

大学研究室紹介

リレ一随筆

キャンパスだより(34)

香川大学農学部
植物病理学研究室あき みつ かず や
秋 光 和 也

所在地：香川県木田郡三木町池戸 2393

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kagawa University. By Kazuya AKIMRSU

(キーワード：植物病理学，糸状菌，宿主特異的毒素，カンキツ，エンバク，脂質過酸化経路，イネ，揮発性物質)



香川大学農学部校舎

はじめに

香川大学農学部はその前身から数えると今年で創立106年になり、産声は1903年木田郡立乙種農学校設立に遡る。現在の農学部の所在地である池戸の大宮八幡宮恵徳寺内に校舎を建て、開校時の定員は就学年数の異なる本科と別科を合わせて200名であった。当時の授業科目に病虫害防除がすでに記され、後の植物病理学講座の原型となっている。その後、1906年に香川県立農林学校へ移管、22年に香川県立木田農業学校と改称され、第2次世界大戦後の50年に香川県立農科大学に昇格して、植物病理学も主要講座の一つとして開設された。その後の香川県立農科大学植物病理学講座は、内藤中人教授(1949～75年定年退官)、谷利一教授(1950～93年定年退官)、安部忠孝副手(1952～53年逝去)、高井省三助手(1953～54年転出)の各先生が発展を担われた。

1955年試行の国立学校設置法の一部改正に伴い、香川県立農科大学を吸収継承する形で香川大学農学部が設置され、植物病理学講座を含む18講座でスタートした。内藤教授(第5代農学部長)が香川県立農科大学からの講座を引き続き率いられ、1975年からは谷利一教授(第11代農学部長)、山本弘幸教授(1965～2006年定年退職)、真山滋志助教授(1977～89年転出)がそれぞれさらなる講座の発展を担われた。山本弘幸教授が率いる植物病理学研究室に、1994年から筆者(秋光和也)、2008年には五味剣二助教、09年には農学部にある遺伝子実験施設の多田安臣准教授が新たに加わり、現在の植物病理学研究室に至っている。

I 研究室の構成

香川大学農学部は応用生物科学科1学科の4コース制(応用生命科学コース、生物生産科学コース、生物資源環境化学コース、食品科学コース)であり、植物病理学研究室は応用生命科学コースに属している。応用生命科学コースでは、微生物から高等動植物までの幅広い生物を対象として、生命科学の基礎から応用技術(生物資源・生物機能の有効利用や有用生物の育種・開発など)まで幅広く学ぶことができる。開講科目の植物病理学は、この応用生命科学コースと生物生産科学コースの2コースの学生が履修し、全学生の半分以上が受講する科目となっている。

香川大学農学部は、生物の持つ機能を生かして、生命機能の解析、環境保全、食糧生産・開発利用などに関して、国際レベルで、かつ、地域貢献・社会貢献となる学術研究を行うことを目標としている。植物病理学は学部研究区分の中で、生物資源の生産性向上や生産環境の適正化、分子、細胞、個体レベルでの微生物の機能や生命現象の解明、植物の持つ機能の遺伝子レベルでの解明に関する研究区分に属する。また、香川大学農学部では希少糖の大量生産系の確立に成功し、植物に対する希少糖作用のメカニズムを解明と希少糖の農業関連場面における試薬/資材としての希少糖利用に関する研究も進展させている。

現在の植物病理学研究室は、教授として秋光和也、助教の五味剣二、遺伝子実験施設の多田安臣准教授の3教員、ポストドック研究員2名、研究補助員1名、博士課程2名、修士課程6名、学部4年生4名、3年生6名の24名からなる(図-1)。毎年日本植物病理学会の全国大会の2日目に開催される研究室OB会も



図-1 植物病理学研究室メンバー集合写真。4F ウッドデッキから



図-2 実験室風景

盛況で、現役学生とOBやOB同士の貴重な情報交換の場となっている。研究室の年間行事は春の花見、他大学との合同合宿、秋の新分属生の新歓、忘年会、追いコンと盛り沢山である。研究室分属は3年生の後期(10月)からで、約1年半をかけて卒論研究を進める。早期卒業制度を利用する学生は、3年前期終了後に分属し約8ヶ月で卒論研究を仕上げ、3年間で学部を卒業する。分属してきた学生の多くは大学院に進学し、修士課程や博士課程でさらに高度な課題に挑戦している。

II 研究紹介

植物病理学研究室では、これまでに植物ホルモン、細胞壁分解酵素、エンバク抵抗性に関する研究を進めてきており、近年地場産業の一つであるカンキツの病害に関する研究も進展させている。カンキツ病害研究については、植物病原糸状菌の生産する宿主特異的毒素の作用機構と毒素レセプターを介した特異性決定機構の解明、宿主特異的毒素の生合成遺伝子解析、病原性関連酵素研究、病原菌およびその代謝物に対する植物防御機構の解析を中心に、カンキツと *Alternaria* 属菌間の相互反応に関する分子生物学的技法を駆使した研究を進めている(図-2)。

世界的主要果樹の一つでありながら、カンキツは生化学・分子レベルでのストレス・防御応答に関わるシグナル伝達関連の基礎研究進展が十分とはいえない。樹木は研究材料として扱い難いという難点もあるが、カンキツは組織培養技術等が発展しており、ラフレモン品種等は非常に生育が旺盛で、当研究機関が所在する四国地方では一年中核酸抽出が可能な若葉を入手できることから、分子レベルのストレス・防御応答研究も進展は可能であると考え、本研究室ではラフレモンにおける *Alternaria brown spot* 病菌・*Alternaria leaf spot* 病菌、黒腐病菌、非病原性 *Alternaria* 属菌、およ

びこれらの菌の代謝物である宿主特異的毒素や細胞外分泌型の細胞壁分解酵素に対する応答を中心に、病原菌に対する宿主特異的反応のメカニズム、各種カンキツ抵抗性関連遺伝子の応答と機能解析、揮発性物質の作用に関する研究を進めている。

近年、植物病原糸状菌が植物感染時に発揮する宿主特異性に関する様々な分子メカニズムが明らかになってきた。宿主特異的な感染の誘導因子の一つとして、植物病原糸状菌が生産する宿主特異的毒素が知られている。

(1) 宿主特異的毒素の作用機構と毒素レセプターを介した特異性決定機構の解明

宿主特異的 ACR 毒素の作用点は感受性カンキツ品種ラフレモンのミトコンドリアであり、単離したラフレモンミトコンドリアへ ACR 毒素を処理することにより、電子伝達系と ATP 合成系との脱共役作用および NAD⁺ 等の TCA 回路の関連因子の漏出による回路の停止が誘起され、ACR 毒素の作用機構はミトコンドリア膜への孔 (pore) 形成による機能障害ではあると推測された。これらの ACR 毒素の作用は、感受性ラフレモンに特異的であり、ラフレモン以外のカンキツ品種にはこのような作用はまったく見られない。本研究室ではラフレモンミトコンドリアに対する ACR 毒素の作用を担う遺伝子として、ラフレモンミトコンドリアゲノムの tRNA-Ala の二つのエキソン間の介在領域 (self-splicing group II intron) に座乗し、大腸菌で発現させることにより通常は ACR 毒素耐性である大腸菌を毒素感受化させることができる 171 bp の遺伝子 ACRS (ACR-toxin Sensitivity) を明らかにした。2次構造解析から amphiphilic helix 型のミトコンドリア膜貫入タンパクをコードすると思われる、ACRS は孔形成型の膜貫入レセプタータンパクによく見られる SDS-PAGE により解離しない SDS 耐性型

多量体 (SDS-resistant oligomer protein) を形成する。また、本遺伝子 ORF のフルサイズの転写物は ACR 毒素感受性のラフレモンミトコンドリア RNA からのみ検出され、検定したすべての毒素抵抗性カンキツミトコンドリア RNA では、転写物が断片化し分解されていることが明らかになった。先にも述べたように本遺伝子は tRNA-Ala の二つのエキソン間の介在領域 (self-splicing group II intron) に座乗し、通常は分解される領域と考えられる。すなわち、ラフレモン以外のカンキツ品種 (= ACR 毒素耐性) では本領域は切断後分解されるが、毒素感受性品種であるラフレモンは何らかの理由で本領域の分解が抑制され、その領域で ORF となり得る領域が翻訳され、その翻訳産物が毒素レセプターをコードしているものと考えられる。ミトコンドリアゲノムに座乗する遺伝子の mRNA 修飾の有無で、宿主特異性が決定される例は、極めて新規な発見であり、現在このプロセッシングに關与するタンパク質の精製に成功し、その機能の解析が進展している。

(2) 宿主特異的毒素の生合成遺伝子解析

宿主特異的毒素の生合成遺伝子解析では、*Alternaria brown spot* 病菌の生産する ACT 毒素生合成遺伝子クラスターに関する研究を進め、部分的類似化学構造を持つ日本産のナシ黒斑病菌の AK 毒素生合成酵素遺伝子のホモログが、米国産の ACT 毒素生産菌ゲノムの 1.9 Mb の染色体に座乗し、標的遺伝子破壊や RNA silencing 法でこれらの生合成遺伝子産物の機能が毒素生産に直結することを明らかにしている。ACT 毒素生合成に關与する 10 遺伝子の全長配列とその機能を明らかにし、本毒素の生合成に關与する遺伝子のほぼ全容を明らかにしている。また ACR 毒素の生合成に關与する遺伝子もいくつか明らかになり、1.5 Mb の染色体上に座乗することが明らかになっている。さらに、ACR 毒素と ACT 毒素の二つの異なる宿主特異的毒素を生産し、ACR 毒素生合成遺伝子クラスターと ACT 毒素生合成酵素遺伝子クラスターの両方を保有する菌株を圃場から分離し、これらの毒素生合成酵素遺伝子クラスターは水平移行する可能性を示した。この 2 毒素を生産する dual 病原型菌株には、これら ACT および ACR 毒素クラスターの双方が座乗し、両クラスターの座乗する染色体の部分領域の双方が存在することが明らかになっている。

(3) 病原性関連酵素研究

カンキツに感染する際に二つの異なる感染様式を示す *Alternaria* 属菌から、細胞壁分解酵素の一つである endo 型のポリガラクトナーゼとそれらの遺伝子を単離し、標的遺伝子破壊法を用いた本酵素欠損株にお

ける病原性変異検定を進めた。宿主特異的毒素を生産せず腐敗症状を誘起するカンキツ黒腐病菌 (*Alternaria citri*) と、毒素を生成するが腐敗症状を誘起しないカンキツ *Alternaria leaf spot* 病菌 (*Alternaria alternata rough lemon pathotype*) を用いて、99% の配列類似性を示すバクチン分解酵素遺伝子を両菌でそれぞれ破壊し、腐敗症状を誘起する病原菌における endo 型ポリガラクトナーゼの役割はその他の病原菌より大きいことを明らかにした。カンキツ黒腐病菌で本遺伝子を破壊すると著しく腐敗症状の誘起が減少され、本菌の病原性における endo 型ポリガラクトナーゼの役割は極めて大きいことが明らかになった。しかしながら、*Alternaria leaf spot* 病菌においては、宿主特異的毒素が病原性の主要因子で、endo 型ポリガラクトナーゼの欠損は病原性にまったく影響を与えなかった。また、カンキツ黒腐病菌の endo 型ポリガラクトナーゼ遺伝子は、環境要因によるプロモーター制御を受けることを明らかにしている。

(4) 病原菌およびその代謝物に対する植物防御機構の解析

宿主特異的毒素は毒性が強く、また宿主植物細胞が死に至るまでの時間があまりに短いため、毒性発揮と抵抗性発現抑制との関係を調べるには適さない例が多い。しかしながら、ACR 毒素を生産する *Alternaria leaf spot* 病菌の胞子は、発芽後水分の少ない条件では 5 ~ 6 時間で付着器を形成して組織への侵入を試み始めるが、噴霧接種後加湿状態で静置すると 15 ~ 18 時間後に侵入し、菌接種後の壊死は他の宿主特異的毒素生成菌の多くの場合は 24 時間以内に葉全面に形成されるのに対して、本菌の場合は 48 時間後まで壊死は葉全面に広がらない。そのため各種抵抗性関連反応を接種後 24 時間以上検定できる利点があり、ACR 毒素生成菌とラフレモン抵抗性関連遺伝子発現との関係を検討することが可能であった。そこで、ラフレモン抵抗性に役割を持つ遺伝子群を明らかにするために、抵抗反応を誘導した状態での cDNA ライブラリーからサブトラクション法により、これまでに約 20 の抵抗性関連遺伝子をクローニングし、これらの遺伝子発現様式や機能を明らかにしてきた。これらの遺伝子群をモニター遺伝子として、本菌を噴霧接種した後に各種遺伝子発現様式を検定した結果、本菌接種後 2 時間以内の極めて早い時点では各種抵抗性関連遺伝子の発現を非病原菌接種時と同様に誘起するが、これらの遺伝子発現はその後急激に抑制され、この防御機能のサブレッサー的抑制が感染の成立と宿主の罹病性の一端を担っていると考えている。これら抵抗性関連遺伝子の発現抑制がミトコンドリアへの作用を経て行われてい

るのか、またはACR毒素にミトコンドリアへの作用とは異なる作用点があるのかという問題の答えはまだでていない。しかし、核とミトコンドリアと葉緑体間には密接な情報・情報制御ネットワークが存在することが近年明らかとなっており、今後このネットワークに関する知見が増えるとともにより詳細な解析が可能となると考える。

おわりに

香川大学が位置する香川県讃岐平野は、風光明媚で温暖な気候であり、過ごしやすい土地柄であります。四国の地方都市ですが、本州とも橋で繋がれ、岡山経

由で新幹線へのアクセスもあり、東京への航空便が毎日往復20便あるため、学生も関西圏を中心に全国から集まる傾向があります。最近は「自然界にその存在量が少ない単糖とその誘導体」と定義された希少糖の大量生産技術の確立に香川大学が世界で初めて成功し、量産体制に入った希少糖の幾つかが、動植物や微生物に作用を及ぼすことが明らかになり、植物への防御関連遺伝子群の発現を誘導活性や生育調節活性に関する作用の研究が植物病理学研究室を中心に進展しています（植物防疫62巻326頁参照）。校舎の耐震改修も終了し、装い新たな香川大学農学部となっています。お近くにお越しの際には是非お立ち寄りください。

！新刊！

新版 農薬用語辞典

農薬用語辞典

社団法人 日本植物防疫協会

社団法人 日本植物防疫協会 編
菊判 416ページ
価格：5,250円（税込）

◆ 農薬関連用語873種類について各分野の専門家が詳しく解説しました。

内容： 環境、毒性、製剤・施用法、分析、法令、行政、国際、殺虫剤、殺菌剤、除草剤、植調剤、生物農薬、栽培等に関連する用語

付録： 1) 農薬の形態分類・規格等
2) 各種単位表
3) 国内外の農薬関係機関・団体等の名称（和名・英名）
4) 農薬関連用語（和：2,929語、英：3,586語）の対訳表

お問い合わせとご注文は

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込1-43-11
郵便振替口座 00110-7-177867 TEL 03-3944-1561 FAX 03-3944-2103
ホームページ：http://www.jppe.or.jp/ メール：order@jppe.or.jp