

ミニレビュー

植物の病傷害ストレス応答機構

—病虫害抵抗性作物作出に向けて—

大 橋 祐 子

農業生物資源研究所 分子遺伝部

Response Mechanism to Pathogen- and Wound-Stress in Plants —For Generation of Transgenic Plants Resistant to Pathogen- and Insect-Attack—

Yuko OHASHI

*Department of Molecular Genetics, National Institute of Agrobiological Resources, Kannondai, Tsukuba,
Ibaraki 305-8602, Japan*

緒 言

大地に根を張って生活する植物は、どのような厳しい環境ストレスに遭遇しようともその場から逃げることが出来ないため、花を付け種子を作るまでの一生を無事に終えるため、優れた自己防衛機構を進化させてきていると考えられている。これらの環境ストレス耐性のうち、耐病性は、病気に感染した植物や、病原体感染に抵抗性を獲得した植物の中で特異的に発現するタンパク質や遺伝子を解析する手法によって研究が進められてきた。特に、病原体に感染した宿主の細胞が病原体封じ込めのために積極的に病原体もろとも無理心中する反応、すなわち過敏反応（Hypersensitive Reaction or Response: HR）については、典型的な植物の抵抗性反応として興味を持たれ、現在その機構に関する遺伝学的・分子生物学的な研究が世界各国で行われ始めている。また、5年ほど前から、種々の病原体に対する抵抗性遺伝子が相次いで単離され、その構造から、HRの情報伝達系のメンバーとして働くのではないかと予想され、現在、植物の研究のなかでも最もホットな部分となっている。

植物が本来有している病原体感染に対する抵抗性の機構を明らかにする研究の進展は、抵抗性発現に関与する遺伝子を利用して、有用作物にさらなる、または新たな病害抵抗性を付与するという、応用面の可能性を示すものである。ここでは、最初に植物の持つ病害抵抗性発現の機構に関してその情報伝達機構も含めて、著者らが行ってきた研究の周辺について概説し、次に、抗菌性タンパク質遺伝子導入による新たな病害抵抗性植物作出に関する研究について述

べる。

過敏反応に伴う PR タンパク質の誘導

侵入してきた病原体の増殖・拡大を防ぐため、感染細胞が過敏細胞死を起こすと、その結果として壊死病斑が出来る。この病斑形成は、病斑周辺のみならず、同じ植物の未感染部位に病原体の再感染に対する抵抗性を誘導する。病斑周辺には多くの低分子物質が新たに合成され、そのうち、サリチル酸、ジャスモン酸、エチレンは、病斑周辺の組織で特異的に誘導される感染特異的タンパク質（Pathogenesis-related protein: PR タンパク質）を誘導する。PR タンパク質は、双子葉、単子葉を問わず広範な植物種で同定されているが、タバコモザイクウイルス（TMV）に感染した TMV に抵抗性のタバコ（N 遺伝子を有する）について、最も詳しい研究が行われ、表 1 に示したように、そのアミノ酸配列や機能から、最近、14 族に分類されるようになった¹⁾。現在、タバコからは 30 種類以上が発見されている。PR-2 は、 β -1,3 グルカンナーゼ活性を、PR-3 はキチナーゼ活性を有することが発見され、これらの酵素が、病原糸状菌の菌糸の構成多糖成分である β -1,3 グルカンやキチンを実際に分解する活性を示すことが *in vitro* で示された。さらに、これらの遺伝子を導入し過剰発現させた形質転換タバコにおいて、これらの遺伝子由来のタンパク質の発現の程度と病原体に対する抵抗性に相関性が見られることが示された。これらの抵抗性は種々の病原体に対して同じではなく導入遺伝子由来の特異性を持っているようである。すなわち、それぞれ固有の機能を有している多種の PR タ

表1 PR タンパク質の分類表

族	メンバーのタイプ	分子量	特 性
PR-1	タバコ PR-1a	14-17 kDa	抗カビ性
PR-2	タバコ PR-2,N,O	31-35	β -1,3-グルカナーゼ
PR-3	タバコ P,Q	27-34	クラス I,II キチナーゼ
PR-4	タバコ "R"	13-20	クラス V キチナーゼ
PR-5	タバコ R	24-26	thaumatin 様
PR-6	トマトインヒビター	6	プロテイナーゼインヒビター
PR-7	トマト P	69-70	エンドプロテアーゼ
PR-8	キュウリキチナーゼ	28	クラス III キチナーゼ/リゾチーム
PR-9	タバコペルオキシダーゼ	35-40	ペルオキシダーゼ
PR-10	パセリ "PR1"	18	RNase 様
PR-11	タバコキチナーゼ	41-43	クラス V キチナーゼ
PR-12	ダイコン Rs-AFP3	4	デイフェンシン
PR-13	アラビドプシス THI2.1	5	チオニン
PR-14	オオムギ LTP4	10	リピッドトランスファータンパク質

L. C. van Loon & E. A. van Strien: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85-97 (1999).

ンパク質が病斑形成とともに一度に新たに誘導されることによって、植物は総合的に病原体感染に対する抵抗性を獲得するものと考えられる。

HR や傷害によるシグナル物質の生産と PR タンパク質の誘導

前述の、病斑形成により誘導される抵抗性は、局部獲得抵抗性 (Localized Acquired Resistance: LAR) と全身獲得抵抗性 (Systemic Acquired Resistance: SAR) に分けて呼ばれるが、この発現にはシグナル物質としてサリチル酸 (Salicylic acid: SA) が関与していると考えられている。実際、HR にともなって SA のレベルが病斑部やそこから離れた部分でも上昇するし、植物に人為的に SA を与えてから病原体を感染させると、その増殖が阻害される。SA によって誘導される PR タンパク質は、酸性の等電点を持つグループであり、誘導されてから細胞の外に分泌され、細胞間隙に貯えられる。これらタバコ酸性 PR-1 から PR-5 については、アミノ酸の配列上かなりの相同性を持つ塩基性カウンターパートタンパク質があることが分かっている。これら塩基性 PR タンパク質は、成熟タバコ葉において傷によって誘導を受けるが、ジャスモン酸 (Jasmonic acid: JA) やエチレンを人為的に与えても誘導され、細胞内の液胞に貯められる。しかし、SA では誘導されない。JA やエチレンは傷害処理によって実際に誘導されるが、SA は誘導されない。興味深いのは、酸性の PR タンパク質群は、JA、エチレン及び傷によっては誘導されず、塩基性 PR タンパク質遺伝子とは全く異なった誘導特性を有していることである。JA の生成は SA 共存下では阻害され、SA の生成は JA 共存下では阻害されること、また、JA による塩基性 PR 遺伝子の発現誘導は SA の共存下では阻害され、SA による酸性 PR 遺伝子の発現は JA によって阻害されるとい

う拮抗関係が存在することも明らかにされている²⁾。我々は、傷による JA シグナル伝達系は、傷誘導性の MAP キナーゼによって制御されており、この遺伝子の働きが抑えられたタバコでは、傷によって JA ができずに SA が生成すること、さらにこの植物は TMV 感染に抵抗性であり、タバコにおける TMV 抵抗性は SA シグナル伝達系によって正に制御されていることを示した³⁾。

植物病原細菌に対する植物の抵抗性

植物病原細菌に一旦感染してしまった植物は、廃棄するか、抗生物質農薬の投与を行うかが一般的な方策といわれる。しかし、抗生物質の野外での大量投与は、環境汚染・耐性菌の出現などで問題である。病原細菌に対する植物側の抵抗性反応としては、前述の抵抗性遺伝子を介した過敏反応 (HR) が知られているが、その病原菌に対する抵抗性遺伝子を持たない植物には、効果がないであろう。また、細菌病に対する有用な抵抗性遺伝子を有する遺伝資源が限られているという実態がある。そこで、広範な病原細菌の増殖を抑えられるようなタンパク質を生産する遺伝子が利用できれば、これを植物に導入することにより、より有用な細菌病抵抗性植物の作出が可能になるものと考えられる。特に、広範な病原体に効果があれば、圃場抵抗性の付与にもつながる。

抗菌性タンパク質・ペプチド

病原体感染によって形成される壊死病斑の形成と共に特異的に誘導されてくる PR タンパク質は、病原体の増殖・拡大や再感染に対する抵抗性誘導に重要な働きを担っていると考えられている。しかし、現在までに明らかになっている対象病原体のほとんどは糸状菌である。すなわち、これらの遺伝子を導入して作出された植物の抵抗性は、ある種

の糸状菌に対してであった。現在、農作物の被害の8割以上が糸状菌によるものと考えられている。したがって、タバコで明らかになったPRタンパク質の機能が、最重要病害である糸状菌病を標的にしていたとしても不思議は無い。しかし、最近、タバコPRタンパク質の中にも、細菌の細胞壁を分解するリゾチーム様活性を有するキチナーゼが認められ、病原細菌をもその標的にしていることが推定できた。タバコから種々の特性を持つキチナーゼをコードする遺伝子が単離されてきている。これらのキチナーゼは糸状菌や細菌の細胞壁の構造の違いで作用に差があるらしい。また、局在性も同じではない。精製されたタンパク質を用いての *in vitro* 実験で主要病原糸状菌や病原細菌の増殖阻害実験、または基質特異性解析などによるタンパク質の機能解明が求められている。しかし、細菌を用いた *in vitro* におけるタンパク質の生産は、これらが糖タンパク質であるがゆえに難しく、また、植物から多量に精製することも容易ではないため、断片的な情報しか得られていない。したがって、これらの遺伝子を直接植物に導入してそのタンパク質を過剰発現させ、実際に病害抵抗性を試してみなければ明らかでないという面がある。

抗菌性タンパク質に関する研究は、昆虫の分野で研究蓄積が多い。昆虫は脊椎動物の重要な自己防御機構である免疫系は有していないが、ハチ毒に見られるような様々な抗菌性ペプチド類を持っており、これらが恒常的にまたは傷誘導的に合成され、細菌病に対する抵抗性因子として働いている。それでは、植物にも昆虫で発見されたような抗菌性ペプチドはあるのだろうか。最近、植物でも昆虫由来の抗菌性ペプチドと良く似た構造を有するペプチドをコードする遺伝子が発見され、遺伝子組換えによる耐病性植物作出に向けての素材として注目を浴びるようになってきた⁴⁾。

1. セクロピン類

セクロピアサン由来のセクロピンは、熱安定性の分子量約4,000のペプチドであり、多くの同族体を有し、日本で発見されたセンチニクバエ由来のザルコトキシン類もこのグループに属する。これらの中でも、ザルコトキシンⅠや、カイコ由来のセクロピンBは、比較的広い抗菌スペクトラムを持ち、グラム陰性菌のみならずグラム陽性菌両者に幅広い殺菌作用を持つ⁵⁾。この種のペプチドはまだ植物からは発見されていないが、豚の小腸から発見されており、動物界には広く分布することが明らかになった。我々は植物病原細菌に対するザルコトキシンⅠAの効果を調べたところ、重要病害細菌を含む広範な種類の細菌に殺菌作用を示すことがわかった⁶⁾。また、は、カイコ由来のセクロピンBが、根頭がんしゅ病菌 (*Agrobacterium tumefaciens* N1001)、麦黒節病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *japonica*) などの病原細菌の増殖を抑える効果を持つことも明らかに

されている⁷⁾。

2. デイフェンシン類

この抗菌性ペプチドは、哺乳類の白血球、マクロファージおよび小腸から発見され、後に昆虫に存在することが明らかになったもので、セクロピン同様、分子量が約4000の耐熱性のペプチドである。これらはシステインを多く含んでおり、グラム陽性菌に対してより強い殺菌効果を示す。最近、植物の種子から単離された抗糸状菌活性を持つペプチドが、他の生物由来のデイフェンシンと相似のアミノ酸配列を持ち、さらに同様の立体構造をとることが明らかにされ、植物デイフェンシンと総称されるようになった。この中では小麦種子中に含まれるガンマチオニンが有名であり、S-S結合している8個のシステインを有する。

3. チオニン

チオニンはS-S結合している8個のシステインを有するタイプと、同じく6個のシステインを有するタイプとからなる、45~47個のアミノ酸を有するペプチドで、前のタイプは広範な植物病原細菌やある種の糸状菌に対して抗菌活性を示すことが明らかになっており、病原菌の膜の透過性を変化させることがその作用点と考えられている。オオムギでは胚乳、葉および根の細胞壁または液胞で検出されるが、同じ植物中で異なる遺伝子が器官特異的な発現をしているらしい。

4. リピッドトランスファープロテイン

LTP (Lipid Transfer Protein) は、90~93アミノ酸からなるペプチドで、やはりS-S結合している8個のシステインを含んでいる。その抗菌活性は様々だが、チオニンがあまりグラム陰性菌には効果が無いのに比較して、グラム陽性菌にも効果があるものがある。このペプチドは表皮の細胞壁におおく検出され、オオムギの葉由来のものは水で簡単に洗い出せるという。

抗菌性ペプチド遺伝子を導入した形質転換植物 における耐病性の獲得

現在、細菌病抵抗性植物作出に用いられる遺伝子の数は限られており、その特性解明が行われているものは少ない。演者らは *in vitro* で植物病原細菌の増殖を阻害するセンチニクバエ由来のザルコトキシンⅠA遺伝子をタバコに導入して、細菌病耐性の組換え植物が出来るかどうかの試みを行ってきた。実験を始めた当初は、まだ昆虫由来の抗菌性ペプチドを用いた実験の報告はなかったが、1993年に、改変セクロピンB遺伝子を導入したタバコが、細菌病 (*Pseudomonas solanacearum*) に一定の抵抗性を有することが報告された。我々は *in vitro* の実験から、センチニクバエ由来の種々の抗菌性ペプチドのうちザルコトキシンⅠAが最も効果がありそうだと判断した。次に本遺伝子の発現効率を上げるための遺伝子改変をまず考えたが、アミノ酸

コードの使用特性を考慮に入れても、改変による効果はあまり多くないと思われたため、そのままの形で使用することにした。このペプチドは2つの α -ヘリックス構造を持ち、その一方が2量体として細胞膜中に入り込み、膜に穴をあけることで殺菌性を示すので、特殊な細菌のみではなく、広範な種類の細菌に殺菌効果を示す可能性があると考えられ、逆に、このペプチドを高濃度で植物に作らせた場合に、植物に害を与える可能性も示す。そこで、タバコおよびイネのけん濁培養細胞の増殖に及ぼす影響を調べたが、培地に100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加しても、全く影響がなかった。

導入遺伝子の構築は、出来るだけ多量のペプチドを細胞内で生産させ、細胞外に分泌させることを目的にして行った。このためには、我々の研究室で構築し、組換えタバコを用いてその発現特性、発現レベルを詳細に調べた高発現プロモーターカセットを用いた。このプロモーターはタバコでは、恒常的な高発現活性を示すカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターの少なくとも10倍は強い活性を示すことが確認されている。その発現は恒常的で、組織を選ばず強い発現を示す⁸⁾。

アグロバクテリウム感染を介してこの高発現プロモーターの下流にザルコトキシンIA遺伝子を連結したキメラ遺伝子をタバコに導入し、カナマイシン耐性個体を選抜した。さらに、ノーザン解析により導入遺伝子の確認ができた個体について、自家受粉させて得た次世代の植物を用い、タバコ野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) および軟腐病菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) に対する抵抗性の検定を行った。針接種により展開葉に感染させ、病斑の拡大の少ないものを選抜した結果、再現性のある抵抗性をいくつかの植物で確認できた。抵抗性は、タンパク質レベルでの発現と相関していた。次にこの野火病抵抗性個体について、軟腐病菌耐性実験を試みた。この病原細菌は非常に広範な作物に軟化・腐敗症状を引き起こす重要病害であり、感染部位に局在化せず容易に全身に蔓延する。葉ディスクを切り抜き、低濃度の軟腐病菌を含むをシャーレ中でゆっくり振とうしながら保温すると、非組換え体では容易に細菌に侵されて水浸状になってしまうが、野火病に抵抗性を示した個体からとった葉ディスクは、これに耐性を示した。これらの結果は、抗菌性ペプチド遺伝子導入により植物に一定の病害抵抗性を付与させ得ることを示している⁶⁾。最近、我々はザルコトキシン発現タバコ植物の芽生えがある種の糸状菌感染に対しても抵抗性を示すことを発見した⁹⁾。

デイフェンシン、チオニンおよびLTP遺伝子を導入し、過剰発現させた形質転換植物で、種々の病原体感染に対する耐病性が増大したことが報告され始めた。我々も、エンバク由来のチオニン遺伝子をイネで高発現させることによ

り、イネ立枯細菌病にたいする抵抗性を付与することができた¹⁰⁾。今後、これらの手法を用いて、どの程度まで実用に耐えるような病害抵抗性が付与できるのか興味深い。

おわりに

新たな耐病性を付与させるため作物に外来遺伝子を導入しようとする試みは、今、盛んに行われている。21世紀を目前として、地球環境の悪化を防止し、改善を行っていくために、また、確実に予想される人口の増加とそれに伴う食糧難に備えて、新たな考え方に基いた、効率優先のみではない新しい農業が求められており、其の意味でも、遺伝子組換え植物は大きな可能性を持っている。実際、外来遺伝子を植物中で発現させることにより、当初予想されたような新たな形質が付加されている現実を見ると、目を見張る思いがする。現在、我々が遺伝子組換えに利用できる素材は限られている。単離されてはいてもその特性の明らかではない遺伝子が大部分であり、機能解析に関する研究の進展が望まれる。また、はっきりした育種目標をたてた上での新しい素材遺伝子探しも必要であろう。目的に合うプロモーターを用い、目的に合う有用タンパク質を、何時、どこで、どの程度の量作らせるかを制御出来るような組換え植物を作り出すことが理想だが、それは、決して不可能なことではない。そのためには、上述のように、植物の病気にに対する抵抗性の機構に関する研究など、基礎研究の進展が必要である。本来植物の持っている抵抗性を損なうことなく、さらに増強させるように、自然に逆らわず、スマートに有用形質を付加し、誰もが納得できるような有用植物を作りたいものである。組換え植物の解析が詳細に行われるに従って、かなり頻繁に導入遺伝子の不活性化が起こることが明らかになってきた。これも解決しなければならない問題である。本当に有用な植物を作出するためには、現在の植物科学の研究レベルの大幅な向上、研究者の有用植物を作ろうとする熱意、これをサポートする体制の確立が必要と思われる。

ここで紹介した筆者らの研究は、生物研 光原一朗、岩井孝尚、加来久敏の諸氏、北陸農試 大島正弘氏、農研センター 松田 泉氏、農環研 西山幸司氏、理研 名取俊二氏をはじめとする多くの方々との共同研究によって行われた。記して心より感謝の意を表する。

引用文献

- 1) L. C. van Loon & E. A. van Strien: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, 85-97 (1999)
- 2) T. Niki, I. Mitsuhashi, S. Seo, N. Ohtsubo & Y. Ohashi: *Plant Cell Physiol.* **39**, 500-507 (1998)
- 3) 大橋祐子・瀬尾茂美: 植物工学別冊 植物細胞工学シリーズ **3**, 193-205 (1995)
- 4) W. F. Broekaert, B. P. A. Cammue, M. F. C. De Bolle, K.

Thevissen, G. W. De Samblanx & R. W. Osborn: *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**, 297-323 (1997)

- 5) 名取俊二・本間光一：化学と生物 **35**, 484-490 (1997)
- 6) M. Ohshima, I. Mitsuahara, M. Okamoto, S. Sawano, K. Nishiyama, H.Kaku, S. Natori & Y.Ohashi: *J. Biochem.* **125**, 431-435 (1999)
- 7) 谷合幹代子・山川 稔: 植物防疫 **48**, 329-332 (1994)
- 8) I. Mitsuahara, M. Ugaki, H. Hirochika, M. Ohshima, T. Murakami, Y. Gotoh, Y. Katayose, S. Nakamura, R. Honkura, S. Nishimiya, K. Ueno, A. Mochizuki, H. Tanimoto, H. Tsugawa, Y. Otsuki & Y. Ohashi: *Plant Cell Physiol.* **37**, 49-59 (1996)
- 9) 光原一郎・大島正弘・大橋祐子：化学と生物 **37**, 205-209 (1999)
- 10) T. Iwai, R. Honkura, S. Nakamura, I. Mitsuahara, H. Kaku

& Y. Ohashi: XVI Int. Bot. Cong., St.Louis, USA, Abstract p. 674 (1999)

略 歴

大橋祐子

生年月日：昭和16年8月13日

略 歴：昭和41年3月 名古屋大学農芸化学科修士課程修了

同4月 農林省植物ウイルス研究所入所

昭和58年12月 農水省農業生物資源研究所細胞育種部

平成8年10月 同分子遺伝部上席研究官

研究テーマと抱負：植物の病傷害ストレス応答機構の解明
趣 味：園芸