

トマト斑葉細菌病菌の病原力制御機構の解析

2018 年 1 月

石賀 貴子

トマト斑葉細菌病菌の病原力制御機構の解析

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（農学）学位論文

石賀 貴子

(第1章) 世界人口は70億人を突破し、40年後には90億人に達すると予想され、現在の1.5倍以上の食料が必要になると試算されている。今後、安定的な食料生産を行うには、病害による損失を抑えるため、植物-植物病原菌の相互作用の解明が不可欠である。そこで、本研究では、トマト斑葉細菌病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000; *Pst* DC3000) の病原力制御機構に着目し、植物病原細菌の感染機構を植物側と病原菌側の両方から解明することを目指した。研究内容として、

(第2章) 高再現性の植物-病原細菌相互作用把握法の開発、(第3章) 植物-病原菌相互作用の植物側の解析、さらに(第4章) 植物-病原菌相互作用の病原菌側の解析を行った。

(第2章) シロイヌナズナと *Pst* DC3000 の相互作用は、植物病原細菌の病原性機構および植物の自然免疫機構を理解するために最も広く使用されている。このモデル系において植物病原細菌相互作用を研究するために、従来様々な接種方法が用いられてきた。しかしながら、自然感染と類似し病原細菌の増殖と局在を経時的に観測可能にすることや、シロイヌナズナ変異体を用いたハイスループットスクリーニングに適した接種法は存在しなかった。本研究では、MS培地上で生育させたシロイヌナズナ植物体を用い、迅速で信頼性の高いフラッド接種法を開発した。この方法は、従来の土壌栽培した植物接種法と比較して、最小限の空間および時間で遂行可能であり、効率的かつ経済的な方法である。本研究では、Ⅲ型分泌系および植物毒素コロナチン (Coronatine; COR) を含む *Pst* DC3000 の病原力因子とエフェクター誘発性免疫、サリチル酸および病原菌関連分子パターン (Pathogen associated molecular pattern; PAMP) 経路を欠損したシロイヌナズナ変異体を用い有効性を実証した。さらに、非宿主病原細菌を用いたシロイヌナズナにおける非宿主抵抗性応答の解析にこの方法を適用し、非宿主抵抗性応答における FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) の役割を確認した。さらに蛍光タンパク質遺伝子の導入により、*Pst* DC3000 の増殖と局在の経時的な観察が可能となった。今後の展望として、フラッド接種法は、シロイヌナズナおよび病原細菌変異株のハイスループットスクリーニングに応用することが期待される。

(第3章) *Pseudomonas syringae* のいくつかの病原型によって生産される非宿主特異的植物毒素コロナチン (COR) は、ジャスモン酸-イソロイシン (JA-Ile) の類似物質として植物免疫を抑制し、葉緑体で活性酸素種の生成を誘導することによって病徴の発現に寄与する。F-box タンパク質 CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) は、COR および JA-Ile の受容体であることが示されている。JASMONATE ZIM DOMAIN

(JAZ) タンパク質は、シロイヌナズナにおける JA シグナル伝達経路の負の転写抑制因子として作用する。しかし、*P. syringae* 病徴発現および非宿主病原菌による過敏反応 (Hypersensitive response; HR) 細胞死における JAZ タンパク質の役割は完全には理解されていない。本研究では、トマト (*Solanum lycopersicum*) 植物から JAZ 遺伝子群 *SlJAZ1*~*12* を同定し、COR 処理、および病原菌接種による JAZ 遺伝子の発現プロファイルを検証した。ほとんどの JAZ 遺伝子は、COR 処理または *Pst* DC3000 接種によって誘導されたが、COR 欠損変異株 DB29 では誘導されなかった。また、トマト COI1 (*SlCOI1*) との相互作用を解析したところ、*SlJAZ2*、*SlJAZ6* および *SlJAZ7* は、*SlCOI1* と COR 依存的に相互作用した。さらに、ウイルス誘導性遺

伝子サイレンシングを用いて、*SLJAZ2*、*SLJAZ6* および *SLJAZ7* が、COR 誘導性クロロシスに影響を与えないが、*Pst* DC3000 に対する病徴関連細胞死には影響することを実証した。加えて、*SLJAZ2* および *SLJAZ6* は、非宿主病原菌または PAMP による HR 細胞死に関与することを示した。これらの結果は、トマト JAZ タンパク質が、宿主および非宿主相互作用における細胞死の進行を調節することを示唆している。

(第4章) *Pst* DC3000は、植物病原菌相互作用を調べるためのモデル病原菌として使用されている。*Pst* DC3000の病原性におけるⅢ型分泌系の研究が広く行われているが、*Pst* DC3000のゲノムに存在する多数の潜在的病原力因子の機能および作用様式は完全には理解されていない。*P. syringae*は、細胞外多糖の構成要素としてアルギン酸を産生することが知られている。*AlgU*は、アルギン酸の生合成に関連する遺伝子、*algD*の発現を調節するが、*Pst* DC3000の病原性における*algU*の機能は不明である。植物と病原細菌の相互作用における*AlgU*およびアルギン酸の機能を解析するために、 $\Delta algU$ および $\Delta algD$ 変異株を作製した。トマトとシロイヌナズナにおける接種実験を行なった結果、 $\Delta algU$ 接種区のみ、*Pst* DC3000野生株と比較して、明らかな病徴及び細菌増殖の低下が認められた。*Pst* DC3000の遺伝子発現解析から、*AlgU*がⅢ型分泌系およびCORに関連する遺伝子の発現を調節することを明らかにした。また、 $\Delta algU$ 変異株およびCOR変異株が、PAMPの認識を欠損したシロイヌナズナ*fls2 efr1*二重変異体において完全な病原力を回復した。これらの結果は、*AlgU*がCOR産生を調節することによって*Pst* DC3000の病原力において重要な役割を有することを示唆している。