

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14664

研究課題名(和文) 葉緑体における活性酸素種生成の制御によるウイルス病トレランス導入法の開発

研究課題名(英文) Development of a system to confer plant virus disease tolerance through the regulation of reactive oxygen species production in chloroplasts

研究代表者

小林 括平 (KOBAYASHI, Kappei)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：40244587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス病耐性植物を作出する目的で、植物病害の発症に重要な役割を果たす活性酸素種(ROS)の生成を制御する遺伝子を必要な時にだけ発現させる系の確立を目指した。まず、葉緑体に遺伝子を導入する安価な法を確立し、ROS制御遺伝子をタバコに導入した。ROS制御遺伝子を病原体が感染した時に発現させるスイッチとなる遺伝子の構成について検討し、このスイッチ遺伝子から作られるタンパク質を葉緑体に運ぶためにタンパク質とRNAの両方の構造が重要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to generate plants tolerant to plant virus diseases. To this end, we designed a genetically modified plant system to express timely the gene(s) regulating the reactive oxygen species (ROS) production in chloroplasts, which is known to have roles in plant disease development. We established a cheap method to introduce foreign genes into chloroplast and introduced genes that can regulate ROS production into tobacco chloroplasts. Through the examination of a switching gene that turns on the foreign gene in chloroplasts, we found that both protein and RNA structures are important to enable the switching gene product for its efficient transport into chloroplasts.

研究分野：植物ウイルス病の発症機構の解析と耐病性分子育種

キーワード：植物ウイルス病 遺伝子組換え植物 活性酸素種 葉緑体

1. 研究開始当初の背景

植物病理学において植物病害として認知されるのは、病的状態の植物のうち、人類がその植物を農作物等として利用しており、病的状態が人類の生産活動に対してマイナスとなる場合に限られる。それゆえタケの開花のような生理的現象も「自然枯」と呼ばれ、病害として認知されてきた。一方、マコモダケは、糸状菌感染によって植物組織が肥大したものであるが、生産活動にマイナスであるどころか、食材として珍重されている。ヒトの糞便中に最も大量に存在するウイルスが食品に由来する植物ウイルスであることも報告されており、人類の生産活動にマイナスの要因とならない場合、植物病原体は人類と共生的な関係を築きうる。しかし、これまでの植物病害防除は、病原体の増殖を抑制し、その結果として植物の生産性を確保することを基本戦略としてきた。そしてその弊害として農薬に対する耐性を獲得した病原体や、植物の抵抗性を打破する病原体などが出現し、再び被害をもたらす結果となっている。これは、病原体に対する増殖抑制活性がそれを打ち破る変異病原体に対する選択圧として働いているからであり、結果として新しい防除法を開発しては打破されることを繰り返す、いわゆるイタチごっこの状況にある。

トレランス(狭義の耐病性)は、病原体が増殖しても病徴を発現しない植物の性質である。これを植物病害防除に利用する考えは古くからあったが、有用な天然遺伝資源が乏しいため、広く利用されるには至っていない。そこで本研究では、効率的に多様な病害に対してトレランスを示す植物を作出する手法を開発することを目指した。

2. 研究の目的

本研究は、効率的に多様な病害に対してトレランスを示す植物を作出する手法を開発することを目的として計画された。植物病害においては光合成を担う葉緑体への障害が広く認められる。その際、特に葉緑体において光合成の光化学反応を担うチラコイド膜の崩壊が認められるが、この現象に葉緑体において光依存的に生成される活性酸素種(ROS)が関与することが示唆されている。そこで本研究では、植物にトレランスを付与方法として葉緑体における ROS の生成を、病原体感染時に抑制するシステムを遺伝子工学的に導入すること、およびこれを導入した植物の病害応答について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 材料植物として遺伝子導入の容易なタバコ(*Nicotiana tabacum* cv. Petit Habana SR1)を用いた。核ゲノムへの遺伝子導入にはアグロバクテリウム法を用いた。葉緑体ゲノムへの遺伝子導入には、遺伝子銃を用いた DNA 導入と相同組換えによる葉緑体ゲノムへの挿

入による手法を用いた(後述)。

2) 核ゲノムに導入した遺伝子を病原体感染時に特異的に発現させる目的で、病態関連タンパク質をコードする PR1a 遺伝子のプロモーターを用いた。また、葉緑体ゲノムに導入した遺伝子については、バクテリオファージ T7 のプロモーターを用い、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を PR1a プロモーターの制御下に核ゲノムに導入したものをを用いた。T7 RNA ポリメラーゼを葉緑体に輸送させるためのトランジットペプチドとして、RubisCO 小サブユニット(SSU)、フェレドキシン(Fd)、FugI、および DVR のものをを用いた。

3) ROS の生成を制御する遺伝子として、シロイヌナズナの Fd およびアスパラギン酸ペルオキシダーゼ(APX) 遺伝子を用いた。

4) 導入遺伝子の発現は、RT-PCR 法、およびウェスタンブロット法で検討した。

5) タバコモザイクウイルス(TMV)およびキュウリモザイクウイルス(CMV)は機械的に接種し、ウイルスの増殖を ELISA 法によって測定するとともに、病徴発現を観察した。

4. 研究成果

1) 葉緑体ゲノムへの遺伝子導入法の確立

葉緑体ゲノムへの遺伝子導入には、これまでラプチャーディスク型遺伝子銃が広く用いられてきたが、装置や消耗品が高価であることからパーティクル・インフロー型の遺伝子銃を用いて葉緑体ゲノムへの遺伝子導入法を確立した。

本研究で用いた遺伝子銃、GIE-III IDERA(タナカ)は、核への遺伝子導入による一過性発現においては十分な導入効率を示していたが、葉緑体ゲノムへの遺伝子導入を行うための導入条件は不明であった。核への遺伝子導入と同様の条件、およびそれよりも高い射出ガス圧力、および射出チャンバー内の減圧において葉緑体ゲノムへの遺伝子導入の成否を検討したが、遺伝子導入個体は得られなかった。そこで、射出口から植物材料までの距離を短くすることを試みた。当初、近距離から射出した場合に植物材料を置床する培地が飛散するという問題に直面したが、培地の固化材濃度を高めることによって解決され、遺伝子導入個体が得られた(図1)。

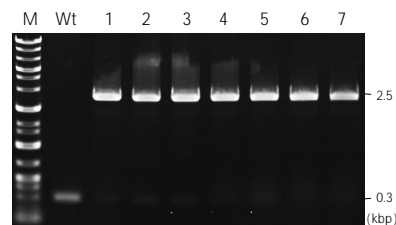


図1. 葉緑体ゲノムへの遺伝子導入。Wt, 無処理個体; 1~7, 遺伝子導入個体。PCR 法によって約 2.2-kbp の遺伝子導入が確認された。

2) 核ゲノムへの遺伝子導入による ROS 消去酵素の病原体感染特異的な発現系の構築

PR1a プロモーターの制御下に SOD および APX を発現する遺伝子組換えタバコを作出した。また、対照実験用植物として、同プロモーターの制御下に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する植物を作出した。全ての植物体において導入遺伝子の存在は PCR によって確認された。

まず、対照実験用の GFP 発現植物において導入遺伝子の発現が病原体感染によって誘導されるか否かを検討した。その結果、図 2 のように TMV および CMV 感染によって蛍光が観察されたことから、導入遺伝子がウイルス感染によって発現誘導されることが示唆された。この時、可視光下においてこれらの植物における明確な病徴発現が観察された。また、GFP mRNA の発現誘導も RT-PCR によって確認された。

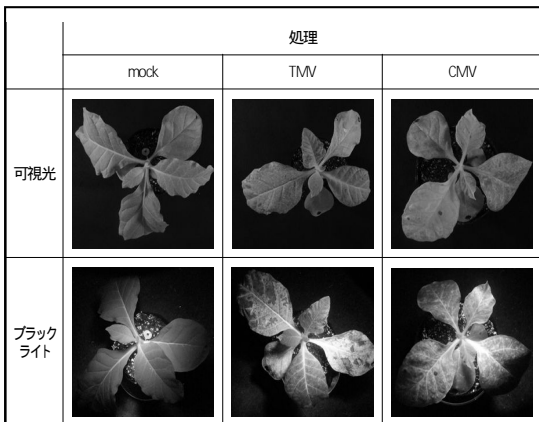


図 2. PR1a プロモーターの制御下に GFP を発現する植物におけるウイルス感染。

mock, 疑似接種した植物; TMV および CMV, それぞれのウイルスを接種した植物。可視光下で病徴発現を、ブラックライト照射下で蛍光を観察した。

次に PR1a プロモーターの制御下 APX 遺伝子導入植物についてウイルスを感染させ、APX mRNA の発現、ウイルスの増殖、および病徴発現を GFP 遺伝子導入植物と比較した。その結果、RT-PCR によって APX mRNA の発現誘導は認められず (図 3A)、ウイルス増殖、および病徴発現についても APX 遺伝子導入植物と GFP 遺伝子導入植物の間で有意な差は認められなかった (図 3B)。その原因として、APX 遺伝子が導入された染色体上の位置が発現に不適当であった可能性も考えられたが、独立した複数の遺伝子導入植物系統においてごく低レベルの発現しか認められなかったことから、ベクターの構造が葉緑体における外来タンパク質の発現に不適切である可能性が示唆された。この考えは、後述の 3) において観察された T7 RNA ポリメラーゼの発現不全においても支持され、後述の 3) および 4) において検証・確認された。

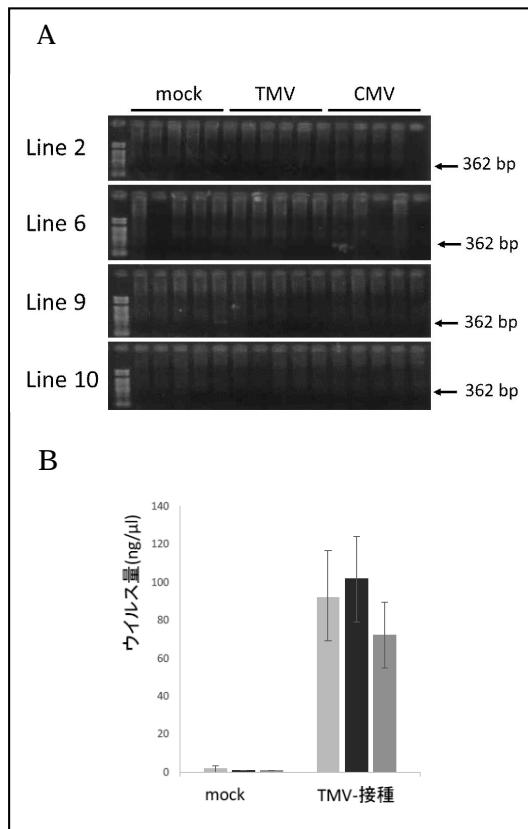


図 3. APX 遺伝子導入植物における導入遺伝子の発現(A)とウイルス増殖(B)。

独立した 4 系統の APX 遺伝子導入植物に TMV あるいは CMV を感染させ、APX 遺伝子の発現を RT-PCR で (A)、ウイルス増殖量を ELISA 法によって (B) 検討した。B では左から、GFP 遺伝子導入植物、APX 遺伝子導入植物系統 Line 2、APX 遺伝子導入植物系統 Line 10 の結果を示す。

3) 葉緑体ゲノムへの遺伝子導入による ROS 消去酵素発現系の構築

上述の 1) のように T7 プロモーターの制御下に APX を発現する遺伝子を葉緑体ゲノムに導入した植物を 6 系統作出した。これらの植物において病原体感染特異的に導入遺伝子を発現させることができるかどうかを検討する目的で、PR1a プロモーターの制御下に T7 RNA ポリメラーゼを発現する遺伝子をアグロインフィルトレーション法によって導入し、APX 遺伝子の発現をウェスタンブロッティングによって検討した。この実験においては、T7 RNA ポリメラーゼを葉緑体に輸送させるために RSU のトランジットペプチド配列を付加したものを使用した。その結果、APX タンパク質の増加は認められず、これが T7 RNA ポリメラーゼの発現が不十分であるためであることが分かった (図 4)。T7 RNA ポリメラーゼの発現不全の原因を明らかにする目的で、GFP に SSU のトランジットペプチド配列を付加したものを PR1a プロモーターの制御下で発現する遺伝子導入植物を作出し、GFP の発現を検討したが、トランジットペプチドを付加しなかったものとは異なる

り、明確な GFP 蛍光は認められなかった。そこで、SSU のトランジットペプチドが外来タンパク質の葉緑体への輸送には不向きである可能性を考慮し、Fd, Fug1, および DVR のトランジットペプチドを GFP に付加したものについて一過性発現系で比較し、Fd のトランジットペプチドが最も効率よく GFP を葉緑体に輸送できることが分かった。そこで、これを T7 RNA ポリメラーゼに付加したものについて、アクチンプロモーターの制御下に発現を検討したところ、Fd のトランジットペプチドによって T7 RNA ポリメラーゼの発現が改善されることが分かった (図 4)。

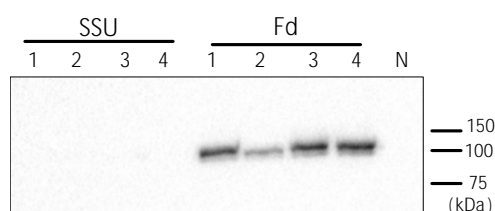


図 4. トランジットペプチドの違いによる T7 RNA ポリメラーゼの発現量の違い。タバコにおいてアグロインフィルトレーションによって、SSU または Fd 由来のトランジットペプチドを付加した T7 RNA ポリメラーゼをアクチンプロモーターの制御下で一過性発現させ、ウェスタンブロットング法で検出した。

APX 遺伝子に加え、タバコの 4 種類の Fd 遺伝子についても葉緑体ゲノムへの遺伝子導入を行い、14 系統において導入を確認し、9 系統について採種した。

4) mRNA の 5'-非翻訳領域が葉緑体タンパク質の発現に及ぼす影響

上述のようにアクチンプロモーターの制御下では、Fd のトランジットペプチドを用いることによって葉緑体に局在する T7 RNA ポリメラーゼの発現が改善されたが、PR1a プロモーターの制御下では、他の葉緑体タンパク質の発現も低レベルであることを経験した。本研究で用いた PR1a プロモーターは、転写開始点の下流に外来遺伝子挿入のための制限酵素認識部位を配置しており、5'-非翻訳領域が非常に短いことから、翻訳効率は高いと考えていたが、実験的には検証していなかった。そこで、これを検証するとともに、5'-非翻訳領域が葉緑体タンパク質発現に及ぼす影響を検討することとした。

PR1a 遺伝子、および Fd 遺伝子の 5'-非翻訳領域を、GFP および Fd のトランジットペプチドを付加した GFP の上流に挿入し、PR1a プロモーターの制御下で一過性発現させ、ウェスタンブロットング法によって GFP を検出した。その結果、いずれの 5'-非翻訳領域もトランジットペプチドを持たない GFP の発現には大きな影響は及ぼさなかったが、Fd

のトランジットペプチドを持つ GFP では Fd の 5'-非翻訳領域によって著明な発現増強が認められた (図 5)。5'-非翻訳領域を持たない GFP 発現系と比較して、Fd の 5'-非翻訳領域を持つものでは、葉緑体への輸送前の GFP とと思われる 36 kDa タンパク質の蓄積が少なく、葉緑体へ輸送された 28 kDa タンパク質は多かった。このことから、Fd の 5'-非翻訳領域が葉緑体へのタンパク質輸送を改善したことが示唆される。この結果は 5'-非翻訳領域が翻訳効率だけでなく、葉緑体タンパク質の輸送に影響しうることを示唆する。

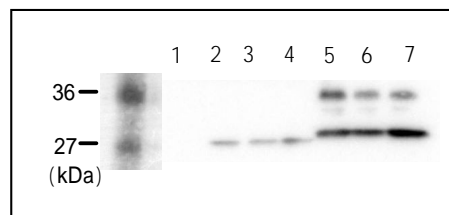


図 5. mRNA の 5'-非翻訳領域が葉緑体タンパク質の発現に及ぼす影響。1, 遺伝子導入なし; 2~4, トランジットペプチドを持たない GFP 発現系; 5~7, トランジットペプチドを持つ GFP 発現系; 2 および 5, 5'-非翻訳領域を持たない GFP 発現系; 3 および 6, PR1a の 5'-非翻訳領域を持つ GFP 発現系; 4 および 7, Fd の 5'-非翻訳領域を持つ GFP 発現系。

5) 結語

本研究では、当初の目標であった ROS 制御遺伝子を病原体感染特異的に高発現させる系を研究期間内に確立するには至らなかったが、外来タンパク質を葉緑体で発現させるためにトランジットペプチドの種類や 5'-非翻訳領域が重要であることを見出した。今後、本研究で得られた知見を活用し、外来タンパク質を効率的に葉緑体で発現させることができるようになり、本研究の目的であった ROS 制御遺伝子の病原体感染特異的な大量発現を実現できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小坂奈央美・八丈野孝・山岡直人・西口正通・小林括平・葉緑体における活性酸素種消去系大量発現のための葉緑体形質転換法の確立。日本植物病理学会感染生理談話会、2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 括平 (KOBAYASHI, Kappei)

愛媛大学大学院農学研究科

研究者番号：40244587

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

小坂 奈央美 (KOSAKA, Naomi)

山下 芽衣 (YAMASHITA, Mei)

岡本 舞子 (OKAMOTO, Maiko)

ボホール サチン アショク (BHOR Sachin
Ashok)