

特集：プラントアクティベーター

プラントアクティベーターの創薬に向けた ハイスループットスクリーニングシステムの開発

岡山県生物科学総合研究所

横浜国立大学大学院

理化学研究所バイオリソースセンター

なる
鳴
ひら
平
あ
安

さか
坂
つか
塚
べ
部

よし
義
かず
和

ひろ
弘
ゆき
之
ひろし
洋

はじめに

農業による病害の防除は農業上極めて重要な技術であるが、環境への影響が懸念されている今日では環境負荷低減型の病害防除法の開発が求められている。プラントアクティベーター（植物活力剤、病害抵抗性誘導物質）は植物がもつ内在性の防御システムを活性化して病害を防除する化合物であり、生態系への直接の影響が少なく環境に対する負荷を大幅に軽減することが期待できる。プラントアクティベーターの開発は急務であるにもかかわらず、これまでその利用は限定的であった。これは、プラントアクティベーターの探索が他の植物保護剤と比較して困難なことが理由の一つであると考えられる。そこで我々の研究グループは NEDO 産業技術研究助成事業（研究代表者：鳴坂義弘）により、モデル実験植物シロイヌナズナを用いてプラントアクティベーターの効率的な検索と評価を行うことが可能なシステムを確立した。以下にその詳細について報告する。

I 植物の病害抵抗性誘導機構を利用したスクリーニングシステムの開発

プラントアクティベーターは次世代の植物保護剤と期待されながら実用化されたものは少ない。その理由として効率的なスクリーニングシステムがなかったことがあげられる。第一に、殺菌性の農薬は天然物、合成化合物等から抗菌活性を指標としてスクリーニングすることでリード化合物を探索する。これに対して、プラントアクティベーターは殺菌性の薬剤とは異なり、植物の防御システムを活性化することで病害防除を行うため、スクリーニングのための指標がなく、候補化合物のスクリーニ

ングが困難であった。第二に、これまでにプラントアクティベーターの開発のために実施されているスクリーニングは、薬剤を作物に散布した後、病原菌を接種し病徴抑制度を評価する方法であるが、①農作物と病気の組み合わせは多数存在する。②病気と薬剤の組み合わせも多数存在する。③したがって、大量のスペース、時間とコストが必要であり非効率的であった。そこで我々はプラントアクティベーターのスクリーニングに植物の病害抵抗性誘導機構を利用することを考えた。病原菌と宿主植物の組み合わせは無数にあり、それぞれの系におけるプラントアクティベーターのスクリーニングは困難であるため、モデル実験植物シロイヌナズナの遺伝子組換え体を薬剤スクリーニングのための装置（バイオセンサー）として用いることとした。シロイヌナズナは植物のモデルとして、植物-病原微生物の相互作用が最もよく研究されている。さらに、シロイヌナズナの病害防御システムは、その大部分で植物共通であることが明らかにされている。実験室内で大量のスクリーニングを行うためにはシロイヌナズナが有するモデル実験植物の特徴（個体が小さい、形質転換が容易、ゲノムサイズが小さい）を利用することが重要である。

病原菌の攻撃に対する植物の主たる防御シグナル伝達経路はサリチル酸（SA）、エチレン（ET）、ジャスモン酸（JA）および活性酸素（ROS）経路と考えられている（図-1）。例えば、抵抗性誘導活性がある SA などの化合物を植物体に処理した場合、病害応答遺伝子群の強い発現誘導が起こり、続いてそれらがコードするタンパク質が蓄積する。したがって、これらの遺伝子発現あるいはタンパク質の蓄積を検出することにより、植物の病害抵抗性誘導の指標とすることができる。そこで、それぞれの防御シグナル伝達経路上で発現しているマーカー遺伝子に着目し、植物の防御応答における遺伝子発現を指標に、プラントアクティベーターをスクリーニングするためのシステムの構築を試みた。我々が用いた各防御シグナル伝達経路上のマーカー遺伝子については図-1に示した（一部については特許申請中）。

Development of a High Throughput System to Screen for Candidate Plant Activators using an Immune-induction System in *Arabidopsis*. By Yoshihiro NARUSAKA, Kazuyuki HIRATSUKA and Hiroshi ABE

（キーワード：レポーター遺伝子、レポーター遺伝子・アクセシ、マイクロアレイ、GUS、LUC）

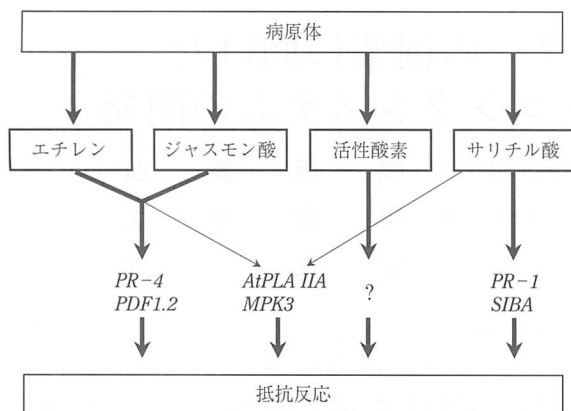


図-1 植物における病害防御シグナル伝達経路の概念図とマーカー遺伝子

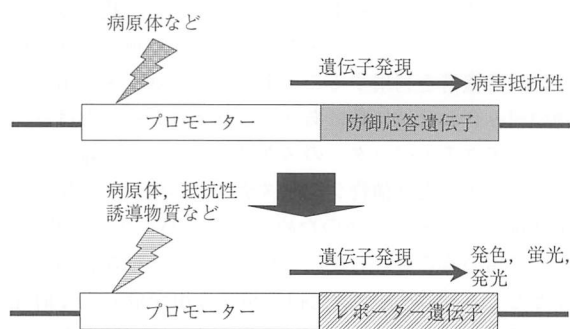


図-2 プラントアクティベータースクリーニングの概略図

防御応答遺伝子のコード領域をレポーター遺伝子に置換したコンストラクトを作成し、シロイヌナズナに導入した。形質転換植物は病原体の攻撃や抵抗性誘導物質の処理に应答して、発色、蛍光または発光を生じるため、遺伝子の発現をモニターすることができる。

遺伝子発現の量的変動を見る方法としてノーザンブロット法、リアルタイム RT-PCR 法などが考えられるが、これらは RNA を取り扱う必要があるため、大量の検体をハイスループットに解析するには作業がやや煩雑である。そこで、遺伝子産物を直接解析するのではなく、検出および定量が容易なタンパク質の遺伝子を、調べたい遺伝子と同様の発現制御下におき、その発現を解析するというレポーター遺伝子・アッセイシステムを利用することを考えた (図-2)。このように、遺伝子発現などの指標として便宜的に用いられる外来性の遺伝子をレポーター遺伝子と呼ぶ。レポーター遺伝子およびその活用法の詳細は文献 (村本・青山, 2000) を参照していただきたい。

II GUS レポーター遺伝子を利用したアッセイシステムの開発

植物では、大腸菌由来の β -グルクロニダーゼ (GUS) がレポーター遺伝子としてよく用いられている。GUS 活性は 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide (4-MUG) を基質としたとき、その産物である 4-methylumbelliferone (4-MU) の発する特異的な蛍光によって定量する。GUS は生体内で比較的安定な酵素であり、産物の 4-MU も安定性が高いうえにバックグラウンドが低いので、容易に測定できる。さらに基質として 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide (X-gluc) を用いると、産物として水に難溶性の青色の色素ができる。この性質を利用して、GUS 活性の局在を容易に調べることができる点において優れている (村本・青山, 2000)。プラントアクティベーターの性質としては、薬害の関係から即効性よりも遅効性かつ持続的な作用が要求される。このような性質は製剤化の段階で、ある程度付与することが可能であるが、スクリーニング段階での機能未知な化合物処理による抵抗性誘導のタイミングを予測するのは難しい。特に、ハイスループットスクリーニングにおいては、一度に百～数百の検体を解析する必要があり、経時的な解析ではなくピンポイントでの検定が可能なアッセイ系が必要とされる。前述のように、GUS は安定であるため、経時的な解析には向かないが、逆にその性質がシステムの開発に最適であった。我々は GUS を用いたレポーター遺伝子・アッセイシステムにより薬剤処理 24 時間および 72 時間の 2 点を検定することで、多様な性質の化合物をとらえることができるスクリーニングシステムを構築した。また、GUS 活性の検定には、96 ウェル対応の細胞破碎装置、可視および蛍光光度計があれば、ハイスループットに活性を測定できる。しかし、これら機器がない場合でも、GUS 染色により特殊な装置を全く用いずに活性の評価が可能なシステムを開発した。以下に、定量性に優れる蛍光による検定法の実例を紹介する。

PR-1 および PR-4 プロモーター::GUS コンストラクトを導入したシロイヌナズナ形質転換植物を用いた化合物の選抜と評価の実例について簡単に紹介する。シロイヌナズナに SA, エテフォン (エチレン誘導体), ジャスモン酸メチル (MeJA), 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA), benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) および β -aminobutyric acid (BABA) を処理し、レポーター遺伝子・アッセイを遂行した。その結果、SA シグナル経路のマーカー遺伝子

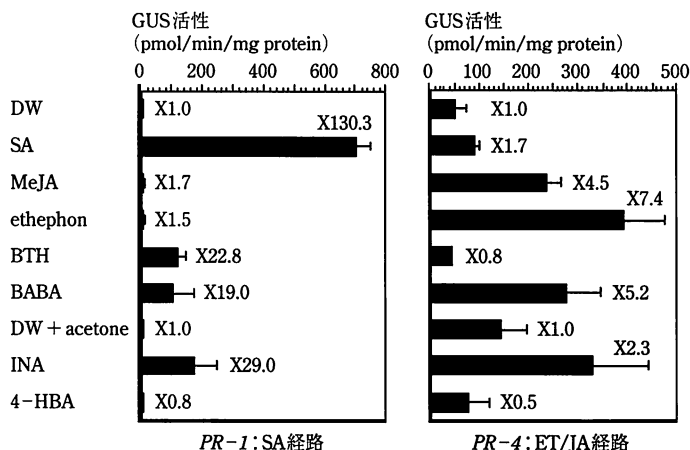


図-3 レポーター遺伝子・アッセイシステムによるプラントアクティベーター候補化合物の誘導抵抗活性の評価

PR-1 または *PR-4* 遺伝子のプロモーター::*GUS* 融合遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換植物に、2.5 mM SA、0.1 mM MeJA、1 mM ethephon、0.5 mM BTH、10 mM BABA、1 mM INA、2.5 mM 4-HBA または DW を噴霧処理した。INA および 4-HBA は 1% アセトン溶液を用いたため、コントロールを 1% アセトンとした。各処理 24 時間後にサンプリングを行い、GUS 活性を測定した。

である *PR-1* プロモーター::*GUS* 導入植物体は SA、BTH、INA、BABA 処理により GUS 活性の上昇が認められた (図-3)。これに対して、ET/JA シグナル経路のマーカー遺伝子である *PR-4* プロモーター::*GUS* 導入植物体は MeJA、エテフォン、BABA 処理により GUS 活性の上昇が認められた。一方、SA の異性体であり、抵抗性誘導能を有さない 4-HBA 処理においては、いずれの形質転換体においても GUS 活性の上昇は認められなかった (NARUSAKA et al., 2006)。

このように、我々が開発したレポーター遺伝子・アッセイシステムにより抵抗性誘導活性を有する化合物の選抜と評価が可能である。今後は本システムを用いた大規模スクリーニングを行う予定である。

III *LUC* レポーター遺伝子を利用したアッセイシステムの開発

非破壊的定量観察が可能な系として、ルシフェラーゼ (*LUC*) をレポーター遺伝子として用いたスクリーニング系の構築を試みた (平塚, 2003)。LUC の発光基質であるルシフェリンは植物細胞・組織への浸透性が優れ、細胞内で LUC による発光反応を起こさせることができる。この発光を冷却 CCD カメラなどの高感度のカメラシステムを用いて画像化することにより、遺伝子発現の

測定が可能である。また、*LUC* 遺伝子産物は、他のレポーター遺伝子産物と比較して植物体内での半減期が短く、病害応答遺伝子の時空間的発現モニタリングも可能であるため、病原菌感染や薬剤処理による病害応答性遺伝子発現の連続観察などにも応用可能である (TANAKA et al., 2006)。非破壊的に連続観察が可能であるということが困難な薬剤の作用機作等に関しても有用な情報が得られる可能性があり、プラントアクティベーターの性能評価などへの応用にも期待がもたれる。

一方、従来のルシフェラーゼアッセイでは、2 種類のプロモーター活性を非破壊的に同時に検出することが困難であった。したがって、一過性発現などを利用した場合、プロモーター活性を正確に評価するために必要な対照区を利用したアッセイの実施が困難であった。この点を改善するため、ヒカリコメツキ由来の 2 種類のクロマリック遺伝子 (*CBG* および *CBR*) を用いた系に着目した (OGURA et al., 2005)。これらは、緑色光および赤色光側にシフトした発光を示す特徴をもち、それぞれの発光を偏光フィルターにより分離することが可能である。そこで、比較的活性の高い *CBG* をモニターするプロモーターに連結し、*CBR* を内部標準となるプロモーターに連結して植物細胞内に導入した。その結果、Red と

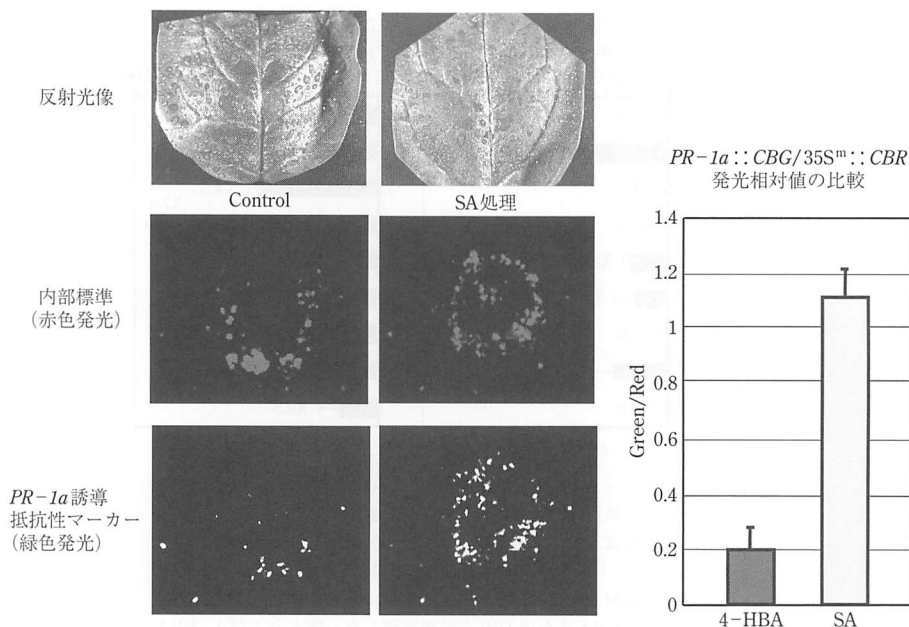


図-4 ホウレンソウ葉を用いた遺伝子銃による一過性発現解析の例

市販のホウレンソウを用いて、*PR-1a* プロモーターに *CBG* を、内部標準とする改変 35S プロモーターに *CBR* を連結し、遺伝子銃により同時に導入した。SA 処理による *PR-1a* プロモーターの発現誘導が明瞭に観察できる。

Green の発光を分離して測定し、両者の比をプロモーター活性として検出するという実験系を開発できた。これにより遺伝子導入が困難な植物に対しても遺伝子銃による一過性発現系 (Ono et al., 2004) を利用して、非破壊のかつ定量的な連続測定が可能となった (図-4)。

IV プラントアクティベーター評価用シロイヌナズナ 1.2K マイクロアレイの開発

我々はレポータージーン・アッセイシステムにより選抜された化合物の性質を、より詳細に解析するシステムとして薬剤評価用アレイキットの開発を試みた。我々がこれまでに遂行したシロイヌナズナマイクロアレイ解析の結果から統計学的解析とデータマイニングにより、植物の病害および環境ストレス応答遺伝子 1,200 個を選抜し、プラントアクティベーター評価用シロイヌナズナ 1.2K マイクロアレイを構築した (NARUSAKA et al., 2006)。まず、シロイヌナズナに SA, エテフォン, MeJA を処理して経時的にサンプリングを行い、1.2K マイクロアレイによる解析を行った。その結果、薬剤処理間の実験系統樹解析により、各処理区は大きく三つのカテゴリー (SA 群, ET 群, MeJA 群) に分類された (図-5A)。本データを基本データとして、化合物処理区のデータをこの基本データとクラスタリング解析することにより、化

合物の特性を推定した。化合物処理間の実験系統樹解析により、INA, BTH 処理区は SA 処理区と同一のカテゴリーに分類され、その処理によりシロイヌナズナの SA シグナル経路を活性化することが示された (図-5B・C)。これら化合物は SA シグナル系に作用することが明らかになっており、評価系の有効性が証明された。また、作用機作が明らかになっていない BABA を処理した区も SA 処理区と同一のカテゴリーに分類された (図-5D)。

我々はマイクロアレイを用いた解析により、①基本となる SA, ET, JA 処理データベースの構築、② SA, ET, JA シグナル伝達経路上のマーカー遺伝子発現プロファイル、③実験系統樹解析、④発現遺伝子の相関解析を統合して解析することにより、プラントアクティベーターを評価するための方法論を構築した。また、本アレイシステムの実用化を目指して 1 アレイ当たり約 8,000 円の低コストを実現している。今後はさらに検体数を増やし、プラントアクティベーターを評価するためのデータベースを充実させる予定である。

また、プラントアクティベーターの評価用マイクロアレイは病害応答診断用のキットとしても使用できる。つまり、プラントアクティベーター開発のための、リード化合物のスクリーニングおよび候補化合物の評価に用い

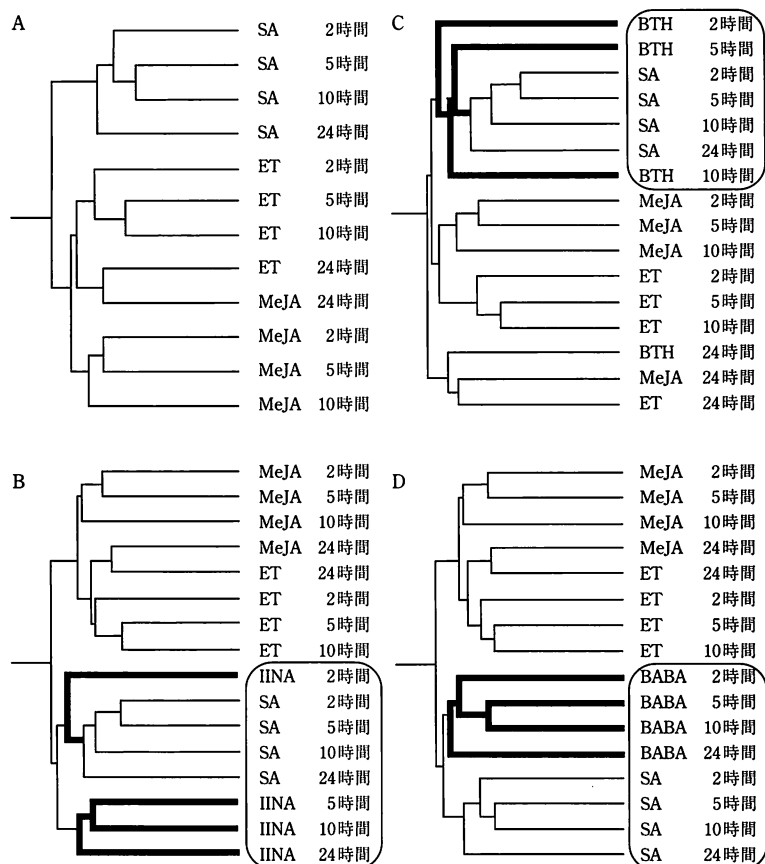


図-5 シロイヌナズナ 1.2K マイクロアレイによるプラントアクティベーターの評価

シロイヌナズナに 5 mM SA, 1 mM ethephon, 0.1 mM MeJA, 1 mM INA, 0.5 mM BTH または 10 mM BABA を噴霧処理した。無処理区を Cy3, 処理区を Cy5 で標識し、ハイブリダイゼーションを行った。SA, ET および MeJA 処理により発現した遺伝子群の階層クラスタリングを基本データとする (A)。INA (B), BTH (C) および BABA (D) 処理により 5 倍以上発現した遺伝子群を用いて階層クラスタリングを行った。

るだけではなく、病原菌の攻撃に対する植物の防御応答経路を診断することも可能である。高性能かつ高感度で簡便な診断技術としてマイクロアレイを利用することで、これまでの技術では難しかった診断、育種および創薬の戦略のエビデンスを得ることができ、本システムの多角的な応用が考えられる。

おわりに

我々が開発したハイスループットスクリーニングシステムについて、簡単に紹介させていただいた。本システムが新規プラントアクティベーター開発の一助となれば幸いである。

最後に、研究遂行に当たりご指導と多くの助言をいただいた理化学研究所の小林正智博士、研究の中心的役割を担った岡山大学の鳴坂真理氏に厚くお礼申し上げる。また、本稿に記載した研究は NEDO 産業技術研究助成事業の支援により行った。

引用文献

- 1) 村本拓也, 青山卓史 (2000): モデル植物ラボマニュアル, Springer-Verlag, 東京, p. 194 ~ 203.
- 2) 平塚和之 (2003): 次世代の農業開発, ソフトサイエンス社, 東京, p. 171 ~ 180.
- 3) NARUSAKA, M. et al. (2006): Plant Biotech. 23: 321 ~ 327.
- 4) OGURA, R. et al. (2005): ibid. 22: 151 ~ 155.
- 5) ONO, S. et al. (2004): Biosci. Biotechnol. Biochem. 68: 803 ~ 807.
- 6) TANAKA, T. et al. (2006): J. Gen. Plant Pathol. 72: 1 ~ 5.