

ミニレビュー

イネいもち病菌の自己感染補助因子[#]

—感染過程解析のツール—

安藤 杉尋[‡], 田部 茂, 繁森 英幸[†], 山田小須弥[†], 清水 崇史^{††},
岡田 憲典^{††}, 山根 久和^{††}, 秋本 千春, 西澤 洋子, 南 栄一*

農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット

[†] 筑波大学大学院生命環境科学研究科

^{††} 東京大学生物生産工学研究センター

(平成 21 年 9 月 7 日受理)

Keywords: rice blast, *Magnaporthe oryzae*, *Oryza sativa*.

はじめに

植物と病原菌の宿主-病原菌間相互作用において、ある種の生理活性物質がその感染の成立に大きな機能を果たしていることはよく知られている。例えば *Alternaria* 属菌や *Cochliobolus* 属菌でよく解析されている宿主特異的毒素 (host-selective toxin, HST) では、この物質が宿主特異的に宿主の細胞死を引き起こすことで感染を成立させている¹⁾。また、エンドウ褐紋病菌のサプレッシンなどで知られるサプレッサーでは、毒素活性はもたないが、宿主のファイトアレキシン産生や防御関連遺伝子の発現を遅延させる活性をもち、これによって感染を成立させていることが知られている²⁾。一般に HST やサプレッサーは病原性決定因子として働いており、これらの生産能と感受性が病原性を決定している。イネ-いもち病菌間の相互作用においても、このような毒素やサプレッサー様物質の探索が行われ、いもち病菌の培養ろ液等からピリクラリオールやテヌアゾン酸といった毒素が報告されているが³⁾、これらが実際に感染の場でどのように機能しているかについては不明である。これとは別に、分生子発芽液中 (Spore germination fluid: SGF) に病原菌に対する感受性を誘導する活性が報告されており⁴⁾、本来イネを宿主としない *Alternaria* 属病原菌が SGF 存在下でイネ細胞に侵入できるようになることが観察

されている。しかしながら、その化学構造は未同定である。我々は上記のような報告とは別に邦産イネいもち病菌 (菌株: Ina86-137, race 007.0) の分生子懸濁液の上清中に自身の感染を促進する活性があることを見出した⁵⁾。本稿では本活性の性状と活性物質の精製について解析結果を併せて紹介する。

1. 分生子懸濁液上清 (SCS) 中に存在する
感染促進活性

通常イネいもち病菌をイネに接種する際、いもち病菌はオートミール培地上で培養され、光条件下で分生子形成を誘導されたのち、形成された分生子は水などに懸濁され、適当な分生子濃度に調整されたのち、噴霧接種等に用いられる。我々はこの過程において、分生子を一度遠心操作によって回収し滅菌水に再懸濁することで洗浄を行い、これを接種に用いると洗浄しない場合に比べて感染率が低下することを観察した。このことから、我々は分生子懸濁液の上清中に自身の感染を促進する因子が存在するのではないかと推察した。そこで、分画遠心で洗浄した分生子とそれに再度上清を添加したものとで感染率を比較した。まず、胞子懸濁液を遠心操作により上清と分生子に分け、上清はフィルターを過すことによって分生子等の混入を除いて胞子懸濁液上清 (supernatant of conidial suspension: SCS) とし、沈殿した分生子は水でさらに 2 回洗浄し洗浄分生子を調製した。洗浄分生子に SCS を添加し、親和性のイネ (日本晴, 抵抗性遺伝子: *Pia*) に対する感染率を葉鞘裏面接種法により評価したところ、対照区 (1 mM MES Buffer に懸濁) に比べ、多細胞侵入率が有意に上昇した。SCS 中の糖濃度を指標にした場合 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が至適濃度であった。ま

[#] 第 34 回大会シンポジウム講演者による解説。

* 〒3305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

E-mail: eiminami@affrc.go.jp

[†] 現在の所属: 東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻植物病理学研究室

© Pesticide Science Society of Japan

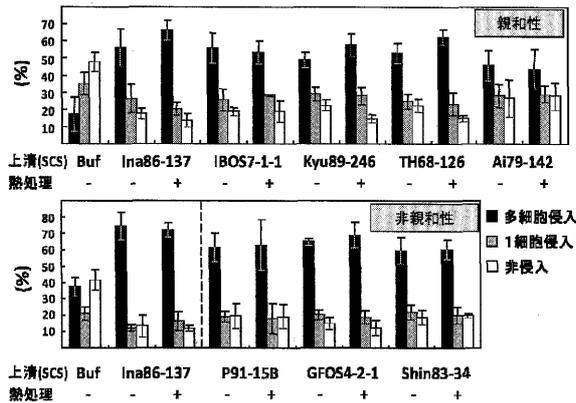


図1. 様々な菌株由来 SCS (Supernatant of Conidia Suspension) が親和性相互作用 (日本晴, *Pia*-Ina86-137 株) に及ぼす影響 (Ando et al. 2009 を改変). 日本晴 (*Pia*) に対し親和性のいもち病菌 5 菌株と非親和性 3 菌株由来の SCS (1 mM MES, pH 5.7 に調整) に分生子を懸濁し, 葉鞘裏面接種検定を行った. 48 時間後に付着器からの侵入菌糸の伸展度によって多細胞侵入, 1 細胞侵入, 非侵入に分類し, 観察した全付着器数に対するそれらの割合を縦軸に示した. 対照区 (Buf) は分生子を 1 mM MES (pH 5.7) に懸濁し, 接種検定に供した.

た, 葉身における病斑形成に対する SCS の影響も調べた結果, 罹病性の進展型病斑の形成率を上昇させることが明らかとなった. このことから SCS 中には自身の感染を助長する働きがあることが示唆された. また我々は, SCS 中にカタラーゼ活性が存在していることを既に報告しており⁶⁾, カタラーゼ活性との関連を調べるために, SCS を 100°C, 15 分間処理し, その感染促進活性を調べたところ, カタラーゼはこの処理によって失活するのに対し, 図1に示すとおり SCS の感染促進活性は失活せず, カタラーゼとは異なる熱安定な自己感染補助因子の存在が示唆された.

2. SCS の活性の普遍性および位置づけ

SCS 中に含まれる感染補助因子について, その普遍性を調べるために, 様々なイネいもち病菌の菌株から SCS を調製し, 洗浄した Ina86-137 分生子に添加後, 親和性のイネ (日本晴: *Pia*) に接種した. その結果, 親和性 5 菌株, 非親和性 3 菌株すべての SCS 中に熱安定な感染促進活性が認められた (図1). 続いて, Ina86-137 株由来の SCS を日本晴 (*Pia*) に対して親和性 (3 菌株) および非親和性 (3 菌株) のいもち病菌の分生子に添加して接種したところ, 親和性の組み合わせの場合のみ感染促進活性が認められた. そこで, イネの品種 (抵抗性遺伝子) といもち病菌のレース (非病原性遺伝子) を組み合わせによって親和性と非親和性が反転するように工夫し, 同様に接種したところ, やはり親和性の組み合わせでのみ感染促進活性が認められた (図2). さらに, 非宿主相互作用に対する影響を調べるため, イネ以外のいもち病菌 (エンバク菌, アワ菌, キビ菌,

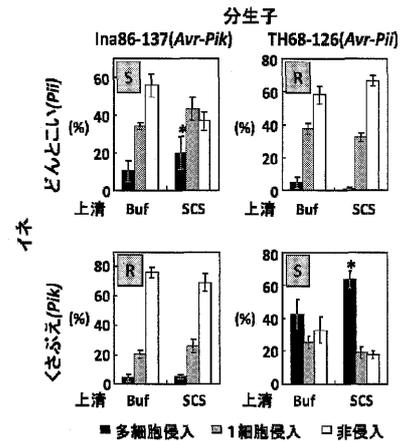


図2. 親和性, 非親和性相互作用における SCS の効果 (Ando et al. 2009 を改変). Ina86-137 株由来の SCS を用い, 葉鞘裏面接種検定を行った. * は Buf に対する Dunnett' test による有意差を示す ($n=6, P<0.05$). S: 親和性相互作用, R: 非親和性相互作用. 縦軸および用いた省略記号は図1と同じ.

シコクビエ菌, メヒシバ菌) およびインゲンマメ炭疽病菌 (*Colletotrichum lindemuthianum*) のイネへの感染に対する SCS 効果を検討したが, いずれの感染にも影響はみられなかった (図3). 以上の結果をまとめると, 本感染促進活性は, イネいもち病菌の SCS 中にある程度普遍的に存在し, その活性はいもち病菌の菌株やイネの品種によらず, 親和性相互作用において特異的に発揮されるものであることが明らかとなった.

前述のとおりイネ-いもち病菌間相互作用に関わる物質の研究では, 培養ろ液中に検出される毒素や SGF 中の病原

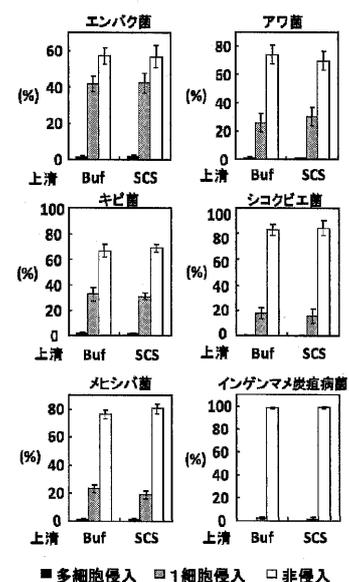


図3. 非宿主相互作用に及ぼす SCS の影響 (Ando et al. 2009 を改変). 病原菌の分生子に Ina86-137 株由来の SCS を添加し, イネ日本晴 (*Pia*) に対して葉鞘裏面接種検定を行った. 縦軸および用いた省略記号は図1と同じ.

菌に対する感受性を誘導する活性などの報告がある^{3,4)}。これらと比較して、SCSは活性の検出できる濃度で葉身に処理しても壊死を引き起こさず、本活性が毒素活性によるものではないことを確認している。また、SGFに含まれる活性は、イネに対し非病原性の糸状菌 *Alternaria alternata* の感染を誘導することが知られている⁴⁾ のに対して、SCSの活性は、*A. alternata* については調べていないがそれ以外の非宿主間相互作用に影響を及ぼさなかった (図3)。このことからSGFに含まれる因子とSCSに含まれる因子は異なる可能性が高い。さらに、これまで他の病原菌で報告されているサプレッサーと比較すると、既知のサプレッサーは全て病原性決定因子として機能しており、サプレッサーの存在によって病原性の有無が決定される。しかしながらSCS中に含まれる活性因子はいもち病菌のSCS中に普遍的に存在し、その存在が病原性を決定しない。つまりイネの抵抗性遺伝子が支配する真性抵抗性を抑えることはできないと考えられる。このような特徴をもった活性の報告はこれまでなく、極めてユニークである。

一方、植物の病害抵抗性に負の影響を与える生理活性物質としてアブシジン酸 (ABA) が報告されている⁷⁾。ABAは植物の乾燥、塩、低温などの環境ストレスの耐性獲得に関与する植物ホルモンとしてよく知られているが、ABA処理により環境ストレス耐性が獲得される一方で、病害耐性が弱まるというようにABAを介した両者の拮抗関係が示唆されている^{8,9)}。我々のグループでもイネいもち病菌の葉鞘裏面接種法で接種前4時間のABA (20 μ M) 処理で多細胞侵入率が増加することを確認している。さらに、切断葉を接種6時間前から20 μ M ABAを浸みこませたる紙上に並べて処理し、その後いもち病菌分生子を滴下接種した場合、対照区 (水) と比べて罹病性の進展型病斑の形成が促進される傾向が見られた。このとき分生子をSCSに懸濁して接種すると、ABA処理と相乗的な効果が認められた (安藤、未発表)。このことは、SCSの感染促進活性はABAによって病害抵抗性が弱められたときに、より効果的であることを示している。本感染補助因子の作用点および、ABAとの相互作用の詳細については、本活性因子の同定・解析が必要である。現時点では、親和性相互作用においても機能する基礎的抵抗性に作用して病原性を高めている可能性と、いもち病菌の感染行動を補助することで菌糸の侵入・伸展を促進している可能性の少なくとも2つが考えられる。また、SCS中には複数の因子が含まれ、その総合的な効果であることも考えられる。今後この因子の精製を進めるとともに、植物側への効果といもち病菌側への効果の両面から解析を進める必要があると考えられる。

3. SCSからの感染促進因子の精製

本感染補助因子が熱に安定であることは既に述べた。こ

のことから、本因子がなんらかの低分子化合物である可能性が高いと推察される。そこで、本因子の精製を目的にIna86-137株由来SCSを熱処理後、不要物を取り除き、水溶性の物質を酢酸エチル可溶性画分、メタノール可溶性画分、水溶性画分に順次分離した。それぞれの画分を葉鞘裏面接種法に供試したところ、メタノール可溶性画分に感染促進活性が含まれることが明らかとなった。しかしながら、メタノール可溶性画分には乾燥重量で全体の約50%が含まれるため、さらに精製を進める必要がある。

おわりに

本研究により、いもち病菌の孢子懸濁液上清中に新規の自己感染補助因子が存在する可能性が示された。イネいもち病菌は宿主の農作物としての重要性和、それに対する重要病害という位置づけから多くの研究がなされ、いもち病抵抗性品種の育成は育種上の重要目標の一つとして取り組まれてきた。その結果、多くの真性抵抗性遺伝子が発見され、優良品種の抵抗性付与に利用されてきた。しかし、一方では育成された抵抗性品種に対して病原性をもつ新たないもち病菌レースの出現を助長し、複雑なレース分化が生じるに至ってしまった。すなわち、イネ-いもち病菌間相互作用はその共進化にヒトの手が大きく加わった、いわば「不自然」な生物間相互作用の代表例といえるだろう。その中で両者はさまざまな攻防を繰り返して、現在の形が形成されている。本感染補助因子が、いもち病菌に普遍的に存在することや、真性抵抗性によってその効果が打ち消されることなどから、本因子はその「攻防」の中で比較的初期にいもち病菌が獲得したツールであり、これに対し、植物の抵抗性遺伝子は優位に機能していることが想像される。そうであるならば、本感染補助因子は、イネ-いもち病菌間相互作用において、基礎的な感染過程の解析ツールとして大変興味深く、今後の解析が期待される。しかしながら、本因子を含むSCSは、人工的に培地上で分生子を形成させたいもち病菌から得たものであり、本因子が実際の感染現場ではどのような意味をもつかは全く分からないのが現状である。本因子の同定とその分布、合成時期などの情報を得ることが、今後の解析のキーとなる。また、本因子の同定およびその感染促進活性のメカニズムの解明が、これを逆手にとった新規農薬の開発に応用されることが期待される。

引用文献

- 1) T. J. Wolpert, L. D. Dunkle and L. M. Ciuffetti: *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**, 251-285 (2002).
- 2) T. Shiraiishi, T. Yamada, Y. Ichinose, A. Kiba and K. Toyoda: *Int. Rev. Cytology* **172**, 55-93 (1997).
- 3) 山中 達, 山口富夫編著: 稲いもち病, 養賢堂, 1987.
- 4) S. Arase, S. Kinoshita, M. Kano, M. Nozu, E. Tanaka and S.

- Nishimura: *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* **56**, 322–330 (1990).
- 5) S. Ando, S. Tanabe, C. Akimoto-Tomiyama, Y. Nishizawa and E. Minami: *J. Phytopathol.* **157**, 420–426 (2009).
 - 6) S. Tanabe, N. Hayashi, Y. Nishizawa, H. Yamane, N. Shibuya and E. Minami: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 889–892 (2008).
 - 7) H. Koga, K. Dohi and M. Mori: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **65**, 3–9 (2004).
 - 8) 島本 功, 渡辺雄一郎, 柘植尚志監修: 植物細胞工学シリーズ 19, 秀潤社, 2004.
 - 9) M. Yasuda, A. Ishikawa, Y. Jikumaru, M. Seki, T. Umezawa, T. Asami, A. Maruyama-Nakashita, T. Kudo, K. Shinozaki, S. Yoshida and H. Nakashita: *Plant Cell* **20**, 1678–1692 (2008).

略歴

安藤杉尋

最終学歴: 筑波大学大学院博士課程生物科学研究科

研究テーマ: アブラナ科野菜根こぶ病の感染機構の解析

趣味: テニス

南 栄一

最終学歴: 名古屋大学大学院農学研究科博士課程

研究テーマ: イネとイネいもち病菌の相互作用

趣味: 家庭菜園