

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 24 年度博士課程進学
湊 菜未
指導教員 難波成任

論文題目 ファイトプラズマ感染による不稔症状を引き起こす病原性因子に関する研究

植物病原体はしばしば宿主植物の稔性にも大きな影響を与えており、植物の不稔症状は病原体と宿主植物の攻防の結果として長らく観察されてきた。植物病原細菌ファイトプラズマについても、多くの種が宿主植物に不稔を誘導することが報告されている。これらのファイトプラズマの多くは花器官が葉に転換する葉化のような花器官の属性決定の異常を促すことで不完全花の形成に依る不稔症状を引き起こすことが知られているが、一部のファイトプラズマは特定の宿主植物に花器官の属性決定に異常を伴わずに不稔症状を誘導する。これらの不稔症状においては宿主植物の花に「奇形」と思しき異常が認められないにもかかわらず種子の稔実率が低下する。ファイトプラズマの誘導する葉化症状については近年その誘導機構が詳細に解明されたのに対し、葉化のような奇形を伴わない不稔症状についてはその誘導機構は未解明であり、またその誘導因子も不明であった。そこで本研究では、ファイトプラズマの感染によって引き起こされる不稔症状の発病機構に病原体側・宿主植物側の両面から迫ることを目的とした。

1. 不稔症状を誘導するファイトプラズマの病原性因子の同定

当研究室が維持するタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma: OY ファイトプラズマ) はその宿主植物毎に生殖生長に異なる影響を及ぼすことが知られており、タマネギやシュンギクに感染した場合はほとんどの株が抽苔しないのに対して、感染ペチュニアでは抽苔後に葉化が認められる。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) においては、OY ファイトプラズマ感染により萎縮・叢生が誘導されることが示されていたものの、花に現れる病徴については詳細な報告が為されていなかった。

本研究ではまずシロイヌナズナの生殖生長期における OY ファイトプラズマ感染の影響を調べるため、OY ファイトプラズマを媒介昆虫ヒメフタテンヨコバイ (*Macrosteles striifrons*) を用いてシロイヌナズナに接種し観察を行った。その結果、OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナは、これまで報告されていた萎縮および叢生といった形態異常に加えて花が蕾のまままで開花しない生育異常を示した。このような OY ファイトプラズマ感染シロイヌナズナではその後種子の稔実が起こらず、不稔であった。また、OY ファイトプラズマ感染植物の蕾ではホメオティックな異常は認められず花器官の数や配置は野生型と同様であった。一方、雌蕊においては柱頭の *papillae* が野生型と比べて短いこと、および雄蕊の葯が裂開しないことが観察された。以上の結果から、OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナの花においては雌性器官および雄性器官の両方の生殖器官でその発達が停止し、成熟不全となっているものと考えられた。

次に OY ファイトプラズマの感染による不稔症状の誘導機構を調べるため、その誘導因子の同定を試みた。既報により、OY ファイトプラズマにおいて萎縮および叢生による天狗巢症状を誘導する分泌タンパク質として報告されている *phytoplasma tengu-su inducer* (TENGU) を 35S プロモーターを用いて異所的に発現させたシロイヌナズナにおいては、莢の発達が妨げられることが示されている。そこで *tengu* 形質転換体の生殖生長期を詳細に観察したところ、OY ファイトプラズマ感染時と同様に抽苔後蕾が開花しないままの重度の生育異常を示す個体と、花が開花するものの莢が成長せず種子が得られない軽度の生育異常を示す個体が認められた。重度の生育異常を示す *tengu* 形質転換花では OY ファイトプラズマ感染花と同様に花器官にホメオティックな異常は認められなかった。また雌蕊の柱頭の *papillae* が若干短く、雄蕊の葯は裂開しておらず花粉の放出は認められなかったことから、このような *tengu* 形質転換花におい

では OY ファイトプラズマ感染花と同様に雌性器官および雄性器官の両方が成熟不全となっているものと考えられた。これに対して、軽度の生育異常を示す *tengu* 形質転換体の花序では、多くの花は開花するが莢の発達が不十分であり、これは既報と同様の病徴であると考えられた。これらの花では花器官にホメオティックな異常は認められず、雌蕊柱頭の *papillae* は野生型のシロイヌナズナと同程度の長さであり、また雄蕊の葯は裂開しており花粉の放出が見られたが、走査型電子顕微鏡観察により花粉壁の構造に異常が生じていることが示された。野生型シロイヌナズナとの交配により、この *tengu* 形質転換体は雄性不稔であることが示唆された。以上の観察結果から、*TENGU* ペプチドはシロイヌナズナにおいてこれまで報告されていた軽度の不稔症状に加えて、OY ファイトプラズマ感染時と同様の不稔症状を誘導することが明らかとなった。また、OY ファイトプラズマ感染および *tengu* 形質転換花では花器官にホメオティックな異常は認められず分化が正常であったことから、これらの植物体に誘導される不稔症状は雌性器官および雄性器官の成熟不全によるものと考えられた。

さらに、*tengu* 形質転換シロイヌナズナが 1) 雄性不稔と 2) 雌性及び雄性器官の成熟不全による不稔の二段階の不稔症状を呈することから、これらの表現型の違いが生じる原因を調べるため *tengu* 遺伝子の転写産物量を定量 RT-PCR 法により比較した。その結果 *tengu* 遺伝子の発現量は、雌性及び雄性不稔を呈する個体において雄性不稔の個体よりも有意に多いことが示された。このことから、*tengu* の発現量依存的に不稔症状の程度が変化している可能性が示唆された。

2. *TENGU* による不稔症状誘導機構の解析

オーキシン応答に関わる転写因子 *auxin response factor (ARF) 6 (At1g30330)* およびそのパラログである *ARF8 (At5g37020)* は雌性配偶体および雄性配偶体の成熟に働く遺伝子で、これらの遺伝子の二重変異体では蕾のまま花器官の成熟が止まる表現型が観察される。本研究では、*ARF6* と *ARF8* の二重変異体が *tengu* 形質転換体とよく似た表現型を示すことに着目し、OY ファイトプラズマ感染および *tengu* 形質転換シロイヌナズナにおいて *ARF6* と *ARF8* およびその下流で働く遺伝子の発現と植物ホルモンの内生量を調べ、宿主植物側から不稔症状の誘導機構に迫ることとした。

まず *ARF6* および *ARF8* の発現量を定量 RT-PCR 法により解析した結果、OY ファイトプラズマ感染シロイヌナズナと *tengu* 形質転換体のどちらの花序においてもこれらの遺伝子発現は有意に低下していた。さらに、*ARF6* および *ARF8* の下流で働くことが知られている *MYB21* (*At3g27180*) および *MYB24* (*At5g40350*) の発現量を解析したところ、OY ファイトプラズマ感染および *tengu* 形質転換シロイヌナズナにおいてこれらの発現はともに有意に低下していた。これらの結果から、*TENGU* はその異所的発現によりシロイヌナズナの花序において *ARF6* と *ARF8* およびその下流の遺伝子発現を低下させることが示唆された。

ARF6 および *ARF8* の二重変異体においてはそのジャスモン酸内生量が著しく減少することが報告されており、*tengu* 形質転換体においても *ARF6* および *ARF8* の発現低下によりジャスモン酸内生量が減少している可能性が考えられた。そこで *tengu* 形質転換体の花芽における内生のジャスモン酸 (*cis*-JA) およびそのアミノ酸縮合体であるジャスモン酸イソロイシン (*JA-Ile*) を定量したところ、これらの花芽では野生型と比べ *cis*-JA および *JA-Ile* の内生量が有意に低下していることが示された。さらに、既報のマイクロアレイ解析により *TENGU* がオーキシンのシグナル伝達または生合成経路を阻害する可能性が示唆されていることから、植物が産生する主要なオーキシンであるインドール-3-酢酸 (indole-3-acetic acid: IAA) を *tengu* 形質転換体の花芽において定量したところ、IAA 内生量は野生型と比べて *tengu* 形質転換体で有意に減少していた。したがって、*TENGU* はシロイヌナズナの花序におけるオーキシン内生量の減少にも寄与することが示唆された。以上の結果から、*tengu* 形質転換体においては *ARF6* および *ARF8* とその下流ではたらく遺伝子の発現が著しく低下し、植物体内の *cis*-JA、*JA-Ile* および IAA 内生量が減少していることが明らかとなった。

以上を要するに、本研究では OY ファイトプラズマの分泌タンパク質 *TENGU* がシロイヌナズナに不稔症状を誘導することを明らかにし、その不稔症状誘導機構に関する詳細な解析を行った。ファイトプラズマが分泌するエフェクター *TENGU* は、直接的または間接的に *ARF6* および *ARF8* の転写を負に制御し、その下流の遺伝子発現を低下させ内生の植物ホルモン量を減少させており、この結果花器官の成熟不全が起こって不稔症状が誘導されているものと考えられた。