

イネの誘導抵抗性に関わる 転写因子 WRKY45 の発見とその利用

農業生物資源研究所 ^{たか} ^{つじ} ^{ひろ} ^し 高 辻 博 志

はじめに

病害による作物の被害は大きく、イネのいもち病だけでも世界で毎年 6,000 万人分に相当する被害がもたらされている。これまで、作物の病害からの防除は主に農薬を用いて行われてきた。しかしながら、経済的なコスト、散布に要する労働コスト、環境負荷、食品安全性、耐性菌出現の可能性等の理由から、遺伝子を用いて作物自体の防御機構を高めることが望まれてきた。抵抗性誘導剤は、植物自体の防御機構に作用して病害を防除する点で、殺菌剤などの病原菌に対して作用する農薬と異なる。また、プライミング効果により、イネの生育に対する悪影響が比較的少ない。筆者らはこれらの点に着目し、抵抗性誘導剤が作用する植物の防御機構においてキーとなる遺伝子をイネから同定しようと考えて研究を行い、ベンゾチアジアゾール (Benzothiadiazole, BTH) によって発現誘導される転写因子 WRKY45 (ワーキー 45 と読む) を見出した。WRKY45 は、イネに再導入して恒常的に発現させると、いもち病および白葉枯病に対して極めて強い抵抗性をイネに賦与することがわかった。また、BTH 処理と同様のプライミング効果を示した。これらの利点から、WRKY45 の実用化に期待が寄せられている。本稿では、WRKY45 の発見に至る経緯や機能の概要、その利用法の開発についての今後の展望などについて概説する。

I 抵抗性誘導剤の作用に中心的役割を果たす WRKY45 の同定

植物活性化剤 (plant activator) と称される一群の抵抗性誘導剤は、植物の防御応答シグナル伝達機構の一つであるサリチル酸 (SA) シグナル伝達経路に作用し、多数の作物の様々な病害に対する抵抗性を誘導する (岩田, 2001)。SA シグナル伝達経路は、双子葉植物で先行して研究され、全身獲得性抵抗性 (systemic acquired resistance, SAR) において主要な役割を果たすことが知

Discovery and Utilization of WRKY45, a Key Transcription Factor of Induced Disease Resistance in Rice. By Hiroshi TAKATSUJI

(キーワード: 誘導抵抗性, 植物活性化剤, イネ, 転写因子, いもち病, 白葉枯病)

られている (DURRANT and DONG, 2004)。植物活性化剤として、BTH (FRIEDRICH et al., 1996)、プロベナゾール (Probenazole, PBZ) (岩田, 2001)、チアジニル (Tiadinil) (YASUDA et al., 2003) 等が商品化されているが、その中で BTH は、SA の機能的アナログであり、チアジニルなどととも、SA の下流に作用すると考えられている (FRIEDRICH et al., 1996)。

通常、病害抵抗性反応が恒常的に活性化している植物では生育や稔性に深刻な悪影響が見られることが多い。しかしながら、BTH を適切な用量で植物に処理した場合は、抵抗性反応は“プライミング (priming)”されるのみで恒常的に活性化されることはない。プライミングされた植物は、病原体の感染に際して抵抗性反応を迅速に発現することにより、病害に対して抵抗性になる (プライミング効果)。一方、病原体が感染していない状態では、プライミングされた植物においては抵抗性反応が発現していないため、(理想的な状態では) 抵抗性反応による生育などへの悪影響がないと考えられる。

BTH などの植物活性化剤によって誘導される植物の病害抵抗性は、抵抗性反応の実行に関わる多数の遺伝子の働きの総和として成立すると考えられる。そして、それらの多数の遺伝子を統括的に制御する転写因子の存在が想定される (図-1)。そのような転写因子を過剰発現などにより植物体で働かせると、その転写因子の制御を

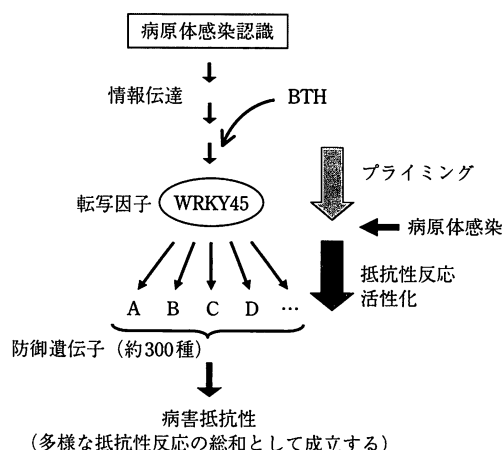


図-1 BTH の作用における転写因子 WRKY45 の役割

受けている多数の遺伝子が一斉に発現誘導され、その結果、強い抵抗性反応が誘導されると考えられる。このような考察に基づき、筆者らは BTH の作用を媒介する転写因子を探索した。BTH の作用に中心的な役割を果たすと考えられるこのような転写因子をイネから同定するため、まず BTH 処理に対して発現応答する遺伝子をマイクロアレイによって探索した。具体的には、4 葉期のイネ幼苗に 0.5 mM BTH をスプレー処理し、30,000 種以上のイネの遺伝子の発現を一挙に解析できるイネ 44K オリゴアレイ (Agilent) を用い、対照 (mock 処理) のイネとの間で遺伝子発現プロファイルの比較を行った。その結果、約 1,000 種の遺伝子が BTH に応答して発現変化を示し、その中にはシロイヌナズナなどでの研究から病害応答への関与が推測される WRKY 型転写因子が 4 種含まれていた (SHIMONO et al., 2007)。WRKY 型転写因子はイネには約 100 種存在し、様々な機能を担っていると考えられるが、病害応答に関与するものが多いのがこの転写因子ファミリーの特徴である。そこで、これらの 4 種の WRKY 型転写因子に着目し、それらの cDNA をそれぞれ恒常的で強い活性を有するトウモロコシのユビキチン・プロモーターの下流につないでイネ (日本晴) に再導入した。得られた形質転換イネに親和性系統のいもち病菌 *Magnaporthe grisea* (race 007) を噴霧接種した後、7 日後に病斑数を計数することによりいもち病抵抗性を検定した結果、*WRKY45-ox* のみが顕著ないもち病抵抗性を示した (図-2; SHIMONO et al., 2007)。*WRKY45* の機能をさらに詳細に解析するため、RNAi 法により *WRKY45* の発現を抑制したイネ系統 (*WRKY45-kd*) を作製した。*WRKY45-kd* イネおよび対照の野生型イネを BTH 処理した後、親和性いもち病菌を接種して抵抗性検定を行った結果、*WRKY45-kd* イネでは BTH による抵抗性誘導がほぼ失われていた (図-3; SHIMONO et al., 2007)。これらの結果から、*WRKY45* は、イネにおいて BTH によるいもち病抵抗性誘導に必須の役割を果たしていることがわかった。

SA 経路の研究が最も進んでいるシロイヌナズナでは、シグナル伝達因子 NPR1 が SA の下流の遺伝子をほぼすべて制御しており (WANG et al., 2006)、イネの *WRKY45* に相当する転写因子は存在しないと考えられる (SHIMONO et al., 2007)。一方、コムギには遺伝子配列上 *WRKY45* に対応する転写因子が存在することを確認した。これらのことから、*WRKY45* はイネ科または単子葉植物に固有の転写因子なのかもしれない。

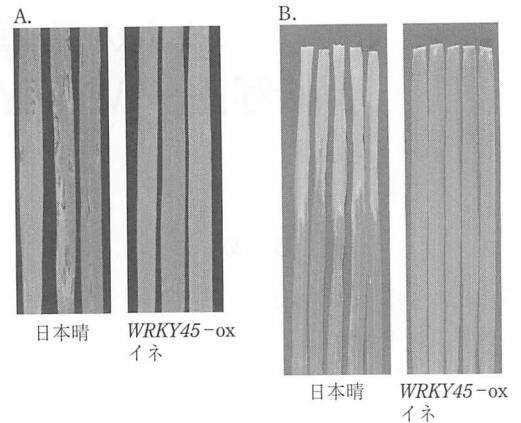


図-2 *WRKY45* 過剰発現 (*WRKY45-ox*) イネのいもち病抵抗性 (A) および白葉枯病抵抗性 (B)

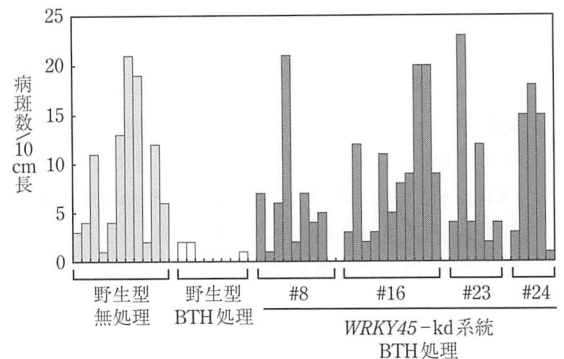


図-3 *WRKY45* 抑制 (*WRKY45-kd*) イネでは BTH によるいもち病抵抗性誘導が失われている

II *WRKY45-ox* イネは複数の病害に極めて強い抵抗性を示す

WRKY45-ox イネのいもち病抵抗性の強度を評価するため、既存の数種のいもち病抵抗性品種と比較した。その結果、6 葉期の葉への親和性いもち病菌の噴霧接種検定において、*WRKY45-ox* イネはいもち病抵抗性強度が「極強」とされる圃場抵抗性品種「戦捷 (せんしょう)」よりもさらに強いいもち病抵抗性を有することがわかった。また、*WRKY45-ox* イネは穂へのいもち病感染 (穂いもち) に対しても非常に強い抵抗性を示した。穂いもちはイネの収量に直接影響することから、この点は重要である。

BTH などの抵抗性誘導剤は、糸状菌病のいもち病だけでなく、細菌病の白葉枯病を含め広範囲の病害に有

効で、広い防除スペクトラムを有する。WRKY45 が BTH の作用のキー転写因子であれば、WRKY45-ox イネの防除スペクトラムが BTH のそれと類似している可能性が考えられる。そこで、WRKY45-ox イネの防除スペクトラムの調査の手始めに、白葉枯病に対する抵抗性検定を行った。その結果、WRKY45-ox イネは、白葉枯病に対しても極めて強い抵抗性を示し (図-2)、糸状菌と細菌の両方に非常に有効であることがわかった。シロイヌナズナでは、BTH はウイルスに対しても防除効果を示すことが報告されている (LAWTON et al., 1996)。今後、WRKY45-ox イネについて、ウイルスも含めて広く防除スペクトラムを調査していきたい。また、筆者らの実験では、WRKY45-ox イネの白葉枯病抵抗性は、BTH 処理によって誘導される白葉枯病抵抗性よりもはるかに強かった。このような効果の差が、BTH の浸透性などに起因するものか、あるいは抵抗性反応の本質的な違いによるものなのかについても今後検証していきたい。

III WRKY45-ox イネにおけるプライミング効果と生育環境の影響

病害応答のシグナル伝達に関わる転写因子やシグナル伝達因子を植物で恒常的に発現させたとき、一般的に致死や生育阻害、稔性の低下が見られる場合が多い。それに対して WRKY45-ox イネは、後述のように生育条件によっても異なるが、筆者らの温室で育成したときには比較的良好的な生育を示し、ほぼ正常な稔実を示した。この状態の WRKY45-ox イネにおいて、病害応答反応が誘導されているかどうかをマーカー遺伝子 (PR1b および PR2) の発現によって調べた。その結果、WRKY45 は恒常的に発現しているにもかかわらず、PR1b および PR2 の発現は全く認められず、恒常的な抵抗性反応の活性化は起きていないことが示された。それにもかかわらず WRKY45-ox イネはいもち病に対して非常に強い抵抗性を示す。これは、BTH 処理の場合と同様、WRKY45-ox イネにはプライミング状態が誘導されており、いもち病菌が感染したときにすばやく抵抗性反応が活性化するためと考えられる。プライミングの誘導に関わる分子機構はサイエンスとして非常に興味深い。筆者らの最近の研究の結果では、いもち病菌感染によって誘導される別のシグナル伝達経路が、WRKY45 の下流のシグナル伝達と相互作用することがプライミング効果において重要であることが示唆された。

上述のように、WRKY45-ox イネは筆者らの温室では比較的良好的な生育を示した (図-4)。しかしながら、別の生育環境 (人工気象室) で育成した WRKY45-ox

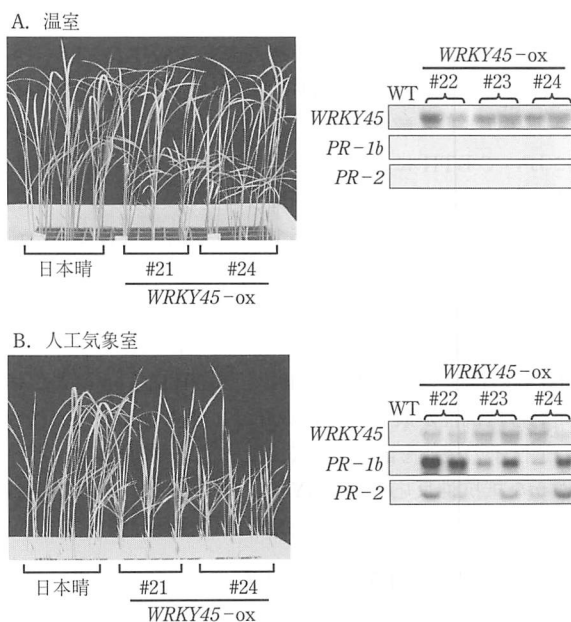


図-4 生育条件による WRKY45 過剰発現 (WRKY45-ox) イネの生育および抵抗性反応の発現の違い

イネは、初期生育の顕著な遅延を示した (図-4)。両生育条件で育成した WRKY45-ox イネにおいて、導入遺伝子由来の WRKY45 の発現レベルはほぼ同程度であった (図-4)。しかしながら、人工気象室で育成した WRKY45-ox イネでは、病害応答反応のマーカー遺伝子 PR1b および PR2 が恒常的に高レベルで発現していた (図-4)。つまりこの条件での WRKY45-ox イネは、プライミング状態ではなく抵抗性反応が恒常的に発現した状態であり、それによって生育遅延がもたらされたと考えられる。これらの事実は、人工気象室では生育環境に由来する何らかの刺激が WRKY45 転写の下流に作用し、それによって抵抗性反応が恒常的に活性化して生育遅延がもたらされたことを示している。人工気象室の環境のどの因子が生育遅延をもたらしたかについては現時点では明らかになっていないが、空調の送風による物理的刺激を最有力候補として考えている。

IV WRKY45 は約 300 の遺伝子を制御している

WRKY45 の過剰発現によってイネに賦与される病害抵抗性は、WRKY45 によって制御されている多数の遺伝子の機能の総和によって担われていると考えられる (図-1)。そこで、WRKY45 に制御されている抵抗性反応の実行遺伝子を以下のような実験で同定した。BTH による発現誘導が WRKY45 によって制御されている遺

伝子は、その BTH 応答性が *WRKY45-kd* イネでは損なわれていると考えられる。そこで、*WRKY45-kd* イネと野生型イネの間で、BTH に対する遺伝子発現応答をマイクロアレイ解析によって比較した結果、野生型イネにおいて BTH に発現応答する遺伝子のうち約 300 個は、*WRKY45-kd* イネでは BTH に発現応答しなかった。これらの遺伝子が *WRKY45* によって制御されている遺伝子であり、*WRKY45* による病害抵抗性はこれらの遺伝子の機能によって担われていると考えられる。おそらく個々の抵抗性反応実行遺伝子の寄与は大きくなく、約 300 個の遺伝子の働きの総和として、*WRKY45* による強い病害抵抗性が成立しているものと推測される。これらの遺伝子の機能を調べていくことによって、具体的にどのような抵抗性反応が *WRKY45* に制御されているかわかると考えられるので、今後実験的に検証していきたい。

V *WRKY45* の実用利用に向けて

WRKY45 遺伝子の発現は、複数の病害に対して強い耐病性を与えることができること（複合抵抗性）が最大のポイントである。また、真性抵抗性の場合のような病原体感染の認識機構には基づいていないため、病原体の遺伝子突然変異により抵抗性が突然崩壊する可能性が低い。生育環境の影響を受けるものの、プライミング効果により生育への影響が比較的小さいことも特徴の一つである。さらに、イネだけではなく、コムギやトウモロコシなど、遺伝子導入が可能なイネ科作物への広い応用も期待できる。これらのメリットから、*WRKY45* 遺伝子を導入した耐病性イネの実用化に対して大きな期待が寄せられている。

しかしながら、トウモロコシのユビキチン・プロモーターを用いた現行の *WRKY45-ox* イネは、プライミング効果により軽減されているとはいえ、環境因子の影響を受けて明らかな生育遅延を示す。生育遅延は当然作物の収量に影響するので、*WRKY45* 遺伝子を用いた耐病性イネを実用レベルにするには、この問題を解決することが必須である。そのため現在、様々な可能性を考慮して *WRKY45-ox* イネの改良を試みている。アプローチの一つは恒常的発現レベルの最適化である。BTH 処理の場合、プライミング状態の誘導には適度な用量での処理が必要であり、過剰量を処理すると恒常的に抵抗性反応が活性化され、その影響がいわゆる薬害となって表れる。このような考察に基づき、*WRKY45* 遺伝子の発現に用いるプロモーターの活性強度を最適化すれば、プラ

イミング状態を安定に維持し、生育遅延を最小限にすることができると考えられる。もう一つのアプローチとしては、いもち病菌などの病原菌の感染に反応して活性化されるプロモーターの使用である。しかしながら、既に単離されたプロモーターの中にはこの用途に使いそうなものがなく、新規プロモーターの探索から行う必要がある。

イネは、我が国の主食であるだけでなく、家畜の飼料用作物としても最近注目されている。飼料用イネの栽培には低コスト栽培が要求され、コスト面から農薬は使用できないため、*WRKY45* により無農薬粗放栽培が可能になればその価値は高い。そこで現在、*WRKY45* の実用化の最初のターゲットとして飼料米を考えている。一方、*WRKY45* 遺伝子の相同遺伝子がイネ科単子葉植物であるコムギにも存在することを確認した。コムギには有効な抵抗性系統がない赤カビ病などの難病があり、その防除に用いられている農薬の人体への影響が指摘されている。赤カビ病に対する *WRKY45* の効果はまだわからない。しかしながら、もしこの病害に対する *WRKY45* の有効性が証明され、有害な農薬に替わりうる防除法になれば、その価値は非常に高い。またそうすれば、遺伝子組換え作物の食品への利用のメリットを国民にアピールすることができ、遺伝子組換え作物の社会的受容の促進にも寄与できると考えている。

おわりに

WRKY45 は、イネの病害抵抗性分子育種の素材として間違いなく有望である。しかしながら、組換え体の最適化という過程においてそれほど容易なことではない。*WRKY45* の活性発現制御や抵抗性発現機構の基礎研究を平行して行っているが、その成果を開発研究にフィードバックしてじっくり取り組むことが本来必要であると考えている。一方で、遺伝子組換え技術が有効であることを早く世に示すことが現在必要であることも認識している。共に研究を行っている研究チームのメンバーとともに、目標に向かって進んでいきたい。

参考文献

- 1) DURRANT, W. E. and X. DONG (2004): *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 185 ~ 209.
- 2) FRIEDRICH, L. et al. (1996): *Plant J.* 10: 61 ~ 70.
- 3) 岩田道顕 (2001): 植物感染生理談話会論文集 37: 1 ~ 13.
- 4) LAWTON, K. A. et al. (1996): *Plant J.* 10: 71 ~ 82.
- 5) SHIMONO, M. et al. (2007): *Plant Cell* 19: 2064 ~ 2076.
- 6) WANG, D. et al. (2006): *PLoS Pathol.* 2: e123.
- 7) YASUDA, M. et al. (2003): *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 322 ~ 328.