

氏 名 (本 国 籍)	Md.Motaher Hossain (バングラデシュ人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 474 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物環境科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Physiological and Molecular Mechanisms of Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF)-Induced Systemic Resistance in Arabidopsis (植物生育促進菌類 (PGPF) により誘導されるシロイヌナズナの全身的抵抗性の生理・分子機構)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 百 町 満 朗 副査 岐阜大学 教授 小 山 博 之 副査 静岡大学 教授 露 無 慎 二 副査 信州大学 准教授 久 我 ゆかり

論 文 の 内 容 の 要 旨

植物生育促進菌類(plant growth-promoting fungi ; PGPF)は様々な植物の生育を促進するとともに、数多くの植物病原菌に対して全身誘導抵抗性(induced systemic resistance ; ISR)を誘導することが知られている。一方、ISR の生理・分子機構については根圏細菌で詳細に調べられているものの、PGPF ではほとんど研究されていない。本研究ではモデル植物であるシロイヌナズナを用いて PGPF の *Penicillium* sp. GP16-2、*P. simplicissimum* GP17-2、*Penicillium* sp. GP15-1 を前処理したときの *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) に対する ISR の有無を調べるとともに、全身誘導抵抗性の生理・分子防御機構を調べた。

シロイヌナズナを GP16-2、GP17-2、GP15-1 の含菌大麦粒 (BGI) を加えた土壌で生育させるか、あるいは上記の菌の培養濾液(CF)に根を浸漬処理することにより、*Pst* による病害進展が顕著に抑制された。すなわち、顕著な ISR が認められた。また、上記の菌の BGI 接種と CF 処理のいずれにおいても *Pst* の植物体中における増殖が顕著に抑制された。

Penicillium spp.とそれらの CF による ISR に関わるシグナル伝達経路を明らかにするために、シロイヌナズナの野生株 Col-0 とそれから派生したサリチル酸分解酵素遺伝子導入株である NahG、PR 遺伝子非発現変異株 *npr1*、ジャスモン酸非感受性変異株 *jar1*、エチレン非感受性変異株 *ein2* を供試した。

BGIを用いた実験からは、GP16-2によるISRのシグナリングはJAとETに依存し、さらにNPR1に依存したパターンをとるのに対し、GP15-1によるISRのシグナリングはETに依存するがNPR1には依存しないパターンをとることが明らかになった。このようにBGI接種により、菌が根に定着することで生じるISRではGP16-2とGP15-1の間でシグナル伝達のパターンが異なった。一方、それらのCFを処理した場合には、NahGや*npr1*、*jar1*、*ein2*のいずれの変異種においても野生株のCol-0と同様に*Pst*に対し顕著なISRを示した。すなわちGP16-2とGP15-1のCFによるISRはSA、JA、ET、あるいはNPR1の単一のシグナル伝達経路に依存しない同一のシグナル伝達パターンを示すことが明らかになった。これらの結果は、GP16-2とGP15-1の根への定着によるISRとそれらのCFによって誘導されるISRの防御シグナル伝達経路は部分的には重複しているものの、同一ではないことを示している。一方、GP17-2とそのCFによるISRはNahG、*npr1*、*jar1*、*ein2*のいずれにおいても認められた。しかし、GP17-2とそのCFによるISRの程度はいずれもNahGと*npr1*で明らかに野生株のCol-0に比べ低かった。このことからGP17-2とそのCFによるISRではSAのシグナル伝達経路の関与は大きくないことが示唆された。また、ISRにSA、JA、ETのマルチプルな伝達経路が関わっていると考えられるが、まだ知られていない他の経路に依存している可能性も否定できない。

CFによるISRに関するシグナル伝達経路をさらに明らかにする目的で、GP15-1のCFとカマレキシン(*pad1*、*pad2*、*pad3*、*pad4*、*pad5*)、オーキシシン(*ar1*、*aux1-7*)、エチレン(*myb72-1*、*myb72-2*、*eir1*)、アブシシン酸(*acd*)、マップキナーゼ4(*mpk4*)の生産能をそれぞれ欠失したシロイヌナズナの変異種株を用いてISRの有無を調べた。その結果、*pad1*を除いたすべての変異株でISRは誘導された。このことはシロイヌナズナにおいてGP15-1のCFによるISRには機能的なPAD1が重要な役割を担っていることを示唆している。

GP16-2とGP15-1のBGIを接種した場合、根と葉のいずれからも既知の防御関連遺伝子の発現は認められなかった。一方、GP17-2のBGIを接種した場合は、SA依存の*PR-2*と*PR-5*及びJA/ET依存の*PDF1.2*の発現が認められた。一方、GP16-2、GP17-2、GP15-1のCFを処理した場合は、SAとJA/ETの両方に依存する防御関連遺伝子の発現が認められた。GP17-2とGP15-1のCFでは、根と葉での防御関連遺伝子の転写レベルを比較すると葉の方が強かった。

GP16-2とGP15-1のBGIを接種し、菌が定着した植物に*Pst*を挑戦接種するとプライミング効果が見られ、病原菌接種後にJA/ETで誘導される*ChitB*とJAで誘導される*Vsp*の発現が著しく高まった。GP17-2が着生した植物に挑戦接種した場合には、JAで誘導される*Vsp*の発現にプライミング効果が認められた。一方、SAで誘導される*PR-2*と*PR-5*の発現は病原菌接種前から強くみられた。

GP16-2のCFを処理すると、SAに依存する*PR-1*、*PR-2*、*PR-5*とJA/ETに依存する*Vsp*の発現は病原菌を挑戦接種する前から強くみられたが、JA/ETに依存する*ChitB*と*Hel*ではプライミング効果が認められ挑戦接種後に強く発現した。GP17-2のCF処理後に、病原菌を接種した場合は大半の防御関連遺伝子(*PR-1*、*PR-2*、*PR-5*、*PDF1.2*、*Hel*)の強い発現がみられた。GP15-1のCFを処理した場合には、*PR-1*と*PR-2*でプライミング効果が認められ病原菌の挑戦接種後に強く発現したが、*PR-5*と*PDF1.2*は病原菌を挑戦接種する前から強く発現した。また、GP17-2とGP15-1のCF処理では病原菌接種後の初期の

段階で SA 依存の防御関連遺伝子の発現が上昇した後に、JA 依存の防御関連遺伝子の誘導が続いた。以上のように、*Penicillium* 菌株によって生じる ISR は菌株ごとに異なる防御機構で制御されていることが示唆された。

シロイヌナズナの異なる 76 種のエコタイプを用いて GP17-2 の CF で誘導される ISR の効果を比較した。エコタイプの約半数は CF 処理後に感染葉数、発病度、および病原菌増殖の減少を示した。このことは、シロイヌナズナの ISR にはエコタイプ特異性があることを示している。抑制の程度は感染葉数と発病度割合よりも病原菌増殖に顕著に現れた。Col-0 は CF 処理により *Pst* に対し最も高い ISR を示した。ISR が生じないエコタイプは一般的に *Pst* の感染に対する高い抵抗性を有していた。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文の公開学位論文発表会は、審査委員全員を含む関連教員や学生の出席者のもと、平成 20 年 1 月 21 日 (月) 午後 3 時より岐阜大学連合大学院棟 6F 会議室において実施された。本論文は、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて植物生育促進菌類 (PGPF) の *Penicillium* sp. GP16-2、*P. simplicissimum* GP17-2、*Penicillium* sp. GP15-1 を前処理したときの *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) に対する全身誘導抵抗性(induced systemic resistance ; ISR)の有無を調べるとともに、全身誘導抵抗性の生理・分子防御機構を調べたものである。その結果、以下の点が明らかになった。

1. シロイヌナズナを GP16-2、GP17-2、GP15-1 の含菌大麦粒 (BGI)の接種あるいは菌の培養濾液(CF)に処理することにより顕著な ISR が認められる。また、BGI 接種と CF 処理のいずれにおいても *Pst* の植物体中における増殖が顕著に抑制される。
2. BGI 接種により、菌が根に定着することで生じる ISR では GP16-2 と GP15-1 の間でシグナル伝達のパターンが異なる。一方、CF による ISR は SA、JA、ET、あるいは NPR1 の単一のシグナル伝達経路に依存しないシグナル伝達パターンを示す。GP15-1 の CF 処理により生じる ISR には機能的な PAD1 が重要な役割を担っている。CF による ISR では、根と葉での防御関連遺伝子の転写レベルが異なり葉の方が強く発現する。
3. GP16-2 と GP15-1 の BGI を接種し、菌が定着した植物に *Pst* を挑戦接種するとプライミング効果が見られ、病原菌接種後に JA/ET で誘導される *ChitB* と JA で誘導される *Vsp* の発現が著しく高まる。また、GP17-2 が着生した植物に挑戦接種した場合は、JA で誘導される *Vsp* の発現にプライミング効果が認められる。一方、SA で誘導される *PR-2* と *PR-5* の発現は病原菌接種前から強くみられる。
4. GP16-2 の CF を処理すると、SA に依存する *PR-1*、*PR-2*、*PR-5* と JA/ET に依存する *Vsp* の発現は病原菌を挑戦接種する前から強くみられるが、JA/ET に依存する *ChitB* と *Hel* ではプライミング効果が認められ挑戦接種後に強く発現する。GP17-2 の CF 処理後に、病原菌を接種した場合は大半の防御関連遺伝子(*PR-1*、*PR-2*、*PR-5*、*PDF1.2*、*Hel*)の強い発現がみられる。GP15-1 の CF を処理した場合は、

PR-1 と PR-2 でプライミング効果が認められ病原菌の挑戦接種後に強く発現するが、PR-5 と PDF1.2 は病原菌を挑戦接種する前から強く発現する。GP17-2 と GP15-1 の CF 処理では病原菌接種後の初期の段階で SA 依存の防御関連遺伝子の発現が上昇した後に、JA 依存の防御関連遺伝子の誘導が続く。

5. このように、*Penicillium* 菌株の含菌大麦粒の接種あるいは菌の培養濾液によって生じる ISR は菌株ごとに異なる防御機構で制御されている。
6. シロイヌナズナの異なる 76 種のエコタイプを用いて GP17-2 の CF で誘導される ISR の効果を比較した結果、シロイヌナズナの ISR にはエコタイプ特異性がある。また、ISR が生じないエコタイプは一般的に *Pst* の感染に対し、高い抵抗性を示す。

以上、本研究で得られた結果は、植物生育促進菌類の *Penicillium* spp. により植物に誘導される全身抵抗性の生理・分子防御機構に関する基礎的かつ重要な知見を提供しており、このことから、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. Md. Motaher Hossain, Farjana Sultana, Mayumi Kubota, Hiroyuki Koyama and Mitsuro Hyakumachi. 2007. The Plant Growth-promoting Fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 Induces Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Activation of Multiple Defense Signals. *Plant Cell Physiology* 48(12): 1724-1736
2. Md. Motaher Hossain, Farjana Sultana, Mayumi Kubota and Mitsuro Hyakumachi. Differential inducible defense mechanisms against bacterial speck pathogen in *Arabidopsis thaliana* by plant-growth-promoting-fungus *Penicillium* sp. GP16-2 and its cell free filtrate. *Plant Soil* (in press)
3. Md. Motaher Hossain, Farjana Sultana, Mayumi Kubota, Hiroyuki Koyama and Mitsuro Hyakumachi. Induction of systemic resistance by culture filtrate of a plant growth-promoting fungus (PGPF) *Phoma* sp. GS8-1 against bacterial leaf speck pathogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal General plant Pathology* (in press)