

大学研究室紹介

リレ一随筆

キャンパスだより(7)

高知大学農学部
植物工学研究室ひきちやすふみ
曳地康史

所在地：高知県南国市物部乙200

Message from Laboratory of Plant Pathology & Biotechnology,
Kochi University. By Yasufumi HIKUCHI
(キーワード：環食同源, 植物病理学)

高知龍馬空港に隣接する高知大学物部キャンパス

はじめに

植物工学研究室は、植物に関する分子生物学の著しい進展に対応すべく、1992年の農学部改組により生物資源科学科に新設された研究室です。植物病理学を教育・研究の柱とし、高知大学の基幹研究プロジェクト「環食同源研究プロジェクト」に属し、現在、博士研究員1名、博士課程3名、修士課程4名、学部学生6名、および助教授の木場章範先生と筆者が現在の構成メンバーです。

高知県は日本有数の農業県です。とくに、トマト、シシトウガラシ、ピーマン、ナスなどの施設園芸栽培と、ショウガやミョウガなどの栽培やイネの早期栽培に特徴があります。さらに、高知大学は高知龍馬空港に隣接しており、地の利を活かし、我々は、「高知発世界行き」の植物病理学の情報発信基地を目指すとともに、「地域に育てられた」「地域にとともに歩む」「地域に貢献する」教育・研究を志向しております。

研究対象の作物として、高知県の農業に準拠したトマト、シシトウガラシ、ピーマン、ナス、イネおよびレタスを中心に扱っております。そして、これらの作物が、「なぜ、病気になるのか」「どうしたら、病気に強い作物を作れるのか」をテーマとし、ナス科作物に甚大な被害をもたらす青枯病とトバモウイルス病、西南暖地の稲作に脅威を与えてきたもみ枯細菌病、および高冷地の夏レタス栽培の難防除病害である腐敗病を対象病害としております。

「農業は人類を救う!」を教育・研究のモットー(図-1)に、食料の安定生産と豊かな食生活の創生への貢献を目指し、圃場における栽培から、植物個体、組織、細胞そして遺伝子やタンパク質などの分子レベ

ルまで幅広い研究を行っております。そして、「高いレベルの教育の基は、高いレベルの研究にある」を信念に、学生と共に学んでおります。

我々が行っている研究は、あくまでも基礎科学研究ではありますが、その基は現場にあります。今回、その一端として、青枯病、レタス腐敗病、トバモウイルス病およびイネもみ枯細菌病の研究内容について紹介させていただきます。ご笑読いただき、ご意見等いただければ、幸甚でございます。

I 青枯病菌の病原性機構の解明

青枯病は、卓効を示す農薬もない難防除細菌病害です。土壌に生息する青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は、根の傷口等の開口部から植物に感染します。導管で増殖を行った青枯病菌が、菌体外多糖を分泌することで導管をつまらせて、植物の水分通導能を低下させます。その結果、感染植物に萎凋症状がもたらされます。野生種が有する青枯病に対する抵抗性は、複数の遺伝子に支配されているため、交配育種で食用品種に導入することは困難です。そこで、抵抗性を示す台木を用いた接木栽培が有効な防除方法です。

不思議な現象があります。青枯病抵抗性の野生種を台木に、青枯病に弱い食用品種を穂木に接木栽培を行いますと、台木での青枯病菌の増殖が抑制されて、青枯病の発病が抑えられます。しかし、青枯病菌は食用品種の穂木で検出されるのです。それらの青枯病菌を分離して、食用品種に接種しますと、植物は青枯病を呈します。接木植物の穂木の導管に青枯病菌を接種しても、植物は青枯病を呈します。では、何故、接木植物の穂木にいる青枯病菌は病気を引き起こさないのでしょうか?



図-1 植物工学研究室の教育・研究のモットー

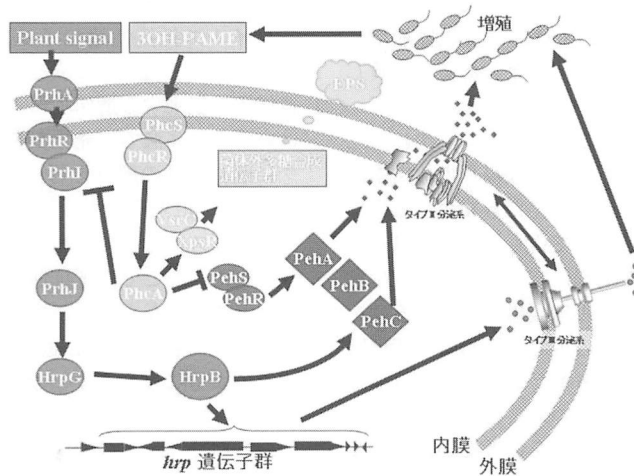


図-2 青枯病菌の病原性に関わるカスケードと遺伝子発現制御系

我々は、青枯病を引き起こす青枯病菌と植物と分子レベルでの相互作用があり、その相互作用は、青枯病菌が根に感染した直後、青枯病菌が導管に侵入する前の、細胞間隙で増殖を行っている時に生じると想定しました。そこで、青枯病菌の根に侵入直後の挙動と青枯病菌の病原性発現機構について分子遺伝学的手法と生化学的手法を用いた詳細な研究を行い、図-2に示す青枯病菌の病原性に関わるカスケードを明らかにしました。驚いたことに、導管病である青枯病が発病するか否かの質的な決定は、根へ侵入直後の青枯病菌が

細胞間隙で増殖する時点で決定されるのです。従来、青枯病菌の病原性の決定因子と考えられてきた導管への菌体外多糖の分泌は、青枯病の発病を量的に決定しておりました。そして、質的な決定と量的な決定は、青枯病菌の増殖を介したクオラムセンシングにより連携していることが明らかになりました。

現在、これらの成果を基に、青枯病発病と青枯病菌に対する抵抗性に関わる宿主遺伝子を、ディフェレンシャルディスプレイ法とRNAサイレンシングを用いた機能解析により同定しました。「細胞間隙」に着目

した研究戦略から、少しずつ、青枯病発病機構の本丸を明らかにする成果が得られております。

II レタス腐敗病の発病機構

はじめて腐敗病のレタス圃場（岩手県一戸町奥中山）を訪れた時の異様な感動は今も忘れません。広大な圃場一面に腐敗症状を呈したレタスが植えられておりました。しかし、不思議なことに、腐敗臭はせず、圃場一面が青汁の匂いに満ちておりました。「これは、植物細胞壁の分解による腐敗症状ではない」と直感しました。腐敗臭に満ちた軟腐病を呈したタマネギやジャガイモの圃場で、薬剤効果試験の調査を行った経験が働かせた直感です。この体験が発端になり、レタス腐敗病の発病機構の解明に取り組みました。その結果、腐敗病の病徴は、病原細菌である *Pseudomonas cichorii* の感染により誘導されるレタス細胞のアポトーシスプログラム自己細胞死（アポトーシス PCD）によることを明らかにすることができました。一般に植物細胞のアポトーシス PCD は病原菌の感染した植物の抵抗反応である過敏反応誘導時に認められると考えられております。今まで腐敗症状と考えられてきた本病の病徴が、アポトーシス PCD による組織崩壊によることは既成概念をくつがえす成果であると自負しております。

P. cichorii の病原性を解析していく上で、次に、元（社）日本植物防疫協会研究所高知試験場長の故山本磐先生（あえて磐さんと書かせていただきます）との出会いがありました。高知について何も知らないにもかかわらず、現場にそくした病理研究を行いたいと生意気なことを言う若造に、磐さんは現場研究のいろはをご教授して下さいました。その中で、高知県や徳島県のナスで、*P. cichorii* による病害だが腐敗病とは病徴が異なる褐斑細菌病が発生していたこと、さらに、ピーマンにも同様の症状が出ることをご教授いただきました。高知の現場研究歴 50 年の磐さんの言葉ですので、素直に実験を開始しました。その結果、*P. cichorii* ゲノム DNA 上の *hrp* 遺伝子群にコードされたタイプ III 分泌系を介して分泌されるタイプ III エフェクターは、ナスやピーマンに対する *P. cichorii* の病原性には関与するが、レタスに対する病原性には直接関与しないことが明らかとなりました。すなわち、*P. cichorii* は複数の病原性機構を有し、宿主植物に応じて使い分けしているようです。さらに、*Pseudomonas* 属細菌間を水平伝搬する遺伝子がナスへの病原性に関与することも明らかにすることができ、病原性分化の解明への糸口をつかむことができました。この研究を最初に行った北條広さんが、現在、

（社）日本植物防疫協会研究所高知試験場で研究員を行っているのも因果でしょうか。

III シントウガラシのタバモウイルス病抵抗性

日本一のシントウガラシとピーマンの産地である高知県にとって、タバモウイルスによる病害は長い間、避けることのできない天敵のようなものでした。タバモウイルス抵抗性遺伝子 *L* を導入した品種の開発により、安定生産を行うことができるようになりました。ところが、*L* 遺伝子による抵抗性を打破するタバモウイルスが出現してきました。さらに、*L* 遺伝子抵抗性は、施設栽培にとって、致命的な欠点を有しておりました。28℃以上の高温で抵抗性機能が喪失するのです。しかも、この高温による抵抗性機能の喪失は、ウイルス病害の拡大とともに、ウイルス密度の上昇により、抵抗性打破株の出現頻度を高める結果につながります。我々は、この *L* 遺伝子抵抗性打破のメカニズムの解明とともに、高温機能性タバモウイルス抵抗性品種の開発を研究命題としてきました。

これまで、我が国で既存品種に導入されているタバモウイルス抵抗性遺伝子は、*L* 遺伝子座に座乗する *L*¹、*L*³ および *L*⁴ 遺伝子と考えられておりました。*L* 遺伝子に座乗する遺伝子によるタバモウイルス抵抗性はいずれも高温で機能性を喪失します。ところが、丹念に既存品種の解析を行ったところ、中国由来の‘大なつめ’を祖先種とする品種は、病原型が Po 型のタバモウイルスに低温でも高温でも抵抗性を示すことわかりました。そこで、抵抗性に関わる遺伝子の同定を行ったところ、なんと、この高温でも機能性を示すタバモウイルス抵抗性は *L* 遺伝子座に座乗する新たな遺伝子によることがわかったのです。この遺伝子を *L*^{1a} と名付けました。実は、タバコやトマトで見つかったタバモウイルス抵抗性もすべて高温にて機能性が喪失するために、一般にタバモウイルス抵抗性は高温で機能性が喪失すると考えられておりました。ある意味、我々の試みは無謀だったかもしれません。この無謀さが、世界で初めて、高温でも機能するタバモウイルス抵抗性遺伝子の同定につながったようです。

気をよくした我々は、高温でのみ機能するタバモウイルス抵抗性の探索にあたりました。これも、無謀な試みです。岩手県では露地の夏作でシントウガラシやピーマンを栽培しております。岩手の夏は涼しく、30℃以上の高温になることは滅多にありません。なんとそこで栽培されているシントウガラシ‘南部大長なばん’が、タバモウイルスの一つパブリカマイルドモトルウイルスに、28℃以上だけで抵抗性を示しまし

た。この抵抗性は *L* 遺伝子とは別の染色体に存在する遺伝子によるものでした。この遺伝子を *Hk* と名付けました。高温でだけ機能するトバモウイルス抵抗性について世界初の発見でした。

現在、*L^{la}* 抵抗性と *Hk* 抵抗性によるトバモウイルス抵抗性の高温機能誘導機構についての解析を行っており、*L^{la}* 抵抗性と *Hk* 抵抗性誘導に関わるエリクターは、それぞれ外被タンパク質と RNA 複製酵素を構成する 180 kDa タンパク質であることを明らかにしております。さらに、*L^{la}* 抵抗性の高温誘導に関わる Po 型トバモウイルス Tobacco mild green mottle virus の外被タンパク質のアミノ酸残基を同定いたしました。

IV イネもみ枯細菌病菌の薬剤耐性機構と環境適応能

1980 年代に猛威をふるった *Burkholderia glumae* によるイネもみ枯細菌病と苗腐敗症は、oxolinic acid などによる化学的防除の普及により、基幹防除病害からはずされるほどに発生が減少してまいりました。一方、多年におよぶ薬剤の連用により、耐性株の出現が報告されており、とくに近年、oxolinic acid 耐性株の出現は問題視されるようになってまいりました。筆者が oxolinic acid 開発研究に関わったこともあり、oxolinic acid 耐性機構についての解析と防除対策の開発に携わってきました。その結果、*B. glumae* 圃場分離株の oxolinic acid 耐性は、oxolinic acid の作用部位である DNA ジャイレースの構成タンパク質である GyrA タンパク質の 83 番目のアミノ酸 (GyrA83) 変異に依存しており、本変異は DNA 複製のエラーによりもたらされることを明らかにしました。GyrA83 変異以外の要因により oxolinic acid 耐性化した株は、イネ植物体における環境適応能力が低く、環境中で淘汰されてしまうことも明らかにしました。さらに、rep-PCR を用いた *B. glumae* 系統解析技術を開発し、これらの結果を基に、oxolinic acid 耐性株感染種子検出技術とともに、oxolinic acid 耐性株の感染経路と感染源の解析技術を開発いたしました。分子遺伝学的に明らかにした植物細菌の薬剤耐性機構を基に、耐性株の伝搬を分子疫学的に解析した数少ない事例であります。

おわりに

日本有数の農業県である高知県にある高知大学で、現場を重視する植物病理学に関する教育・研究につい



図-3 植物工学研究室一同

て基礎科学を重視して行うことは、地域貢献をうたいながら矛盾していると感じております。しかし、現場に密着しているからこそ手に入る現象を解明することにより、世界に向けた高知発の植物病理学の情報発信基地になればと考えております。

紹介させていただいた研究成果は、筆者と木場先生の投げかけに同調し、昼夜を問わず、貴重な大学生活を研究に没頭してくれた植物工学研究室卒業生と、真摯に研究に取り組んでくれている在学生 (図-3) の貢献によるものです。我々が自負できることは、こんな我々と一緒に研究を続けてくれる学生を世に送り出せることです。そして、彼ら彼女らが、少なからず日本の農業に、貢献し続けてくれることです。

なお、今回紹介させていただいた成果は、京都大学大学院農学研究科、東京大学大学院総合文化研究科、神戸大学大学院農学研究科・自然科学研究科、岐阜大学大学院医学研究科、九州大学大学院農学研究院、ゲント大学、中央農業総合研究センター、農業環境技術研究所、北海道研究センター、東北農業研究センター、近畿中国四国農業研究センター、高知県農業技術センター、(財)岩手生物工学研究センター、住友化学工業(株)および高知大学遺伝子実験施設大西浩平先生との共同研究によるものであります。また、紙面の都合上、割愛させていただきましたが、(社)日本植物防疫協会研究所高知試験場、岩手県農業研究センターおよび高知県農業技術センターとは、植物病原菌の寄生性と薬剤耐性について、現場対応の研究を一緒にさせていただいております。各位に紙面を借りてお礼申し上げます。