

細菌病抵抗性トランスジェニック植物の作出

明治大学農学部植物病理学研究室 **よね** **やま** **かつ** **よし**
 農林水産省野菜・茶業試験場育種第一研究室 **米** **山** **勝** **美**
ぬの **め** **つ** **つかさ**
布 **目** **司**

はじめに

植物細菌病は防除が困難で、特に果樹、野菜では難防除病害の一つとされている。これは、現在まで細菌病に対する有効な薬剤が開発されていないことが一因といえる。一方、細菌病防除薬剤の開発面からみると、植物体内に深く生息する病原細菌に効果を示し、かつ完璧に退治しないと残存菌が直ちに増殖を開始し発病を引き起こすことから、細菌病に対する優れた薬剤を開発することはきわめて難しい。また、たとえ有効な薬剤が開発されたとしても、耐性菌の出現による医薬品との交差耐性など、社会的問題も考慮しなければならない。このような点から、細菌病の防除には抵抗性品種の育成が最善の策であるが、これまで多くの努力が重ねられてきたにもかかわらず、残念ながら依然として満足のいく品種が少ないのが現状である。

こうした状況から、近年の新しい展開として遺伝子操作技術を応用した抵抗性品種の作出研究が世界的に注目されている。実際に除草剤や植物ウイルス病に抵抗性の植物など数多くのトランスジェニック植物が作出され、すでに実用化に向けた研究が進展している。植物細菌病に関しても、筆者ら(1989)のタバコ野火病菌に対する抵抗性トランスジェニックタバコの作出を端緒として、表-1に示すように毒素耐性遺伝子、植物の動的病害防御関連遺伝子等を導入した細菌病抵抗性トランスジェニック植物が作出されている。

ここでは、筆者らが行った毒素耐性遺伝子の導入による細菌病抵抗性トランスジェニック植物の作出を中心に、その手法について紹介する。

I トランスジェニック植物の作出法

細菌病抵抗性トランスジェニック植物の作出は、基本的には目的とする抵抗性遺伝子を微生物、植物、動物等から単離し、この遺伝子を対象植物に導入・発現させて病害抵抗性を付与する。この場合、抵抗性を付与するためにいかなる遺伝子を利用するかが大きな課題で、アイ

Creation of Transgenic Plants Resistant to Bacterial Diseases. By Katsuyoshi YONEYAMA and Tsukasa NUNOME

デアの求められるところである。これまで作出された手法についてみると、以下のようである。

(1) 病原毒素に対する耐性の付与

病原菌の産生する毒素を分解あるいは修飾する酵素遺伝子、または病原毒素に耐性の標的酵素遺伝子を植物に導入、発現させ、抵抗性を付与する。この方法は、以下に述べる方法に比べて抵抗性遺伝子の探索が比較的容易であり、また耐性植物における病害抵抗性も強く、遺伝的にも長期的に安定しているなどの特徴がある。さらに細菌病ばかりでなく、病原毒素が病徴発現の主要因となる菌類病に対しても広く応用することができる。

(2) 植物の動的病害防御機構の増強

植物と病原菌の相互作用に関連する遺伝子、例えば病原細菌の非病原性遺伝子等を導入して植物の動的防御反応を補強したり、あるいはそれらの機構に関与する物質の遺伝子を新たに導入、発現させることにより、病害抵抗性を増強する。菌類病抵抗性では、ファイトアレキシン合成酵素やキチナーゼ、グルカナーゼ等のPRタンパク質の遺伝子を導入したトランスジェニック植物が作出されている。

(3) 抗菌性物質産生能の付与

植物病原細菌に対して特異的に抗菌性を有する物質、特にタンパク性抗菌物質(リゾチーム、アタシンE等)

表-1 細菌病抵抗性トランスジェニック植物の作出例

病名	供与遺伝子	植物	文献
タバコ野火病	タブトキシン不活化酵素遺伝子	タバコ	米山ら(1989)
インゲンかさ枯病	ファゼオロトキシン耐性酵素遺伝子	タバコ	DE LA FUENTE et al. (1992)
		タバコ	HATZILOUKAS & PANOPOULOS (1992)
		インゲン	DE LA FUENTE et al. (1993)
リンゴ火傷病	アタシン-E 遺伝子	リンゴ	布目(1994) NORELLI et al. (1993)
タバコ立枯病	非病原性遺伝子	タバコ	HUANG et al. (1993)

の遺伝子を植物に導入・発現させることにより、病原菌の増殖を抑制する。ただしこの場合、抗菌性物質の人畜毒性などが問題になる恐れがあるので注意を要する。

II 病原毒素に対する耐性トランスジェニック植物

植物病原菌の産生する毒素は、その選択性によって宿主特異的毒素と非特異的毒素に分けられるが、これまで単離されている植物病原細菌の毒素はすべて非特異的毒素である。非特異的毒素は、宿主はもちろんのこと、宿主以外の植物にも広く毒性を有する。宿主特異的毒素とは違って、毒素が病原性を一次的に決定するものではないが、病徴の発現、宿主の代謝異常など加害因子として重要な役割を果たしている場合が多い。このように毒素が主要な加害因子となり植物細菌病が引き起こされる場合、病原毒素に対する耐性を植物に付与することにより細菌病抵抗性植物を作出できるものと期待される。以下に、毒素解毒酵素遺伝子の利用によるタバコ野火病抵抗性タバコ、及び毒素耐性標的酵素の利用によるインゲンかさ枯病抵抗性植物の作出例を述べる。

1 タバコ野火病抵抗性タバコ

タバコ野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) の産生する毒素タブトキシンは、タバコの葉に処理すると野火病に特徴的な黄色斑を形成することから、毒素の作用と病徴の発現とが密接に関係している。本毒素はグル

タミン合成酵素を阻害し、タバコを含む多くの植物や微生物に作用を示す。しかし生産菌である野火病菌に対しては全く作用しないことから、野火病菌は自己の産生する毒素タブトキシンに対して何らかの特異的な耐性機構を有するものと推測される。そこでこの自己耐性機構に関与する遺伝子を病原菌自体からクローニングすることを試みた。

図-1 に示すような手法で、*P. syringae* pv. *tabaci* からゲノム DNA を抽出し、制限酵素で切断後タブトキシン耐性遺伝子をクローニングした結果、タブトキシン耐性を示す 2 種の DNA 断片が得られた。これらクローン化された DNA の機能について調べたところ、一つはタブトキシンアセチル化酵素遺伝子 (*ttr*) を含む約 2 kbDNA で、他はグルタミン合成酵素遺伝子をもつ約 11 kbDNA であることが明らかになった。前者の 2 kbDNA を断片化して活性のある約 700 bp の DNA 断片を得た後、塩基配列を決定した。その結果、本遺伝子 DNA は 531 bp からなり、その産物は 177 個のアミノ酸残基よりなる分子量約 19,200 のタンパク質であると推定された。本遺伝子を *ttr* と命名した。

このタブトキシン耐性遺伝子を植物ベクター pBI 121 の β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子と置換してカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35 S プロモーターで発現できるようにプラスミド pARK 21 を構築した。この構築プラスミドを大腸菌から *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 へ接合伝達し、pARK 21 をもつ *A. tumefaciens* を得た後、無菌培養したタバコの葉のディスクに感染させ、選択マーカーを含む MS 茎葉分化培地 (BAP 1.0 mg/l, IAA 0.1 mg/l 添加) で培養して植物体を再生した。分化した幼タバコ植物における *ttr* 遺伝子の染色体 DNA への組み込みをサザン解析により、またその遺伝子発現をノーザン解析により検定し、転写活性の強いクローン 5 株を選び、タブトキシン含有 MS 培地でのカルス形成能及びタバコ野火病抵抗性を調べた。

P. syringae pv. *tabaci* (10^7 細胞/ml) をトランスジェニックタバコ及び対照タバコに 2 針接種して、ポット内で 25°C、照明下で発病させた場合、約 1 週間後対照のタバコでは野火病に典型的な黄色病斑が現れたが、トランスジェニックタバコでは供試した 5 クローンのいずれにおいても黄色病斑は全く認められなかった。つまり、*ttr* 遺伝子を有するトランスジェニックタバコはタブトキシンに対する耐性ばかりでなく、タバコ野火病に対しても抵抗性であることが明らかとなった。

なお、本実験の詳細については植物防疫 43 巻 12 号

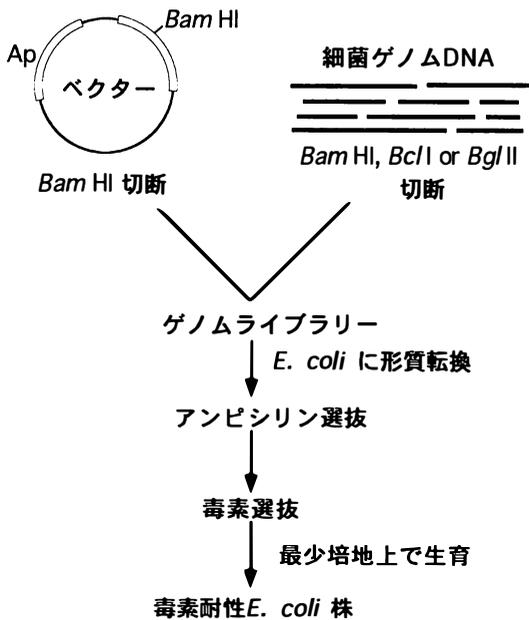


図-1 毒素耐性遺伝子のクローニング法 (Bam HI 切断の例)

(米山・安西, 1989) を参照されたい。

2 インゲンかさ枯病抵抗性植物

インゲンかさ枯病菌 (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) の産生する毒素ファゼオロトキシンは、インゲンのほか多数の植物葉に黄化を誘導するとともに、大腸菌を含む多くの微生物にも抗菌性を有する。本毒素は図-2に示すようにオルニチン回路におけるオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (OCTase) に作用し、アミノ酸の一種アルギニンの生合成を阻害する。しかし、生産菌であるインゲンかさ枯病菌はファゼオロトキシンによって全く生育阻害を受けないことから、病原菌自体からファゼオロトキシン耐性遺伝子をクローニングすることを試みた。

タバコ野火病菌の場合と同様の手法で (図-1), インゲンかさ枯病菌のゲノム DNA を制限酵素で切断し、ベクターに挿入後、大腸菌を形質転換し、ファゼオロトキシン耐性株を得た。これらの耐性大腸菌株についてクローニング遺伝子の機能を調べるため菌体及び菌体抽出液とファゼオロトキシンを反応した結果、いずれの場合にも毒素の分解あるいは不活性化は認められず、クローニングされた遺伝子は毒素の解毒に関与しないことがわかった。

ところで、インゲンかさ枯病菌には P_{EET} et al. (1986) 及び MOSQUEDA et al. (1990) によりファゼオロトキシンに対して感受性と非感受性の2種類の OCTase が存在することが報告されている。そこで、ファゼオロトキシン非感受性の OCTase 遺伝子がクローニングされたものと想定して制限酵素地図を作成したところ、MOSQUEDA et al. により報告されている遺伝子と完全に一致し、本遺伝子はファゼオロトキシン非感受性 OCTase 遺伝子 (*argK*) であると決定された。このファゼオロトキシン耐性 OCTase 遺伝子を常法に従い、アグロ感染法によりタバコに導入してトランスジェニックタバコを作出したが、強い毒素耐性を示す植物は得られなかった。その理由として、植物の OCTase は本来葉緑体内に局在しているが、導入したファゼオロトキシン非感受性 OCTase は

細胞質に存在するため強い耐性を発揮しないものと考えられた。

さらに、OCTase タンパク質を葉緑体へ移行させるため、ファゼオロトキシン非感受性 OCTase 遺伝子の上流にタバコのトランジットペプチド遺伝子を融合することを試みた。図-3に示すような方法により、PCR 法でタバコゲノム DNA をテンプレートとして Rubisco の小サブユニットのトランジットペプチド遺伝子を増幅するとともに、ファゼオロトキシン非感受性 OCTase 遺伝子の5'末端部分を増幅し、これら両 DNA を再び PCR 法により融合した。この融合 DNA について塩基配列を確認後、さらに OCTase の残りの部分を結合し、トランジットペプチドと OCTase の完全な融合遺伝子を構築した。この遺伝子を植物発現ベクター pBI 121 の GUS 遺伝子と置換することで CaMV の 35 S プロモーター下流に挿入し、プラスミド pMY 6 を構築した。この構築プラスミドを用いて融合遺伝子をアグロ感染法によりタバコ植物へ導入した。得られたクローンについて、サザーン及びノーザン解析により *argK* 遺伝子の染色体への組み込み及び発現を調べ、遺伝子発現の強い株を選抜した。これらクローンについて、ファゼオロトキシン含有 MS 培

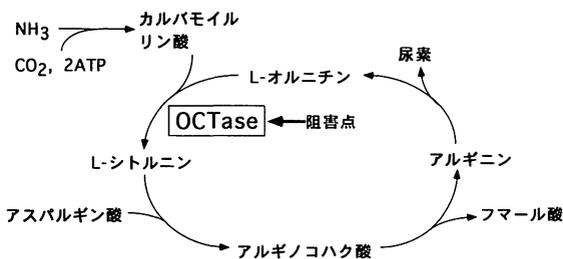


図-2 オルニチン回路とファゼオロトキシンの阻害点

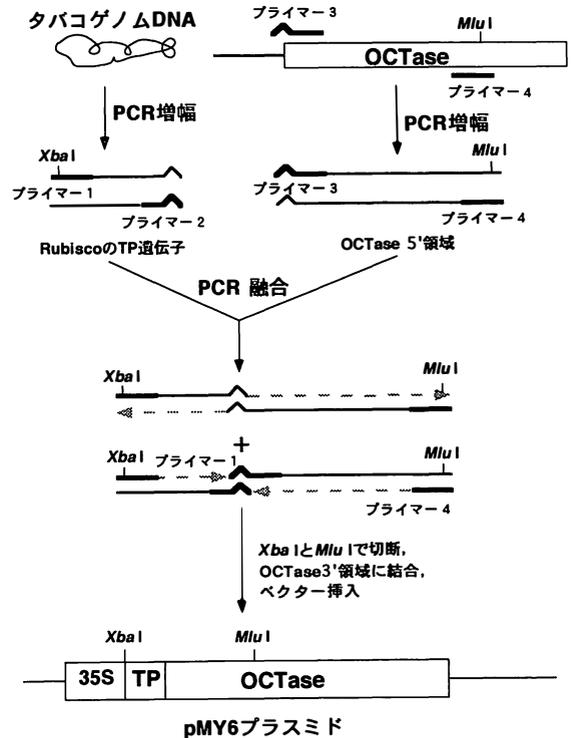


図-3 Rubisco のトランジットペプチドと OCTase の融合遺伝子の作出

地におけるカルス形成能を調べた結果、いずれも活発なカルス形成が認められ、ファゼオロトキシン耐性であることが示された(布目, 1994)。

De LA FUENTE et al. (1992, 1993) は同様の方法でエンドウの Rubisco 小サブユニットのトランジットペプチド遺伝子と *argK* 遺伝子を融合した遺伝子をタバコ及びインゲンに導入し、トランスジェニック植物を作出した。このトランスジェニックインゲンに *P. syringae* pv. *phaseolicola* を接種したところ、強い過敏反応を起こし、インゲンかさ枯病に対して高い抵抗性を示した。

また、キウイフルーツかいよう病菌がファゼオロトキシンと類似した毒素を産生することから、現在、筆者らはキウイフルーツに *argK* 融合遺伝子を導入し、かいよう病抵抗性トランスジェニック植物の作出を試みている。最近、澤田ら (1995) はキウイフルーツかいよう病菌からクローニングした *argK* 遺伝子の塩基配列がインゲンかさ枯病菌の *argK* 遺伝子と全く同一であることを報告している。

III その他の細菌病抵抗性植物

1 細菌の非病原性遺伝子の利用

HUANG et al. (1993) は、*P. syringae* pv. *tomato* の非病原性遺伝子 *avrD* 及び *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* の非病原性遺伝子 *avrRxv* を植物の動的防御反応に関与する遺伝子のプロモーターに結合してタバコで発現させたところ、タバコの立枯病、野火病などに対して抵抗性が増大したという興味ある結果を報告している。ただ、*avrD* 遺伝子を発現したカルス及びトランスジェニック植物では正常な生育を示したが、*avrRxv* 遺伝子を導入したカルスの50%がネクロシスを生じ、非病原性遺伝子の利用にはまだ問題が残されているようである。

2 抗菌性タンパク質遺伝子の利用

NORELLI et al. (1993) は昆虫の *Hyalophora cecropia* の体液に存在する抗菌性タンパク質アタシン-Eの遺伝子をリンゴに導入したところ、リンゴ火傷病の発生が抑制されたと報告している。

おわりに

病原毒素に耐性のトランスジェニック植物の細菌病抵抗性を中心に述べたが、植物に遺伝子を直接導入して病害抵抗性を付与する手法は、従来の交雑による抵抗性品種の育成とは基本的に異なる新しい戦略である。現在のところ、細菌病抵抗性トランスジェニック植物の作出はまだ基礎的、モデル実験の段階である。しかし、除草剤抵抗性植物やBT遺伝子による害虫抵抗性植物の例からみて、目的の植物品種に対し単一または数種の遺伝子を導入することにより比較的簡単に抵抗性を付与することができるため、研究の積極的な推進を図るならば実用品種の開発も時間の問題である。

今後、農業上栽培される野菜や果樹等の種類がしだいに多様化してくる傾向があり、栽培面積が少なく採算性の低い防除薬剤の開発に企業的研究努力をあまり期待することはできない。こうした状況からみると、病害抵抗性トランスジェニック植物の研究はこれからの農業における植物保護の新たな展開として期待される面は大きいであろう。

引用文献

- 1) 米山勝美・安西弘行 (1989): 植物防疫 43 (12): 635~638.
- 2) ANZAI, H. et al. (1989): Mol. Gen. Genet. 219: 492~494.
- 3) ——— et al. (1990): Nucleic acids Res. 18: 1890.
- 4) DE LA FUENTE, J. M. et al. (1992): Bio/Technology 10: 905~909.
- 5) ——— et al. (1993): Abst. 6th Intl. Cong. Plant Path.: 23.
- 6) HATZILOUKAS, E. and PANOPOULOS N. J. (1992): J. Bacteriol. 174: 5895~5909.
- 7) HUANG, Y. et al. (1993): Abst. 6th Intl. Cong. Plant Path.: 188.
- 8) MOSQUEDA, G. et al. (1990): Mol. Gen. Genet. 222: 461~466.
- 9) NORELLI, I. et al. (1993): Abst. 6th Intl. Cong. Plant Path.: 190.
- 10) 布目 司 (1994): 明治大学農学研究科修士論文.
- 11) PEET, R. C. et al. (1986): J. Bacteriol. 166: 1096~1105.
- 12) 澤田宏之ら (1995): 日本植物病理学会大会講要, 東京, pp. 110.