# 抗菌性ペプチドを利用した細菌病抵抗性植物の作出

おおしま まさひろ おおはし ゆうこ 農林水産省農業生物資源研究所 **大島 正弘・大橋 祐子** 

#### はじめに

バイテク技術によって植物を病害から守るため様々な 試みが行われている。その中で害虫、糸状菌、ウイルス については他の筆者が解説するような方法論の有効性が 認識され、実用化に向けて研究が進められているところ である。一方、バクテリアによって引き起こされる病害 については農業上重要な問題であるにもかかわらず、こ れを防除するのは容易ではなく、通常は罹病株を抜き取 って焼き捨てるか抗生物質等の薬剤の使用しかないのが 現状である。また従来の育種手法によって抵抗性品種を 作出することも、適当な交配母本を選択することが難し

筆者らは遺伝子組換えの手法を用いて、細菌病に抵抗 性の植物を作出することができないかと考え、研究を行 っている。その戦略として, 異種の生物から殺菌活性を 持ったタンパク質の遺伝子を取り出し、これを植物に導 入することによって植物自体が細菌を侵入のごく早い段 階で殺してしまうような能力をもつことができれば、そ れによって細菌病抵抗性を付与することができるのでは ないかと考えた。このような殺菌活性を持ったタンパク 質はこれまでに各種の昆虫をはじめ、哺乳類まで多くの 生物から見いだされており(Lee et al., 1989; Kimbel, 1991),かなり普遍的な存在であると考えられる。中でも 昆虫は、免疫系を持たない代わりに、自己防御のための 様々なメカニズムを発達させていると考えられており、 実際、様々な種類から様々な性質を持つ抗菌活性タンパ ク質が発見されていて、未開封の宝箱といえる。抗菌活 性タンパク質遺伝子を、遺伝子組換えによってモデル植 物に導入した例としては、既にアメリカスタンフォード 大学のグループが発表したヤママユガの一種から得た抗 菌性ペプチドを利用し、青枯病抵抗性のタバコを作出し た研究が知られている (Jaynes et al., 1993)。しかし、 これはまだ実用化のレベルには達しておらず, 世界的に も発展途上の技術である。本稿では、筆者らの行ったザ ルコトキシンIA を用いた、細菌病抵抗性のタバコ作出 経過の概要について紹介したい。

Development of Disease Resistant Plant by the Using of Anti-bacterial Peptide. By Masahiro Ohshima and Yuko Ohashi

## I ザルコトキシン IA 殺菌活性タンパ ク質について

筆者らが殺菌性タンパク質の遺伝子素材として用いた のは、わが国に普遍的に生息するハエの一種であるセン チニクバエ (Boettcherisca peregrina) から東京大学薬学 部の名取俊二教授らによって単離されたザルコトキシン IA である (Okada and Natori, 1983; Okada and Natori, 1985)。これは図-1 に示すように、39 個のアミノ酸から 構成されるごく短いタンパク質なので、以下では抗菌性 ペプチドと呼ぶこととしたい。既に三次元構造が決定さ れており、それによると、ザルコトキシン IA は二つの  $\alpha$ ヘリックス領域を持ち, ヘリックスの片側が親水性, 反 対側が疎水性という顕著な性質を持っている。このよう な性質を両親媒性といい、昆虫由来の殺菌性タンパク質 の一部に見られる特徴的な構造である。このタンパク質 はバクテリアの細胞膜にイオノフォアとして働き、膜に 穴を開けることで殺菌活性を示すと考えられている。そ のため, このような殺菌活性タンパク質に対して, バク テリアが耐性を獲得するのはかなり困難であると考えら れ、これを利用することができれば有効な技術になるこ とが期待される。

このタンパク質の遺伝子を植物に導入するのに先だって、これが植物の病原細菌にも有効であるか否かを検討した結果を表-1に示す。これは、各種の植物病原細菌に対する殺菌活性を阻止円法で検定したものである。この

Met-Asn-Phe-Gin-Asn-Ile-Phe-Ile-Phe-Val-Ala-Leu-Ile-Leu-Ala-Val Phe-Ala-Gly-Gin-Ser-Gin-Ala-Gly-Trp-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lus-Lys Ile-Glu-Arg-Val-Gly-Gin-His-Thr-Arg-Asp-Ala-Thr-Ile-Gin-Gly-Leu Gly-Ile-Ala-Gin-Gin-Ala-Ala-Asn-Val-Ala-Ala-Thr-Ala-Arg-Gly



図-1 ザルコトキシン IA の一次構造および三次元構造 の模式図

アミノ酸配列のうち、斜体で示した部分はシグナルペプチドでありペプチド自体の成熟に伴って除去される。また C 末端のグリシンも除去され、アミド化されたアルギニンが C 末端となっている。()内の数字は N 末端の Met を 1 としたときの数値。

### 表 - 1 ザルコトキシン IA が有効な植物病原細菌のリスト

Pseudomonas cichorii Pseudomonas syringe pv. tabaci Xanthomonas campestris pv. vitians Xanthomonas campestris pv. pruni Xanthomonas campestris pv. oryzae Xanthomonas campestris pv. citri Erwinia carotovora subsp. carotovora (ハクサイ軟腐病菌)

(レタス腐敗病菌) (タバコ野火病菌) (レタス斑点細菌病菌) (モモせん孔細菌病菌) (イネ白葉枯病菌) (カンキツかいよう病菌)

Escherichia coli (大陽菌)

ペプチドは元来大腸菌に増殖阻害作用を持つことがわか っていたが、検定の結果、このリストにある植物病原細 菌にも同程度もしくはそれ以上に有効であることがわか った。青枯病菌 (Pseudomonas solanacearum) に対して は無効であったが、この理由については今のところ不明 である。

次の実験として, このペプチドの植物に対する安全性 を確認した。タバコおよびイネの培養細胞に添加したと ころ、 $100 \mu g/m l$  という高濃度であって、細胞の外に存 在する時には、植物細胞の増殖になんら影響を及ぼさな いことがわかり、このペプチドを抵抗性植物作出という 目的で用いることが有効であると予想された。

#### Ⅱ 殺菌活性タンパク質の植物への導入

本遺伝子を用いて細菌病抵抗性の植物を作出するた め,実験植物としてタバコを用い,通常のバイナリーベ クター法を用いて導入した。その際, 予備的な実験から, 植物の形質転換実験でよく用いられるカリフラワーモザ イクウイルス 35S 遺伝子(以下, 35S と略す)のプロモ ーターを用いた実験では、ほとんど抵抗性が認められな かったことから, 発現量を高めることが非常に重要であ ろうと判断し, 当所で開発した双子葉植物用高発現プロ モーター(光原ら,1996)を用いて改変した。このプロ モーターは、35Sプロモーター内のエンハンサーを含む と考えられる領域を二つタンデムにつなぎ、さらにタバ コモザイクウイルスゲノム上の非翻訳領域に存在する翻 訳促進配列 ( $\Omega$  配列) をつないだものであり、元のプロ モーターの発現特性を反映して,植物体のほとんどの組 織で恒常的に,元の35Sプロモーターに比べて十倍以上 の高い発現を起こすことができる。図-2に、このように して作製したキメラ遺伝子の構造を示した。この遺伝子 をタバコに導入し、ノーザンブロッティングによってそ の発現が確認できた植物の自殖次世代の植物群を用意し て、これらを対象として細菌病抵抗性の検定を行った。

#### En35S P35S Q Sig Sarcotoxin Tnos En35S

#### 図-2 タバコに導入されたザルコトキシン IA 遺伝子の構造

En 35 S は 35 S プロモーターのうち, エンハンサーを含むと 考えられる-419から-90まで、P35Sはコアプロモーター (-90 から-1 まで)を示す。 $\Omega$  はタバコモザイクウイルスの 翻訳促進領域, Tnos は Ti プラスミド上のノパリン合成酵素 遺伝子のターミネーター配列であり、Sig は PR-IA 遺伝子の シグナルペプチド、Sarcotoxin は成熟ペプチドの配列を示す。

#### Ⅲ 野火病菌の感染に対する抵抗性の検定

野火病はタバコの細菌病の一つであり、Pseudomonas syringae pv. tabaci によって引き起こされる。この細菌 は、増殖する際にタブトキシンと呼ばれる特有の毒素を 生産するため、感染部位周辺に黄色のハローができるの が特徴であり, 気象条件等によっては激しいまん延をも たらすことがあり、しばしば大きな問題となる病害であ る。しかし一方では、この病気の特徴として感染が罹病 部に留まり、肉眼的にも観察しやすいこと、またすぐに は全身感染による供試株の枯死を起こさないことから、 抵抗性検定に適した細菌であると考えられた。

このような研究では適切な検定法の開発が重要である ので, 農林水産ジーンバンク保存の菌株から適当な株を 選び、さらに様々な接種条件を検討した。その結果、最 も強い病原性を示した株をインジケーターとし、鋭利な 針を植え込んだ接種器具を用いて、完全に展開した葉の 中で最上位にあたる葉に穴を開け、そこに 108 細胞/ml の濃度に調整した菌懸濁液を接種することで安定的に病 徴を出せることがわかったので、以後この条件で抵抗性 の検定を実施した。このような検定を多数の形質転換植 物を対象に計4回行い,常に抵抗性を示した株を選抜し た。図-3 および図-4 はその結果の一部であり、接種後約 10日経った接種部位である。コントロールの植物では 図-3のように感染が進行し、明瞭なハローが形成される が,遺伝子導入植物では図-4に示すように,接種に用い た針の傷跡が残るのみで感染は成立していないと考えら れる。実際の実験では、この両者の中間の様々な程度の 罹病性/抵抗性を示す個体が認められた。抵抗性を示した 株ではウェスタンプロット分析によりタンパク質レベル でザルコトキシン IA が発現していることを確認してい

### IV 軟腐病抵抗性の検定

先に野火病抵抗性を示した個体について, 別の細菌病 である軟腐病に対する抵抗性の検定を行った。この病気



図-3 タバコ野火病菌接種約10日後の接種部位 (コントロールとして用いた非形質転換植物)

はハクサイ,キャベツ,その他種々の作物の病害で, Erwinia carotovora subsp. carotovora によって引き起こ され、葉や葉柄などが軟化・腐敗し、独特の悪臭を発す る重要病害である。この細菌は先の野火病菌と異なり、 接種部位から全身に急速に拡大する危険性があり、また 安定した病徴発現のためには高い湿度が必要である。そ こで、植物体についた状態の葉に直接接種する代わりに 切離葉に対して野火病菌と同様な方法で接種した後、湿 らせたペーパータオルの上にのせ、密閉チャンバー中で 27°Cでインキュベートすることによって病徴発現(接種 部位の腐敗化)の程度を評価した。図-5にその結果の一 部を示した。コントロールの植物あるいは抵抗性に無関 係と考えられる大腸菌の $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)を 導入した植物では、図-5のように急速に病徴が出現・拡 大し, 腐敗症状を示しているのに対し, 先に野火病に対 して抵抗性を示した個体では明らかに病徴発現の程度が 軽減されていた。

さらに定量的な評価をするため、葉の一部を切り出し 軟腐病菌懸濁液の中でインキュベートしたところ、遺伝 子導入植物のうち、先の実験で抵抗性を示した個体では 軟腐症状の出現が明らかに遅れることが確認でき、この 菌に対しても抵抗性であることが示された。

また、先の殺菌活性の検査で無効と判断された青枯病菌についても、様々な条件の下で抵抗性検定を行ってみたが予想どおり無効であり、この菌に対しては抵抗性を示さないことが確認できた。

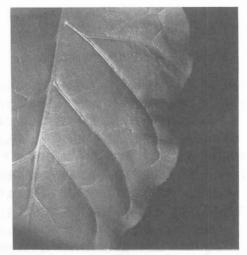


図-4 タバコ野火病菌接種約10日後の接種部位 (形質転換植物での結果)

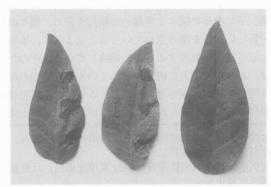


図-5 軟腐病菌接種部位に生じた病徴 左はコントロールとして用いた非形質転換植物,中は GUS 遺伝子を導入した形質転換植物,右はザルコト キシン IA 遺伝子を導入した形質転換植物。

#### V 遺伝子の発現レベルと抵抗性の関係

抵抗性を示した形質転換植物と、コントロールの植物を交配し、遺伝学的な解析を行った結果、強い抵抗性を示した植物はザルコトキシン遺伝子をホモで(2個)持っているものであることがわかった。これらの植物と野生型タバコとの戻し交配で得られた植物は弱い抵抗性しか示さず、ゲノム当たりの遺伝子の数によって規定されるザルコトキシンの発現量の差が抵抗性発現に重要であることが示唆された。この知見は35Sプロモーターを用いてもほとんど抵抗性が観察されなかったことと符合する。このことを踏まえ、今後さらに導入遺伝子の発現量を増加させたり、植物体内での安定性を増加させるなど

の方策を取ることによって,抵抗性をより強化すること が可能ではないかと考えている。

#### おわりに――今後の展開方向について

この研究により、当初に考えた戦略が有効であり、こ の方法によって細菌病抵抗性植物が作り出せることが示 された。しかし、今回の実験はまだ不完全なものであっ て、今後この方法を実用化していくためには、導入遺伝 子の発現強化,発現様式についての検討が必要であろう。 すなわち、全身的・構成的発現から、必要な時に罹病部 およびその周辺に誘導的に生産させる方法など、より自 然界で起こる現象に近く, 実用的な発現方式に改良して いくことが望ましい。またザルコトキシンのような異種 生物由来であり、しかも非常に短いペプチドを効率的、 安定的に発現させるための技術も工夫する必要がある。 遺伝子組換え技術を用いて植物に低分子量のタンパク質 やペプチドを作らせるような研究の歴史はまだ浅い。導 入遺伝子の構築に関する理論的な検討を深め、種々の経 験・新しい試みを積み重ねていくことによって、本当に 役に立つ技術に発展するものと期待している。そのため には、あせらず着実に研究を進めていく研究者側の熱意 と周囲の理解が必要と考えられる。 さらに、本研究は実 験植物であるタバコを対象に行ったが、他の農業上重要 な植物への適用が次の段階で必要であり、現在計画中である。このペプチドは動物が自己防御のために作り出す動物版の抗生物質とも考えられ、類似のものが哺乳類の小腸からも検出されている。この点も踏まえて安全性の観点からも有用かどうかの判断をする必要がある。その上で、今後この技術を種々の作物に適応・発展させることができれば、省農薬、省エネルギーで細菌病を克服するための新技術となることが期待されるであろう。

本研究は東京大学薬学部名取俊二教授,東亜合成化学 (株)つくば研究所岡本雅次博士,農業環境技術研究所西 山幸司博士,農業生物資源研究所加来久敏博士,並びに 岐阜県農業研究センター沢野定憲氏との共同研究で行わ れたものであり、ここに記して感謝の意を表したい。

#### 引用文献

- JAYNES, J. M. et al. (1993): Plant Science 89: 43
  ~53.
- 2) Kimbel, D. A. (1991): Bi oEssay 13: 657~663.
- Lee, J.-Y. et al. (1989): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9159~9162.
- OKADA, M. and S. NATORI (1983): Biochem. J. 211: 727~734.
- 5) ———•—— (1985) : J. Bi ol. Chem. 260 : 7174 ~7177.
- MITSUHARA, I. et al. (1986): Plant Cell Physiol. 37: 49~59.
- 杉本俊一郎氏(横浜植防業務部国際第一課第一係長)は 企画班企画調整係長に
- 三村広信氏(横浜植防総務部会計課用度係長)は庶務班 場所庶務係長に
- 鶴崎一郎氏(企画班法令係長)は農薬第一班安全指導係 長に
- 土井茂幸氏 (農薬第二班生産係長) は農薬第二班取締係 長に
- 橋本浩明氏(農薬検査所検査第一部企画調整課取締企画 係長)は農薬第二班生産係長に
- 大村克己氏(横浜植防調査研究部企画調整課防疫管理官) は植防課併任に
- 松崎 晃氏 (横浜植防調査研究部調査課) は植防課併任 に
- 楠川雅史氏(採用・農薬検査所検査第二部農薬残留検査 課)は植防課併任に
- 中澤広行氏(採用・横活植防業務部国際第一課)は植防 課併任に
- 神戸昌仁氏(植防課庶務班場所庶務係長)は農産園芸局 婦人・生活課庶務係長に
- 工藤浩平氏 (植防課課長補佐 (検疫第一班担当)) は横浜 植防調査研究部付に
- 阪本 剛氏(植防課課長補佐(農薬第二班担当)) は農薬 検査所調整指導官に
- 塚本和彦氏(植防課企画班企画調整係長)は横浜植防業 務部国際第一課防疫管理官に
- 山峯喜美夫氏(植防課農薬第二班取締係長)は農薬検査

- 所検査第二部化学課検査管理官に
- 鈴木 修氏(植防課農薬第一班安全指導係長) は農薬検 査所検査第一部毒性検査課安全基準係長に
- 岩井朋久氏(横浜植防調査研究部企画調整課兼植物防疫 課)は併任解除
- 真壁貞夫氏 (横浜植防調査研究部調査課兼植物防疫課) は併任解除
- 松本 翠氏(植防課兼普及教育課)は農産園芸局企画課 企画班企画第一係長に

#### 農産園芸局(4月1日付)

- 田中淳子氏(環境庁水質保全局土壌農薬課)は普及教育 課就農推進班就農企画係長に
- 森田富幸氏(総務課総括班総括第二係長)は通商産業省 工業技術院技術調査課課長補佐(調査班担当)に
- 瀧澤直樹氏(肥料機械課)は環境庁出向(水質保全局土 壌農薬課へ)

#### 農政局関係(4月1日付)

- 東 義裕氏(九州農政局企業流通課農政調整官) は九州 農政局生産流通部農産普及課課長補佐(土壌) に
- 池田淳一氏(農薬検査所検査第二部農薬残留検査課残留 第二係長)は関東農政局生産流通部農産普及課植物防 疫係長に
- 島袋智志氏 (那覇植物防疫事務所国内課) は沖縄総合事 務局農林水産部農産園芸課植物防疫係長に
- 坂 治己氏(関東農政局生産流通部農産普及課植物防疫 係長)は技会事務局国際研究課技術協力係長に

(34 ページに続く)