

学位論文題名

Study for control of plant disease resistance
by genetic engineering

（遺伝子工学による植物病害抵抗性の制御に関する研究）

学位論文内容の要旨

近年、植物病原体に対抗する手段として、抗菌性タンパク質をコードする遺伝子を利用して、病害抵抗性が増強した植物を作出することが可能になってきた。しかし遺伝子工学による病害抵抗性作物は、未だ実用化されておらず、これは一つには発現する抵抗性の弱さに起因すると考えられる。遺伝子工学を用いて分子育種を行う利点は、種を越えた遺伝子を、形質転換できる作物ならば基本的にどの作物にも、短期間に導入することができる点にある。しかし、遺伝子組換え作物は、それに対するパブリックアクセプタンスが得られにくいのが現状である。従って遺伝子工学を利用した病害抵抗性作物を実用化するためには、抵抗性の強さもさることながら、用いる遺伝子の安全性にも留意しなければならない。

本研究の目的は、植物の病害抵抗性を制御する足掛かりになる基礎的知見を得ることにある。そのために新規な抗微生物活性を有するタンパク質、あるいは植物の防御反応を誘導するタンパク質性エリシターを同定し、それらの性質を解析した。さらに、それらを分子育種へ応用するために遺伝子をクローニングし、植物で発現させ、病害抵抗性を制御する能力を含めた機能を解析した。具体的には、植物抵抗性反応の下流で機能すると考えられる防御関連タンパク質キチナーゼ、最も上流で機能するタンパク質性エリシター、ハーピンを新たに同定し、それらの性質を分析し、植物における機能を解析した。また食用キノコから、新規抗菌性タンパク質として過酸化水素を発生させる酵素を同定し、その諸性質を明らかにした。

具体的には第二章において、まずイネ (*Oryza sativa* L.) の雌蕊からクローニングされたキチナーゼに関して述べた。イネの穎の内部は開花と同時に無菌的状态から、外部環境に晒される。しかしこの過程で雌蕊等が病原菌に侵されることは稀であり、生殖器官特異的な防御機構の存在が示唆される。実際、これまでに双子葉植物では花器で特異的に発現する防御遺伝子が単離されていた。本研究で同定されたキチナーゼ遺伝子はディファレンシャルスクリーニングでクローニングされ、コードするタンパク質は、その構造からクラス I キチナーゼに分類され、組換えタンパク質は、実際にキチナーゼ活性を示した。本遺伝子は、イネの雌蕊、雄蕊、鱗被の伸長または拡大中の組織で強く発現し、葉や根などの器官では殆ど発現していない、つまり植物の花器で特異的に発現する初めてのクラス I キチナーゼ遺伝子であった。キチナーゼは菌類の細胞壁構成成分の一つであるキチンを分解する溶菌酵素である。これまでにも植物キチナーゼを用いた病害抵抗性の増強例が報告されている。そこで本遺伝子を高発現カセットに接続し、イネに導入し、本遺伝子を葉で高発現している形質転換イネを作出し、病害抵抗性を調査した。その結果、紋枯れ病菌 (*Rhizoctonia solani*) に対するわずかな抵抗性が観察された。しかし、そのレベルはまだ低く、実用化には他の抗菌タンパク質との同時発現が必要と考えられた。

第三章では、より強力な抗菌性タンパク質を見出すため、菌類、特に食用キノコから、抗菌性タンパク質の選抜を行った。これまでに食用キノコ類からの抗菌性タンパク質の研究例はほとんど知られていない。菌類を用いた理由は、菌類の溶菌タンパク、例えばキチナーゼは、植物のそれに比較し、活性が高いためである。また食用キノコを用いたのは、菌類の中でも食品として安全性の高いものを材料に選定したためである。この研究では、食用キノコ類から抗菌性を有するタンパク質を見だし、その遺伝子を作物で働かせ、抵抗性を付与する技術を開発することを目標とする。これが成功すれば、食品として安全性が高く、しかも低農薬で栽培可能な作物を作出することが可能になる。まず、イネの最重要病害であるいもち病菌、紋枯れ病菌を用いた *in vitro* 抗菌アッセイ系を確立した。これを利用して、食用キノコ群の選抜を行ったところ、マツタケ (*Tricholoma matsutake*) の子実体に非常に強い抗菌活性を見出すことができた。マツタケに見出された高い抗菌活性はタンパク質によるものであることが分かり、そのタンパク質を精製したところ、その部分アミノ酸配列がピラノースオキシダーゼという酵素と同一性を示した。さらに精製したマツタケ抗菌タンパク質には実際に強いピラノースオキシダーゼ活性があることが判明した。この酵素は、糖を酸化する過程で過酸化水素を発生させる酵素であり、この過酸化水素が抗菌活性の原因であることを突き止めた。前述の如く、過酸化水素は植物の防御反応において、直接的な抗微生物活性の他、防御反応のシグナル分子としても働く。マツタケピラノースオキシダーゼを、病害抵抗性の分子育種に利用するため、その遺伝子をクローニングした。これまでに植物にグルコースオキシダーゼを導入し、植物に過酸化水素を発生させ、複合病害抵抗性を付与した例が報告されている。ピラノースオキシダーゼも同様の戦略が応用できると考えられる。

第四章では、植物病原細菌由来のタンパク質性エリシターであるハーピンを導入した植物に関して述べる。エリシターは植物抵抗性反応の最上流のスイッチを入れる分子であり、ハーピンを植物で発現させると、上述の一連の抵抗性反応が作動し、広いスペクトラムの病害抵抗性を与える可能性がある。これまでに、ハーピンを注入あるいは噴霧処理した植物では、全身獲得抵抗性が誘導され、病原体に対する抵抗性が增強することが示されていた。しかしながら、ハーピン遺伝子を発現する形質転換植物は報告されていなかった。本研究ではライラック枝枯れ細菌病 (*Pseudomonas syringae* pv *syringae* LOB2-1) 由来のハーピン遺伝子をクローニングし、植物で作動するプロモーターに接続、タバコ (*Nicotiana tabacum*) とイネに導入した。その結果、ハーピンを細胞内に高発現する植物は形態的に正常で、種子稔性も正常範囲であった。形質転換タバコの葉に、うどんこ病菌 (*Erysiphe cichoracearum*) を接種したところ、興味深いことに、4-5日で、過敏感反応様の壊死斑が形成された。壊死斑の生じた個体の多くにおいて、うどんこ病に対する抵抗性が增強していた。防御関連タンパク質群 (PR-1a, Q, S) の発現誘導は、非組換え体に比較し、組換え体の方が早かった。ハーピンは細胞膜の外側で認識されると考えられているので、以上の結果の説明の一つとして、植物細胞内に蓄積していたハーピンが、病原菌感染によって細胞外に流出し、そこで初めて植物に認識され、抵抗性反応が流れた、という推論が可能である。一方、ハーピンを導入したイネでは、過敏感反応は観察されなかったものの、いもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) に対する有意な抵抗性が確認された。以上の結果から、ハーピン導入によって、タバコでは過敏感反応と誘導抵抗性が、イネでは誘導抵抗性が付与されたことが示された。こうして、細菌のタンパク質性エリシターであるハーピンの遺伝子を発現させることによる病害抵抗性付与の可能性がはじめて実験的に示された。

本研究を通じ、植物の花における防御遺伝子の特異的発現、担子菌における防御因子としての役割を担い得る過酸化水素発生酵素の存在が明らかとなり、それらの遺伝子による植物の改良の可能性が指摘さ

れた。さらに植物-微生物相互作用に重要な役割を果たすエリシター分子が、植物種を越えて効果のあることが判明し、その作用機作の一端を解明することが出来た。即ち、自然界の多様な防御機構は、種を越えて効果のある可能性が指摘され、一部についてはその潜在能力を明示することが出来た。これらの知見はパブリックアクセプタンスの問題が解消された後、品種育成、特に病害抵抗性の分子育種に大きく貢献できると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 芳 雄
副 査 教 授 三 上 哲 夫
副 査 教 授 増 田 税
副 査 助 教 授 貴 島 祐 治

学 位 論 文 題 名

Study for control of plant disease resistance by genetic engineering

(遺伝子工学による植物病害抵抗性の制御に関する研究)

本論文は、112ページからなる英文で、別に3編の参考論文が添えられている。植物病原体に対抗する手段として、抗菌性タンパク質遺伝子を利用して、病害抵抗性を増強する新育種法の開発が期待されている。有用遺伝子を、形質転換により種を越えて利用する試みは、組換え作物としての利用のみならず病害抵抗性の機作の解明によって新たな防除法を確立できる可能性も高く、その潜在的意義について注目される。本研究は、病害抵抗性制御法の開発を目的として、植物抵抗性反応の下流で機能する防御関連タンパク質を新たに同定し、植物における機能を解析したものである。得られた結果は以下のように要約される。

1) イネ (*Oryza sativa* L.) の雌蕊から単離したキチナーゼの抗菌性

イネの穎内部は開花後無菌的状态から病原菌に晒されるが、防御機構の存在により病原菌の被害を受けることは少なく、双子葉植物では花器特異的に発現する防御遺伝子が報告されている。本研究では、イネの雌蕊からディファレンシャルスクリーニングによりキチナーゼ遺伝子を単離した。そのタンパク質は構造からクラスIキチナーゼと考えられ、キチナーゼ活性を示した。この遺伝子は、雌蕊、雄蕊、鱗被の伸長中の組織で強く発現し、他の器官では殆ど発現していなかった。したがって、この結果は花器特異的に発現するクラスIキチナーゼ遺伝子として最初の報告となる。キチナーゼは細胞壁構成成分のキチンを分解する溶菌酵素であり、植物キチナーゼを用いた病害抵抗性の増強例が報告されている。そこで病害抵抗性との関連性を検討するために、本遺伝子をイネに導入し高発現する形質転換イネを作出した。紋枯れ病菌(*Rhizoctonia solani*)に対するわずかな抵抗性が観察されたが、実用化には他の抗菌タンパク質との同時発現が必要と考えられた。

2) 食用キノコからの抗菌性タンパク質の選抜

抗菌性タンパク質の活性は、菌類では高等植物に比べ高いことが報告されているが、食用キノコ類の抗菌性タンパク質についてはほとんど知られていない。本実験では菌類の中でも食品として安全性の高いものとして食用キノコ類の抗菌性タンパク質を取り上げた。

まず、イネの最重要病害であるいもち病菌、紋枯れ病菌を用いた *in vitro* 抗菌アッセイ系を確立した。このアッセイ系を利用して、食用キノコ群の探索を行ったところ、マツタケ (*Tricholoma matsutake*) の子実体から強い抗菌活性を見出すことができた。マツタケに見出された高い抗菌活性はタンパク質によるものであることが分かり、そのタンパク質を精製し構造解析したところ、アミノ酸配列の一部がピラノースオキシダーゼと相同性を示した。さらに、マツタケ抗菌タンパク質が高いピラノースオキシダーゼ活性をもつことを証明した。病害抵抗性への育種利用にむけて、マツタケピラノースオキシダーゼ遺伝子を単離した。この酵素は、糖を酸化する過程で過酸化水素を発生させ、植物の防御反応において、抗微生物活性の他、防御反応のシグナル分子としても働くことが期待される。

3) 植物病原細菌由来のタンパク質性エリシター・ハーピンの抗菌性

エリシターは植物抵抗性反応の最上流で機能する分子であり、広いスペクトラムの病害抵抗性に関与する可能性がある。これまでに、ハーピンの投与により植物の全身獲得抵抗性が誘導されることが判明しているものの、ハーピン遺伝子を導入した形質転換植物についての報告はない。本研究ではライラック枝枯れ細菌病 (*Pseudomonas syringae* pv *syringae* LOB2-1) 由来のハーピン遺伝子を単離し、タバコとイネに導入し発現させることに成功した。これら形質転換植物の発育形態は正常で、種子稔性も正常であった。形質転換タバコの葉に、うどんこ病菌 (*Erysiphe cichoracearum*) を接種したところ、4-5日で、過敏感反応様の壊死斑が形成され、防御関連タンパク質群の発現も早く誘導された。一方、ハーピンを導入したイネでは、過敏感反応は観察されなかったものの、いもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) に対する有意な抵抗性が確認された。以上の結果から、ハーピン導入によって、タバコでは過敏感反応と誘導抵抗性が、イネでは誘導抵抗性が付与されたものと考えられた。本結果は、植物-微生物相互作用に重要な役割を果たすエリシター分子が、植物種を越えて効果のあることを実証するものである。

以上のように、自然界の多様な防御機構が、種を越えて効果ある可能性が指摘され、その潜在能力を一部証明した。これらの成果は病害抵抗性の新たな育種にむけて重要な知見を与えるものと評価される。よって審査員一同は、高倉由光が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。