

主論文の要約

ナス科植物の病害抵抗性における分泌型ペプチドの機能に関する研究

生命農学研究科 植物生産科学専攻

植物病理学研究室

今野 沙弥香

病原性卵菌のジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) は、ジャガイモの最重要病害であり、世界中で深刻な被害をもたらしている。現在まで、ジャガイモ疫病菌抵抗性のジャガイモ品種の育種は、ジャガイモ疫病菌が持つ病原性因子の認識に関わる抵抗性遺伝子 (*R* 遺伝子) の導入が主流である。しかし *R* 遺伝子を用いた抵抗性は、新たな疫病菌系統の出現により短期間で打破されるという欠点がある。持続的なジャガイモ疫病菌防除法を開発するためには、ジャガイモ疫病菌に対する植物の抵抗性機構を明らかにすることが必要不可欠である。

本研究室では、ジャガイモ疫病菌に対して非宿主抵抗性を示すベンサミアナ (*Nicotiana benthamiana*) を用いてジャガイモ疫病菌抵抗性に関与する遺伝子の単離を行ってきた。ベンサミアナ約 3000 株の遺伝子をランダムに発現抑制し、ジャガイモ疫病菌に対する抵抗性の調査を行い、疫病菌抵抗性が低下した 82 株から 33 遺伝子を単離している。単離された遺伝子の中には、低分子の抗菌性物質ファイトアレキシンの生合成に関わる遺伝子やエチレン生成に関与する遺伝子が多数含まれており、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はファイトアレキシンが中心的な役割を担っていることが示されている。またこれまでの研究から、ベンサミアナのエチレン応答性の転写制御因子がファイトアレキシン生合成遺伝子の発現を直接制御することが明らかとなっている。抵抗性関連遺伝子のスクリーニングで抵抗性が低下した 82 株のうち 12 株から機能未知の *NbSAR8.2m* が抵抗性に必須な遺伝子として単離された。*NbSAR8.2m* はジャガイモ疫病菌抵抗性に大きく寄与していると推定されるが、その植物-病原菌相互作用における機能はわかっていない。

本学位論文では、ベンサミアナのジャガイモ疫病菌抵抗性機構を明らかにし、その抵抗性機構をジャガイモに応用することを目的として解析を行った。

まずベンサミアナのジャガイモ疫病菌抵抗性に関与する遺伝子を網羅的に調査するため、ジャガイモ疫病菌由来の分泌性エリシタータンパク質である INF1 を処理したべ

ンサミアナの遺伝子発現プロファイルを調査した。その結果、ベンサミアナの主なファイトアレキシンであるカプシジオールの前駆体合成に関与するメバロン酸経路の酵素遺伝子やカプシジオール生合成関連遺伝子群に加え、エチレン生合成遺伝子が顕著に発現増加していることを示した。また、エチレン情報伝達に関与する APETALA2/Ethylene-responsive element binding factor (AP2/ERF) 型転写因子の発現パターンの解析から、ジャガイモ疫病菌抵抗性に関与している ERF を見出した。これらの結果から、ベンサミアナの病害抵抗性応答において、エチレン生合成と情報伝達系の活性化が重要な役割を担っていることが示された。

次に、ベンサミアナのジャガイモ疫病菌抵抗性に必須な分泌タンパク質 SAR8.2m をコードする遺伝子の機能解析を行った。プロモーター SAR8.2m-GFP を用いた *NbSAR8.2m* の発現誘導解析から、*NbSAR8.2m* の発現がベンサミアナに感染できないジャガイモ疫病菌（非親和性菌）と感染できる *P. nicotianae*（親和性菌）によって誘導されることが明らかとなった。*NbSAR8.2m* プロモーターがサリチル酸によって活性化されたことから、病害応答時には、菌の種類に関わらず、非特異的に *NbSAR8.2m* が誘導されている可能性がある。プロモーター SAR8.2m-GUS を用いた *NbSAR8.2m* の発現誘導解析では、*NbSAR8.2m* が葉脈、孔辺細胞、根で誘導されることが示唆された。よって、病原菌と遭遇する組織で、*NbSAR8.2m* の発現誘導が活発である可能性ある。*NbSAR8.2m* 相同遺伝子のうち、*NbSAR8.2a* の発現は病害抵抗性応答時に認められず、病害抵抗性に関与していないと考えられた。一方で、SAR8.2b もしくは SAR8.2d は、ジャガイモ疫病菌に対する抵抗性には関与しない一方でショウガ疫病菌に対する抵抗性に必要であることが明らかとなった。

ジャガイモ疫病菌感染時のベンサミアナの野生株と *sar8.2m* 破壊株の遺伝子発現を RNAseq によって比較した。*sar8.2m* 破壊株では、ジャガイモ疫病菌のエフェクター遺伝子の発現増加が顕著であった。感染後期には、ベンサミアナのファイトアレキシン生合成関連遺伝子の発現が低下しており、カプシジオールの蓄積量が低下していた。よって、*sar8.2m* 破壊株では、ジャガイモ疫病菌がエフェクター分泌を活発に行った結果、ファイトアレキシン生成が抑制されていることが示唆された。

NbSAR8.2m の成熟型構造を明らかにするため、*NbSAR8.2m* を発現するシロイヌナズナを作出し、植物体の水中培養液からの *NbSAR8.2m* の検出を試みた。その結果、*NbSAR8.2m* の C 末近傍の 8 アミノ酸のペプチドが検出された。検出された 8 アミノ酸のペプチドの抗菌活性を調査したところ、ジャガイモ疫病菌と病原性糸状菌に処理した時に、菌の生育を阻害した。

これまでの結果を総括すると、以下の仮説が考えられた。*Phytophthora* 属菌の感染を認識したベンサミアナは、素早く *NbSAR8.2m* の発現を誘導する。*NbSAR8.2m* はプロテアーゼの働きにより 8 アミノ酸の成熟型ペプチドとなり、細胞外に分泌される。その後 *NbSAR8.2m* ペプチドは細胞間隙で *Phytophthora* 属菌に作用し、菌の伸長や吸器形成を阻害する。疫病菌はエフェクターを分泌することが出来ず、ベンサミアナで感染を成立させることが出来ない。

本研究では、*NbSAR8.2m* の成熟型構造を初めて示した。またベンサミアナの非宿主抵抗性は、エチレンによって制御されるファイトアレキシンとサリチル酸制御下の分泌型ペプチド *NbSAR8.2m* が担っている可能性を示した。今後は、*NbSAR8.2m* を疫病菌に罹病性のジャガイモに導入することで、ジャガイモの疫病菌抵抗性を向上することが可能であるか検証したい。