

植物の免疫機能の強化による病害抵抗性向上の試み

(独)農研機構 花き研究所 岸^{きし} 本^{もと} 久^{きゅう} 太^た 郎^{ろう}
 筑波大学大学院生命環境科学研究所 香^{こう} 西^{さい} 雄^{ゆう} 介^{すけ}
 (独)農業生物資源研究所 西^{にし} 澤^{ざわ} 洋^{よう} 子^こ

はじめに

植物は、多様な微生物にさらされた状態にあっても、限られた微生物にしか感染を許さない。例えば、日本植物病名データベース（農業生物資源ジーンバンク, 2011）によれば、既報の病原微生物は 10,000 種類以上に及ぶが、イネに感染可能な微生物は 100 種類ほどで、農業上の被害が大きく防除対象とされている種類は 10 前後に過ぎない。これは植物が非常に優れた先天性の免疫力、すなわち自然免疫をもつことを意味している。

植物には、微生物由来の分子を認識して防御応答を活性化する機構が知られている。植物に防御応答を促すこれらの分子群を総称して Microbe/Pathogen Associated Molecular Patterns (MAMPs/PAMPs) と呼ぶ。また、微生物の攻撃を受ける過程で、植物自身の細胞壁から Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) と呼ばれる分子群が放出され、植物に防御反応を誘導する。近年、MAMPs や DAMPs を認識する植物側の受容体が明らかにされ、パターン認識受容体 (Pattern-Recognition Receptors: PRRs) と呼ばれている。PRR を欠損した変異体等を用いた研究から、PRR を介した MAMPs 誘導的な防御応答が自然免疫として機能していることが明らかになっている。このように PRR を介して MAMPs/PAMPs が誘導する病害抵抗性を PAMP-triggered immunity (PTI) と呼ぶ。

PRR 遺伝子の同定に伴い、これを改変して植物に再導入し、PTI の向上を図る研究が始まっている。本稿では PTI の概要と、PRRs を用いた植物の病害抵抗性向上の試みについて紹介する。

I PAMP-triggered immunity

典型的な PRR タンパク質は、細胞膜を貫通する形で局在している。通常、細胞外には標的 MAMP と結合す

るための領域が存在し、細胞内には防御応答シグナル経路の活性化に必要なプロテインキナーゼ (PK) 領域が存在する。MAMPs の種類は、オリゴ糖、オリゴペプチド、酵素タンパク質あるいはリポ多糖の脂質領域と多様で、化学的な共通性はないが、ある微生物群に高度に保存された分子であるため、その微生物の生存や病原性にとって重要な因子である場合が多い。したがって、微生物が突然変異によって MAMPs を変性、あるいは欠損させ、植物側の監視網を回避することは困難であると考えられる。本章では、特に研究の進んでいるいくつかの PRRs と MAMPs の組合せについて紹介する。

シロイヌナズナの Flagellin-Sensing 2 (FLS2) は、flg22 を認識する PRR である (CHINCHILLA et al., 2006)。flg22 は、細菌のフラジェリンタンパク質の N-末端付近に保存されている 22 アミノ酸残基からなるオリゴペプチドである。FLS2 は受容体型キナーゼ (RLK) で、主に細胞外ロイシンリッチリピート (LRR) 領域と細胞内 PK 領域で構成されている (図-1)。シロイヌナズナでは、flg22 が FLS2 に認識されると一過的な活性酸素 (ROS) 生産、Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) の活性化、防御遺伝子の発現 (GÓMEZ-GÓMEZ et al., 1999)、および孔辺細胞の閉鎖 (MELOTTO et al., 2006) が誘導される。孔辺細胞の閉鎖は、細菌の葉組織内への侵入を防ぐことから、FLS2 依存的な病害抵抗性の主要因と考えられている。FLS2 を欠損したシロイヌナズナでは、flg22 誘導的な防御応答が消失し、*Pseudomonas syringae* の感染が増大する (ZIPFEL et al., 2004)。また、FLS2 のホモログを欠損し、flg22 認識能を失ったタバコ植物では、非病原性細菌に対する感受性が増加する (HANN and RATHJEN, 2007)。したがって、flg22 によって誘起される防御応答は、病原細菌の増殖や非病原細菌の感染を抑制することで、植物の自然免疫に寄与していると考えられる。FLS2 ホモログは、双子葉植物の枠をこえて存在することから、フラジェリンの認識機構は高等植物に広く存在すると推定される。

シロイヌナズナの Elongation Factor-Tu Receptor (EFR) も、FLS2 と類似のドメイン構成をもつ RLK で (図-1)、elf18 を認識する PRR である (ZIPFEL et al.,

Approaches to Improve Disease Resistance by Modification of Plant Immunity. By Kyutaro KISHIMOTO, Yusuke KOUZAI and Yoko NISHIZAWA

(キーワード: パターン認識受容体, 自然免疫, 病害抵抗性, 病原菌, イネ)

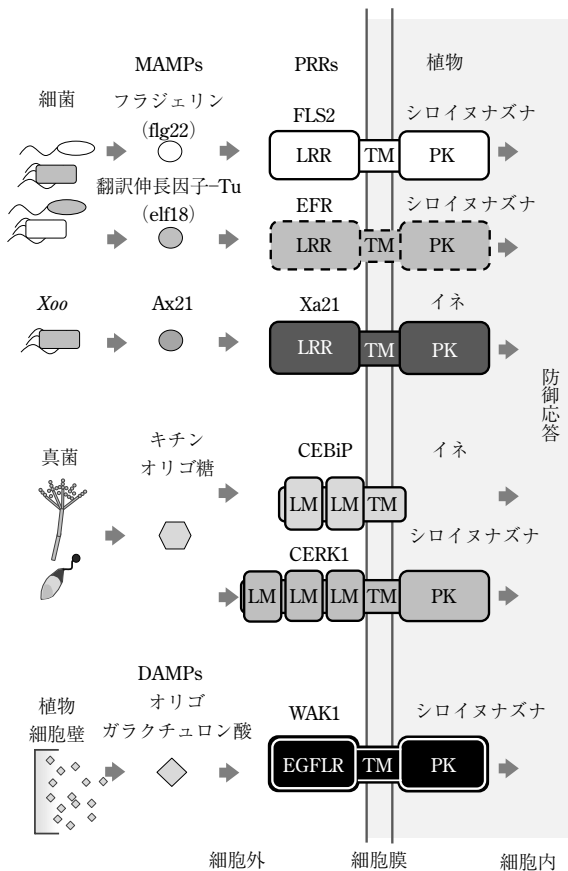


図-1 植物のパターン認識受容体 (PRRs)

MAMPs, Microbe Associated Molecular Patterns ;
DAMPs, Damage-Associated Molecular Patterns ;
Xoo, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ; LRR, ロイシン
リッチリピート領域 ; TM, 膜貫通領域 ; PK, プロ
テインキナーゼ領域 ; LM, LysM 領域 ; EGFLR,
Epidermal Growth Factor 様リピート領域

2006)。elf18 は、細菌の翻訳伸長因子である Elongation Factor-Tu (EF-Tu) の N-末端領域に保存されているオリゴペプチドである。EFR による elf18 の認識もまた ROS 生産、MAPK の活性化および防御遺伝子の発現を誘導する (ZIPFEL et al., 2006)。また、EFR の変異体では、elf18 に対する応答が消失し、*Agrobacterium tumefaciens* に対する感受性が増加することから (ZIPFEL et al., 2006)、EFR はシロイヌナズナの自然免疫に寄与すると考えられる。今のところ、EF-Tu 認識機構はアブラナ科でしか発見されていない。

Xa21 は野生イネ *Oryza longistaminata* から栽培イネに交配によって導入された白葉枯病抵抗性遺伝子で、細胞外 LRR 領域と細胞内 PK 領域を有する RLK をコード

する (図-1) (SONG et al., 1995)。*Xa21* は、イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) が分泌する硫酸化ペプチド Ax21 を認識する PRR とされるが (LEE et al., 2009)、広範囲の細菌に存在するフラジェリンや EF-Tu とは異なり、Ax21 のホモログは *Xanthomonas* 属と一部の細菌にしか知られていないため、*Xa21* を介した Ax21 の認識・応答は、進化の過程で比較的新しく成立した PTI であると推定される。*Xa21* をもつイネは、イネ白葉枯病菌に対して過敏反応 (HR) 様の強い防御応答を誘導するため、発病が顕著に抑制される (HE et al., 2000)。これは他の PRRs と異なり、*Xa21* の際だった特徴である。

イネの Chitin Elicitor-Binding Protein (CEBiP) は、真菌の主要な細胞壁構成成分であるキチン由来のオリゴ糖を認識する PRR である (KAKU et al., 2006)。CEBiP は細胞外にキチンオリゴ糖を結合すると予想される二つの LysM 領域をもつが、他の PRRs とは異なり、細胞内 PK 領域をもたない (図-1)。CEBiP の発現を RNA 干渉によって抑制すると、キチンオリゴ糖誘導的な ROS 生産や遺伝子発現変動が著しく減少し (KAKU et al., 2006)、葉鞘におけるイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) に対する抵抗性が低下する (KISHIMOTO et al., 2010)。キチンオリゴ糖の PRR として、シロイヌナズナからは Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 (CERK1) が同定されている (MIYA et al., 2007)。CERK1 は細胞外に三つの LysM 領域、細胞内に PK 領域をもつ RLK である (図-1)。CERK1 はシロイヌナズナのキチンオリゴ糖誘導的な防御応答に不可欠で、菌類に対する自然免疫に寄与することが確認されている (MIYA et al., 2007; WAN et al., 2008)。イネの CERK1 ホモログである OsCERK1 は、CEBiP とキチンオリゴ糖依存的にヘテロ 2 量体を形成し、防御応答を誘導することが示唆されている (SHIMIZU et al., 2010)。

シロイヌナズナの Wall-Associated Kinase 1 (WAK1) は、植物細胞壁由来の DAMP であるオリゴガラクトロン酸を認識し、防御応答を誘導する PRR である (BRUTUS et al., 2010) (図-1)。WAK1 は、細胞外に Epidermal Growth Factor (EGF) 様リピート領域、細胞内に PK 領域をもつ RLK である (図-1)。

上述以外にも MAMPs や DAMPs とそれに対応する PRRs およびその候補タンパク質が続々と報告されている。これらについては、BOLLER と FELIX (2009) の総説を参照されたい。

植物には、PTI 以外に、微生物由来の病原性因子 (エフェクター) を認識し、防御応答する機構が知られてい

る。それは、Effector-triggered immunity (ETI) と呼ばれ、多くの場合 HR を伴い、病原体の感染を完全に抑制する強力な免疫応答である。ETI は、病原性因子と植物側の真性抵抗性タンパク質 (R) の相互作用によって活性化されると考えられ、植物が R 遺伝子をもち、病原菌がそれに対応する病原性遺伝子をもつ特異的な状況下で成立する。

微生物の病原性因子の標的となる植物側のタンパク質には、PTI に寄与するもの (あるいは、寄与すると予想されるもの) が多い (ZHANG and ZHOU, 2010)。これは、一部の微生物が宿主植物の PTI を回避する機構を獲得したことで、その植物の病原菌となったことを示唆しており、ETI は、PTI を回避できるようになった病原菌に対して確立された、より新しい免疫機構であると考えられている (JONES and DANGLE, 2006)。

II PRRs を用いた病害抵抗性向上の試み

ETI は、これまで真性抵抗性遺伝子の導入という形で植物の耐病性育種で利用されてきた。ETI の導入によって植物には強い抵抗性が付与されるが、病原性因子の有無が病原菌のレース間で異なる場合が多いため、その適用範囲はレース特異的である。また、真性抵抗性は病原性因子の変異などによって崩壊することが知られている。

一方、PTI は、幅広い微生物に対して持続的な抵抗性を発揮すると考えられるが、これまでの遺伝子工学的手法による病害抵抗性向上戦略では、MAMPs が誘導する複合的な防御応答の一部を活用するにとどまっていた。例えば、1980 年代から 90 年代にかけて、MAMPs 応答性の溶菌酵素遺伝子を強発現する組換え植物が開発された。しかしながら、一般にこれらの植物の耐病性は十分でなかった (西澤, 2004)。2010 年になって、PRRs を改変することによって植物の PTI を強化する研究が相次いで発表された。本章では、その新しい試みについて紹介する。

ZIPFEL らのグループは、アブラナ科植物に特異的な EF-Tu の認識機構に着目した。彼らはシロイヌナズナの EFR 遺伝子をそのプロモーターごとトマトなどのナス科植物に導入した。その結果、これらの植物では EF-Tu をもつ複数の病原細菌に対する抵抗性が向上した (LACOMBE et al., 2010)。この結果は、植物種間に共通するシグナル伝達経路を介して PTI が発動されることを示唆しており、興味深い。

PRRs 遺伝子を過剰に発現させた植物の耐病性も検討されている。シロイヌナズナでは、FLS2 や WAK1 の過剰発現によって、それぞれ *P. syringae* と灰色かび病菌

(*Botrytis cinerea*) に対する抵抗性が向上することが報告されている (BRUTUS et al., 2010)。一方、FLS2 のホモログである OsFLS2 や CEBiP を過剰発現させたイネでは、MAMP 誘導的な ROS 生産は増加したものの、今のところ顕著な病害抵抗性の向上は見いだされていない (TAKAI et al., 2008; KISHIMOTO et al., 2010)。これらの結果は、既存の MAMPs 認識能を高めるだけでは抵抗性の向上が不十分であることを示唆している。

一般に、PTI による抵抗性は ETI ほど強いものではない。これは、PTI の多くが、ETI で認められる HR のような強力な防御応答を誘導しないことが一因と考えられる。HR の特徴の一つに HR 細胞死と呼ばれる宿主細胞の迅速な細胞死が知られている。キチンオリゴ糖をイネの培養細胞に処理しても細胞死は誘導されるが、HR 細胞死と比較すると低レベルである。

筆者らは、イネにレース非特異的なもち病抵抗性を付与するために、イネの PRRs である CEBiP と Xa21 に着目した。CEBiP は、菌類病菌に普遍的な MAMPs であるキチンオリゴ糖を認識する。一方、Xa21 は、HR 様の防御応答を伴う強い抵抗性を誘導することが示されているが、Ax21 を分泌するイネ白葉枯病菌にしか応答しない。筆者らは、キチンオリゴ糖で Xa21 下流の強力な防御応答を誘導するために、CEBiP と Xa21 を組合せた防御応答システム (CRXA) をデザインした (図-2)。CRXA は CEBiP の細胞外領域と、Xa21 の細胞内領域を膜貫通領域を介して連結したキメラ受容体である。

CRXA を発現するイネの培養細胞では、キチンオリゴ糖処理による ROS 生成や細胞死誘導が CRXA 非導入細胞よりも亢進したことから、キチンオリゴ糖が CRXA を介して HR 様の防御応答を誘導したことが強く示唆された。次に、CRXA を発現するイネ葉にイネいもち病菌を接種したところ、菌の増殖や病斑形成が抑制された (図-3)。一方、キチンを持たないイネ白葉枯病菌に対する抵抗性は変化しなかった (KISHIMOTO et al., 2010)。これらの結果から、CRXA は感染時にキチンオリゴ糖を放出する病原菌類に対して有効なシステムであると期待している。

DE LORENZO らのグループは、FLS2 の細胞外 LRR 領域と EFR の細胞内 PK 領域を連結したキメラ受容体 (TMC) (図-2) や、WAK1 の細胞外 EGF 様リピート領域と EFR の細胞内 PK 領域を連結したキメラ受容体 (WEG) (図-2) が、シロイヌナズナにおいて PRR として機能することを示した (BRUTUS et al., 2010)。シロイヌナズナでは、TMC や WEG の過剰発現によって、それぞれ *P. syringae* 抵抗性と灰色かび病抵抗性が向上す

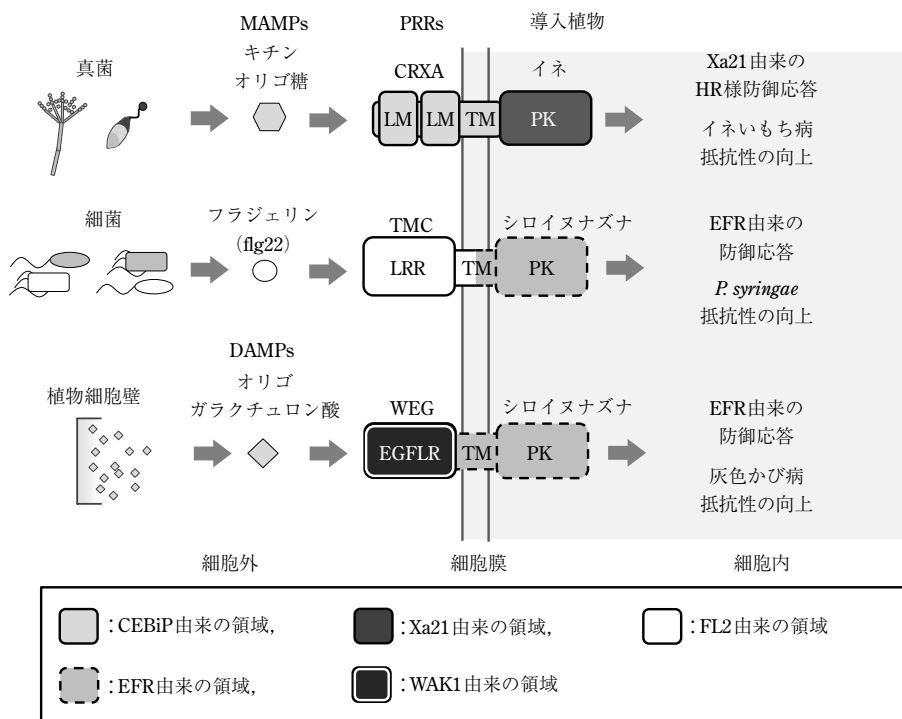


図-2 PRRのキメラ受容体

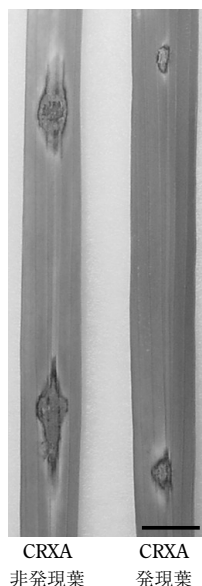


図-3 CRXA発現イネ葉におけるイネいもち病抵抗性の亢進
イネいもち病菌分生子を滴下接種して1週間後の病徴。スケールバー=5mm。

る (BRUTUS et al., 2010)。

以上の結果は、起源や構造の異なる PRRs 同士を融合させても PRR として機能することを示している。今後、これらのキメラ受容体をイネやシロイヌナズナ以外の植物に導入した場合の効果を解析し、その汎用性を検証する必要があるが、PRRsのキメラ受容体システムは、有望な耐病性付与戦略の一つであると考えている。なぜならば、対象とする複数の病原菌に共通して存在する MAMPs を認識する PRR を利用することで、作物に複合病害抵抗性を付与できると期待されるからである。

おわりに

PRR 遺伝子を操作して耐病性を高める研究は始まったばかりであり、紹介してきた戦略も実用化に耐えるかどうかは未知数である。今後、さらなる PRR の同定と作用機構の解明が進むにつれ、より防除効果の高い PRR 改変法が見いだされると期待される。

引用文献

- 1) BOLLER, T. and G. FELIX (2009): Annu. Rev. Plant Biol. **60**: 379 ~ 406.
- 2) BRUTUS, A. et al. (2010): Proc. Natl. Acad. Sci. USA **107**: 9452 ~ 9457.
- 3) CHINCHILLA, D. et al. (2006): Plant Cell **18**: 465 ~ 476.
- 4) GÓMEZ-GÓMEZ, L. et al. (1999): Plant J. **18**: 277 ~ 284.

- 5) HANN, D. R. and J. P. RATHJEN (2007): Plant J. **49**: 607 ~ 618.
- 6) HE, Z. et al. (2000): Science **288**: 2360 ~ 2363.
- 7) JONES, J. D. G. and J. L. DANGLE (2006): Nature **444**: 323 ~ 329.
- 8) KAKI, H. et al. (2006): Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**: 11086 ~ 11091.
- 9) KISHIMOTO, K. et al. (2010): Plant J. **64**: 343 ~ 354.
- 10) LACOMBE, S. et al. (2010): Nat. Biotechnol. **28**: 365 ~ 369.
- 11) LEE, S-W. et al. (2009): Science **326**: 850 ~ 853.
- 12) MELOTTO, M. et al. (2006): Cell **126**: 969 ~ 980.
- 13) MIYA, A. et al. (2007): Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**: 19613 ~ 19618.
- 14) 農業生物資源データベース (2011): 日本植物病名データベース
- ス, http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php
- 15) 西澤洋子 (2004): 分子レベルからみた植物の耐病性, 秀潤社, 東京, p. 136 ~ 146.
- 16) SHIMIZU, T. et al. (2010): Plant J. **64**: 204 ~ 214.
- 17) SONG, W-Y. et al. (1995): Science **270**: 1804 ~ 1806.
- 18) TAKAI, R. et al. (2008): Mol. Plant Microbe Interact. **21**: 1635 ~ 1642.
- 19) WAN, J. et al. (2008): Plant Cell **20**: 471 ~ 781.
- 20) ZIFFEL, C. et al. (2006): Cell **125**: 749 ~ 760.
- 21) ——— et al. (2004): Nature **428**: 764 ~ 767.
- 22) ZHANG, J. and J-M. ZHOU (2010): Molecular Plant **3**: 783 ~ 793.

書 評

地球温暖化と南方性害虫

積木久明編集

環境 Eco 選書 4

A5 判, 244 頁, 本体価格 3,000 円

北隆館 (2011 年 9 月 10 日発行)

(ISBN978-4-8326-0724-8)



子供の頃の夏に比べ最近の夏は確かに暑く、夏バテして夜更かしできなくなった。しかし、約 50 年前の 1960 年の大阪市の最高気温は 36.6℃あり、今年の最高気温 36.2℃より高い。ということは、年齢のせい、と短絡的に考え落胆する。しかし、記憶や限定的な気温の変化から、単純に温暖化の影響を推し量れない。一方、温暖化の影響と片付けてしまっていることが、実は温暖化とは無縁な現象であることも多い。例えば本書では、日本列島での分布域を北上させているムラサキツバメは、温暖化の影響ではなく、餌となる街路樹への人為的作用が主因とのことである。また、南方性の昆虫が日本へ侵入しても、必ずしも日本列島を南の温かい地域から冷涼な地域へと北上しておらず、ゲンバヤシ類やトガリアメンボのように関西で最初に見つかったこともある。キボシカミキリでは、中部地方以南の系統より東

北・関東に分布する東日本型が亜熱帯の系統であるにも係わらず、気温の低い環境に適応できる生活史を持つ話など興味は尽きない。

編者の積木先生は昆虫生理学がご専門であるが、フィールドワークを伴う実用的な害虫防除の研究にも積極的に取り組まれ、生理学者としての視点から、私には予期できない貴重なアドバイスを頂くことが多かった。約 25 年前、ミナミキイロアザミウマの低温耐性の研究でお世話になった当時、地球温暖化は今ほど問題視されておらず、この研究の実用的価値をそれほど意識していなかった。しかし、本書を読むとミナミキイロアザミウマの露地越冬の可能性がうかがえる話が出てきて驚いた。

本書では、国内に侵入してきた南方性の害虫を中心に、生息状況、生物環境や農作物等に及ぼす被害、温暖化にともなう分布拡大の可能性、より冷涼な気候に適応するための発育や休眠など生活史の変化などが、22 名の研究者の方々により執筆されている。本書の「I. 温暖化と分布拡大」ではフタテンチビヨコバイ、ミカンキジラミ、ゲンバヤシ類、アメンボ類、ミバエ類、ムラサキツバメが、イチジクヒトリモドキが、「II. 休眠と越冬」ではミナミキイロアザミウマ、タバココナジラミ、ケブカアカチャコガネ、キボシカミキリ、アリモドキゾウムシ、オオタバコガが、「III. 生活史と耐寒性の地理的変異」ではトビイロウンカなど水稲の長距離移動性害虫、キムネクロナガハムシ、ハモグリバエ類、ニカメイガ、アワノメイガおよび近縁のメイガ類、オオタバコガを取り上げている。この中には絶滅危惧種のような害虫と自嘲気味に記されたニカメイガのように、現在、農業害虫としての重要度が低い害虫も含まれているが、長年の研究の蓄積から南方性害虫の生活史の特徴を理解するのに適した昆虫が選ばれている。本書では多くの図表を用いて、現在までに解明されたことが分かりやすく解説されていて、読み物としても面白く、研究を開始する必要性に迫られた時には、掲載された豊富な引用文献は非常に役に立つ。

私のように害虫防除に直接関与する仕事をしていると、えてして害虫の生態や農業に知識は偏りがちになる。しかし、昆虫生理に踏み込んだ知識が少しあると、温暖化に対する適応戦略が理解しやすくなり、今まで見過ごしてきたことに気づき、興味も増してくると思う。是非一読をお勧めする。

(永井一哉)