

R&D フロンティア

イネのスーパー遺伝子「HAP2E」 ～耐病性，耐乾性，耐塩性の付与と収量増に向けて～

愛媛大学農学部

農業生物資源研究所

西口 正通 (にしぐち まさみち)

M. M. ALAM (えむ えむ あらむ)

小林 括平 (こばやし かっぺい)

市川 裕章 (いちかわ ひろあき)

はじめに

イネゲノムの全塩基配列決定から十数年経過したが、機能未知の遺伝子も多く存在する。筆者らは、イネにおける感染に应答する遺伝子群から、転写因子であるイネヘムアクチベーター遺伝子 (HAP2E) に焦点を当て、その機能の解析を実施してきた。その結果、本遺伝子を過剰発現することにより、菌類病、細菌病およびウイルス病の三つの異なる範疇の病原体に対する抵抗性が付与されることを見いだした。さらに耐乾性や耐塩性をも同時に付与されることが判明した。これらストレス耐性に加え、光合成効率の向上や分げつの増加にも寄与するという多様な機能を一つの遺伝子が担っていることを明らかにしてきた。ここでは、病原体に対する抵抗性を中心に、これまでに得られた結果について述べる (ALAM et al., 2015 a; 2015 b)。

I イネ HAP 遺伝子

ヘムアクチベータータンパク質 (HAP) は、核因子 (nuclear factor) Y または CCAAT 結合因子とも呼ばれており (HAP/NF-Y/CBF)、植物の発生・生育やストレス反応に重要な役割を果たすと考えられている (BALLIF et al., 2011; PETRON et al., 2012; LALOUM et al., 2013)。HAP はすべての生物に存在し、そのアミノ酸配列は広く保存されている。HAP は HAP2, HAP3 および HAP5 の 3 種類のサブユニットが複合体を形成し、DNA 上の CCAAT

配列に結合する転写因子として知られる。イネでは、HAP2, HAP3 および HAP5 をコードする遺伝子がそれぞれ 10, 11 および 7 コピー存在し、それぞれが異なる、あるいは類似した発現様式をとる。HAP2 については、干ばつ、高温や低温などの非生物学的ストレス、開花時期制御、小胞体ストレスなど多くの機能に関与していることが報告されている。しかし、病原体感染に対する抵抗性を扱った報告はこれまでになく、HAP2 は幅広い耐病性という新たな農業上重要な機能を持つことを初めて見出した。

II HAP2E 遺伝子の発現部位

HAP2E 遺伝子は病害抵抗性誘導剤のプロベナゾールにより発現が誘導されることから、病害耐性に何らかの関与が予想された。本遺伝子の発現部位と感染による発現誘導について検討した。本遺伝子はイネ第 3 染色体上に存在し、7 つのエクソンと 6 つのイントロンからなる 5587 塩基対が相当する。本遺伝子のコード領域の上流部の約 2 キロ塩基対の領域、さらにこの配列から第 2 エクソンの数十塩基までを含む領域 (約 4 キロ塩基対) の 2 種類の推定発現制御断片をそれぞれ GUS (β -グルクロニダーゼ) レポーター遺伝子の 5' 上流に接続し、2 種類の発現ベクターを構築した。それぞれのベクターをアグロバクテリウムを介してイネに導入し、質質転換イネを作出した。その結果、約 4 キロ塩基対の DNA 断片 + GUS 導入イネのみで、GUS 活性によって青色に染色された細胞がみられたことから、HAP2E 遺伝子の発現には、第 1 イントロンを含む約 4 キロ塩基対の領域が重要であることが判明した。このイネを用いて、本遺伝子の発現部位や感染に対する影響を検討した。その結果、対照区 (mock, 付傷) の葉組織でもわずかに発現が見られたものの、イネいもち病菌、イネ白葉枯病細菌、キュウリモザイクウイルスなどの感染によって GUS 発現が葉組織で高度に誘導され、表皮細胞を除くどの部位でも

A Multifunctional Gene of Rice (HAP2E): Towards Disease Resistances, Drought and Salinity Tolerances and Yield Increase. By Masamichi NISHIGUCHI, Md.MAHFUZ ALAM, Kappei KOBAYASHI and Hiroaki ICHIKAWA

Plant

(キーワード: イネ, ヘムアクチベーター遺伝子, HAP2E, 転写因子, いもち病, 白葉枯病, キュウリモザイクウイルス, イネえそモザイクウイルス, 耐乾性, 耐塩性, 光合成, 分げつ)

普遍的に発現が見られた。このことは、本遺伝子が病原体の感染によって顕著に発現が誘導されることを示す。

III HAP2E 過剰発現イネの いもち病に対する抵抗性

イネの最重要病害であるいもち病は、毎年世界のイネ栽培地帯において発生し、甚大な被害を与える。そこで、初めにいもち病を研究対象に取り上げた。本遺伝子のコード領域をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターの下流に配置したプラスミドをイネに導入し、HAP2E 過剰発現株を得た。その中から 2 系統 (#4 および #18) を選び、イネいもち病に対する抵抗性を調査した。他に供試したイネは、対照の品種‘日本晴’、いもち病に極強抵抗性品種である‘戦捷’、感受性品種の‘アソミノリ’である。切離した 4 葉期のイネの葉身 (第 2 および 3 葉) に、いもち菌 (系統 001 および 102.0) の分生子懸濁液を針で接種した。接種した葉身をペトリ皿内で暗黒下で 2 日間保った後、明期 16 時間、暗期 8 時間の条件下で培養し、出現する病斑を観察した。出現した病斑のサイズの比較を図-1 に示す。本遺伝子の高発現株は、品種‘戦捷’と同等の病斑サイズを示したことから、「極強」の抵抗性を持つと判定した。

IV HAP2E 過剰発現イネの 白葉枯病に対する抵抗性

次に、細菌により引き起こされるイネの重要病害である白葉枯病を取り上げた。本病は我が国では西日本に多く発生するが、東南アジアの稲作地帯でも発生し、問題となる。本細菌病に対する HAP2E 過剰発現株の抵抗性について検討した。供試したイネは上記と同様である。ただし‘アソミノリ’は、本白葉枯病に対して高度抵抗性である。逆に‘戦捷’は感受性である。各イネ系統の切離した葉身に、白葉枯病細菌 (系統 T7174) の懸濁液を針

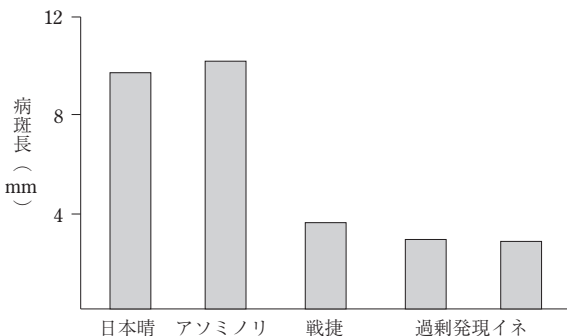


図-1 いもち菌による病斑長の比較
(ALAM et al., 2015 a を一部改変)

で接種した。接種後のイネ葉身はペトリ皿に入れ、培養室で 7 日間培養した。各イネ葉身に生じた病斑の写真を図-2 に示す。病斑サイズから、本遺伝子の高発現系統の抵抗性はどの系統も、高度抵抗性品種‘アソミノリ’が示した抵抗性と同程度であることが判明した。

V HAP2E 過剰発現イネの ウイルス病に対する抵抗性

病害耐性検定の最後に、ウイルス病に対する抵抗性を検討した。イネの重要ウイルス病害である委縮病やイネ縞葉枯病はそれぞれヨコバエおよびウンカにより媒介されるが、これらの抵抗性検定は、ウイルスを保毒した媒介昆虫を飼育する必要がある、どの研究室でも容易に実施できるとは限らない。このような事情から、接種・感染が比較的容易に行えるキュウリモザイクウイルス (CMV) (CHEN et al., 2011) ならびに土壌生息菌 (*Polymixa graminis*) で伝搬するイネネそモザイクウイルス (RNMV) (藤井, 1978) を供試した。RNMV は世界で最初に日本で単離されたウイルスで、一本鎖 (+) 鎖 RNA ウイルス、2 本の RNA からなる *Bymovirus* グループに属する。本ウイルスのゲノム構造は長らく未解明であったが、最近、私たちのグループがその全塩基配列を明らかにした (WAGH et al., 2015)。本ウイルスによる病害発生は、近年、我が国では見られていないが、インドではイネやジュート等で発生が見られている (WAGH, 私信)。ウイルス病に対する抵抗性検定に供試したイネは、RNMV 高度感受性品種の‘アケボノ’ (藤井, 1978)、感受性品種の‘日本晴’および過剰発現株 (3 系統) である。部分純化した CMV (SRO 株) を、4 葉期のイネの葉身 (第 2 および 3 葉) にカーボランダムをふりかけ、ガラスペラによるこすりつけ接種を行った。RNMV 処

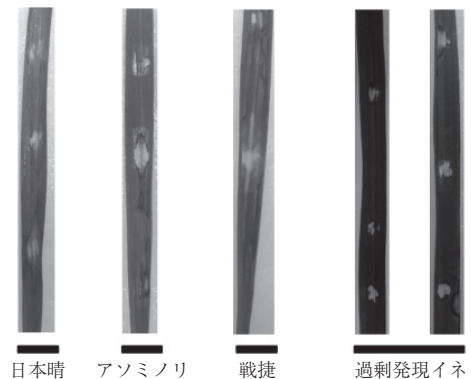


図-2 白葉枯病細菌による病斑の比較
(ALAM et al., 2015 a を一部改変)

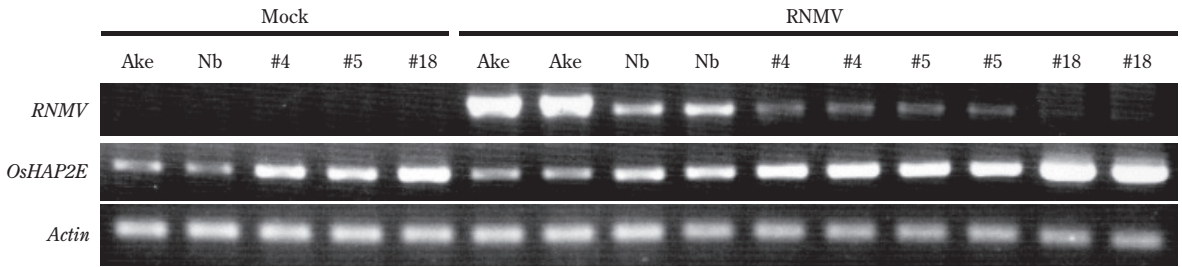
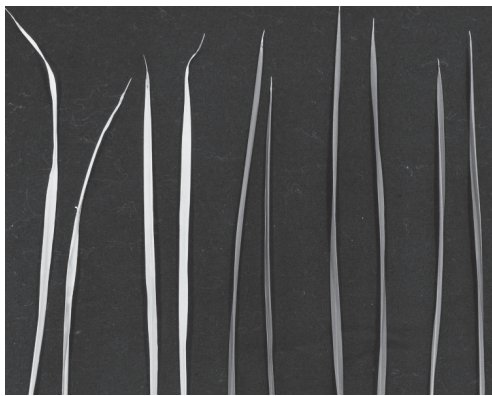


図-3 イネえそモザイクウイルス (RNMV) の蓄積量

Ake; アケボノ; Nb; 日本晴; # 4, 5, 8; 過剰発現株. (ALAM et al., 2015 b を一部改変)



アケボノ 日本晴 過剰発現イネ

図-4 イネえそモザイクウイルス (RNMV) による既存 2 品種の黄化
(ALAM et al., 2015 b を一部改変)

理は、ウイルスを保毒する土壌生息菌を含む汚染土壌にイネを播種することにより行い、播種して2週間後に苗をポットに移し、さらに生育させた。その結果、図-3に示すように、対照のイネに比べ、過剰発現株では明らかに RNMV の蓄積量は減少しており、抵抗性が見られた。CMV 感染による病徴は本来見られないが、CMV の蓄積量は過剰発現株で減少した。RNMV 処理区では‘アケボノ’や‘日本晴’で葉が黄化し、特に‘アケボノ’では葉の先端部分で枯死も見られたのに対し、本高発現株ではそのような目に見える病徴は観察されなかった (図-4)。また、イネの草丈は上記 2 品種で低下したのに比べ、本高発現株の草丈は対照区 (mock) と同等であった (ALAM et al. 2015 b)。

VI HAP2E 過剰発現イネの耐乾性と耐塩性

乾燥や塩害は非生物的ストレスの典型的な例であるが、砂漠などの乾燥地帯や塩害地帯は地球上で大きな面積を占め、農業に不適な土地である。もし耐乾性や耐塩性が付与できればこのような地帯が農耕地に代わる可能

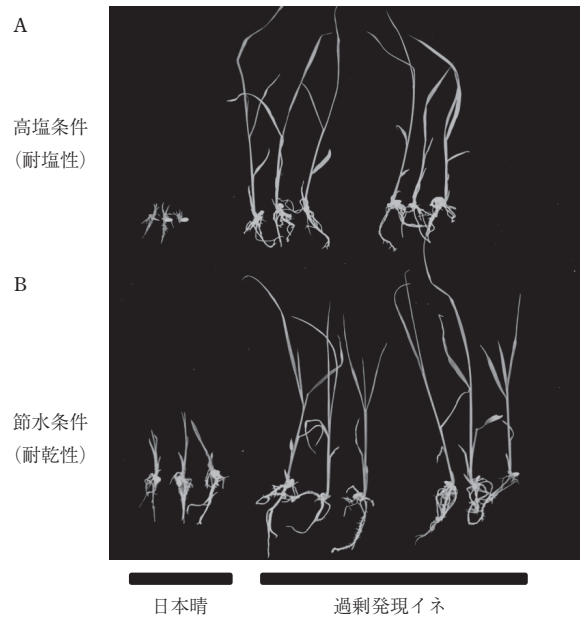


図-5 耐乾性および耐塩性検定
(ALAM et al., 2015 a を一部改変)

性がある。HAP2E 過剰発現株の耐乾性の検定には、浸透圧調整物質がよく用いられるが、その一種であるマンニトール (200 mM) を含む培地にイネを播種し、3週間生育させた。図-5Aに示すように、対照の“日本晴”は生育不良を示したのに対し、2つの HAP2E 過剰発現系統は生育が旺盛で、耐乾性を持つことが判明した。一方、HAP2E 過剰発現株の耐塩性の検定では塩化ナトリウム (200 mM) を含む培地にイネを播種し、生育させた。培地に播種して3週間後のイネの写真を図-5Bに示す。対照の“日本晴”ではほとんど生育不可能であったのに対し、2系統の過剰発現株は旺盛な生育を示し、耐塩性を持つことが判明した。以上のように、本遺伝子の過剰発現株は耐塩性と耐乾性の両方を合わせ持つことが明らかになった。

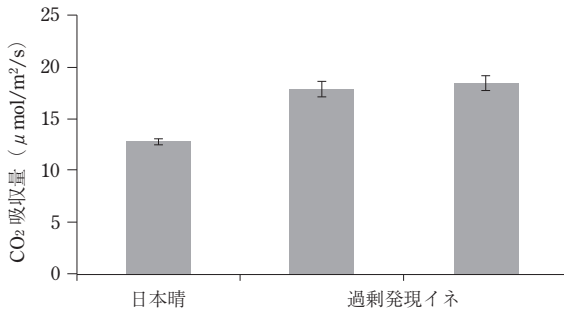


図-6 光合成効率の比較
(ALAM et al., 2015 a を一部改変)

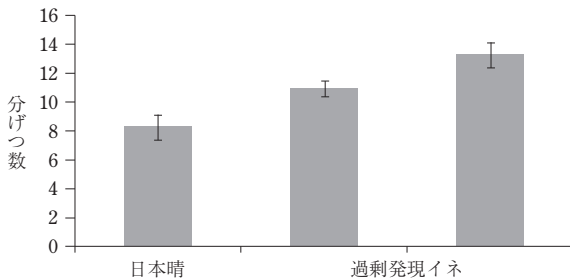


図-7 分けつ数の比較
(ALAM et al., 2015 a を一部改変)

VII HAP2E 過剰発現イネの光合成効率と分けつ数

すでに記述した通り、本遺伝子は大きなファミリーを形成する転写因子で、これまでにいろいろな機能がシロイヌナズナ等で報告されている。HAP2E の役割は、開花時期の制御（遅延）等が知られているが、ここで供試した HAP2E 過剰発現株において、生育に負の影響を及ぼすような表現型はこれまでのところ観察されていない。光合成に係る特性に関し、いくつかの指標を元に分析した。その結果、対照区のイネと比べ、HAP2E 過剰発現株では葉緑素量が増大していた他、単位面積・時間当たりの二酸化炭素の取り込み量も増大していることが判明した（図-6）。さらに、一株当たりの分けつ数を対

照と比較したところ、1.3～1.6倍に増大していた（図-7）。これらの特性は、バイオマスや収量に好適な影響を与えることが期待され、今後、さらにこれらの点について評価・分析を要する。

おわりに

以上のように本遺伝子の過剰発現株の特性を評価した結果、いもち病菌、白葉枯病細菌および CMV, RNMV の 4 種類の異なる病原体に対する抵抗性を合わせ持っていることが判明した。さらに、耐塩性や耐乾性も付与され、光合成効率と分けつ数も増大することが明らかになった。現在のところ、HAP2E 過剰発現株の生育特性に問題は見つかっていない。しかし、ここで記述したデータは一定の手法や生育条件下で得られた結果であり、本植物体の特性が圃場レベルでどの程度発揮されるかは、今後検討すべき課題として残されている。また、高温や低温ストレスに対する耐性等他にも有用な機能を保持しているか、あるいは他の作物への応用についての検討も必要である。さらには、地球レベルでの種々の環境条件下での試験を行い、将来的には国内のみならず海外でも、HAP2E 過剰発現作物が農業等を使用しない低環境負荷農業や人口増に伴う食糧不足に寄与できればと願う次第である。本研究は、生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業、農水省の農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業および有用遺伝子活用のための植物（イネ）・動物ゲノム研究の支援を受けて実施された。

引用文献

- 1) ALAM, M. M. et al. (2015 a): Plant Biotech. J. 13: 85 ~ 96.
- 2) ————— et al. (2015 b): J. Gen. Plant Pathol. 81: 32 ~ 41.
- 3) BALLIF, J. et al. (2011): Plant Physiol. Biochem. 30: 1 ~ 5.
- 4) CHEN, H. et al. (2011): 日植病報 77: 59
- 5) 藤井新太郎 (1978): 岡山県農試研報 69: 1 ~ 81.
- 6) LALLOUM, T. et al. (2013): Trends Plant Sci. 18: 156 ~ 166.
- 7) PETRON, K. et al. (2012): Plant Cell 24: 4777 ~ 4792.
- 8) WAGH, S. G. et al. (2015): J. Gen. Plant Pathol. DOI 10.1007/s10327-015-0618-7.