会 長 講 演

過敏反応から学んだ作物の耐病性強化戦略 —主としてジャガイモ疫病の研究を通して—[†]

道 家 紀 志*

DOKE, N.*: A strategy for enhancement of disease resistance that were drawn from the mechanism of hypersensitive reaction in host-parasite interaction of potato late blight

はじめに

本講演では、演者が30数年の永きにわたる「ジャガイモ疫病における宿主-寄生菌相互作用の機構に関する研究」の成果のエポックを紹介し、そこから学んだジャガイモ疫病に対する耐性強化戦略について考えることにする。

19世紀中頃におきた北アイルランドのジャガイモ疫病飢饉は、その後、植物病害の認識や病害防除技術に格段の進歩をもたらした。しかし今日、四大作物の地位まで築いているジャガイモですら未だに疫病の恐怖から解放されていない。疫病によるジャガイモ生産の損失は世界で毎年数千万トンにおよぶと言われる。他の多くの作物でも同様な傾向で、病害で2-3割の収穫被害を被っているのが実状である。21世紀に入って、近い将来に危惧される世界の人口増加や環境異常による食糧の逼迫問題を考えるとき、作物の生産性を高める食糧戦略として、「病害による損失の回復」は、「作物の生産能の向上」や「栽培技術の向上」以上に、食糧増産に希望がもてるのである。

ジャガイモ疫病の防除では優れた殺菌剤に恵まれず、石灰・硫黄・銅合剤のような予防剤の散布に頼っているのが現状である。この間、野生種のもつ抵抗性遺伝子を栽培種に導入する抵抗性品種の育種が他の作物に先駆けて実施され、野生種との交配によりジャガイモ疫病菌に対する真性抵抗性遺伝子をもつ多くの栽培品種が育種されている。しかし、この抵抗性品種の育種は一見成功したかに見えたが、導入した真性抵抗性遺伝子を侵す上位のレースの出現によ

り、単一品種の栽培体系では無駄な努力に終わった感がある。今日では、多重遺伝子で支配された圃場抵抗性をもつ品種の改良に期待がかけられている。

本講演では、真性抵抗性の発現で誘導される「過敏反応型誘導抵抗性」の能力を信頼し、植物の耐病性強化の戦略について考えてみる。

1. 真性抵抗性の発現とその意味

ジャガイモ疫病菌レースと真性抵抗性遺伝子をもつジャガイモ品種との間には、親和性（罹病性）と非親和性（抵抗性）という極めて明瞭な関係があり、典型的な遺伝子対遺伝子説に沿った病害の一つである。本菌はクチクラ侵入力や発病させる病原力が強く、真性抵抗性遺伝子をもつ品種に対しても親和性レースはたちまち疫病を発生させる。同じレースでも非親和性関係の真性抵抗性遺伝子をもつ品種に感染すると、局部的動的抵抗性、すなわち過敏反応（HR）を伴う防御反応が誘導され、限られた一部の組織に封じこめられる。この意味では宿主には極めて強力な抵抗能力があることになる。さらに、このHRが起こると全身的に免疫力を高める全身獲得抵抗性（SAR）が誘導され、二次的な病原性レースの攻撃に対する免疫性が高まる。真性抵抗性遺伝子は、問題を起こす親和性関係の菌の感染に対しては非力であるが、機能さえすれば絶対的に信頼できる生体防御機構であり、全身的免疫強化をも誘導する、一石二鳥の役割を果たす優れたものである。

真性抵抗性遺伝子の機能発現で誘導される防御応答は、実は、真性抵抗性遺伝子を持たない品種でも、異物の認識さえ起これば誘導されるもので、防御応答システム自体は

[†] 平成17年3月28日 平成17年度大会で行われた会長講演の要旨

* 名古屋大学大学院・生命農学研究科 Nagoya University, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan

全ての品種に備わっている。真性抵抗性遺伝子の機能に危機の念はあっても、その下流で動く防御応答システムは信頼に足るものである。したがって、ジャガイモを疫病の親和性レースに対する耐病性戦略を立てるうえで、宿主-寄生者の関係における感染の特異性を決める鍵反応の解明が重要で、そこに焦点を絞れば疫病耐病性強化の知恵が得られるものと思われる。

2. 非親和性の感染特異性の方向を決める鍵反応

ジャガイモ疫病に対する真性抵抗性遺伝子は、いまだ R_1 遺伝子のみが判明しているに過ぎない。その遺伝子の産物は、菌レースの産物を異物として特異的に認識しそのシステムを動かす受容体かと思われる。この過程は疫病菌が寄生を全うする戦略拠点であり、親和性レースはそれを取り越えたものであろう。この場の詳細な解明は戦略上極めて重要であるが、ここを操作しても寄生進化の標的となっているので凌駕されやすい。むしろ、そこから発信される情報伝達系を統御すれば戦術的にも有効性が高い。そこで親和性レースと非親和性レースの感染の流れの中で、生理・生化学的相違が発生する分岐点を見つけ、その反応が何であるかを見定めれば、道が開けると考えた。

古くからミクロな観察により、菌が第1次侵入菌糸嚢を形成している時点で感染の特異性がすでに見られている。そこでは、非親和性レースに限って侵入菌糸嚢の周辺部に原形質凝集がみられる。その同じ現場で、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) の還元活性の高まりを示すブルーフォルマザンの生成蓄積が観察される。これは、酸素要求性の還元活性の昂揚を示唆する反応であり、 O_2^- 生成反応があるヒントとなった。その結果、 O_2^- の発生は生化学的に捉えられた。

好氣的代謝をする生物では必然的に活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) が生産されるため、反応性に富み毒性を発揮する ROS を消去する方向で生体システムが進化している。それにも拘わらず、菌と闘いを開始する場で O_2 を1電子還元して O_2^- が生産されることは、エネルギーを使った能動的な生体反応と理解される。ROS が HR 反応への引き金となっているのではないかとの考えはここから生まれた。これを「オキシダティブバースト (Oxidative burst : OXB)」と呼ぶことにした。

3. OXB の発生と感染防御応答との関係

宿主ジャガイモ塊茎組織の加齢切断面に非親和性レースを接種または菌の細胞壁由来の非特異的エリシターである HWC を塗布処理すると、まず速やかに一過性の O_2^-

生成反応が高まる。その数時間後に再び一過性の O_2^- 生成反応が高まる。それぞれを第1相および第2相の局部的 OXB という。これらの反応の下流で HR 反応が誘導される。さらに奇妙なことに、直接応答した切断面ばかりでなく、反対の加齢切断面で第1相の局部的 OXB の発生と少しタイミングがずれるが、一過性の OXB が発生する。これを全身的 OXB という。その後には SAR の誘導がかかる。このように防御応答と関連し、複相的に OXB が発生すること、および親和性関係の菌が感染した場合には、いずれの OXB も発生せず防御応答がないことから、OXB は防御応答の始動シグナルかメディエーターとして重要な機能を果たしていることが考えられる。

4. OXB と NADPH オキシダーゼ (gp91^{phox} ホモログ : rboh)

今日、OXB 現象は植物を問わず HR 型感染防御応答には普遍的な現象として認められる。この OXB の生成基盤となる酵素の遺伝子が、イネ、シロイヌナズナ、ジャガイモ、トマト、ベンタミアナタバコなど各種の植物からクローニングされている。これらは、ヒト好中球の食食時に活性化され、ROS 生成酵素として機能する NADPH オキシダーゼの主因子である gp91^{phox} のホモログ (respiratory burst oxidase homolog : rboh) であった。筆者らは、ジャガイモ塊茎から、*StrbohA* と *StrbohB*、ベンタミアナタバコから *NbrbohA* と *NbrbohB* を単離した。ジャガイモ塊茎組織では、*StrbohA* は傷誘導性で常時発現型、*StrbohB* は感染応答発現型で通常は発現していない。同様に *NbrbohA* も常時発現型で、*NbrbohB* は感染応答発現型であった。

ベンタミアナタバコ植物を用いて、ウイルス誘導性ジーンサイレンシング (VIGS) 法で *NbrbohA*、*NbrbohB* あるいは両者の発現を抑制し、機能解析をした。VIGS にかかった葉組織に、非親和性菌となる疫病レースを接種すると、対照葉では、感染部位で活性酸素種の生成を示す DAB 染色がポジティブとなり、肉眼的にも HR 反応の誘導が見られたが、両遺伝子のみならず、いずれか一方の rboh の発現が抑制された葉組織では、菌の感染率が上がり、OXB の発生も HR 誘導も抑制され、感染が進行し罹病病斑を示した。接種の代わりにエリシターの INF1 処理でも、VIGS のかかった葉組織では、HR 応答は抑制された。これらは HR 応答の誘導には両 rboh による第1相および第2相の OXB が必須であり、HR 誘導過程には、両者が協調して機能することを示唆している。

5. OXBの発生制御とシグナル伝達系

1) StrbohAの活性化へのシグナル伝達系

ジャガイモ塊茎加齢切断面にHWCを塗布処理すると第1相のOXBが速やかに発生する。この発生は、 Cl^- チャネル阻害剤、 Ca^{2+} チャネルブロッカー、 H^+ -ATPアーゼ阻害剤および細胞外 Ca^{2+} キレート剤、カルモジュリン阻害剤、タンパク質リン酸化酵素阻害剤の前処理で阻害され、タンパク質合成阻害剤では抑制されない。また Ca^{2+} イオノフォアやタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤の単独処理で第1相に類似したOXBが発生し、両者を同時処理すると相乗的效果により強力なOXBが発生する。これらの薬理作用から第1相のOXBはStrbohAに依存し、チャネルを介してインフラックスした Ca^{2+} および Ca^{2+} 依存のタンパク質リン酸化による活性化とタンパク質脱リン酸化による不活性化により、 O_2^- 生成活性のレベルが調節されて発生するものと推定される。

菌の感染過程で、フォスフォ- β -1 $\rightarrow$ 3- β -1 $\rightarrow$ 6-グルカンが分泌されるが、親和性関係にある品種の第1相のOXBの発生を抑制する活性を持つことを明らかにしている。これをサプレッサーと呼んでいるが、これが菌の第1義的寄生戦術因子として機能しているとするならば、この作用モードを負に制御すれば親和性関係は打破されると思われる。ただ、今後の研究に待たねばならない。

2) StrbohBの活性化へのシグナル伝達系

一方、第2相のOXBのシステムは、通常は発現しておらず感染やエリシター刺激により誘導され、その誘導はタンパク質リン酸化酵素阻害剤、タンパク質合成阻害剤、RNA合成阻害剤により阻害されるので、StrbohBに依存するものと考えられ、その発現誘導にはリン酸化酵素の関与が予想される。エリシター刺激でStrbohBの発現とタイミングを合わせて活性化される51 Kdのタンパク質リン酸化酵素を見つけ、それを純化・精製し、アミノ酸シーケンスを解析したところMAPキナーゼであると判明し、StMAP1と命名した。さらに、それをリン酸化する上流のMAPKKに相当するStMEK1遺伝子をクローニングした。StMEK1の機能解析のため、2カ所のアミノ酸置換により常時活性型に変換した遺伝子のStMEK1^{DD}を作成し、アグロインフィルトレーション法によりベンタミアナタバコで一過性に発現させ、その機能をみた。その結果、OXBの発生を伴うHR反応が誘導され、この過程でINF1エリシター処理と同様に、MAPKのSHIPとWIPKの活性化、NbrbohBの発現、NbrbohBの生産、防御関連遺伝子の発現、などが見られた。さらに、StMEK1^{DD}をNbrboAまたはNbrbohBをVIGSにかけた葉で発現させると、後者の場

合のみにおいて、HRの誘導が抑制され、第2相のOXBはMAPキナーゼカスケードにより制御されるStrbohBに依存することが明らかとなった。

ところが、MAPキナーゼカスケードの活性化とStrbohBの発現までは、いずれのOXBも起こらない親和性レースの感染でも、非親和性レースの感染と遜色なく誘導されていた。このことは、非親和性レースの感染特異的な第2相のOXBの発生は、翻訳後にStrbohBがレース特異的な活性調節を受けて活性化することになる。第1相のOXBを阻害すると第2相のOXBが発生しないことから、StMEK1^{DD}がするように、第1相のOXBがMAPキナーゼカスケードの持続的活性化を条件づけ、StrbohBを活性化することが考えられる。親和性レースの感染でMAPキナーゼカスケードが動くということは、耐病性強化を図るうえで重要なヒントを与えている。

3) 全身的OXB誘導へのシグナル伝達系

全身的OXBはエリシター刺激による第1相のOXBに与える阻害剤と類似した薬理効果を受けるので、StrbohAに依存して発生すると思われる。全身的OXBの誘導刺激を加える前に局部的OXBの発生阻害剤、あるいは生成するROSの消去剤やカタラーゼで処理すると全身的OXBの発生が起こらない。このことから局部的OXBで生成される H_2O_2 が全身的情報伝達の刺激因子となっていると思われるが、OXB機能が確立していない切断直後の組織に H_2O_2 刺激を加えても全身的OXBは発生しない。つまり、加齢切断組織のようなOXBポテンシャルが高まっている組織における H_2O_2 の発生が、何らの内生的シグナルを生産し全身的シグナルの発信をしていることが考えられる。このシグナル因子が免疫誘導剤としての候補に成りうる可能性を含んでいる。

さらに全身的シグナルが伝達される組織の中間部に Ca^{2+} キレート剤、 Ca^{2+} チャネルブロッカー、 H^+ -ATPアーゼ阻害剤を処理すると伝達されるはずの情報の流れが停止する。これらのことから、全身的シグナル伝達は、物質因子が移動するのではなく一種の細胞興奮が連鎖的に伝わり、OXBポテンシャルの高まった組織に到達して Ca^{2+} インフラックスが起こるとStrbohAが活性化され、全身的OXBが発生するものと思われる。

6. 親和性レース感染応答性遺伝子のプロモーターの探索と発現特性

OXBの発生がHR型防御応答のみならずSARの誘導に密接に関わっていることが解ってきた。OXBが発生しない親和性レースの感染でもOXB系が作動できるように何

らかの操作をすれば HR 型防御応答が発現し耐病性にすることも夢でない。

明らかにしてきた智恵を背景に考えると、導入した *StMEK1^{DD}* が親和性レースの感染で発現すれば、その感染の場で HR 誘導が可能となる。親和性レースの感染特異的に発現する遺伝子があれば、その遺伝子のプロモーターに期待がかけられる。親和性レースと非親和性レースがそれぞれ感染した組織を用いて、ディファレンシャルディスプレイ法またはサブストラクション法で特異的に発現をする遺伝子を解析した結果、奇妙なことに防御応答と密接に関連するはずのファイトアレキシン代謝系の酵素遺伝子が見つからない。これがヒントとなり、ファイトアレキシン生産を誘導しない親和性レースの感染でもセスキテルペノイドファイトアレキシン代謝系の主要な酵素遺伝子 (*HMG2*, *HMG3*, *PVS1*~4) が発現することが判明した。特に、ベティスピラジエンシンターゼの *PVS3* は塊茎でも葉でも強く発現し活用に期待がもたれた。このプロモーターに *GUS* 遺伝子を連結したキメラ遺伝子で形質転換したジャガイモを作出し、感染やその他のストレスでのプロモーターの発現様相を調べた。予想通り親和性菌および非親和性菌の感染現場で発現する *GUS* 染色が見られ、傷や雑菌に対して、また根では発現しないことが明らかとなった。

7. *PVS3* プロモーター連結 *StMEK1^{DD}* キメラ遺伝子の形質転換植物の作出と耐病性化の証明

PVS3 のプロモーターを *StMEK1^{DD}* に連結したキメラ遺伝子で形質転換したジャガイモを作出した。これは正常に生育した。これに親和性レースを接種すると、感染現場で HR 様反応が見られ、感染進展が止まり、全体として発病せず、耐病性が賦与されたことが証明された。

これは、感染現場で MAP キナーゼカスケードが活性化し、*PVS3* のプロモーターが発現調節を受け、*PVS3* プロモーター結合 *StMEK1^{DD}* も発現し、生成された *StMEK1^{DD}* が上流の MAPKKK により活性化を受け常時活性状態になり、下流の *StMAP1* 以下を連続的に活性化し、さらに *StrbohB* の発現促進と活性化による OXB を発生させたものと推定させた。さらに、*PVS3* などファイトアレキシン合成系遺伝子が活性化し、OXB の下流で HR に伴う各種の防御関連遺伝子が誘導され、抵抗性を示したものと考えられる。

おわりにかえて

この形質転換ジャガイモは、感染で動く自身の遺伝子のプロモーターを MAPKK のアミン酸を一部置換した遺伝子に結合させたキメラ遺伝子による形質転換体である。非感染の健全状態や傷などのストレスでは発現せず、食糧としない茎や葉の感染部位で局部的に発現するのみで、食糧とする健全塊茎では導入遺伝子は発現していない。したがって、その遺伝子産物は蓄積しないものと思われ、食糧としての安全性にも特に問題はないと思われる。このような形質転換ジャガイモの種いもは、現在栽培されている品種から数ヶ月で作出可能で、これは栽培許可さえ得られればジャガイモ疫病の恐怖から解放され、省農業による環境調和型の栽培が可能となると考えている。

親和性レースの寄生進化は、真性抵抗性遺伝子に絡む第1相の OXB の発生系を抑制する方向で起こっていると考えられるが、本耐病性ジャガイモは、菌の第一義的寄生戦略は機能させたまま、その裏をかき別の情報伝達系を増幅し、第2相の OXB を強行に発生させ HR 型防御応答を誘導し、感染を阻止する戦略である。この意味で、真性抵抗性についてまわる新レースの出現の可能性は低いものと期待される。また、親和性レースの感染でも誘導される HR 反応を起点として SAR の誘導も期待され、全身的免疫力も強化されると思われる。

宿主-寄生菌相互作用の機構から学んできた OXB の戦略的重要性に基づく理論で耐病性作物の作出に成功したが、他の作物においても、感染特異的に発現する遺伝子さえ見つければそのプロモーターを活用し宿主のもつ潜在的防御システムを活かした耐病性強化ができると考えている。今後の進展を期待し話を閉じることとする。

謝 辞

本講演の内容は多くは名古屋大学大学院生命農学研究科・植物病理学研究分野に関わるスタッフの吉岡博文および川北一人両助教授ならびに多くの大学院学生、学部学生の共同により成し遂げられたものである。また、北海道農業試験場時代ならびに現独立法人北海道農業研究センター・ばれいしょ育種研究室の歴代の室長、西部幸男氏、梅村芳樹氏、森元幸氏および多くの研究員の皆様によるジャガイモや疫病菌の研究材料の支援の賜である。ここに深甚なる謝意を表します。研究の多くは、文部省科学研究費補助金（特定研究 A）、日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究 A, B, C, および S, ならびに未来研究）の援助を受けて行った。記して謝意を表する。