

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 26 年度博士課程進学

氏名 北沢 優悟

指導教員名 難波成任

論文題目 植物病原細菌の花き類に対する病原性に関する研究

花き類における細菌病は、植物体の生育を阻害するだけでなく、外観を損ない商品価値を低下させるために大きな問題となり得る。病害の原因となる細菌（病原細菌）は、種によって伝染環、宿主範囲などが異なるため、病原細菌に応じた適切な防除法を構築する必要がある。従って病害発生時には、細菌の病原性試験を介して病原細菌を正確に同定する必要がある。また細菌の性状をさらに把握するには、それらの細菌の病原性機構を解明することが重要であり、防除戦略の構築に向けた基盤ともなり得る。以上を踏まえ、本研究ではコスモスに発生した新規細菌病の病原細菌の同定を行った。また、複数の花き類に花器官形態の異常を誘導する病原細菌ファイトプラズマについて、その病原性因子の機能を解析した。

1. 葉枯症状を示すコスモスより分離された細菌の病原性解析

コスモス (*Cosmos bipinnatus* Cav.) はメキシコ原産のキク科植物であり、日本では景観植物として頻りに利用される。2012年に東京大学植物病院に葉枯症状を呈するコスモスの診断依頼があり、検体の観察から細菌による病害と推定された。日本では細菌によるコスモスの葉枯症状は報告されていないため、被害部から細菌を分離し、病原性を解析した。被害部からは、LAB-LEMCO 寒天平板培地に淡黄色の集落を形成する細菌が優占的に分離された。病斑部ごとに単一の集落を再度分離し、計4分離菌株 (UTLPPB120801~ UTLPPB120804) を得た。簡易分類試験の結果から、分離菌株はいずれも様々な植物に病原性を示すことが知られる植物病原細菌 *Pseudomonas cichorii* である可能性が示唆された。分離菌株が病原細菌であるかを検証するため、コスモスに対する病原性を解析した。分離菌株をコスモスに噴霧接種したところ、葉枯症状が再現され、罹病部からは接種細菌と同様の集落を形成する細菌が高率に分離された。従って、分離菌株はコスモスに対して病原性を有し、本病害の病原細菌であると考えられた。さらに、コスモス以外の植物 (レタス、メボウキ、トマト、ゴマ、アスター) に対する分離菌株の病原性を試験した所、いずれの植物種にも病原性を有していた。

最後に分離菌株の種の分類を目的とし、その細菌学的性質の試験を行った。分離菌株の糖利用能や酵素活性などの43項目の細菌学的性状を試験し既報の *P. cichorii* 株と比較したところ、ほぼ全ての項目で性状が一致していた。加えて、16S rDNA の部分配列を用いた系統解析を行ったところ、分離菌株の配列は既報の *P. cichorii* と共に、他の *Pseudomonas* 属細菌とは独立した同一のクレードを形成した。以上の結果より分離菌株を *P. cichorii* と分類した。*P. cichorii* は多犯性の植物病原細菌であり、日本において複数のキク科植物に病害を引き起こすことが報告されているほか、実験的にはコスモスに病原性を持つことが過去に報告されている。しかし、日本におけるコスモス栽培において *P. cichorii* による病害の発生が確認されたのは初めてである。本病害が *P. cichorii* によることが明らかになったことから、本病害の防除には他作物における *P. cichorii* の防除法が有効であると考えられた。

2. *phyllogen* による葉化誘導機構

ファイトプラズマは、花き類を含めた様々な植物に感染する篩部局在性の植物病原細菌である。ファイトプラズマは感染植物に様々な症状を引き起こすが、特徴的なものとして花器官の葉化や突き抜け（雌蕊の茎への変化）といった形態異常の誘導がある。これまで、ファイトプラズマに保存された分泌タンパク質 *Phyllody-inducing gene family* (*phyllogen*) が、シロイヌナズナに花器官の形態異常を誘導することが知られているが、その機能は明らかでない。植物の花器官分化では、A、B、C、E の 4 クラスに分類される MADS-box 転写因子 (MADS transcription factor; MTF) が器官特異的な組み合わせで機能する (ABCE モデル)。A、E クラスの MTF が欠失したシロイヌナズナでは、*phyllogen* 形質転換シロイヌナズナと同様の花器官の変異が観察されるため、*phyllogen* がこれらの機能を阻害している可能性が考えられた。

そこで本研究では、タマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma wild line; OY-W) が持つ *phyllogen* (PHYL1oy) と、シロイヌナズナの MTF である APELATA1 (AP1; クラス A)、SEPALLATA3 (SEP3; クラス E) の相互作用を解析した。Yeast two hybrid 法により、PHYL1oy は両 MTF と結合することが示された。さらに、これらの MTF から成る多量体の形成が PHYL1oy によって阻害されることが、*in planta* で示された。また、PHYL1oy を形質転換したシロイヌナズナにおいては、AP1 や SEP3 による遺伝子の発現制御が阻害されていた。以上のことから、*phyllogen* は A クラス、E クラスの MTF の機能を阻害し、シロイヌナズナに花器官の形態を誘導すると考えられた。

phyllogen による標的 MTF の機能阻害機構を更に解析するため、YFP を付加した標的 MTF を *Nicotiana benthamiana* 葉において PHYL1oy と共に一過的に発現させ、YFP 蛍光を観察した。その結果、YFP 融合 MTF の蛍光は PHYL1oy 存在時には著しく減衰していた。このことから PHYL1oy によって MTF の蓄積量が低下したと考えられた。従って、PHYL1oy 存在下でこれらの MTF は分解へと誘導されるものと考えられ、分解誘導経路のさらなる解析を行った。その結果、植物細胞内の主要なタンパク質分解経路であるプロテアソームを阻害した場合に、PHYL1oy による YFP-SEP3 の分解誘導が抑制された。以上より、*phyllogen* は標的 MTF のプロテアソームを介した分解を誘導し、花器官の形態異常を引き起こすと考えられた。

3. 様々な花き類に対する *phyllogen* の機能の検証

ファイトプラズマは双子葉植物・単子葉植物を含めた被子植物全般に感染し、異常な花器官の形成を誘導する。そこで、*phyllogen* がシロイヌナズナと同様に様々な植物においても、花器官の形態異常を誘導するかを解析した。広範な植物に感染するリンゴ小球形潜在ウイルス (apple latent spherical virus ; ALSV) をベクターとして、PHYL1_{oY}、または peanut witches' broom phytoplasma (PnWB) の *phyllogen* (PHYL1_{PnWB}) をナス科植物のペチュニアで発現させた。その結果、PHYL1_{oY}、PHYL1_{PnWB} を発現させたペチュニアでは全ての花器官に異常が生じ、*phyllogen* はペチュニアに対しても花器官形態の異常を誘導すると考えられた。また、これらのペチュニアの形態や花芽における MTF 遺伝子の発現様式は、E クラス MTF 変異体のものに類似しており、*phyllogen* による E クラス MTF の機能の阻害が形態異常の誘導に大きく寄与していることが示唆された。次いで、PHYL1_{PnWB} をキク科のヒマワリ、アスターに同様の手法で発現させたところ、いずれの植物にも花器官の形態異常が誘導された。加えて、PHYL1_{oY} は、ペチュニア、及びキク (キク科) の A クラス、E クラスの MTF と相互作用し、その分解を誘導することが確かめられた。以上のことから、*phyllogen* は少なくともアブラナ科 (シロイヌナズナ)、ナス科 (ペチュニア)、キク科 (ヒマワリ・アスター) の双子葉植物に対して活性を有することが示された。さらに、PHYL1_{oY} は単子葉植物であるユリ (ユリ科) の A クラス、E クラスの MTF も、上述の MTF と同様に標的とすることが可能であった。以上の結果から、*phyllogen* は広範な植物の A クラス、E クラス MTF を標的とし、それらの分解を介して、広く植物に花器官の形態異常を誘導可能であることが示唆された。

以上を要するに、本研究では、コスモスに生じた葉枯症状が *Pseudomonas cihorii* による細菌病であると同定した。また、ファイトプラズマの病原性因子 *phyllogen* が、様々な植物の A クラス、E クラスの MTF を標的とし、その分解を誘導することで植物の花器官に形態異常を誘導することを示した。以上の解析は、細菌の病原性機構を理解し、病害の防除戦略を構築する上で基盤となる知見であると考えられる。