学会賞受賞者講演

エンバク冠さび病特異的抵抗性発現に関わるファイトアレキシンの 細胞・生理・遺伝学的研究*

眞 山 滋 志**

Shigeyuki MAYAMA** : Cytological, Physiological and Genetical Studies on Phytoalexin Accumulation Associated with Specific Resistance Expression in the Crown Rust of Oats

栽培植物では、基本的親和性関係にある病原菌の感染防除を目的として、突然変異体の利用や新しい遺伝資源を用いた交配育種により抵抗性品種が絶えず作出されている。しかし、病原菌にも突然変異により異なるレースが出現して、新たに導入された抵抗性品種に寄生できるものが現れる。その結果、植物品種と病原菌レースの相互関係には品種特異的抵抗性現象が現れる。作物の病害防除戦略にはこの品種特異的抵抗性現象の実体の解明が重要である。今日まで多くの植物感染生理・生化学的研究が行われ、病原性発現物質や抵抗性発現物質、それらの生合成経路や生合成の始動に介在する認識物質が明らかにされて来た。最近ではこれらの基礎研究に立脚して、分子生物学的技術による病原性および抵抗性発現遺伝子のクローニングとそれらの発現を制御する認識・情報伝達機構の解明が進行中である。なぜ、特定の病原菌レースに対して抵抗性発現の可否が生ずるのか、この非常に明確な特異的抵抗性発現にあずかる抵抗性遺伝子発現の分子機構の解明は植物疾病の論理的防除法の創出のために是非必要であり、今なお植物病理学の最も重要な研究課題の一つである。

特異的抵抗性発現には、過敏感反応の過程で様々な生体防御反応が誘導され、特に化学的抵抗性因子として抗菌性の生理活性物質・ファイトアレキシンが感染後に新たに生成誘導される。ファイトアレキシンは非宿主抵抗性あるいは特異的抵抗性の区別無く、植物細胞の抵抗性発現に伴って生産される抗菌性の二次代謝物質であり、侵入時の感染傷害が新たな刺激となって感染部位に大量に生成蓄積する。本稿では、絶対的寄生病であるエンバク冠さび病の品種特異的抵抗性発現におけるファイトアレキシン・アベナルミンの役割について著者らの得た若干の知見について概説したい。

1. 品種特異的抵抗性とファイトアレキシン生産

エンバク冠さび病は絶対的寄生病であり顕著な品種特異的抵抗性を示す。エンバク冠さび病菌 (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*) とエンバク品種間の親和性組み合わせでは、冠さび菌夏胞子はエンバク葉上で発芽して、接種後 10 時間以降に気孔上に付着器を形成後、気孔から侵入する。気孔下のうから伸長した感染菌糸が細胞間隙に蔓延後、最終的に葉肉細胞に侵入し吸器を形成して、接種後 36~48 時間で感染を成立させる。一方、非親和性組み合わせでは菌糸が葉肉細胞に侵入する接種後約 20 時間前後から過敏感反応が起こり、侵入を受けた細胞とその周縁細胞に感染による傷害ストレスを与える。エンバクのファイトアレキシン・アベナルミンはこの過敏感反応の時期に呼応して生成蓄積を始め、死細胞とその周縁細胞に多量に蓄積する。しかし、親和性組み合わせの場合には、感染初期に過敏感反応は起こらずアベナルミンも蓄積しない。

1) ファイトアレキシンの蓄積と抵抗性発現時期：ファイトアレキシン生産の抵抗性における役割を評価するために検討すべき第一点は、抵抗性発現の時期および強さとその生産が相関しているか否かである。エンバク PC 系統 21 品種に対する冠さび菌レース 203 および 226 の 42 通りの組み合わせで、感染菌糸の生長停止時期による抵抗性の強さとアベナルミン生産との関係を調べたところ、アベナルミンの蓄積時期は過敏感反応と呼応して感染菌糸生長の停止時期と一致する。一般に、抵抗性の強い組み合わせほど、アベナルミン蓄積はより早くかつ量的にも多いことが判明した。中間型のものではアベナルミンの蓄積時期はおくれ、蓄積量も少なく、罹病性ではアベナルミンはほとんど蓄積しない。両レース 226 と 203 に対して全く逆の反応を示す品種では、非親和性組み合わせの抵抗性発現時にのみアベナルミンが蓄積する。

* 平成 9 年 4 月 2 日 平成 9 年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨

** 神戸大学農学部 Faculty of Agriculture, Kobe University, Kobe 657, Japan

2) ファイトアレキシンの局在性：ファイトアレキシンの抵抗性発現に対する役割について評価すべきことは感染部位での蓄積量である。ファイトアレキシンの病原体の侵入部の表皮細胞や組織に速やかに、かつ抗菌力の発現に十分な濃度に蓄積するか調べる必要がある。

エンバクの初生葉に非親和性の冠さび菌を部分的に接種すると、アベナルミンは全身的に蓄積せず、接種部組織にのみ蓄積する。さらに、冠さび菌は気孔からのみ侵入するのでタルク粉と混合した冠さび菌夏胞子の濃度を変えて噴霧接種し、接種部位でのアベナルミンの蓄積量は気孔感染率と正の相関を示すことを確認し、レース 226 感染勝冠 1 号葉 1 g 当たりのアベナルミン (μg) 量 (Y) と気孔感染率 (X) との間に $Y=23 X$ の相関があることを認めた。このことは、アベナルミンが感染した気孔部細胞に局在して蓄積することを示すものであり、接種 36 時間後の実際の蓄積量と気孔感染率から換算すると、一つの気孔感染部に約 $1800 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上の強い抗菌性を示す濃度で存在することが明らかにされた。さらに、ファイトアレキシンの局在性については、本研究の以前には生化学的分析により調べられていたが、我々はアベナルミンの、紫外線吸収や蛍光のスペクトル特性を利用して、顕微分光測光法を用いてアベナルミンが過敏感壊死細胞とその隣接細胞に集中して蓄積していることを初めて可視的に証明した。

3) ファイトアレキシン生産の制御と抵抗反応：エンバク感染葉のアベナルミン蓄積量をフェニルアラニンアンモニリアーゼ活性の阻害剤である α アミノオキシ酢酸や温度変換処理によって阻害し、人為的にファイトアレキシン生産を減少させるとさび菌感染に対する抵抗性が減少する。また、過敏感壊死細胞が形成される接種 36 時間後に 20°C から 25°C に移行すると、それまでに蓄積したファイトアレキシンが減少し、感染菌糸の生育が再び始まることから直接的な抗菌性因子としてファイトアレキシンの蓄積が作用していることが示された。

2. ファイトアレキシン生産と抵抗性発現の遺伝解析

ファイトアレキシンに関する研究は多い。しかし、ファイトアレキシン生産と抵抗性遺伝子発現について雑種後代における詳細な遺伝解析を行ったものは少ない。筆者らは品種間の交配を行いエンバクのファイトアレキシン生産と冠さび病抵抗性遺伝子との関係について遺伝解析を行い両表現形質が強く連鎖することを明らかにした。エンバクのファイトアレキシンであるアベナルミン生産の分離を冠さび菌レース 226 に対する強抵抗性品種 (勝冠 1 号) と罹病性品種 (Pc-38) の F1 および F2 世代で調べたところ、各品種間 F1 では最終的病徴は抵抗性であったが、アベナルミン生産は中間型を示し、感染菌糸もやや伸長した。F2 集団の個々の植物個体におけるレース 226 の感染菌糸長および最終的な感染型とアベナルミン蓄積量を 194 個体別々に

詳細な比較を行った。その結果、抵抗性個体ではアベナルミンが生産され、罹病性個体ではその蓄積は認められなかった。孢子形成の有無などの最終病徴から抵抗性 139 個体、罹病性 55 個体の 3:1 に分離し、抵抗性個体の内、親型に近い強抵抗型 55 個体と中間型 84 個体に分離し、理論比 (1:2:1) に有意に適合する分離を確認した。この分離の結果は感染初期における感染菌糸生長の程度とアベナルミン量による判定とほぼ完全に一致した。中間型個体の感染菌糸長には変異幅があるがアベナルミン蓄積量との逆相関傾向がみられ、罹病性個体ではファイトアレキシンの蓄積は認められなかった。勝冠 1 号のレース 226 に対する抵抗性には、不完全優性の単一の主働遺伝子が関与し、アベナルミン蓄積と強く連鎖していることが示唆された。以上から、冠さび病菌とエンバク品種間の品種特異的抵抗性発現にはアベナルミン生産が遺伝形質として密接に関与することが明らかにされた。

3. アベナルミン生成を始動する認識物質

特異的抵抗性発現に関与するエリシター活性物質の実体を明らかにすべく多くの研究が続けられている。エンバクにおいてアベナルミンに対するエリシター活性を持つ各種オリゴ糖について調べたところ、ダイズなどにエリシター活性を示すグルカンなどセロオリゴ糖には全く活性が認められないが、冠さび病菌など多くの糸状菌の壁成分であるキチンおよびキトサンのオリゴ糖 (5~7 量体) に強い活性が認められた。冠さび病菌を親和性品種上で旺盛に生育させた感染葉の磨砕物をキチナーゼ処理し、冠さび病菌の細胞壁より遊離する画分のエリシター活性を調べたところ、キチンオリゴマー 4, 5, 6 量体の画分に強い活性を認めている。エンバク冠さび病の非親和性反応に伴って PR タンパクであるキチナーゼの活性が増加することから、遊離キチンオリゴマーがエンバクのストレッサーとなることが考えられる。今後、エリシターおよびそれらのレセプターの化学実体を是非明らかにしなければならない。

4. アベナルミンの特異的エリシターと Pc-2 遺伝子

エンバク冠さび病菌に対する抵抗性を支配し、かつ、ビクトリア葉枯れ病菌 (*Helminthosporium victoriae*) と同菌の分泌する宿主特異的毒素ピクトリンに対する感受性も支配する多面発現遺伝子といわれる冠さび病抵抗性遺伝子 Pc-2 について同様の遺伝解析を行ったところ、Pc-2 遺伝子発現に伴うピクトリン感受性、さび病抵抗性およびアベナルミン産生は相互に高い相関性を示した。ピクトリンの希釈液 ($0.01\sim 1000 \text{ ng/ml}$) に対する感受性の違いから Pc-2 遺伝子のホモ、ヘテロおよび劣性ホモ型を識別することが可能である。Pc-2 遺伝子保有品種では 1 ng/ml でクロロシスが起りアベナルミンも生成するがピクトリン非感受性品種では 1000 ng/ml でも異常はなくアベナルミンも蓄積しない。レース 226 の接種に対してホモおよびヘテ

ロ型はすべて抵抗性であり理論比に適合する分離を認め、アベナルミン蓄積が冠さび病抵抗性遺伝子 *Pc-2* 発現と強く連鎖することから、共優性 1 遺伝子支配と考えられた。他の菌体壁成分と異なりピクトリンが *Pc-2* 遺伝子保有品種にのみ特異的にエリシター活性を示すことが判明した。ピクトリン感受性および抵抗性品種間の F1 と F2 個体におけるエリシター・ピクトリンに対する感受性とアベナルミン産生を調べたところ、F1 (ヘテロ) のエリシター感受性は親型 (ホモ) に比べて約 5~10 倍低く定量的に区別でき、ピクトリンのアベナルミン誘導能に *Pc-2* 遺伝子の遺伝子量効果 (gene-dose effect) が認められた。また、F2 個体で判別されたホモ型、ヘテロ型においても顕著な遺伝子量効果がみられ、両遺伝子型における等量のアベナルミン誘導にはエリシター量に約 10 倍の差が認められた。このことはピクトリンが特異的なエリシターとして作用するとともに *Pc-2* 遺伝子発現を始動するピクトリンのレセプターに遺伝子量効果が反映することを示唆するものである。以上のことは、ピクトリンが冠さび病抵抗性遺伝子 *Pc-2* を始動する非病原性遺伝子の表現物質として、そのレセプター分子は同抵抗性遺伝子の産物としての機能を持つことを示すものである。したがって、さび菌レースとエンバク品種間の特異的な抵抗性の相互認識においてもピクトリンとそのレセプターのように相互認識に関わる物質の介在が示唆され、育種によって明らかにされてきたエンバクの品種特異的な抵抗性遺伝子はさび菌レースとの相補的な相互認識遺伝子であることが容易に理解できる。化学構造の明らかなエリシター・ピクトリンによる *Pc-2* 遺伝子の発現系は品種特異的な抵抗性の分子機構解明の格好のモデル系である。

5. アベナルミン生成誘導と情報伝達物質

ジャガイモ疫病の系などにおいて、活性酸素や過酸化水素などの生産が、植物の防御応答のシグナル伝達に重要な役割を演ずることが指摘されているが、エンバクにおけるアベナルミン誘導の場合においても、エリシターの認識直後に発生する活性酸素が生体内ストレスとして作用している。特異的なエリシター・ピクトリンが光呼吸反応の重要酵素であるミトコンドリア内のグリシン脱炭酸酵素に結合、活性阻害することが判明しており、また、ピクトリンによるアベナルミン誘導は光照射下で起こり、暗黒下では起こらない。このことからピクトリンによりミトコンドリア、葉緑体、パーオキシゾームを介する光呼吸反応を阻害すると、葉緑体中の反応から活性酸素が放出されることが想定され、事実、エリシター・ピクトリン処理葉を、フリーラジカルの非特異的なスカベンジャーで処理すると、アベナルミンの生産が顕著に抑制された。このことは、エンバク *Pc-2* 遺伝子保有品種におけるピクトリンの特異的なエリシター説を裏付ける機構としてピクトリンによる光呼吸反応

の阻害による活性酸素放出がアベナルミンの生成誘導反応に介在することを示している。また、最近、非親和性レース冠さび菌感染葉における過敏感反応細胞とその周縁細胞の細胞壁において、壁結合性のフェルラ酸が酸化のカップリングしてジフェルラ酸を形成することを明らかにした。このジフェルラ酸形成による細胞壁多糖の架橋が非親和性感染部位細胞壁の壁分解酵素に対する耐性化の原因と考えられる。したがって、このジフェルラ酸形成がパーオキシダーゼと過酸化水素により触媒されることから、エンバク冠さび病の品種特異的な抵抗性発現においても活性酸素-過酸化水素の生産が感染応答反応に介在することを具体的に示す例証である。

6. おわりに

過去に行われたファイトアレキシンに関する多くの研究は植物疾病における抵抗性発現の役割を担う抗菌性物質を明らかにしたばかりでなく、抵抗性遺伝子発現の分子マーカーを明らかにしたことにより、植物のシグナル応答科学の発展に少なからず貢献をしている。ファイトアレキシンの単離と化学構造の解析は、生合成経路の推定を可能にし、その微量定量法の確立は細胞レベルの研究を可能にした。植物の感染応答シグナルの認識と情報伝達機構の解明を目的とした多くの研究は、ファイトアレキシン生成を抵抗性発現のマーカーとして組織や培養細胞レベルで解析されている。また、遺伝子工学技術の発達により、ファイトアレキシン生成酵素遺伝子のクローニングが行われ、これらの遺伝子を導入した形質転換体における抵抗性発現も確認され、ファイトアレキシンの抵抗性における役割は遺伝子工学的にも証明されている。

植物疾病における特異性決定機構の解明は抵抗性の遺伝解析やファイトアレキシンなどの表現型の解明から遺伝子 DNA の実体解明と病原菌のシグナルとその認識・情報伝達機構の解明へと進んでいる。

今後、多くの植物疾病において、非病原性遺伝子と抵抗性遺伝子がクローニングされ、その産物間の相補的な認識と抵抗性発現の遺伝子レベルでの制御機構の解明がなされるであろう。これらの実体解明に基づく病害発生のような制御法の創出がなされるものと期待したい。

本研究の端緒を与えていただいた香川大学名誉教授谷利一先生に深甚なる感謝の意を表します。本研究は神戸大学農学部植物病理学教室、香川大学農学部植物病理学教室、大阪府立大学農学部遺伝育種学教室、京都大学農学部農業研究施設、長崎大学薬学部有機合成教室の先生方との共同研究で進めたものであり、本研究にご協力いただいたこれらの方々へ深く感謝致します。また、本研究の遂行に共に取り組まれた神戸大学および香川大学の卒業生に感謝の意を表します。