

オキシダティブバースト制御による耐病性植物作出に関する研究

吉岡博文 (名古屋大学大学院 生命農学研究科)

hyoshiok@agr.nagoya-u.ac.jp

植物病害は農業生産に多大な経済的被害をもたらしている。植物の免疫反応である活性酸素生産「オキシダティブバースト」に着目し、反応を担う酵素遺伝子を単離した。さらに、その制御遺伝子を活性化すると一連の防御機構が始動することを明らかにした。この機構を応用した植物免疫の向上による次世代型病害抵抗性作物を作出することで、安全性の高い作物の生産増加が期待される。

はじめに

農薬、化学肥料等の人工化学製品に依存する近代農業は、ポストハーベストや薬剤耐性菌出現などの問題を派生し、消費者に食の安全性への疑念を抱かせ、安心作物の栽培技術に農業者の関心を高める事態を引き起こした。病原菌の攻撃を受けた植物は、活性酸素を生産して積極的にこれを排除する免疫様反応を示す。これは急激な酸素の消費を伴うため、「オキシダティブバースト」と一般的に呼ばれている。本来感染できない非病原性微生物が感染行動をおこすと、オキシダティブバースト関連遺伝子が発現し、動的防御応答が誘導される。この防御応答を回避して感染できる能力を獲得した微生物が病原微生物ということになる。本研究は、この植物免疫機構を制御する遺伝子を利用した次世代型抵抗性作物作出の分子基盤を構築したものである。

オキシダティブバーストによる防御応答

局部的に発生した活性酸素種 (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$) は、防御遺伝子の活性化に関わるシグナル因子として機能するばかりでなく、何らかの移動性シグナルに変換されて感染部位から離れた組織にオキシダティブバーストを誘導し、全身的な抵抗性を付与する¹⁾。活性酸素種の増加は、直接的な殺菌作用、細胞壁でのヒドロキシプロリンに富む糖タンパク質の酸化的架橋反応の促進、PR タンパク質を誘導するサリチル酸生合成経路の活性化等により、病原菌の進展阻害に関与することが示されている。

NADPH オキシダーゼ

筆者らは、食細胞 NADPH オキシダーゼの活性中心 gp91^{phox} ホモログである *rboh* (respiratory burst oxidase homolog) cDNA をジャガイモ植物 (*Solanum tuberosum*) より単離した (*StrbohA* および *StrbohB*)²⁾。これら遺伝子の推定アミノ酸配列には、ヒト gp91^{phox} と同様に、FAD および NADPH 結合領域や、電子を受け渡すヘムとの結合に必要な4つのヒスチジン残基も共に保存されていた。また、その N 末端領域には Ca^{2+} と結合する EF ハンドモチーフが隣接して2カ所に認められた。このことは、*rboh* の活性制御に Ca^{2+} の細胞内への流入が深く関わることを示唆している^{3,4)}。*StrbohA* および *StrbohB* は、gp91^{phox} と同様の疎水性プロットを示すことから、6つの膜貫通領域を持つことが推定された。*StrbohA* および *StrbohB* mRNA の蓄積動向を調べた結果、前者は恒常的に発現し、後者はエリシターやサリチル酸で誘導されることが明らかとなった²⁾。

ウイルスによる遺伝子サイレンシングを利用した *rboh* の機能解析

ウイルス誘導型遺伝子サイレンシング (virus-induced gene silencing; VIGS) は、植物遺伝子の機能を解析する上で効果的な遺伝子ノックダウン法として近年注目を集めている。VIGS は、本来ウイルスに対する生体防御システムであり、ウイルス内の遺伝子とホモロジーの高い宿主遺伝子の転写産物が特異的に分解される。ジャガイモ X ウイルス (PVX) とベンサミアナ (*Nicotiana benthamiana*) の系は、逆行性遺伝学的な機能解析に有用である。筆者らは、*rboh* の活性酸素種生成への関与または病害抵抗性における役割を明らかにするために、PVX ベクターを用いて *StrbohA* および *StrbohB* に対応するベンサミアナの *NbrbohA*、*NbrbohB* を特異的にサイレンシングした⁵⁾。アグロバクテリウムをサイレンシング葉の細胞間隙に注入することで、ジャガイモ疫病菌由来のエリシターである INF1 を一過的に発現させたところ、サイレンシング区では過敏反応 (hypersensitive response; HR) 細胞死が抑制された。本来感染できないジャガイモ疫病菌を接種した結果、感染に成功した。さらに、いずれのサイレンシング区においても疫病菌侵入細胞における過酸化水素生成が抑制されていた。これらの結果は、*NbrbohA* および *NbrbohB* が活性酸素生成に関与し、活性酸素が防御反応を制御する可能性を示すものであろう。

MAPK による *rboh* 遺伝子の制御

MAPK (mitogen-activated protein kinase) カスケードは、真核生物において保存されている主要なシグナル伝達系路である。このリン酸化反応系は、MAPKKK (MAPK kinase kinase)、MAPKK (MAPK kinase)、および MAPK の 3 種類のタンパク質リン酸化酵素で構成されている。タバコ植物においては、SIPK (salicylic-acid induced protein kinase) および WIPK (wound-induced protein kinase) が防御応答において主役を担っている。筆者らは、ジャガイモの SIPK をリン酸化する *StMEK1* をジャガイモ植物より単離した⁶⁾。アミノ酸置換により恒常的活性型変異体 *StMEK1^{DD}* を作成し、アグロバクテリウムを介してベンサミアナ葉に一過的に発現させると、活性酸素の生成を伴った細胞死が起こること、SIPK および WIPK の活性上昇が起こることを確認した⁶⁾。

これらの結果は、MAPK カスケードが活性酸素の生成および細胞死を制御する可能性を示している。では、*NbrbohA* または *NbrbohB* をサイレンシングしたベンサミアナ葉で、*StMEK1^{DD}* 誘導による HR 様細胞死は起こるのであろうか。*NbrbohB* のサイレンシング区においては細胞死が抑制されたが、*NbrbohA* サイレncing区においては抑制されなかった。*StMEK1^{DD}* を発現させた葉組織より RNA を抽出して *NbrbohA* および *NbrbohB* の発現動向を調べると、MAPK カスケードの活性化は *NbrbohB* を転写レベルで誘導するようである⁵⁾。一方、タバコにおいて、活性酸素種処理は SIPK を誘導することが報告されている。これらの傍証より想定されるシグナル伝達経路を図 1 に示した。

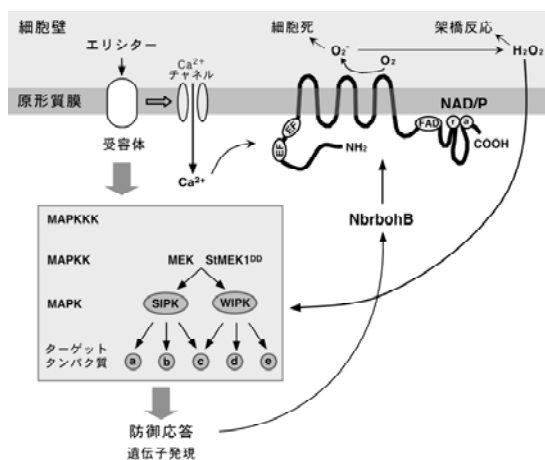


図 1 植物病原菌に反応するシグナル伝達経路の概念図

病原菌の攻撃は、MAPK カスケードを通じて *NbrbohB* を含む様々な防御遺伝子を活性化し、*NbrbohB* によって生産された H_2O_2 は SIPK および WIPK を活性化する。

親和性ジャガイモ疫病菌で誘導されるプロモーターを利用した耐性植物の作出

ジャガイモ疫病菌は、ジャガイモ植物に壊滅的被害をもたらす重要病原菌であり、農薬による防除も容易ではない。疫病菌耐性形質転換作物を作出するにあたり、上で述べた情報伝達系酵素 *StMEK1^{DD}* を発現させる戦略が考えられる。しかしながら、形質転換作物をデザインする上で、親和性ジャガイモ疫病菌の感染に応答する病原菌特異的プロモーターの存在が必須であろう。ジャガイモの *PVS* (*potato vetispiradiene synthase*) は

ファイトアレキシン合成に関与し、多重遺伝子族を形成している⁷⁾。これらメンバーの中で、ジャガイモ葉組織においても誘導される *PVS3* 遺伝子に注目し、推定プロモーター領域を単離した(特許出願中)。*PVS3* プロモーターの下流に *GUS* 遺伝子を連結し、疫病菌に対する真正抵抗性遺伝子を持たないマーカーを形質転換して本プロモーターの応答性について詳細に調べた。傷害に対する *GUS* の発現は認められず、成長点や根における恒常的な発現も観察されなかった。一方、親和性ジャガイモ疫病菌を葉組織に接種すると、6時間以内に *GUS* 活性が認められたため、予測どおり抵抗性植物の作出に利用できると確信した。さらに、以下の結果より *PVS3* プロモーターは *SIPK* により制御されるものと思われる。1) ジャガイモ植物にエリシター活性を示す疫病菌の菌体壁成分や膜成分であるアラキドン酸でジャガイモ組織を処理すると、*SIPK* が活性化され⁸⁾、同様に *GUS* 活性も誘導された。2) *StMEK1^{DD}* をアグロバクテリウムを介して一過的に形質転換葉組織で発現させた結果、*GUS* 活性が認められた。3) 非親和性疫病菌を葉組織に接種した場合に比べて活性は低いものであったが、親和性疫病菌接種の場合においても *SIPK* の活性化が観察された。

実際に *PVS3* プロモーターの下流に、*StMEK1^{DD}* 遺伝子を連結し、ジャガイモの形質転換体を作成した。この葉組織にジャガイモ疫病菌を接種したところ、発病は認められず、著しい抵抗性が確認された。想定される病害抵抗性機構を図2に示した。すなわち、親和性疫病菌の攻撃により誘導された *SIPK* は、*PVS3* プロモーターを誘導し、その下流に連結された *StMEK1^{DD}* が再び *SIPK* を活性化する。この活性化サーキットはオキシダティブバーストを誘導し、HR を引き起こすものと思われる。

おわりに

微生物由来の外来遺伝子を導入した作物の安全性に危惧を抱く消費者は多いが、ジャガイモ由来の *PVS3* プロモーターにジャガイモのシグナル伝達酵素遺伝子を連結して作出できる作物は、安心感の強い遺伝子組換え作物と言える。この次世代型病害抵抗性作物が、近い将来、食糧問題に貢献することを期待したい。

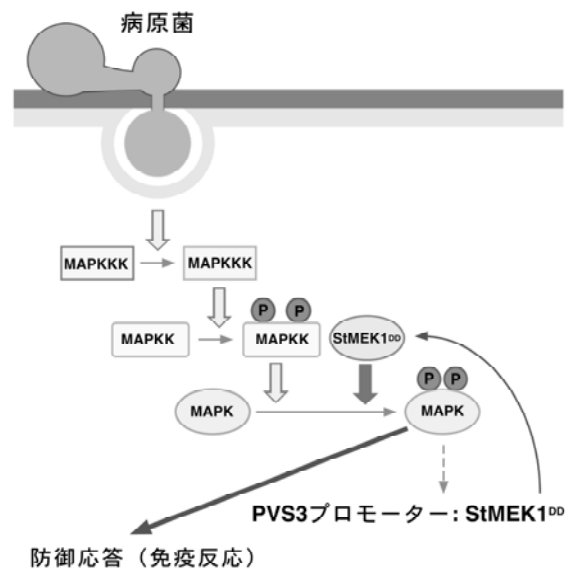


図2 形質転換ジャガイモ植物の抵抗性機構

病原菌の攻撃は、MAPK カスケードを通じて *PVS3* プロモーターを活性化し、*StMEK1^{DD}* を誘導する。*StMEK1^{DD}* は様々な防御遺伝子を活性化し免疫反応を引き起こす。

謝辞

本研究は、名古屋大学大学院生命農学研究科植物病理学研究分野で行われたものです。本成果は学生諸氏の努力の賜物であり、心から感謝いたします。研究を遂行するにあたり、終始御指導いただきました名古屋大学道家紀志教授、川北一人助教授に感謝いたします。また、この間ご指導いただいた諸先生方に厚く御礼申し上げます。さらに、現在の研究に御協力いただいている北海道農業研究センター畑作研究部、小林 晃博士ならびに研究室の皆様にも御礼申し上げます。本農学進歩賞に御推薦くださいました日本植物病理学会長、小島 誠先生ならびに学会の諸先生方に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Park H.-J., Miura Y., Kawakita K., Yoshioka H. and Doke N. (1998) Physiological mechanisms of a sub-systemic oxidative burst triggered by elicitor-induced local oxidative burst in potato tuber slices. *Plant Cell Physiol.* 39:1218-1225.
- 2) Yoshioka H., Sugie K., Park H.-J., Maeda H., Tsuda N., Kawakita K. and Doke N. (2001) Induction of plant gp91 *phox* homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:725-736.
- 3) Miura Y., Yoshioka H. and Doke N. (1995) An autophotographic determination of the active oxygen generation in potato tuber discs during hypersensitive response to fungal infection or elicitor. *Plant Sci.* 105:45-52.
- 4) Miura Y., Yoshioka H., Park H.-J., Kawakita K. and Doke N. (1999) Plasma membrane perturbation in association with calcium ion movement followed by fungal elicitor-stimulated oxidative burst and defense gene activation in potato tuber. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* 65:447-453.
- 5) Yoshioka H., Numata N., Nakajima K., Katou S., Kawakita K., Rowland O., Jones J.D.G. and Doke N. (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15:706-718.
- 6) Katou S., Yamamoto A., Yoshioka H., Kawakita K. and Doke N. (2003) Functional analysis of potato mitogen-activated protein kinase kinase, StMEK1. *J. Gen. Plant Pathol.* 69:161-168.
- 7) Yoshioka H., Yamada N. and Doke N. (1999) cDNA cloning of sesquiterpene cyclase and squalene synthase, and expression of the genes in potato tuber infected with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiol.* 40:993-998.
- 8) Katou S., Senda K., Yoshioka H., Doke N. and Kawakita K. (1999) A 51 kDa protein kinase of potato activated with hyphal wall components from *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiol.* 40:825-831.

Regulatory mechanisms of oxidative burst and production of transgenic plants showing tolerance to plant pathogens

Hirofumi Yoshioka (Graduate School of Bioagricultural Sciences Nagoya University)

hyoshiok@agr.nagoya-u.ac.jp