



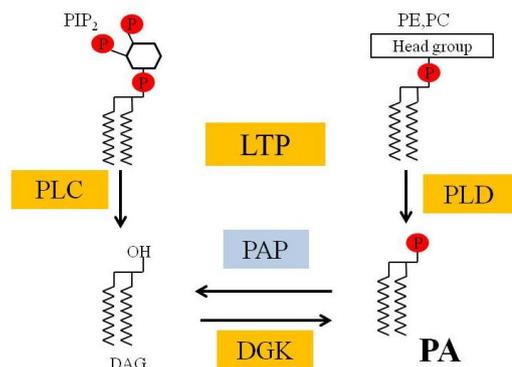
高知大学教育研究部  
総合科学系  
教授  
博士 (農学)  
木場章範

・経歴  
1994年4月 岡山大学大学院自然科学研究科修了  
1999年4月 (財) 岩手生物工学研究センター研究員  
2001年3月 高知大学農学部講師  
2003年3月 高知大学農学部助教授  
2012年4月 高知大学教育研究部・教授

## 分子遺伝学的手法およびゲノム編集による 病害耐性作物の作出に関する研究

### 1. 目的

“安全で安心な食料を安定的に供給する”ための大きな障壁として病害がある。病害は期待される収穫量の約30%以上の減収・損失を与えていることから、病害による食糧生産のロスを軽減することが、安全で安心で安定的な食料供給を実現するための重要な手段である。しかしながら、現状では毎年30以上の新規病害が報告されており、現状の知識や技術では、「病害防除により安全で安心な食料を安定的に供給する」という目標に達することができない。このような背景から、申請者は「タバコ植物と細菌間相互作用」をモデルに耐病性植物作出のための基礎研究を進めてきた。その結果、リン脂質代謝関連遺伝子の発現を抑制した植物は、耐病性に変化が生じること。リン脂質代謝関連遺伝子を抑制した植物では、感染に伴う活性酸素の生産、ジャスモン酸経路を介した免疫応答に影響を与えた結果、病害抵抗性を制御していることを見出した。そこで、分子生物学的手法を主に用いて、リン脂質代謝関連遺伝子の発現をコントロールすることによる耐病性作物の作出に関する基礎研究を行った。



### 2. 内容・方法

リン脂質代謝関連遺伝子抑制形質転換植物の選抜と耐病性検定

ウイルス誘導ジーンサイレンシング法、RNA 干渉法によりリン脂質代謝関連遺伝子抑制普通タバコ・トマト植物を作出した。定量的 RT-PCR により遺伝子抑制系統を選抜した。遺伝子抑制植物および対照植物に病原微生物を接種し、病原体の増殖、発病、防御関連遺伝子の発現を解析した。リン脂質代謝関連遺伝子抑制形質転換植物より、全 RNA を調製し cDNA サブトラクション法により、リン

脂質代謝関連遺伝子抑制により発現が変化した遺伝子について、トランスクリプトーム解析を行った。

### 3. 結論

#### (1) 植物免疫におけるリン脂質代謝の役割

ウイルス誘導ジーンサイレンシング法を用いて、リン脂質代謝関連遺伝子抑制植物を作成し、青枯病の発病を調査した。フォスファチジン酸 (PA)、ジアシルグリセロール (DAG) のうち、PA 合成に関わるフォスホリパーゼ、脂質リン酸化酵素、リン脂質輸送 SEC14 を抑制した植物では、菌数の上昇や萎凋症状の進展が著しく、植物免疫の低下が観察された。さらに、これらのリン脂質代謝関連遺伝子抑制では、ジャスモン酸経路の抑制が顕著であった。

#### (2) 植物免疫におけるフォスファチジン酸の役割

シグナルリン脂質である PA の代謝に関わる遺伝子 (DS1) を抑制した植物を用いた解析では、菌数の減少、青枯病の発病が著しく抑制され耐病性を示した。DS1 抑制植物では、活性酸素の過剰生産、ジャスモン酸経路の活性化を介した免疫応答が急速に活性化された結果、病害耐性を示すことが明らかとなった。

対照植物                      DS1抑制植物



#### (3) リン脂質代謝による植物免疫の制御機構

DS1 抑制植物を用いたトランスクリプトーム解析を行ったところ、ジャスモン酸経路の活性化や酸化ストレス応答遺伝子の有意な発現上昇が確認できた。一方、ジャスモン酸と同様に、植物免疫ホルモンであるサリチル酸が制御する複数の遺伝子の発現抑制も観察された。

#### (4) リン脂質代謝制御による耐病性作物の作出

PA の代謝に関わる遺伝子 (DS1) を抑制した植物は耐病性を示す。そこで、DS1 をターゲットにした分子育種の可能性について検討を進めた。RNAi コストラクトにより、DS1 を抑制させた普通系タバコ (品種 SR-1) およびトマト (品種マイクロトム) を作製した。タバコ、トマトとも野生株同様の生育を示した。複数の DS1 抑制タバコ系統では、青枯病菌の増殖を抑制し抵抗性を示した。

#### (5) 突然変異・ゲノム編集による耐病性作物の作出

ウイルス誘導ジーンサイレンシング法や RNAi により、DS1 を抑制させた植物が耐病性を示すことから、DS1 変異による耐病性作物の作出が可能であると考えた。そこで、まず、モデル植物のシロイヌナズナ、イネのミュータントパネルから DS1 のオルソログの変異植物を、シロイヌナズナでは 2 系統、イネでは 1 系統を見出した。シロイヌナズナの 2 系統については、野生株同様の生育を示すことを確認しており、今後耐病性試験を行う予定である (イネについては現在検討中)。さらに、実用作物への展開を図るべく、ゲノム編集による耐病性作物の作出を進めている。現在、トマト、ジャガイモについて、DS1 オルソログを TALEN 法により変異させた植物を作出中である。

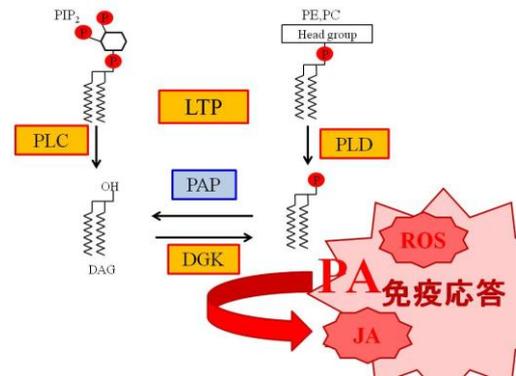
### 4. 考察

リン脂質代謝、特に PA が植物免疫の制御に重要であることが解った。さらにリン脂質関連遺伝子をターゲットにした、耐病性分子育種、新規防除法の確立の可能性が示された。

今後、DS1 抑制タバコ、トマトを用いた詳細な解析を進めるとともに、実用化作物での検証を進める必要がある。

## 5. 要約

シグナルリン脂質である PA はジャスモン酸経路や活性酸素経路を介して、植物免疫を制御していることを明らかにした。PA の代謝に関わる DS1 を抑制すると耐病性を示すことから、リン脂質代謝、とくに PA やその代謝に関わる DS1 をターゲットにした耐病性分子育種の可能性を示した。今後は、突然変異、分子育種、ゲノム編集による耐病植物の作出と解析を進めていく予定である。



## 6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人サッポロ生物科学振興財団による助成を賜りましたことを深く感謝いたします。また、本研究には、高知大学農学部博士研究員中野真人が参画し、大きな貢献があったことをここに記し、謝意を表します。また、当研究の遂行に尽力していただいた研究室の学生諸氏に感謝申し上げます。

## 7. その他

### 参考文献

Kiba A, Nakano M, Vincent-Pope P, Takahashi H, Sawasaki T, Endo T, Ohnishi K, Yoshioka H, Hikichi Y (2012) Novel SEC14 gene that is up regulated during the infection with *Ralstonia solanacearum* infection, pathogen-associated molecular patterns and effector molecules and involved in plant immunity. Journal of Plant Physiology 169: 1017-1022.

Nakano M, Nishihara M, Yoshioka H, Takahashi H, Sawasaki T, Ohnishi K, Hikichi Y, Kiba, A. (2013) Suppression of DS1 phosphatidic acid phosphatase confirms resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Nicotiana benthamiana*. PLOS ONE 8, e75124.

Kiba A, Galis I, Hojo Y, Ohnishi K, Yoshioka H, Hikichi Y. (2014) SEC14 phospholipid transfer protein involve in lipid signaling-mediated plant immune response in *Nicotiana benthamiana*. PLOS ONE, 2014 9: e98150.