

植物の病害感受性因子の機能抑制による
耐病性ダイズの作出に関する研究

高知大学 農林海洋科学部 農芸化学科

木場 章範

ダイズはタンパク質、炭水化物、脂質等の栄養素や、ダイゼイン、ゲニステイン等のイソフラボンに代表される生理活性物質を含む重要な食用作物である。さらに、脂質を多く含むことから、油脂の生産にとって欠くことができない作物であり、高品質なダイズの安定的な供給が求められている。ダイズの栽培において、減収や品質低下の原因の1つに病害がある。一般的に病害の防除には、抵抗性品種の利用や農薬の使用が考えられる。しかしながら、抵抗性を打破する病原体の出現や農薬耐性の病原体の出現、さらに、温暖化の影響に伴う熱帯・亜熱帯地域からの病原体の流入や、新規の病害の発生等が原因となり、十分な効果は得られていない。申請者は、病原体の感染・発病に必要な植物因子を病害感受性因子(S 因子)と定義し研究を進めている。これまでのナス科植物を用いた解析から、S 遺伝子の機能抑制により、細菌病、卵菌病、ウイルス病に対して耐性を付与できることを見出してきた。すなわち、S 因子をノックアウト・機能抑制することにより、耐病性育種への応用できる。そこで本研究では、重要なマメ科作物の代表的存在であるダイズを用いて、ダイズ栽培に甚大な被害を及ぼすダイズ茎疫病、ダイズ斑点細菌病、ダイズ葉焼病を対象に、S 因子のノックアウト・機能抑制による耐病性ダイズ品種の作出に向けた基礎研究を目的とした。

実験方法

供試菌として、ダイズ栽培に甚大な被害を及ぼす卵菌 1 種類および細菌 2 種類を用いた。ダイズ茎疫病菌は V8 ジュース寒天培地、ダイズ斑点細菌病、ダイズ葉焼病菌は PY 液体培地にて培養した。

- ・ダイズ茎疫病(卵菌:*Phytophthora sojae* MAFF23802)
- ・ダイズ斑点細菌病(細菌:*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* MAF301683)
- ・ダイズ葉焼病(細菌:*Xanthomonas campestris* pv. *glycinea* MAF106736)

供試植物として、ダイズ品種スズマル、エンレイ、フクユタカ、ユキホマレを用いた。

- ・ダイズ品種スズマル、エンレイ(茎疫病罹病性)
- ・ダイズ品種フクユタカ、ユキホマレ(茎疫病抵抗性)

病原体の接種法

ダイズ茎疫病的接種は爪楊枝穿刺接種法、培地挿芽接種法(田澤ら 2009)、並びにより簡便な爪楊枝穿刺接種法、培地挿芽接種法として、黄化胚軸爪楊枝穿刺接種法、黄化胚軸培地挿芽接種法の開発を行った。実験には、滅菌したバーミキュライトにダイズ種子を播種し、通常光条件、および暗黒下で出芽したダイズを用いた。

爪楊枝穿刺接種では、出芽したダイズの胚軸に菌糸を穿刺することで接種した。培地挿芽接種は、厚さ 1 cm に分注した V8 寒天培地、あるいはトウモロコシ煎汁培地 (CMA 培地) で培養した茎疫病菌の菌叢に、出芽後 3 cm の切りそろえた胚軸を差し込むことで行った。いずれの接種法の場合も、接種 6 日後の病徴を観察した。

ダイズ斑点細菌病菌、ダイズ葉焼病菌の接種は、感染を同調化できる葉肉注入接種法による感染系の確立を行った (Kiba et al. 2003)。実験には、滅菌したバーミキュライトにダイズ種子を播種し、通常光条培養し、本葉が展開したダイズを用いた。PY 培地にてオーバーナイトで培養したダイズ斑点細菌病菌、ダイズ葉焼病菌の濁度を分光光度計で測定し、 $OD_{600nm}=0.1$ (1×10^8 cfu/ml) に調整し、針なしシリンジにて、ダイズ本葉の細胞間隙に注入した。

病原体のバイオマスの測定法

培地中での培養中、およびダイズに感染した病原体のバイオマスの測定は、定量的 RT-PCR によって行った。V8 寒天培地、あるいは CMA 培地で培養した茎疫病菌の菌叢を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜き、サンプリングを行った。また、茎疫病菌を黄化胚軸に挿芽接種後 6 日目の胚軸 1 cm を切り取ることでサンプリングした。それぞれのサンプルからゲノム DNA および全 RNA 抽出した。RNA については逆転写反応により cDNA を合成した。ゲノム DNA および cDNA を鋳型に、ダイズ茎疫病菌の定量に用いることができると報告のあるプライマー (Catal et al. 2013) を用いた、定量的 RT-PCR を行った。

病害感受性因子 (S 因子) 候補の単離

S 因子の単離は、病原体感染時に特異的に発現が誘導される遺伝子として単離を試みた。モデル供試菌として、感染を同調化でき、病徴の発現が明確なダイズ斑点細菌病を用いた。 1×10^8 cfu/ml に調整したダイズ斑点細菌病を、葉肉注入接種を行った。対象区として水を注入した。1, 3, 6 時間後にサンプリングし、全 RNA を抽出した。オリゴ dT プライマーを用いた逆転写酵素により cDNA ライブラリーを調整し、cDNA サブトラクション法によって、細菌感染時に発現が変動する cDNA の単離と濃縮を行った。

ウイルス誘導遺伝子サイレンシング法の確立

S 因子の機能解析には、簡便で、ハイスループットに解析できる、ウイルス誘導遺伝子サイレンシング (VIGS) 法を用いることとした。ウイルスベクターとして、広宿主範囲を持つリンゴ小球形潜在ウイルス (Apple latent spherical virus, ALSV) ベクターを使用した (吉川ら 2014)。S 因子の機能解析に先立って、モデル遺伝子であるフィトエンデサチユラーゼ (PDS) による VIGS 系の確立を行った。PDS 遺伝子 300bp を増幅する制限酵素認識配列付加プライマーをそれぞれプラス鎖プライマーおよびマイナス鎖プライマーとして用い、RT-PCR を行った。また、ナス科植物で見出し

た S 因子であるリン脂質脱リン酸化酵素 (Phospholipid phosphatase: PP) とリン脂質加水分解酵素 (Phospholipase: PL) をダイズの S 因子候補として用いた。PDS 遺伝子同様に PL、PP 遺伝子 300bp を増幅する制限酵素認識配列付加プライマーをそれぞれプラス鎖プライマーおよびマイナス鎖プライマーとして用い、RT-PCR を行った。増幅した遺伝子を *Xho*I および *Bam*HI で切断し、同様に *Xho*I および *Bam*HI により切断した ALSV-RNA2 ベクターに挿入した。

実験結果及び考察

田澤ら (2010) が報告している爪楊枝穿刺接種法について、ダイズ茎疫病原病性品種エンレイを用いて行ったところ、典型的な茎の壊死症状が観察される個体が認められた。しかしながら、発病を安定させることは難しく、ダイズ胚軸の色素沈着、リグニン化の程度によっては、病徴の判定が容易でない個体も見受けられた。そこで、爪楊枝穿刺接種法を改良し、病徴確認がより容易にできる系の確立を試みた。暗黒化で栽培したダイズの黄化胚軸を用いて接種を行った。その結果、胚軸の褐変化が明確に確認でき、茎の壊死症状の確認も容易にできた (図 1)。以上の結果から、簡便で判定が容易な黄化胚軸爪楊枝穿刺接種法による発病検定が、より有用であると考えられた。

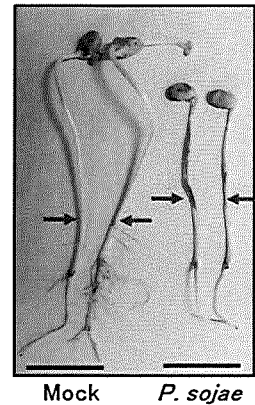


図1 黄化胚軸爪楊枝穿刺接種法

次に田澤ら (2009) が爪楊枝穿刺接種法とともに報告している、培地挿芽接種法について検討した。ダイズ茎疫病の感染と発病に伴う、胚軸の生育停止と腐敗症状が確認できた。茎疫病原病性のスズマルも、エンレイ同様に胚軸の生育停止と腐敗症状が確認できた。さらに、抵抗性品種のフクユタカ、ユキホマレを用いた解析では、胚軸の腐敗症状は認められず、胚軸の生育と初生葉の展開、発根が認められた。爪楊枝穿刺接種法同様に黄化胚軸を用いて、病徴確認がより容易にできる検定系の確立を試みた。その結果、罹病性のエンレイ、スズマルとも胚軸の褐変化が明確に確認でき、胚軸の生育停止と腐敗症状が容易に確認できた。一方、抵抗性のフクユタカ、ユキホマレを用いた解析では、胚軸の褐変化や腐敗症状は認められず、胚軸の生育と初生葉の展開、発根が認められた (図 2)。以上の結果から、培地挿芽接種法、特に黄化胚軸培地挿芽接種法は、簡便で判定が容易な発病検定であり、抵抗性・罹病性の検定委も可能であると判断した。

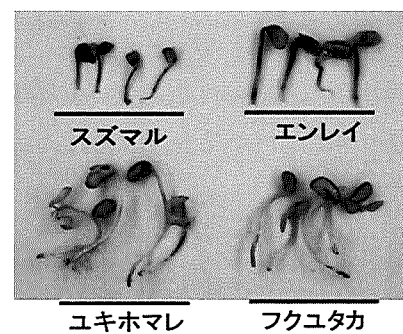


図2 黄化胚軸培地挿芽接種法

次に、培地中、およびダイズ植物内での茎疫病の検出と定量を試みた。定量的 RT-PCR の結果、V8 培地と CMA 培地を比較したところ、V8 培地で約 2 倍程度のバイオマスが検出され、鋳型にゲノム DNA、cDNA を用いた場合も同様の傾向であった。鋳型による違いを解析すると、ゲノム DNA の場合、cDNA の約 2 倍のバイオマスが検出された (図 3)。このことは、ゲノム DNA

を鋳型にした場合、すでに死滅した茎疫病菌も検出していることを示すと考えられた。以上の結果から、培地を使い分けることで、茎疫病菌の接種圧を調整し、詳細な抵抗性検定ができることがわかった。また、定量的 RT-PCR によって茎疫病菌の存在とバイオマスの定量が可能であり、目的に応じて鋳型を使い分けることができる、すなわち感染した茎疫病菌の総バイオマスの定量にはゲノム DNA を、生菌バイオマスの定量には cDNA を鋳型にすることで判定できると考えられた。

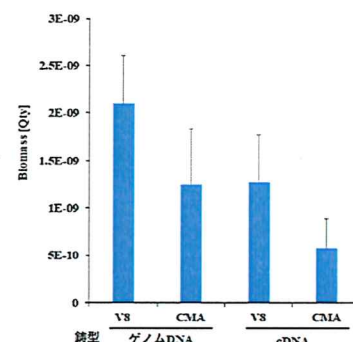


図3 定量的RT-PCRによる茎疫病菌バイオマスの測定

次に細菌病の接種法の確立を試みた。作物の細菌病の接種法として、種々の方法が報告されているが、基礎研究で用いられている方法として葉肉注入接種法がある。本方法では、針なしのシリンジで細菌懸濁液を細胞間隙に人為的に注入する方法で、感染のタイミングを同調化できる利点があり、分子生物学・生化学解析に有用である方法である。すなわち、本接種法は S 因子の単離に適していると考えられた。そこで、ダイズ斑点細菌病、葉焼病菌においても本接種法が適用できるか否かについて検討を行った。その結果、斑点細菌病菌を接種した葉では、接種3日後から接種部位の黄化、さらには壊死症状が確認できた。葉焼病菌接種葉では、接種7日目以降に黄化症状が確認できた(図4)。以上の結果から、ダイズにおいても葉肉注入接種法が有効であり、S 遺伝子の単離のためには、症状が明確で、発病までの時間が短い斑点細菌病菌が適しているものと考えられた。

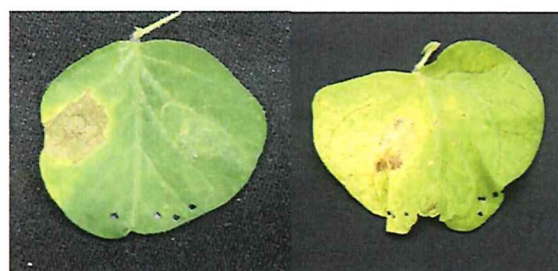


図4 斑点細菌病(左)と葉焼病(右)の病徴

そこで、モデルとして品種エンレイを用いて、斑点細菌病菌を接種後の cDNA ライブラリーを用いた cDNA サブトラクションを行い、感染特異的に発現が変動する遺伝子のライブラリー(S 因子候補 cDNA ライブラリー)を構築した。今後は、本ライブラリーの遺伝子の詳細について、遺伝子配列の解析、機能別の分類、VIGS による機能解析、S 因子の同定を進める予定である。

上記のように、茎疫病、斑点細菌病、葉焼病の発病系、抵抗性検定系が確立できた。さらに、S 因子候補 cDNA ライブラリーも構築できたことから、S 因子の解析に必要な VIGS 系の確立を試みた。PDS 遺伝子断片 300bp を挿入した ALSV ベクターを作成した。また、ナス科植物で見出した S 因子であるリン脂質脱リン酸化酵素(Phospholipid phosphatase:PP)とリン脂質加水分解酵素(Phospholipase:PL)のオルソログをダイズから単離し、個々の遺伝子断片 300bp を挿入した ALSV ベクターを作成した。VIGS 系確立のためのモデル品種としてエンレイに接種した。その結果、接種後に展開した本葉に PDS 遺伝子抑制による効果である、白化現象が確認された。以上の結果から、ALSV ベクターを用いたダイズの VIGS が可能であることがわかった。今後は、モデ

ル S 因子である PP および PL 遺伝子抑制植物の耐病性検定、並びに S 因子候補 cDNA ライブラリーを用いた新奇 S 因子の探索を行う予定である。

近年のゲノム編集技術の向上によって、実用作物であるマメ科植物への応用が可能となってきた。このような背景から、S 因子の欠損による、耐病性分子育種は極めて有効な手段と考えられる。今回、申請者が用いたウイルスベクターを用いた一過的な遺伝子機能抑制系は、同時に多数の遺伝子の抑制植物個体を短期間で作出でき、S 因子の有効性を検討する上で非常に有用な方法である。本研究の成果を基に、今後は S 因子群の単離と複解析を行うことで、S 因子の機能別分類・カタログ化を行い、対象病害に応じて S 因子を選択、単一～複数の組み合わせによって、糸状菌、細菌、卵菌、ウイルス等の分類、感染・発病様式も異なる病原体への耐病性付与につながる研究を進める予定である。

要約

本研究では、ダイズの主要な病害である茎疫病のより簡便な接種系並びに、抵抗性・罹病性判定が容易な検定系を確立した。また、分子生物学的実験に向けて、斑点細菌病、葉焼病の同調化できる接種法である葉肉注入接種法が有効であること、斑点細菌病がモデルの病原体として有効であることを見出した。さらに、リンゴ小球形潜在ウイルス (Apple latent spherical virus, ALSV) ベクターを使用したダイズ遺伝子の一過的抑制系が S 因子の解析に利用可能であることがわかった。今後は S 因子の解析、機能別分類・カタログ化を進めることによって、S 因子の耐病性育種への応用に貢献したいと考えている。

謝辞

本研究の推進にあたり、多大なご支援をいただいた。タカノ農芸化学研究助成財団に心より感謝申し上げます。

引用文献

田澤暁子(2009)ダイズ茎疫病抵抗性の簡便な幼苗接種検定法および同法を用いたレース J 抵抗性の遺伝解析。北海道立農試集報 93: 35-40.

吉川信幸・山岸紀子・今辰哉(2014)植物 RNA ウイルスベクターを利用した植物の新育種技術。JATAFF ジャーナル 2: 30-35.

Catal M, Erler F, Fulbright DW, Adams GC (2013) Real-time quantitative PCR assays for evaluation of soybean varieties for resistance to the stem and root rot pathogen *Phytophthora sojae*. Eur J Plant Pathol 137:859–869 DOI 10.1007/s10658-013-0297-1

Kiba A, Tomiyama H, Takahashi H, Hamada H, Ohnishi K, Okuno T., Hikichi Y (2003) Induction of resistance and expression of defense-related genes in tobacco leaves infiltrated with *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Physiol* 44: 287–295