する非病原性：病原性の分離は1：1に適合した（表2）。したがって、各品種に対する表現形質の分離は1遺伝子座の対立遺伝子の分離で説明できると考えられた（Luo *et al.* 2004）。また、両親菌株がともに病原性を示す感受性イネ品種を片親として作出された各品種のF₃系統、ならびに、各抵抗性遺伝子を同定する際に供試された基

表 1 親菌株として使用したイネいもち病菌の日本産レース判別イネ品種に対する病原性

レース判別 イネ品種 ^a	抵抗性遺伝子 ^b	両親菌株	
		84R-62B	Y93-245c-2
新2号	<i>Pish</i>	V	V
愛知旭	<i>Pia</i>	V	V
石狩白毛	<i>Pii</i>	V	V
関東51号	<i>Pik</i>	A	V
ツユアケ	<i>Pikm</i>	A	V
フクニシキ	<i>Piz</i>	V	A
ヤシロモチ	<i>Pita</i>	A	V
Pi No. 4	<i>Pita2</i>	A	V
とりで1号	<i>Pizt</i>	V	A
K60	<i>Pikp</i>	A	V
BL1	<i>Pib</i>	A	A
K59	<i>Pit</i>	A	A

^a Kiyosawa (1984)および Yamada ら (1976)。

^b Hayashi ら(1998), 井辺・松本(1985)および Kiyosawa (1969)。

A, 非病原性; V, 病原性。

準菌株 (Kiyosawa 1974) を利用した遺伝解析により、関東51号、フクニシキ、とりで1号に対する非病原性を支配する遺伝子が各品種の有する抵抗性遺伝子に一対一に対応した非病原力遺伝子 (*AvrPik*、*AvrPiz*、*AvrPizt*) として同定可能であることを明らかにした(Luo *et al.* 2004)。

表2 84R-62B および Y93-254c-2 の F₁ 世代菌株集団における 3 つの日本産レース判別イネ品種に対する非病原性/病原性の分離

品種	両親菌株		F ₁ 世代	χ^2	P
	84R-62B	Y93-245c-2	A : V	1 : 1	
関東 51 号	A	V	67 : 48	3.14	0.08
フクニシキ	A	V	62 : 53	0.7	0.4
とりで 1 号	A	V	62 : 53	0.7	0.4

A, 非病原性; V, 病原性.

3. *AvrPik*、*AvrPiz*、*AvrPizt* の座乗染色体

次に我々は *AvrPik*、*AvrPiz*、*AvrPizt* について連鎖地図を作成し、染色体歩行法による単離を試みた。結局、この 3 遺伝子の単離は我々の研究室では行うことができず、*AvrPik* は 2009 年に Yoshida ら (2009) により (後述)、*AvrPizt* は 2009 年に Li ら (2009) によりそれぞれ単離された。しかしながら、単離に向けた取り組みの中で *AvrPik* については極めて興味深い知見が得られた。連鎖地図は上記の F₁ 世代 115 株から選んだ 60 株について各種分子マーカーの遺伝分離のデータから作成した (Luo *et al.* 2005) (図 1)。連鎖地図は 7 つの連鎖群 LGA~LGD で構成されたが、*AvrPik*、*AvrPiz*、*AvrPizt* はそれぞれ別の連鎖群 LGA、LGD、LGG にプロットされた(図 1)。我々は各連鎖群と両親菌株の染色体との対応関係から 3 つの非病原力遺伝子の座乗染色体の同定を試みた。染色体との対応は各連鎖群に含まれていた RFLP マーカーのプローブを CHEF 電気泳動で分画した両親菌株の染色体にハイブリダイズさせる CHEF-Southern 分析により調査した (Luo *et al.* 2005)。その結果、*AvrPiz* と *AvrPizt* を含む連鎖群 LGD、LGG はそれぞれ両親菌株の第 3、第 6 染色体に対応することが明らかとなった。つまり、*AvrPiz* と *AvrPizt* の座乗染色体は第 3、第 6 染色体と同定された(図 1)。一方、*AvrPik* であるが、両親菌株のうち 84R-62B は常染色体である 7 本の染色体に加え、小型の染色体 (1.6Mb 染色体) を保有する(図 2)。不思議なことに、LGA の中で *AvrPik* と密接に連鎖した RFLP マーカーのプローブは 1.6Mb 染色体にハイブリダイズした。さらに、興味深いことに、*AvrPik* と離れた位置にあるマーカーのプローブは両親菌株ともに第一染色体にハイブリダイズした。つまり、LGA は 1.6Mb 染色体と第一染色体を補足していると考えられ、*AvrPik* は 1.6Mb 染色体を補足する LGA の部分に座乗している可能性が考えられた。そこで、*AvrPik* と 1.6Mb 染色体の連鎖を確認するために、連鎖地図作成に使用した F₁ 世代 59 菌株 (60 菌株から死亡により使用不可となった 1 株を除く) について CHEF 電気泳動による直接観察により 1.6Mb 染色体保有の有無を調査した(表 3)。その結果、1 菌株の例外 (F1-327、後述) を除き、*AvrPik* の保有・非保

有（関東 1 号に非病原性と病原性）と 1.6Mb 染色体の保有・非保有は完全に一致した（表 3）（Luo *et al.* 2007）。すなわち、*AvrPik* は 1.6Mb 染色体と強く連鎖することから同染色体上に座乗することが強く示唆された。

また、1.6Mb 染色体そのものも奇妙な性質を有していた。このような小型の染色体は一般的には生存に必須な遺伝子が座乗しない過剰染色体と考えられる（Covert 1998）。そして、生存に必須な遺伝子が座乗しないため、過剰染色体は保有する菌株と保有しない菌株との交配では次世代に非メンデル遺伝することが報告されている（Jones 1995）。ところが、上述の F₁ 世代では 1.6Mb 染色体の保有・非保有は 30 : 29 となり 1 : 1 の分離比に適合した（表 3）（Luo *et al.* 2007）。そこで、1.6Mb 染色体に座乗する遺伝子について検討を行ったところ、1.6Mb 染色体は第一染色体の部分領域が過剰染色体に転座して形成されたキメラ染色体であることが明らかとなった（Luo *et al.* 2007）。つまり、転座した第一染色体の部分領域が 84R-62B の第一染色体と 1.6Mb 染色体との間に共分離が生じやすい傾向をもたらし、両染色体を捕捉する領域間にも連鎖関係が生まれたものと推定された。また、1.6Mb 染色体がメンデル遺伝をする要因として、この第一染色体の部分領域に生存に必須の遺伝子が座乗する可能性が示唆された。

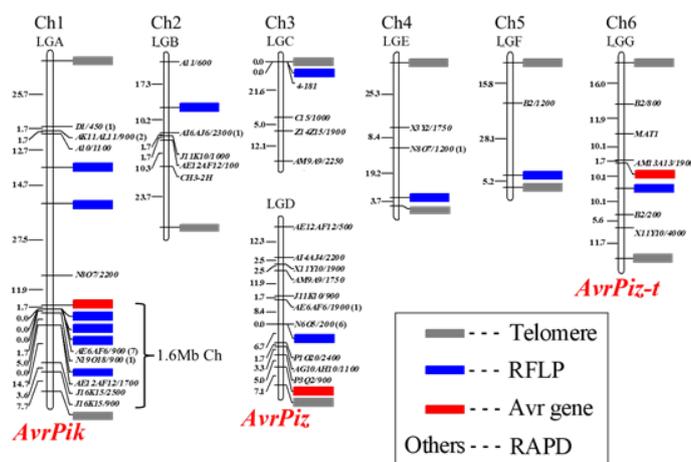


図 1. 両親菌株 84R-62B および Y93-245c-2 の F₁ 世代菌株集団における各種遺伝マーカーの分離データから作出した連鎖地図. Ch1~Ch6 は両親菌株の染色体（第 1 染色体~第 6 染色体）に対応. 1.6Mb Ch は 1.6 Mb 染色体に対応.

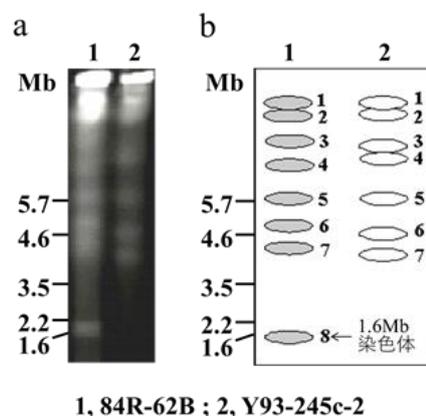


図 2. 両親菌株 84R-62B および Y93-245c-2 の電気泳動核型. a CHEF 電気泳動分画により観察された両親菌株の染色体バンド. b 電気泳動核型の模式図. 1~7 の番号を付けた染色体は常染色体（第 1 染色体~第 7 染色体）に対応.

4. *AvrPik* と *AvrPikm* および *AvrPikp* との連鎖関係

AvrPik は座乗染色体がユニークなことに加え、他の非病原力遺伝子との連鎖関係にも興味深い性質が観察された。上述の F₁ 世代 59 菌株をツユアケ (*Pikm*) と K60 (*Pikp*) に接種したところ、関東 51 号に非病原性の菌株のほとんどはツユアケと K60 に非病原性となり、病原性の菌株はこれら 2 品種に病原性となった（表 3）（Kusaba *et al.* 2014）。例外は F1-390 であり、この菌株はツユアケのみに非病原性を示した。すなわち、*AvrPik* は *Pikm* と *Pikp* に対

応する非病原性遺伝子 (*AvrPikm* と *AvrPikp* と推定) と連鎖していることが示唆された。また、*AvrPik* が 1.6Mb 染色体に座乗するならば、連鎖する *AvrPikm* と *AvrPikp* も 1.6Mb 染色体に座乗すると考えられる。ところが、F1-390 は 1.6Mb 染色体を保有しておらず、この仮説を支持していない (表 3 および図 3)。

この 3 遺伝子の連鎖関係は Yoshida ら (2009) によって *AvrPik* がクロー

表 3 84R-62B および Y93-254c-2 の F₁ 世代菌株集団における 1.6Mb 染色体, 病原性に関する表現型, *Pex31* ホモログの分布

1.6 Mb ^a 染色体	表現型 ^b			<i>Pex31</i> ホモログ ^c			菌株数	備考
	関東 51 号	ツユアケ	K60	A	C	D		
+	A	A	A	+	+	+	4	
+	A	A	A	+	-	+	20	84R-62B 型
+	A	A	A	-	+	+	5	
-	V	A	V	+	-	-	1	F1-390
-	V	V	V	-	+	-	28	Y93-245c-2 型
+	(V)	(V)	(V)	+	+	+	1	F1-327

^a +, 保有; -, 非保有.

^b A, 非病原性; V, 病原性. (V)は病原性が弱いことを示す.

^c *Pex31* ホモログの分離データは p*Pex31* をプローブとした *XhoI*-RFLP 分析による.

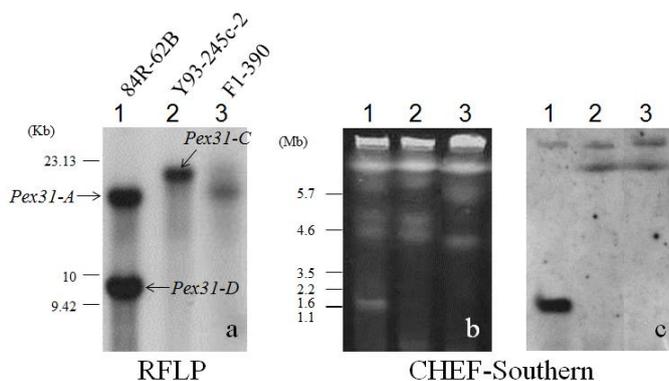


図 3. F₁ 世代菌株 F1-390 で観察された 1.6Mb 染色体と第一染色体間の *Pex31* ホモログの転座. a *Pex31* ホモログの RFLP 分析による識別. 両親菌株および F1-390 の全 DNA を制限酵素 *XhoI* により切断後, *Pex31* ホモログをインサート配列とする p*Pex31* をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った. b, c CHEF-Southern 分析による *Pex31* ホモログ座乗染色体の同定. 両親菌株および F1-390 の染色体を CHEF 電気泳動で分画後(b), p*Pex31* をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った(c).

ニングされたことにより解明された。

Yoshida らは *AvrPik* の候補遺伝子として分泌タンパク質をコードする *Pex31* を同定した。*Pex31* は A から E のホモログに分化しているが、*Pex31-D* には *Pik* に加え、*Pikm* と *Pikp* に対しても非病原性を誘起する活性、すなわち、*AvrPik* /*AvrPikm*/*AvrPikp* として機能することを見出した (Yoshida *et al.* 2009; Kanzaki *et al.* 2012)。また、*Pex31-C* は非病原性遺伝子としての機能がないものの、*Pex31-A* は *AvrPikm* の機能のみを有することが明らかとなった (Yoshida *et al.* 2009; Kanzaki *et al.* 2012)。そこで、両親菌株の保有する *Pex31* ホモログの同定を試みた。*Pex31-E* の部分配列をインサートに持つプラスミドクローン p*Pex31* をプローブとして用い、両親菌株の Fosmid ライブラリーからスクリーニングを行った。得られた陽性クローンの塩基配列解析から、Y93-245c-2 は *Pex31-C* を保有し、84R-62B は *Pex31-D* と *Pex31-*

A を保有することが明らかとなった (Kusaba *et al.* 2014) (表 3)。また、これら 3 つのホモログは pPex31 をプローブとし、制限酵素 *Xho*I を用いた RFLP 分析により、それぞれハイブリダイゼーションバンドのサイズの違いから識別可能となった (図 3a)。この RFLP 分析により F₁ 世代 59 菌株における *Pex31* ホモログの遺伝分離を調査した。その結果、F₁ 世代のほとんどの菌株は *Pex31-D* と *Pex31-A* を 2 つとも保有する、あるいは、*Pex31-C* のみを保有する親型に類別された (表 3)。すなわち、*Pex31-D* と *Pex31-A* は密に連鎖していることが明らかとなった。*Pex31-D* と *Pex31-A* の両方が遺伝した親型の F₁ 世代では *Pex31-A* の活性 (*AvrPikm*) が *Pex31-D* にマスクされる。すなわち、関東 51 号、ツユアケ、K60 に同時に非病原性、あるいは、病原性となる F₁ 世代が大多数となったのは *Pex31-D* と *Pex31-A* の連鎖で説明可能となった。また、上述の F1-390 は *Pex31-A* を単独で保有している唯一の F₁ 世代菌株であり、*Pex31-A* のみを持つことでのツユアケのみに非病原性となったことが明らかとなった。また、この菌株は *Pex31-D* のみ保有する 5 菌株と合わせて、少数生み出された組換え型の F₁ 世代であること、すなわち、ツユアケのみに非病原性となる菌株が例外的になるのも *Pex31-D* と *Pex31-A* の連鎖に起因する現象として説明可能となった。次に *Pex31* ホモログの座乗染色体を pPex31 を両親菌株の染色体にハイブリダイズさせる CHEF-Southern 分析により調査した。その結果、Y93-245c-2 については第一染色体からハイブリダイゼーションシグナルが検出された (図 3b,c)。従って、*Pex31-C* の座乗染色体は第一染色体と同定された。一方、84R-62B では 1.6Mb 染色体のみからシグナルが観察され (Fig. 3b,c)、*Pex31-D* と *Pex31-A* の座乗染色体は 1.6Mb 染色体と同定された。このことより、*AvrPik*、*AvrPikm* および *AvrPikp*、すなわち、関東 51 号、ツユアケ、K60 に対する非病原力遺伝子が 1.6Mb 染色体に座乗するとした筆者らの仮説が証明された。一方、F1-390 では興味深いことに *Pex31-A* が第一染色体に転座していた (Kusaba *et al.* 2014) (表 3 および図 3)。この転座により、F1-390 は例外的な表現型 (ツユアケのみに非病原性、かつ、1.6Mb 染色体非保有) を示したことが明らかとなった。1.6Mb 染色体は第一染色体の部分配列を保有するため、減数分裂時に Y93-245c-2 の第一染色体との希に対合が生じる可能性が考えられる。この対合が *Pex31-A* の転座を引き起こしたと推定された。

5. F1-327 で観察された 1.6Mb 染色体の消失変異

以上より、*Pex31-D* と *Pex31-A* が 1.6Mb 染色体に座乗することが明らかとなった。従って、1.6Mb 染色体を保有する F₁ 菌株は必ず関東 51 号、ツユアケ、K60 に非病原性となる。ところが、F1-327 は例外であり、1.6Mb 染色体を保有するにも関わらず 3 品種に病原性を示した (表 3)。その一方、F1-327 の 3 品種に対する病原性は弱く、他の F₁ 菌株よりも形成する病斑数が極端に少なかった (表 3)。本研究の接種実験は菌株を培地上で培養し、形成された胞子を植物体に噴霧接種することにより行った。F1-327 では培養時に一部の

細胞で 1.6Mb 染色体が消失する変異が生じ、1.6Mb 染色体を保有しない胞子が低率で形成されると考えれば、その弱い病原性を説明することができる。そこで、F1-327 が関東 51 号に形成した病斑から分離した後代菌株について 1.6Mb 染色体の保有を調査した (Kusaba *et al.* 2014) (図 4)。F1-327 と後代菌株の染色体を CHEF 電気泳動により分画したところ、F1-327 では 1.6Mb 染色体の保有が確認されたが、後代菌株では 1.6Mb 染色体に対応する染色体バンドが観察されなかった。また、これら後代菌株を関東 51 号、ツユアケ、K60 に接種した。接種は反復して行ったが、毎回、完全展開した病斑が多数形成された。すなわち、これら 3 品種に対する病原性については F1-327 と比較して明らかな向上が認められた。さらに、接種は F1-327 が明確な病原性反応を示す新 2 号(*Pik-s*)および非病原性反応を示す BL1 (*Pib*)に対しても行ったが、これら品種に対しては F1-327 と同じ反応を示した。すなわち、上述の病原性の向上は *Pex31-D* と *Pex31-A* が非病原性に関与する品種に対してだけに生じていた。これらのことより、F1-327 では 1.6Mb 染色体が消失したことにより、3 品種に特異的な病原性獲得が生じたこと、つまり、レース変異が生じたことが明らかとなった。1.6Mb 染色体の消失変異は他の F₁ 菌株では観察されておらず、F1-327 に特異的な現象のようである。前述の通り、1.6Mb 染色体はメンデル遺伝をするが、これは本染色体の第一染色体由来領域にハウスキーピング遺伝子が座乗するためと推定されている。この仮説が正しければ、1.6Mb 染色体の消失は致死性の変異となる。一方、F1-327 では第一染色体の遺伝子としてこのハウスキーピング遺伝子を Y93-245c-2 から受け継いだため、1.6Mb 染色体は生存に必須の染色体ではなくなったのかも知れない。

おわりに

先に Chuma ら (Chuma *et al.* 2011) はヤシロモチの抵抗性遺伝子 *Pita* に対応する非病原力遺伝子 *AvrPita* は菌株によっては常染色体でなく、過剰染色体に座乗することを見出した。本研究は過剰染色体に座乗するイネいもち病菌の非病原力遺伝子の 2 例目の報告となる。一方、本研究で著者らが見出した 1.6Mb 染色体は第一染色体の部分配列と過剰染色体のキメラであり、本染色体は第一染色体の部分配列を有することでこれまでに報告の無いような遺伝的変異を F₁ 世代菌株集団に生じさせていた。一つは過剰染色体と第一染色体間の非病原力遺伝子 (*Pex31-A*) の転座現象であり、もう一つは、1.6Mb 染色体の消失による病原性獲得変異である。本研究で見出した 1.6Mb 染色体を原動力とする遺伝的変異が自然界で生じている本菌の病原性変異に

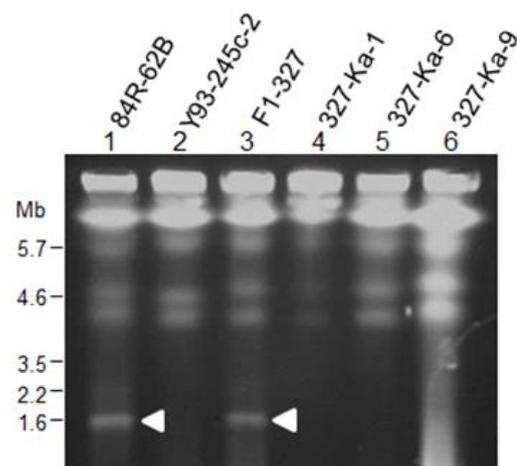


図 4. F₁ 世代菌株 F1-327 に由来する単胞子分離菌株(327-Ka-1, -6, -9)で観察された 1.6 Mb 染色体の消失変異。1.6Mb 染色体は矢印で示す。

関わっているかは不明である。しかしながら、実際に日本で抵抗性崩壊が起きた抵抗性遺伝子に対応する非病原力遺伝子にこのような特異な変異を起こす可能性があることは極めて興味深いと考えられる。

ここ 10 年ぐらいの間に普及した次世代シーケンサーは本菌の非病原力遺伝子の遺伝解析に変革をもたらした。現代では非病原力遺伝子の研究にイネ品種に対する非病原性・病原性の遺伝分離から非病原力遺伝子を追う従来型の遺伝解析は必ずしも必要としなくなった。今回、紹介する筆者らの研究はまさにこのような古典遺伝学的アプローチによるものである。次世代シーケンサーを利用した研究が全盛期を迎えた今、古典遺伝学を基調とした解析から得られる研究発想はむしろ新鮮なものとして捉えていただけるのではと考える。本稿が温故知新となれば幸いである。

謝辞

本稿は筆者の所属する佐賀大学農学部植物病制御学分野において行われたイネいもち病菌に関する研究の成果をまとめたものである。これら成果のほとんどは佐賀大学前教授 八重樫博志博士、および、当時、博士課程の大学院生であった羅朝喜博士（現 華中農業大学）によるものである。筆者は現在の分野の代表として、彼らの成果を本稿にまとめさせていただいた。本稿の研究を行うに当たり、多大なるご協力・ご指導をいただいた日本大学 藤田佳克博士、神戸大学 土佐幸雄博士、帯広畜産大学 中馬いづみ博士に感謝の意を表す。

引用文献

Chuma I, Isobe C, Hotta Y, Ibaragi K, Futamata N, Kusaba M, Yoshida K, Terauchi R, Fujita Y, Nakayashiki H, Valent B, Tosa Y (2011) Multiple translocation of the *AVR-Pita* Effector Gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. *PLoS Pathog* 7:e1002147.

Covert S (1998) Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Curr Genet* 33: 311–319.

Flor HH (1955) Host-parasite interaction in flax rust - Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45:680-685.

Hayashi N, Ando I, Imbe T (1998) Identification of a new resistance gene to a Chinese blast fungus isolate in the Japanese rice cultivar Aichi Asahi. *Phytopathology* 88:822–827.

井辺時雄, 松本省平 (1985)イネ品種レイホウに病原性のいもち病菌系に対す

るイネ品種の抵抗性の遺伝と新遺伝子の同定. 育種学雑誌 35:332-339.

Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* 19:4004-4014.

Jones RN (1995) B chromosomes in plants. *New Phytologist* 131:411-434.

Kanzaki H, Yoshida K, Saitoh H, Fujisaki K, Hirabuchi A, Alaux L, Fournier E, Tharreau D, Terauchi R (2012) Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice *Pik* genes driven by their physical interactions. *Plant J* 72:894-907.

Kiyosawa S (1969) Inheritance of resistance of rice varieties to a Philippine fungus strain of *Pyricularia oryzae*. *Jpn J Breed* 19:61-73.

Kiyosawa S (1974) Studies on genetics and breeding of blast resistance in rice. *Misc. Publ. Bull. Natl. Inst. Agric. Sci., D No.1: 1-58* (In Japanese with English summary).

Kiyosawa S (1984) Establishment of differential varieties for pathogenicity test of rice blast. *Rice Genet Newslett* 1:95-97

Kusaba M, Mochida T, Naridomi T, Fujita Y, Chuma I, Tosa Y (2014) Loss of a 1.6 Mb chromosome in *Pyricularia oryzae* harboring two alleles of *AvrPik* leads to acquisition of virulence to rice cultivars containing resistance alleles at the *Pik* locus. *Curr Genet* 60:315-325.

Li W, Wang B, Wu J, Lu G, Hu Y, Zhang X, Zhang Z, Zhao Q, Feng Q, Zhang H, Wang Z, Wang G, Han B, Wang Z, Zhou B (2009) The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPiz-t* encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene *Piz-t*. *Mol Plant Microbe Interact.* 22:411-20.

Luo CX, Hanamura H, Sezaki H, Kusaba M, Yaegashi H (2002) Relationship between avirulence genes of the same family in rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *J Gen Plant Pathol* 68:300-306.

Luo CX, Fujita Y, Yasuda N, Hirayae K, Nakajima T, Hayashi N, Kusaba M, Yaegashi H (2004) Identification of *Magnaporthe oryzae* avirulence

genes to three rice blast resistance genes. *Plant Dis* 88:265–270.

Luo CX, Yin LF, Koyanagi S, Farman ML, Kusaba M, Yaegashi H (2005) Genetic mapping and chromosomal assignment of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes *AvrPik*, *AvrPiz*, and *AvrPiz-t* controlling cultivar specificity on rice. *Phytopathology* 95:640–647.

Luo CX, Yin LF, Ohtaka K, Kusaba M (2007) The 1.6-Mb chromosome carrying the avirulence gene *AvrPik* in *Magnaporthe oryzae* isolate 84R-62B is a chimera containing chromosome I sequences. *Mycol Res* 111:232–239.

Silue D, Notteghem JL, Tharreau D (1992) Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa* -*Magnaporthe grisea* pathosystem. *Phytopathology* 82:577–580.

Yamada M, Kiyosawa S, Yamaguchi T, Hirano T, Kobayashi T, Kushibuchi K, Watanabe S (1976) Proposal of a new method for differentiating races of *Pyricularia oryzae* Cavara in Japan. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 42:216–219.

山崎義人, 高坂淖爾 (1980) イネのいもち病と抵抗性育種. 博友社. 東京. 607pp.

Yoshida K, Saitoh H, Fujisawa S, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Tosa Y, Chuma I, Takano Y, Win J, Kamoun S, Terauchi R (2009) Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 21:1573–1591.

病原ウイルス探索のいま - 潜在性ウイルスの感染生理 -

関根健太郎*

Sekine, K.-T.

Now in search of pathogenic viruses
- *Infectious physiology of latent viruses* -

Abstract

High through-put sequencings (HTS) make it easy to identify viruses via metagenomic analyses. In the past decade, various plant viruses have been detected using HTS and corresponding bioinformatics analyses. Bioinformatics can reveal novel viral genomes efficiently based on homology searching. However, it is difficult to find genetically distant viruses, such as viruses belonging to novel families, through homology-based analysis. Additionally, it is unclear whether the expected virus has accurately been presented on detection of virus-like partial sequences. These issues associated with searching viruses via metagenomic analyses need to be solved. Furthermore, HTS has been applied to detect pathogenic viruses that are causative agents of plant diseases. Diseased plants, especially perennial plants, are occasionally infected by multiple virus species. HTS-based metagenomic analyses could identify the causative viruses comprehensively. Kobayashi et al. (2009) established an exhaustive plant RNA virus-detection method, “DECS analysis”, which has contributed to finding novel viruses from several diseased plants. Yanagisawa et al. (2016) improved DECS analysis with HTS. Many viruses have been identified with DECS analysis. These viruses were considered as candidates of the causative agents for the diseases. Partial sequences of pararetrovirus are the most troublesome. Also viruses previously identified as a latent virus are doubted to be innocent. Generally, the candidate should be proven as the causative agent by following Koch’s postulates. However, these postulates sometimes present hindrances in proving that a candidate virus is a pathogen. Often, a virus cannot be isolated or inoculated. Even when a virus successfully infects healthy plants, no symptom may appear under an experimental environment. Although novel viruses can be identified easily recently, confirmation of their pathogenicity is always the most important parameter for diagnosing plant diseases.

Key words: plant virus, dsRNA, high through-put sequence, deep sequence, DECS method

*琉球大学農学部 Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 903-0213, JAPAN.

はじめに

頻発する病害については、長い農業の歴史の中でその原因が明らかにされ、耐病性作物の育種や防除技術の開発が進められてきた。一方、グローバル社会は栽培作物の多様化を促し、病害も併せて多様化しており、地球規模で対策しなければならない病害が増えている。このような病害に対する最も有効な防除手段は、病原体を早期に発見し、蔓延を未然に防ぐことである。特に感染後の治癒が不可能なウイルスによる病害は壊滅的な被害をおよぼしかねない。従来ウイルス病の診断は、PCR や ELISA などウイルスの基本骨格である核酸またはタンパク質を特異的に検出する個別検定法を用いて、病原ウイルスの感染の有無を検知するものが一般的であり、限られた病害の情報をもとに、病原ウイルスを推測して検定を実施しなければならない。そのため、想定外のウイルスや未知のウイルスが感染していた場合には、その病原ウイルスを検出することはできない。マイナークロップや栽培作物以外の植物に感染するウイルスに関する知見は非常に限定されており、未だ同定されていないウイルスが多く残されていると推察される。分子生物学のめざましい発展とともに、網羅的なウイルス検出技術が様々に開発されてきた (Kobayashi et al. 2012)。特に高速シーケンス技術 (High Through-put Sequencing; HTS ; deep sequencing) を駆使して、感染が疑われる宿主や、環境中などの大量の遺伝子配列情報の中からウイルスゲノム配列情報が探索されるようになってきている (Barba et al. 2014, Roosinck et al. 2015)。これにより比較的簡便にウイルスを見出すことが可能となった。このようなゲノム解析研究から、メガウイルスなどのそれまでウイルスと認識されていなかった巨大ウイルスの存在も明らかにされている。ゲノム情報からウイルス感染が疑われた場合には、実際にこのウイルスが感染しているかについての検証、さらには、コッホの原則に従った病原体としての同定が必要である。しかし、ウイルス学の進歩に伴って、コッホの原則では証明できない感染症の存在が明らかになっており、ウイルスが存在しても発病しない場合や、実験による症状の再現が不可能な場合、必ずしも全ての発症例でウイルスが検出されない場合などが挙げられる。本講演では、近年の高速シーケンシング技術を用いた病原ウイルス探索の現状と、コッホの原則に沿った病原体同定が難しい例として、他種のウイルスの重複感染の事例と、特に不顕性感染することが報告されている潜在性ウイルスの関与が疑われる病害について紹介する。

1. 網羅的な植物ウイルス検出技術による病原候補ウイルスの探索

病気の植物に感染しているウイルスを特定する場合、既報の病害の病徴との比較やウイルス粒子の電子顕微鏡による形態観察や、外被タンパク質の分子量、検定植物への感染試験による宿主範囲を知ることなどにより、ウイルス種を類推していく。一方で、ゲノム配列情報を得ることができれば、種を特定することができる。網羅的なウイルス検出技術とは、ウイルスの核酸やタンパク質に対して、種特異的に検出するプライマーや抗体を用いる方法とは異なり、一回の検定によって、ウイルスのゲノム配列やタンパク質のアミノ酸配列を直接解析することで、感染ウイルス種を同定する技術である。ウイルスの分類における「属」間で保存された遺伝子配列がある場合には、

この属に含まれるウイルス種を包括的に検出可能なユニバーサルプライマーを用いたPCRによる検定方法が開発されているが、全ウイルスを対象とするPCR検定法は確立されていない。仮に微生物相解析で用いられているような種を特定可能な遺伝子領域（ミトコンドリアCOI領域やリボソームITS領域など）があれば、DNAメタバーコーディング技術のように、シーケンシングによって種を判別可能であるが、残念ながら全てのウイルスゲノムに共通するコンセンサス配列は見つかっていない。一方、植物ウイルスの多くはゲノム情報をRNAとして有し、その感染サイクルの中で2本鎖RNA（dsRNA）の状態を必ずつくり、いわばdsRNAの蓄積はウイルス感染マーカーとして利用することができる。つまりdsRNAを特異的に抽出することで、ウイルスのゲノムRNAの存在を効率的に検出することが可能である。Kobayashi et al. (2009)は、HTSが今ほど普及する以前に、サンガーシーケンサーの利用を前提とした網羅的ウイルス検出技術「DECS法」を開発した。DECS法は、植物のdsRNA結合タンパク質DRB4を用いてウイルス由来のdsRNAを抽出し、この逆転写産物を網羅的に増幅した後、クローニングしてシーケンス解析することで、得られた塩基配列情報からウイルス種を特定、または類推する技術である。現在では、dsRNAの抽出工程は、Plant viral dsRNA enrichment kit (MBL社)などの製品が市販されている。また、Yanagisawa et al. (2016)がHTSと組み合わせることでウイルス検出効率を飛躍的に高めたDECS-C法を確立して、blueberry shoestring virusのゲノム全長を決定するなど、わが国の植物検疫の現場においても活用されている（図1）。

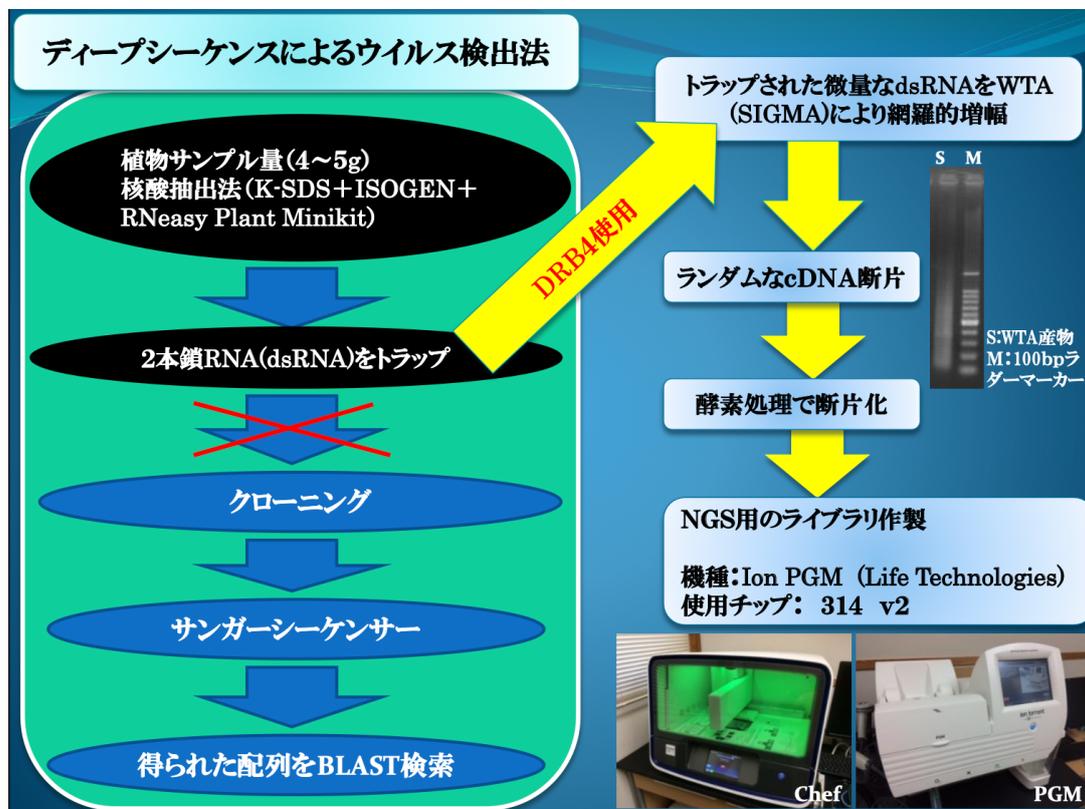


図1. 網羅的ウイルス検出技術「DECS-C法」

ここではディープシーケンサーIonPGMを利用した手法を一例として挙げている。

また、ディープシーケンサーの出力データ量が多いため、リボソーム RNA を除く全 RNA を網羅的にシーケンシングすることで、宿主の RNA とウイルスのゲノム RNA の塩基配列情報をまとめて解読し、ウイルスゲノム様配列を探索することも可能である。さらに RNA サイレンシング機構で生じる 21-24 塩基の小分子 RNA (siRNA) を網羅的にシーケンシングすることで、RNA ウィルスに限らず DNA ウィルスの塩基配列情報を得ることも可能である。HTS の出力データ量が大量になるほど、高感度かつ信頼性の高いウイルスゲノム情報の取得が可能である。他方、大量の塩基配列情報を効率よく解析するためには、相応のランニングコストと高度な情報解析技術「バイオインフォマティクス」が必要となる。HTS の 1 塩基あたりのランニングコストは年々低下している一方で、出力される最大データ量が指数対数的に増えており、一回のランに複数サンプルを投入することで 1 サンプルあたりのランニングコストを抑えることができる。データ解析については、多重のフィルタリング、mapping や *de novo* assembly、BLAST® 相同性検索などを駆使して、可能な限り計算時間を短縮し、信頼性を高めたウイルス様配列検出プログラムが様々に開発されている。著者は、迅速性・簡便性をもとめて一分子シーケンサー MinION (Oxford Nanopore 社) を利用したウイルス RNA 検出技術を確立している (図 2)。直接 RNA の塩基配列を読むことが可能であるため、ゲノム全長を一つのシーケンスリードとして得ることができる点が最大の利点であり、長鎖のシーケンスをウイルスゲノムの一つのコンセンサスとして、新規ウイルスゲノム情報を同定することが可能になると考えている。しかし、現実的には dsRNA のコピー数が多量に必要であることなどの課題が見出されており、dsRNA の濃縮方法や一分子シーケンサーのライブラリ作製工程の最適化を検討している。以上のように、ウイルスゲノム配列を検出することは比較的簡便になっている。

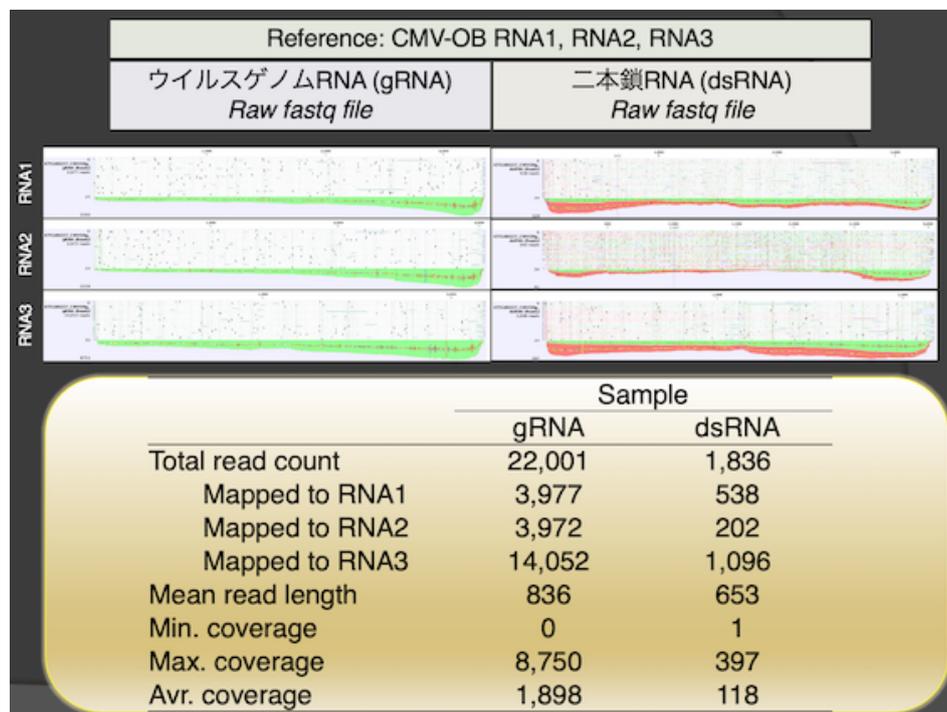


図 2. ナノポアシーケンサーを利用した RNA ダイレクトシーケンス結果の一例

2.効率的なウイルス検出技術

病原体の候補として植物ウイルスが見出された際には、ウイルスの単離を目的として宿主植物の探索を行う必要がある。単病斑分離が可能な宿主を見つけることができれば、ウイルスを純化することができるためである。しかし多くの植物においては、感染しないか、顕著な病徴を呈さないため、感染の有無を検定する必要が生じる。また、必ずしも接種実験がすぐにできないこともあるため、生産現場において病徴を呈する植物と健全植物におけるウイルス感染の有無を調査することも、病原体であることを裏付ける大切な根拠を得られる可能性がある。既知のウイルスであれば、抗体を利用したイムノクロマトグラフィーが最も簡易に迅速な検出が可能である。一方で、新規ウイルスについては、抗体作製には時間を要することから、ゲノム情報を元にPCRなどの分子生物学的な遺伝子検出手法を早期にデザインする。新型コロナウイルスの流行で一般的となったリアルタイムPCRは1-2時間程度でウイルスの検出が可能である。近年では、マイクロ流路を利用した高速リアルタイムPCR装置が販売されており、10分以内で植物ウイルスを検出することも可能である（Furutani et al. 2016; 関根ら, 2017）。簡便性の面からはLAMP法も有力なウイルス検出技術である。近年では、PCR増幅産物をクロマトグラフィーで可視化するDNAクロマトグラフィーが実用化されており、LAMPと併せることで簡便かつ高感度な信頼性の高い検定が可能であり、特にマルチプレックス化が可能である点で優れているため、今後植物ウイルス検出への応用が期待される（図3）。これらの効率的なウイルス検出技術は、植物への接種実験のみならず、生態学的な調査に活用され、作物だけでなく、圃場周辺の雑草におけるウイルスの感染状況の調査が行われている。個別検定法に比べるとコストがかかるHTSを用いた網羅的検出技術ではあるが、野生植物でのウイルスの網羅的調査研究も実現可能になってきている（神谷ら, 2017）。新型コロナウイルスのようなパンデミックを起こすウイルスのみならず、ゲノム配列の多型解析によるウイルスの生態の理解が、細胞、植物、ローカル、およびグローバルな視点で進められている。このような情報は、ウイルス病害の防除に活用されるのみならず、病原ウイルスを特定する上でも有用な情報となる。

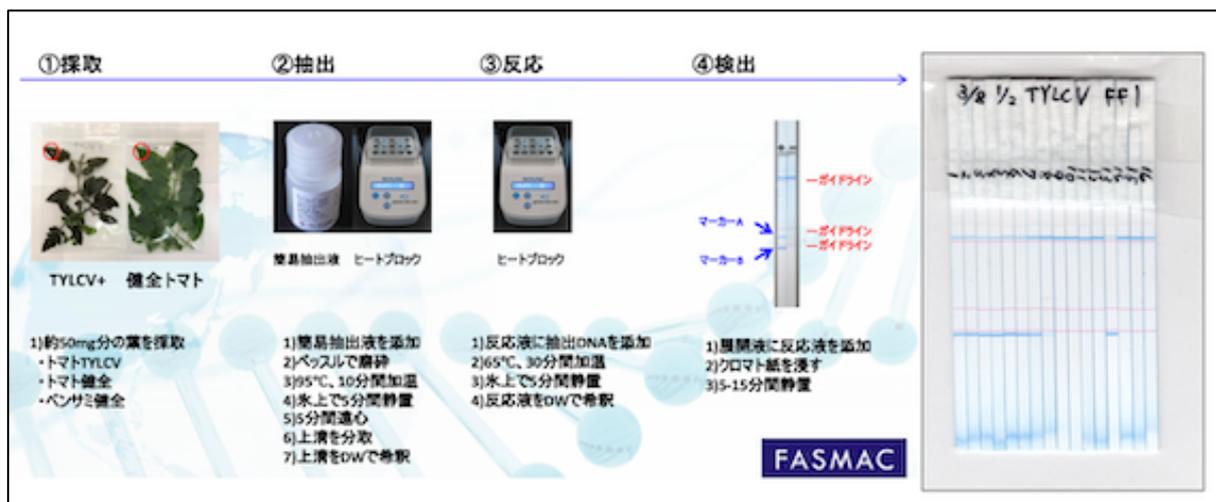


図3. DNAクロマトグラフィーを用いたTYLCVの検出（協力：ファスマック社）

3.病原ウイルスの探索

上述のように、植物に感染しているウイルスを同定することは比較的容易になった。一方で、近年、病原ウイルスを特定する必要がある場合は、マイナークロップの新興病害や長らく原因不明のままに病原体が特定されていないケースがほとんどである。見出されたウイルスが病気を起こしている病原体か否かを明らかにするためには、コッホの原則を満たすことを証明する必要がある。すなわち、1) 病原体を単離、2) 健全植物へ接種、3) 病徴を再現、4) 再び病患部より病原体が単離できることを示さなければならない。しかし、ウイルスの種によっては、単離が困難なものや、接木以外に接種方法が見出せないものがある。また、果樹や花きなどの多年生の植物は、候補病原体が見つかっていても、感染試験による病徴の再現に時間がかかることや、そもそも実験に用いる健全個体を容易に準備できないなどの障壁がある。また、挿木、球根、いもなどの栄養繁殖によって増殖されている植物においては、顕著な病徴がないものであっても、不顕性感染しているウイルスが存在し、複数種のウイルスが重複感染していることも珍しくない。「latent virus」と名付けられたウイルスが必ずしも病原性を持たない無害な存在として無視してよいのか？常に悩ましい問題である。著者が近年研究対象としている沖縄の作物の病害においては、病原ウイルスの同定が容易ではないケースが多く、以下にいくつかの事例を紹介したい。

3-1. 重複感染 シマトウガラシのモザイク病

沖縄県では、シマトウガラシ（キダチトウガラシ；*Capsicum frutescens*）の果実を泡盛に漬けたコーレーグースという調味料が古くから親しまれており、沖縄本島や種々の離島において栽培が盛んである。近年、国内産の香辛料の需要は高く、生産量の増加が期待されている作物の一つである。シマトウガラシは、多年生の植物であり、露地で栽培されていることが多く、ウイルスの感染の機会が非常に多く、顕著なモザイクや矮化症状があっても果実が収穫できる限りは抜去されないこともあり、ウイルスの多重感染が容易に予想された。黄化や矮化、モザイク症状の激しいシマトウガラシから HTS を用いた dsRNA の網羅的解析を実施したところ、pepper mild mottle virus (PMMoV), pepper veinal mottle virus (PVMV), pepper vein yellows virus (PeVYV), tobacco vein clearing virus (TVCV) と相同性を持つ配列がそれぞれ検出された。汁液接種で感染させられる PMMoV や PVMV については、単病斑分離や虫媒伝染の選択性を利用して純化することができ、戻し接種によってシマトウガラシへの単独の病原性を調べることができた。一方で、汁液接種の難しい PeVYV と TVCV については、病原性の解析が進んでいない状況にある。パラレトロウイルス（逆転写酵素を持つ DNA ウイルスの総称）である TVCV は、ゲノム全長が存在するか、植物ゲノム内に存在しているのか、ウイルス粒子として存在するのかなど詳細を明らかにしていく必要がある。また、なぜ dsRNA の網羅的解析でパラレトロウイルスが検出されるのかについても興味を持たれる。沖縄県内のピーマンやパプリカなどのトウガラシ属作物においてもウイルス性の病害と考えられる被害が多数報告されており、watermelon silver mottle orthotospovirus (WSMoV) の感染によって生じるピーマン壊疽輪紋病は網羅的ウイル

ス検出技術を用いて同定した病害の一つである。この壊疽輪紋病発症株においても、PMMoV の混合感染が認められた株があった。多年生のシマトウガラシに感染しているウイルスがピーマンなどへ広がっていないかについての調査が今後必要である。先行的に実施した沖縄県内のモザイク症状を呈するトウガラシ属における PeVYV の感染状況の調査ではシマトウガラシ以外のピーマンやパプリカ、トマトでも感染が見つかった（谷口ら, 2021 ; 令和 3 年度園芸学会秋季大会発表予定）。この際に、DNA ウィルスであるベゴモウィルスの感染も広く認められた。



図 4. シマトウガラシのモザイク病とピーマン壊疽輪紋病

3-2. 病原性未同定のウイルス パインアップル萎凋病（仮称）

パインアップル萎凋病（pineapple mealybug wilt disease ; 和名なし）は世界的に広く知られる病害であり、カイガラムシ、もしくは、これに媒介されるウイルス pineapple mealybug wilt-associated virus（PMWaV）種群の関与が示唆されている病原未同定の病害である（図 5 ; Dey et al., 2018）。カイガラムシによる伝染以外の接種方法がないために、ウイルス単独での病徴再現試験ができないため、病原体を同定できていない。病原体候補となるウイルスとして PMWaV1-5 の 5 種が様々な組み合わせで重複感染しており、RNA サイレンシングサプレッサーの機能解析から、病徴誘導の主たる要因が PMWaV2 であると有力視されているが、PMWaV2 が感染していたとしても必ずしも萎凋病を発症するとは限らない。パインアップルの台湾からの輸入苗において、萎凋症状に加え不定形の壊疽を持つ個体について、網羅的ウイルス検出技術を適用した結果、PMWaV1-3 に加え、2 種の DNA ウィルス、さらに sugarcane mosaic virus の感染が確認された。この SCMV の接種に成功しておらず、病徴の再現ができていない。仮に接種に成功したとしても、ウイルスの感染していない植物を準備する必要がある。生長点培養や種子から育てることによって PMWaV の感染していない植物を用意することができるが、DNA ウィルスについては植物のゲノム内に挿入されているため、除くことが難しいことがわかった。また、生長点培養では PMWaV を全て除ける場合と除けない場合があることがわかった。これによって PMWaV と SCMV のそれぞれの種を分離できる可能性があると考えられた。ただし生長点培養は、いつでも大量にでき

るものではないため、1 個体から分離していくことは非常に難しい。葉肉細胞から再分化できればより効率的に培養個体でウイルスを分離することができるものと推察される。このように同定されたウイルスを個々に分離して、ウイルスの性状を詳細に解析していくことが今後重要であると考えられる。なぜなら、ゲノム情報からウイルスを発見できるようになり、PMWaV のように病原性が不明のウイルスが増加傾向にあり、例えば検疫の現場などでは、その検査対象が否応なしに拡大するためである。



図5. パイナップルの萎凋病（仮称）

3-3. 潜在性ウイルス パッションフルーツ異常症（仮称）

沖縄県農業研究センターでは沖縄県内で発生しているウイルス感染が疑われる葉の奇形や葉巻症状などを持つ異常症個体（133 個体）の全県的な大規模な調査を実施したところ、*passiflora latent virus* (PLV; 和名トケイソウ潜在ウイルス) が 80%を超える感染率であった（図6）。著しい矮化症状を発症した PLV 感染株において、網羅的ウイルス検出技術を実施したところ、PLV 以外に感染しているウイルスは確認されなかった。当該ウイルス株を PLV 沖縄パッションフルーツ分離株 (PLV-OP) として、健全なパッションフルーツやクサトケイソウ、キノアに接種したところ、顕著な病徴は見られなかった。*latent* の名の通りだとすると不顕性感染するものとして、別の病原体を探索するかもしれない。しかし網羅的ウイルス検出技術で PLV のみが検出されたことから、PLV によって生じた病害である可能性を探ることにした。パッションフルーツ生産現場での病害は秋から冬にかけての栽培期に異常症の発症が見られる一方、春から夏にかけての栽培期にはあまり症状が見られないということから、温度が影響しているのではないかと考えられた。低温条件で接種試験を試みたものの、特にウイルスの有無で生育に顕著な差は見られなかった。PLV-OP で試行錯誤を繰り返している間に、新たに沖縄県農業研究センターで分離された株 (PLV-NP) はキノアで顕著な病徴を示していた。沖縄県農業研究センター温室において、OP、NP 株をキノアにそれ

ぞれ接種し、qRT-PCRにより増殖量を比較した結果、NP株の方がOP株よりも増殖量が多く、接種2週後の症状が明瞭であった。NP株もパッションフルーツにおいて顕著な病徴を呈さなかったが、生産現場での発生状況を考えると環境の要因や品種が影響することが予想されるため、増殖量の多いNP株を用いて、低温下で病徴の再現ができないか検討している。OP株は、キノアにおいても不顕性感染していたため（沖縄農業研究センターでは接種葉で症状あり）、OP株とNP株に対するキノア細胞内応答をmRNAのプロファイルから解析することで、代謝変動から病徴発現機構を紐解く一助となると期待している（Takahashi et al. 2017）。

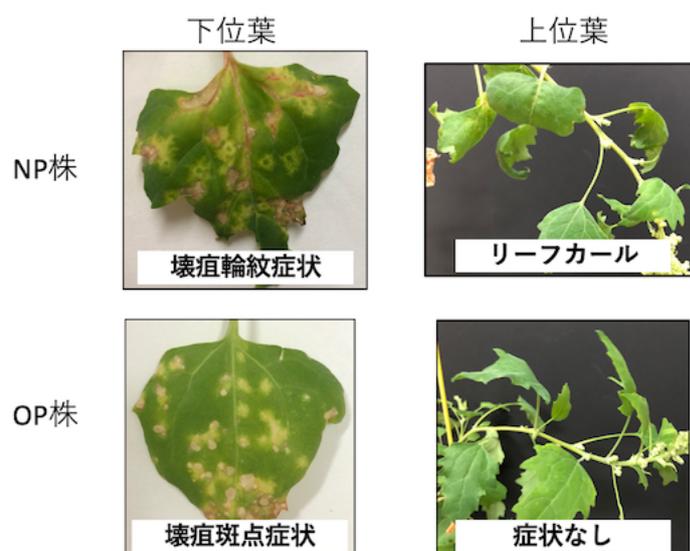


図6. トケイソウ潜在ウイルス2分離株のキノアにおける病原性の差異

おわりに

コッホの原則が、病原体を同定する上で基本となることは変わらない。しかし既に多くの病害について原因究明がなされており、特に病原体の分離や感染試験の難しいものほど未同定病害として残されている。遺伝子配列ベースの新たな病原体探索が活発化した結果、重複感染や、病原性不明のウイルス、潜在ウイルスとして報告のあるウイルスが、新病害の病原体の特定をより複雑にしている。病原性因子や病害の発症メカニズムを明らかにすることで病原体を同定する手法がますます必要となってくる。その一方で、病害を及ぼさない不顕性感染する無害な潜在性ウイルスが、本当に無害であることを証明することも重要である。

謝辞

本研究を行うにあたり、沖縄県農業研究センター河野伸二氏、那覇植物防疫事務所池城隆明氏、横浜植物防疫所柳澤広宣博士、農研機構植物防疫研究部門富高保弘博士、近畿大学小枝壮太博士、東京農工大学小松健博士、株式会社ファスマック高橋一人博士のご協力をいただいた。また、沖縄県科学技術イノベーションシステム構築事業の支援を受けて実施した。ここに感謝申し上げる。

引用文献

- Atsumi, G., Sekine, K.-T. and Kobayashi, K. (2015) New method to isolate total dsRNA. *Methods in Molecular Biology*. 1236: 27-37..
- Barba, M., Czonsnek, H., & Hadidi, A. (2014) Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. 6: 106-136.
- Dey, K.K., Green, J.C., Melzer, J., Borth, W. and Hu, J.S. (2018) Mealybug wilt of pineapple and associated viruses. *Horticultrae* 4:52
- Furutani, S., Naruishi, N., Hagihara, Y., Nagai, H. 2016. Development of an on-site rapid real-time polymerase chain reaction system and the characterization of suitable DNA polymerases for TaqMan probe technology. *Anal. Bioanal. Chem.* 408: 5641-5649
- Kobayashi, K., Tomita, R., and Sakamoto, M. (2009) Recombinant plant dsRNA-binding protein as an effective tool for the isolation of viral replicative form dsRNA and universal detection of RNA viruses. *J. Gen. Plant Pathol.* 75:87-91.
- Kobayashi, K., Atsumi, G., Yamaoka, N., and Sekine, K.-T. (2012) Sequencing-based virus hunting and virus detection. *Jpn. Agric. Res. Q.* 46:123-128.
- 神谷麻梨・永野惇・本庄三恵・工藤洋 2017. 野生植物とウイルスの見えない相互作用を RNA-Seq で観る. *植物科学最前線*8: 12-21.
- 関根健太郎・柳澤広宣・永井秀典 2017. 効率的な植物ウイルス検出技術の開発. *植物科学最前線*8: 4-11.
- Takahashi, H., Abe, H., Fujita, K. & Sekine, K.-T. 2017. The use of metabolome analysis to identify the cause of an unexplained disease of Japanese gentians (*Gentiana triflora*). *Metabolomics* 13: 51.
- Yanagisawa, H., Tomita, R., Katsu, K., Uehara, T., Atsumi, G., Tateda, C., Kobayashi, K., & Sekine, K.-T. 2016. Combined DECS analysis and next-generation sequencing enable efficient detection of novel plant RNA viruses. *Viruses* 8: 70.

ニンニクウイルスの宿主適応戦略を逆手にとった ウイルス駆逐作戦

Hangil Kim · 増田 税
Kim, H. and Masuta, C.

A strategy to prevent viral diseases in garlic by taking advantage of viral host
adaptation tactics

Abstract

Onion yellow dwarf virus (OYDV) is a common potyvirus infecting *Allium* species, which includes garlic and onion. OYDV is transmitted by aphids in a non-persistent manner, and the vector transmission is mediated by a viral protein, helper component proteinase (HC-Pro). When we investigated viral infection of garlic samples from various Japanese regions, we noticed that Hokkaido OYDV isolates were always detected together with another potyvirus, leek yellow stripe virus (LYSV). We analyzed the OYDV HC-Pro genes and found that all the HC-Pro sequences from the Hokkaido OYDV isolates lacked ~ 100 amino acids in their N-terminal region. Our analysis of the RNA silencing suppressor (RSS) activity of HC-Pro showed that the short-type HC-Pro of Hokkaido OYDV isolates lost their RSS activity, while LYSV HC-Pro showed strong RSS activity. Because the deleted region includes a crucial motif for aphid transmission, we tested aphid transmissibility of Hokkaido OYDV isolates with or without co-infection of LYSV, and confirmed that the Japanese OYDV carrying a short-type HC-Pro was transmitted only when the plants were co-infected by LYSV. In addition, because the interaction between LYSV HC-Pro and OYDV coat protein was detected, LYSV HC-Pro may compensate for a disability of the aphid transmissibility of the OYDV strains containing a deficient HC-Pro. We presume that the Japanese OYDVs may take some advantages of mixed-infection with LYSV for their spread and survival.

Key words: Onion yellow dwarf virus, Leek yellow stripe virus, HC-Pro, RNA silencing suppressor, Aphid transmission, Garlic

北海道大学大学院農学研究院 Research Faculty of Agriculture Hokkaido University, Kita 9, Nishi
9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, JAPAN

Introduction

Garlic, a valued crop as a spice seasoning over the world, is a common host of several viral species of *Potyvirus*, *Carlavirus* and *Allexivirus* (Arya *et al.*, 2006; Conci *et al.*, 2003; Dovas *et al.*, 2001; El-Wahab, 2009; Fayad-André *et al.*, 2011; Mohammed *et al.*, 2013). Among them, onion yellow dwarf virus (OYDV), a garlic-infecting potyvirus, is one of the most important viral pathogens, commonly detected together with another potyvirus, leek yellow stripe virus (LYSV).

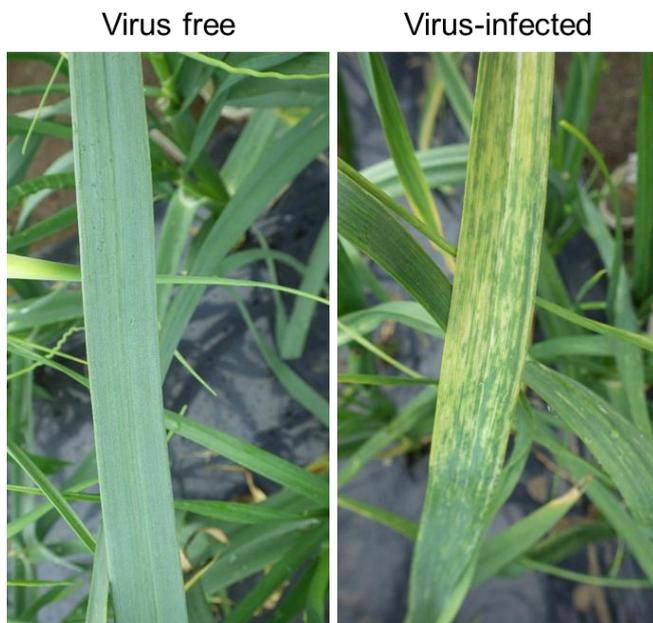


Figure 1. Symptom of garlic plants infected with viruses including OYDV and LYSV.

diseases are usually induced in mixed-infection of several virus species including potyviruses, carlaviruses and allexiviruses, and the co-infection of the viruses often causes severe yellow mosaic/stripe with stunting in infected garlic plants (Fig. 1). Both LYSV and OYDV are nonpersistently transmitted by several species of aphids (Drake *et al.*, 1933; Lunello *et al.*, 2002), and it has been generally considered that the transmission of OYDV and LYSV is mediated by the helper component proteinase (HC-Pro), which may function as a ‘bridge’ between the potyviral coat protein (CP) and the aphid stylet.

In Japan, garlic plants have been broadly cultivated, mainly in Aomori Prefecture. To establish an effective control system against the garlic viral diseases, several attempts have been made to generate virus-free garlic (Ayabe and Sumi, 1998; Takaki *et al.*, 2005). However, the virus-free garlics have been quickly re-infected via an insect vector, and the viruses have been spread over the garlic fields by vegetative reproduction. To overcome such problems, biological control using attenuated viral strains has been tested. Among the attenuated OYDV isolates, Takaki *et al.* (2006) found the isolate whose HC-Pro has an N-terminal deletion (~ 100 amino acids) including a crucial motif (KITC) for aphid transmission.

About 15 years passed from the first report of the OYDV isolate carrying a short-type HC-Pro (OYDV-S). We wondered if the viral population in the Japanese garlic fields changed. In this study, we investigated garlic-infecting viruses in garlic samples from the various Japanese fields and analyzed the garlic-infecting potyviruses to understand how those viruses have survived in the Japanese garlic field.

1. Viral detection from Japanese garlic plants

We first investigated viral infection in several garlics produced in the various Japanese local regions.

Table 1. Detection of viruses in Japanese garlic samples (Kim *et al.*, 2020)

Region	Detected viruses		
	LYSV	OYDV	Allexivirus
<i>Hokkaido</i>			
Tokoro 1	+	-	-
Tokoro 2	+	-	+
Furano 1	+	-	-
Furano 2	+	-	+
Unknown	+	-	-
Hokkaido	+	+	-
Hurano	+	-	-
Kiyosato	+	-	-
Touyako	+	-	-
Nakasatsunai	+	+	-
Asahikawa	+	-	-
Obihiro	+	-	-
Makubetsu	+	+	-
Shinshinotsu	+	+	-
Hokudai1	+	+	-
Hokudai2	+	+	+
<i>Other regions in Japan</i>			
Aomori1	-	-	-
Aomori2	+	-	+
Miyagi	+	-	+
Fukuoka	+	+	+
Okinawa1	+	+	+
Okinawa2	+	+	+

For the viral detection, RT-PCR analysis was conducted using specific primers for LYSV, OYDV and allexiviruses. We found that almost all the garlic samples were infected with LYSV in Hokkaido and the other regions in Japan, whereas OYDV was always detected together with LYSV (Table 1). For allexiviruses, it was frequently detected in the main island but scarcely detected in Hokkaido. Then, we focused on OYDV isolated in Hokkaido because the OYDV strains seemed to be dependent on LYSV for their spread.

2. HC-Pros of the Hokkaido OYDV strains lacked ~ 100 amino acids in the N-terminal region

The potyvirus HC-Pro has multiple functions: viral polyprotein cleavage, suppression of RNA silencing, viral replication, long-distance/cell-to-cell movement and aphid transmission (Blanc *et al.*, 1998; Carrington *et al.*, 1989; Cronin *et al.*, 1995; Kasschau and Carrington, 2001; Pruss *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 1997). We focused on the HC-Pro gene because it is involved in insect transmission (Blanc *et al.*, 1998). For the sequencing analysis, RT-PCR was first conducted to amplify the full-length sequence of the HC-Pro genes isolated from the garlic samples of different origins. Interestingly, the RT-PCR products from the Hokkaido garlic samples were always ~ 300 bp shorter than those from the America and Spain samples (Figure 2).

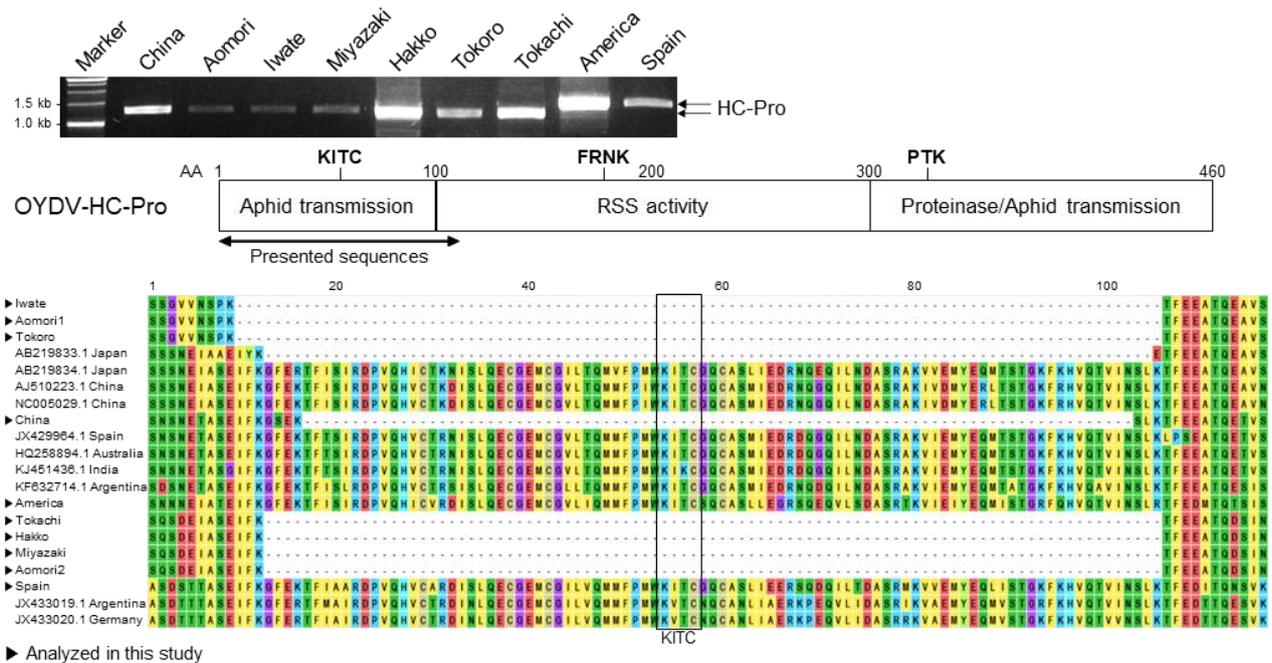


Figure 2. N-terminal deletion of the Hokkaido OYDV isolates. Arrowheads on the left side indicate the OYDV HC-Pro's analyzed in this study.

Sequencing analysis of the amplified PCR products showed that all the HC-Pro's from the Hokkaido OYDV isolates lacked ~ 100 amino acids in the N-terminal including KITC motif (Figure 2), suggesting that the OYDV strains carrying a short-type HC-Pro (Takaki *et al.*, 2006) became predominant in the Japanese garlic field.

3. HC-Pro's of Hokkaido OYDV strains do not have RSS activity

Because HC-Pro is one of the most studied viral RSSs, we investigated whether the ~ 100 amino acid deletion affects the OYDV HC-Pro's function in suppression of RNA silencing. As a result, all the OYDV HC-Pro's could not effectively suppress RNA silencing with the conventional agroinfiltration method in *N. benthamiana*. However, in onion, which is a natural host for OYDV, the long-type OYDV HC-Pro (America) showed distinct RSS activity (Figure 3). In contrast, all the short-type HC-Pro's from Hokkaido OYDV isolates (Tokoro, Hakko and Tokachi) had no RSS activity, suggesting that the region of N-terminal deletion is crucial for RSS activity. The HC-Pro's of two LYSV strains (LYSV-K and LYSV-O) had strong RSS activity in onion cells (Figure 3). Considering that OYDV was always associated with LYSV (Table 1), the Hokkaido OYDV strains may depend on LYSV for RSS activity.

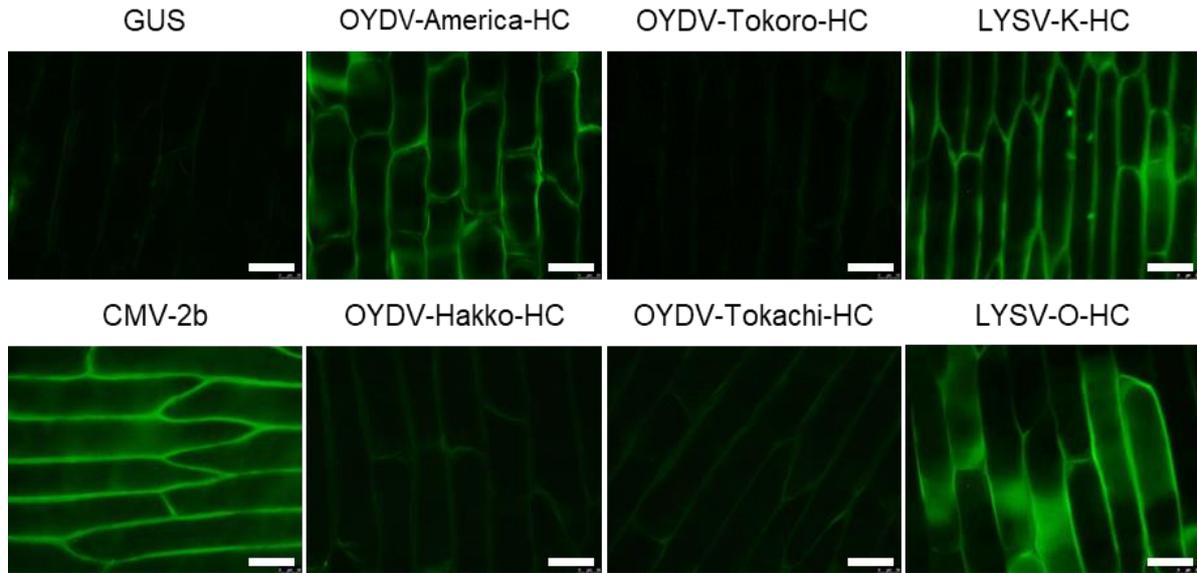


Figure 3. Assay for RSS activity in onion epidermis. GFP was co-expressed with HC-Pro by agroinfiltration. Scale bars: 50 μ m

4. Hokkaido OYDV strains may depend on LYSV for spread

We wondered how the Hokkaido OYDV-S strains spread in the field and could survive in spite of their lack of the KITC motif and aphid transmissibility. Because almost all the OYDV-S isolates in the Hokkaido fields were co-infected with LYSV, we hypothesized that the Hokkaido OYDV-S strains may be transmitted by aphids in aid of LYSV HC-Pro. To verify the hypothesis, we conducted aphid transmission using the OYDV-S strains with or without LYSV. The transmission of the viruses was determined by RT-PCR.

Table 2. Aphid transmission of LYSV, OYDV-S and OYDV-L (Jayasinghe *et al.*, 2021)

Exp.	Inoculum (Virus)	Inoculated plants ^a (Number)	No. of infected plants (%)				
			OYDV	LYSV	Allexivirus	GCLV	GLV
1	Garlic (OYDV-S + LYSV)	Garlic (18)	3 ^b (17%)	11 (61%)	–	–	–
2	Garlic (OYDV-S)	Garlic (16)	–	–	–	nt	nt
	Onion (OYDV-S)	Garlic (14)	–	–	nt	nt	nt
3	Garlic (OYDV-L)	Garlic (10)	3 (30%)	–	–	–	–
	Onion (OYDV-L)	Onion (6)	1 (17%)	–	nt	nt	nt
	Onion (OYDV-L)	Garlic (7)	2 (29%)	–	nt	nt	nt

OYDV-S, OYDV with short HC-Pro; OYDV-L, OYDV with long HC-Pro; –, not detected; nt, not tested

^aPlants were virus-free

^bPlants were mixed-infected by LYSV and OYDV-S

As a result, the OYDV-S alone could not be transmitted by aphids (*Myzus persicae*), whereas, when

[OYDV-S + LYSV]-infected garlic plants were used as an inoculum, both viruses were transmitted together (3 out of 18 garlic plants) (Table 2). When garlic or onion plants infected with the OYDV carrying a long-type HC-Pro (OYDV-L) was used as an inoculum, the OYDV-L could be transmitted by aphids. Taken together, these results indicate that the OYDV-S strains cannot be transmitted by aphids, but the presence of LYSV may compensate for an OYDV disability of aphid transmission.

Finally, we tested the direct interaction between LYSV HC-Pro and OYDV CP. To verify the *in vitro* interaction, LYSV HC-Pro and OYDV CP proteins were fused to the maltose-binding protein (MBP) and synthesized in *E. coli*. The fusion proteins were used for co-immunoprecipitation (Co-IP). As a result, LYSV HC-Pro was co-precipitated with OYDV CP indicating that both proteins could interact *in vitro* (Figure 4). The interaction between LYSV HC-Pro and OYDV CP was also confirmed *in planta* (Jayasinghe *et al.*, 2021). All these data indicate that LYSV may interact with OYDV CP and function as a ‘bridge’ between the viral particle and aphid stylet.

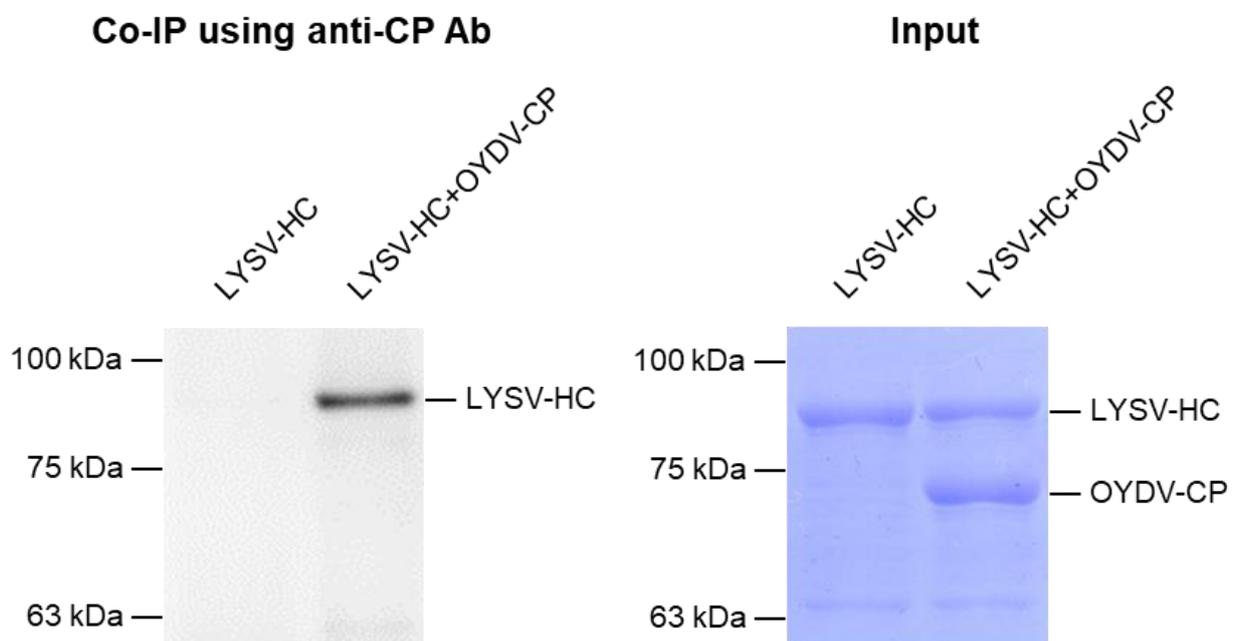


Figure 4. Interaction between LYSV HC-Pro and OYDV CP. The interaction between *in vitro*-synthesized MBP-LYSV-HC-Pro-FLAG and MBP-OYDV CP was examined by Co-IP. Both proteins were co-incubated and precipitated using anti-OYDV CP antibodies. The LYSV HC-Pro-FLAG in the precipitant was detected by western blot analysis using anti-FLAG antibody.

Conclusion

Over the centuries, virus-infected garlics in the field have been cultivated and selected by garlic growers. In Japan, various attempts have been made to generate virus-free garlic, and farmers have aggressively eliminated the symptomatic plants in the garlic fields. Because the virus-infected plants

with severe symptoms are easily detected and eliminated by the growers, the selection by human may have acted as a selective force for the viruses. Therefore, the Japanese OYDV-S strains have some advantages of inducing mild symptoms concealing their infections.

On the other hand, in the co-infection with LYSV, the OYDV-S strains could be still transmitted by aphids. The *in trans* interaction between LYSV HC-Pro and OYDV capsid would make aphid transmission of both viruses possible. Therefore, the Japanese environment of garlic cultivation may have generated the OYDV-S strains, which have some advantages under the human-made selection pressure, and those strains may be transmitted by aphids using LYSV for their spread and survival.

References

- Arya, M., Baranwal, V. K., Ahlawat, Y. S. and Singh, L. (2006) RT-PCR detection and molecular characterization of *Onion yellow dwarf virus* associated with garlic and onion. *Curr. Sci.* 91:1230-1234.
- Ayabe, M. and Sumi, S. (1998) Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 17:773-779.
- Blanc, S., Ammar, E. D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V. V., Llave, C., Baker, J. and Pirone, T. P. (1998) Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.* 79:3119-3122.
- Carrington, J. C., Freed, D. D., and Sanders, T. C. (1989) Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and *in vitro*. *J. Virol.* 63:4459-4463.
- Conci, V. C., Canavelli, A., Lunello, P., Di Rienzo, J., Nome, S. F., Zumelzu, G. and Italia, R. (2003) Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. *Plant Dis.* 87:1411-1415.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C. and Carrington, J. C. (1995) Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7:549-559.
- Dovas, C. I., Hatziloukas, E., Salomon, R., Barg, E., Shibolet, Y. and Katis, N. I. (2001) Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. *Eur. J. Plant Pathol.* 107:677-684.
- Drake, C. J., Tate, H. D. and Harris, H. M. (1933) The relationship of aphids to the transmission of yellow dwarf of onions. *J. Econ. Entomol.* 26:841-846.
- El-Wahab, A. S. A. (2009) Aphid-transmission efficiency of two main viruses on garlic in Egypt, *Onion yellow dwarf virus* (OYDV-G) and *Leek yellow stripe virus* (LYSV-G). *Academic J. Entomol.* 2:40-42.
- Fayad-André, M. D. S., Dusi, A. N. and Resende, R. O. (2011) Spread of viruses in garlic fields cultivated under different agricultural production systems in Brazil. *Trop. Plant Pathol.* 36:341-349.
- Jayasinghe, W. H., Kim, H., Sasaki, J. and Masuta, C. (2021) Aphid transmissibility of onion yellow dwarf virus isolates with an N-terminal truncated HC-Pro is aided by leek yellow stripe virus. *J. Gen. Plant Pathol.* 87:178-183.
- Kasschau, K. D. and Carrington, J. C. (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* 285:71-81.
- Kim, H., Aoki, N., Takahashi, H., Yoshida, N., Shimura, H. and Masuta, C. (2020) Reduced RNA silencing suppressor activity of onion yellow dwarf virus HC-Pro with N-terminal deletion may be complemented in mixed infection with another potyvirus in garlic. *J. Gen. Plant Pathol.* 86:1-10.

- Lunello, P., Ducasse, D. A., Helguera, M., Nome, S. F. and Conci, V. C. (2002) An Argentinean isolate of *Leek yellow stripe virus* from leek can be transmitted to garlic. *J. Plant Pathol.* 84:11-17.
- Mohammed, H. S., Zicca, S., Manglli, A., Mohamed, M. E., El Siddig, M. A. R., El Hussein, A. A. and Tomassoli, L. (2013) Occurrence and phylogenetic analysis of potyviruses, carlaviruses and allexiviruses in garlic in Sudan. *J. Phytopathol.* 161:642-650.
- Pruss, G. J., Lawrence, C. B., Bass, T., Li, Q. Q., Bowman, L. H. and Vance, V. (2004) The potyviral suppressor of RNA silencing confers enhanced resistance to multiple pathogens. *Virology* 320:107-120.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. and Lucas, W. J. (1997) Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237:283-295.
- Takaki, F., Sano, T., Yamashita, K., Fujita, T., Ueda, K. and Kato, T. (2005) Complete nucleotide sequences of attenuated and severe isolates of *Leek yellow stripe virus* from garlic in northern Japan: Identification of three distinct virus types in garlic and leek world-wide. *Arch. Virol.* 150:1135-1149.
- Takaki, F., Sano, T. and Yamashita, K. (2006) The complete nucleotide sequence of attenuated onion yellow dwarf virus: a natural potyvirus deletion mutant lacking the N-terminal 92 amino acids of HC-Pro. *Arch. Virol.* 151:1439-1445.

植物感染生理談話会論文集 (第 55 号)

原稿受理 令和 3 年 8 月 25 日

PDF 作成 令和 3 年 8 月 25 日

発 行 令和 3 年 9 月 1 日

発行者 日本植物病理学会
会長 土佐 幸雄
〒170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11 日本植物防疫協会ビル内
TEL: 03-3943-6021

編集者 令和 3 年度植物感染生理談話会事務局
竹下 稔・菅野善明・草場基章
〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1
宮崎大学農学部

PDF 作成 宮崎大学農学部植物生産環境科学科植物病理学研究室
〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

無断複写・転載を禁ず

ISSN 1345-8086 No. 55

Printed in Japan

