

特集：植物ウイルス病防除技術開発最前線—イネ萎縮ウイルス—

ウイルス感染に必要なイネ遺伝子とその破壊による イネ萎縮病抵抗性の付与

中央農業総合研究センター ^{しみず}清水 ^{たくみ}巧・^{よし}吉井 ^{もとやす}基泰・^{おおむら}大村 ^{としひろ}敏博
農業生物資源研究所 ^{みやお}宮尾 ^{あきお}安藝雄・^{ひろちか}廣近 ^{ひろひこ}洋彦

はじめに

イネ萎縮病は、イネ萎縮ウイルス (*Rice dwarf virus*: RDV) によって引き起こされるイネの重要病害の一つである。本病に感染したイネは、典型的な萎縮症状を呈するが、これはセルロース合成酵素などの細胞壁関連遺伝子群の発現がウイルス感染によって顕著に抑制され、個々の細胞が伸長できなくなるためであることが DNA マイクロアレイ法を用いたイネのトランスクリプトーム解析 (イネの全 mRNA 発現変動の解析) の研究から明らかになってきた (SHIMIZU et al., 2007)。

RDV は媒介昆虫ツマグロヨコバイによって永続的に伝搬され、昆虫と植物の両生物種で増殖可能なシャトル感染能を有する。RDV はレオウイルス科ファイトレオウイルス属に分類される径約 70 nm の球状ウイルスである (OMURA and YAN, 1999)。RDV の粒子形態、ゲノム構造およびウイルスタンパク質の機能等については、本ミニ特集の他稿を参照されたい。

これまでの病害抵抗性育種では、抵抗性遺伝資源を選抜し、優良品種に導入することが伝統的に行われてきた。イネ萎縮病の防除においても、抵抗性品種の育成が最も有効な手段の一つであると考えられるが、本病の病原である RDV に対する抵抗性品種はいまだ報告されていない。

本稿では、RDV 抵抗性イネを作出することを目的として、イネ品種‘日本晴’の遺伝子破壊系統群 (ミュータントパネル) から得られた RDV 感受性喪失系統が示す抵抗性について概説したい (YOSHII et al., 2009)。

I RDV 感受性喪失変異系統の単離

近年、イネ品種‘日本晴’の内在性レトロトランスポゾン *Tos17* の培養による活性化を利用して作出したミュー

Disruption of a Host Gene Required for Virus Multiplication in Rice Confers Resistance to *Rice dwarf virus*. By Takumi SHIMIZU, Motoyasu YOSHII, Akio MIYAO, Hirohiko HIROCHIKA and Toshihiro OMURA

(キーワード：イネ萎縮ウイルス、イネ、ミュータントパネル、抵抗性)

タントパネル (HIROCHIKA, 2001 ; MIYAO et al., 2003) から、多くの農業上重要な形質を支配する遺伝子として形態形成関連遺伝子、環境ストレス関連遺伝子や病害抵抗性遺伝子等が相次いで同定されている。*Tos17* は、①約 4.1 kb からなる動く遺伝子である、②組織培養下で活性化され、再分化によって不活化される、③染色体上に任意に転移し、効率的な遺伝子破壊が可能である、④誘発された変異は安定である、⑤イネのレトロトランスポゾンの中では例外的にコピー数が少ないため、破壊された遺伝子の解析が容易である、⑥組換え DNA 実験の制約を受けないため、一般圃場での栽培が可能である等の特質を有している。

このミュータントパネルに RDV の感染・増殖に関与する宿主遺伝子が破壊された系統が存在すれば、その系統は RDV に対して感受性が喪失され、その結果として抵抗性を示すのではないかと考えられた。まず、ミュータントパネル約 5,500 系統を対象に、RDV 感受性喪失系統を探索した。具体的には、1 系統につき 20 株のイネの稚苗に対して、1 株当たり 5 頭の RDV 保毒ツマグロヨコバイを 1 日間放飼することで虫媒接種 (RDV は機械的接種では植物に感染しないため) した後、RDV の感染を免れた系統をスクリーニングした。これは、延べ 10 万株のイネと 55 万頭のツマグロヨコバイを供試した大規模な探索試験であった。

その結果、RDV に対する感受性を喪失した、すなわち抵抗性を示した 1 系統が得られ、この変異系統を *rim1* (*rice dwarf virus multiplication 1*) と命名した (図-1)。*rim1* 系統が示す RDV 抵抗性には、RDV 接種による過敏感応や防御関連遺伝子の発現の誘導は認められず、ウイルス側の因子によって誘発されるものではないと考えられた。

以上の結果から、変異原因遺伝子は RDV の感染をサポートするタンパク質をコードする可能性が示唆された。

II *rim1* 系統の RDV 特異的抵抗性

RDV 感受性喪失系統の探索試験では RDV を保毒した昆虫を用いたため、まず、得られた *rim1* 系統の抵抗性

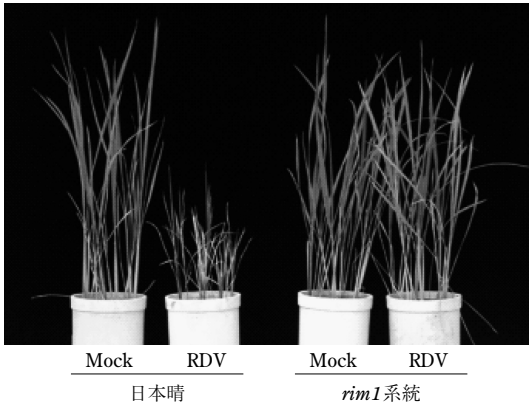


図-1 RDV 感受性喪失系統 (*rim1*) のウイルス抵抗性
引用文献 8) より転載。

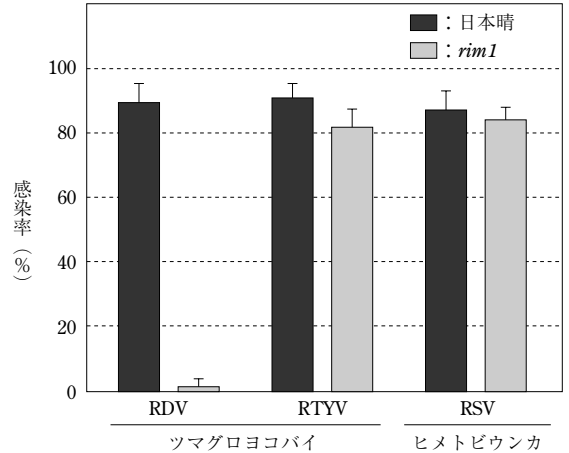


図-3 RDV 感受性喪失系統のウイルス特異性

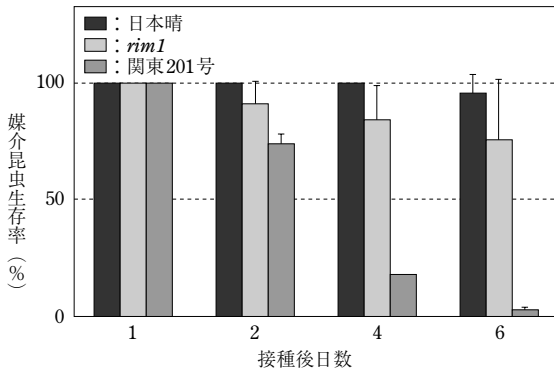


図-2 各種イネ品種における RDV 媒介虫ツマグロヨコバイの生存
引用文献 8) より転載。

が RDV を伝搬する ツマグロヨコバイ に対するものであるか否かについて解析する必要がある。そこで、*rim1* 系統、‘日本晴’ および ツマグロヨコバイ 抵抗性品種 ‘関東 201 号’ について、各々 50 株に 100 頭の ツマグロヨコバイ を放飼し、経時的に媒介昆虫の生存率を調べた。その結果、*rim1* 系統の媒介昆虫の生存率は、‘日本晴’ と比較して若干の減少が認められたものの、‘関東 201 号’ と比較してその減少はわずかであった (図-2) ことから、本抵抗性は虫に対するものではないと考えられた。

次に、*rim1* 系統および ‘日本晴’ について、RDV と同一の媒介昆虫により伝搬されるイネ黄葉ウイルス (*Rice transitory yellowing virus*: RTYV) を接種した。その結果、*rim1* 系統は、RTYV には高率に感染した (図-3 中央) のに対し、RDV には感染しなかった (図-3 左)。これらの結果から、*rim1* 系統の抵抗性は、昆虫に対するも

のではなく、ウイルスに対して作用するものであることが確認された。

また、ヒメトビウンカにより伝搬されるイネ縞葉枯ウイルス (*Rice stripe virus*: RSV) 感受性についても同様に試験したところ、*rim1* 系統は感受性品種である ‘日本晴’ と同様に RSV に対して高い感受性を示した (図-3 右)。

本結果および上記 RTYV での結果から、*rim1* 系統が示す抵抗性は、ウイルスの中でも RDV に特異的に作用するものと考えられた。

III *RIM1* 遺伝子の単離

RDV 感受性喪失系統の探索試験において、当初用いた遺伝子破壊系統群の種子は変異導入再分化当代のものである。そのため、本スクリーニングから選抜された *rim1* 系統は、ミュータントホモ、ヘテロ、野生型が混合した状態となっている。そこで、*rim1* 系統の RDV 感受性喪失変異が *Tos17* 挿入によるものであるか否かについて解析を進めた。RDV を接種した *rim1* 系統 (配布を受けた 20 粒の種子のうち、発芽した 16 株を使用した) について、*Tos17* をプローブにサザン解析したところ、無病徴株すべてに共通し、かつ感染株ではあったりなかったりするバンドが見いだされた (図-4 左、矢尻)。すなわち、RDV 感受性喪失の表現型と連鎖すると思われる *Tos17* のバンドが認められた。次いで、*Tos17* の隣接配列を単離し、これをプローブにしてサザン解析を行った結果、すべての無病徴株で単一バンドが検出されたのに対し、感染株ではそのバンドの有無にかかわらず原品種 ‘日本晴’ と同じ位置にバンドが認められた (図-4 右、矢尻)。このことから、病徴を示さなかった 7 株で

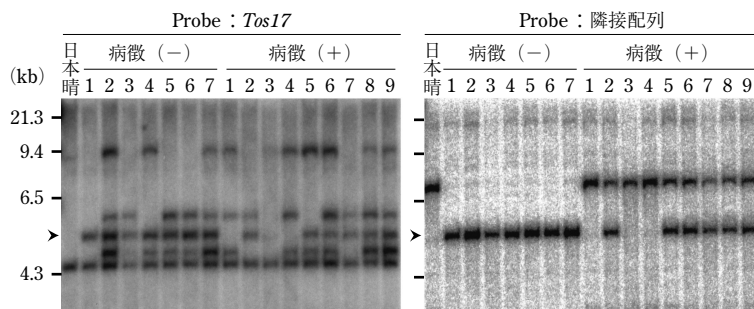


図-4 ゲノミックサザンによる変異形質の連鎖解析
引用文献 8) より転載。

は *Tos17* の挿入がホモになっており、また、本変異系統の RDV 感受性の喪失は *Tos17* の挿入に起因しているものと考えられた。

次いで、上記の配列情報を基にして原品種から単離した野生型 *RIM1* 遺伝子を含むと想定されるゲノミック DNA 断片を本変異系統に導入したところ、そのイネの RDV 感受性は‘日本晴’と同等に復帰し、変異形質が相補された。すなわち、RDV に感染するようになった。以上の結果から、*Tos17* 挿入による RDV 感受性喪失変異に関与する遺伝子が本ゲノミック DNA 断片内に存在するものと考えられた。

IV *RIM1* の遺伝子構造

前章で得られた *RIM1* は、イネの第3染色体の1Mb近傍に位置する遺伝子 (Os03g0119966) で、七つのエクソンからなっていた (図-5)。また、*rim1* 系統では、*RIM1* 遺伝子の第1イントロンに *Tos17* が挿入されていた (図-5)。本結果から、*rim1* 系統が RDV 感受性を喪失したのは、*Tos17* の挿入に起因する mRNA のスプライシング異常のために *RIM1* タンパク質の発現量が低下し、RDV の増殖が抑制されたものと推察される。

次いで、既知の遺伝子との相同性検索を行った結果、*RIM1* 遺伝子から翻訳されるタンパク質は、核への局在や DNA との結合に必要な NAC ドメインを含む転写制御因子であると推定された。植物特有の NAC ドメインタンパク質遺伝子 (OLSEN et al., 2005) は、これまでに全ゲノムが解読されたシロイヌナズナでは 105 種、イネでは 75 種の存在がそれぞれ確認されており、大きなファミリーを形成している (OOKA et al., 2003)。現状では、多くの NAC タンパク質の機能については不明である。

一方、数種 NAC 遺伝子は、傷害や病原体感染等のストレスによってそれらの発現が誘導されることが知られ

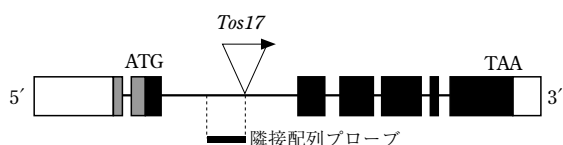


図-5 *RIM1* 遺伝子の構造
引用文献 8) より転載。

ている。そこで、‘日本晴’における *RIM1* 遺伝子の RDV の応答性について解析したところ、*RIM1* mRNA 発現量に顕著な変動は認められなかった。

V *RIM1* タンパク質の性質

数種 NAC ファミリータンパク質は、転写活性化能を有することが知られている。そこで、*RIM1* タンパク質を酵母内で発現させたところ、上記活性が認められた。

次いで、原品種‘日本晴’に自身の *RIM1* タンパク質を過剰発現させた形質転換イネに RDV を接種したところ、RDV 主要外殻タンパク質遺伝子が迅速かつ高レベルに蓄積され (図-6)、病徴も原品種より早く出現した。一方、*RIM1* タンパク質が RDV の増殖にかかわるという直接的な証拠を得る目的で、酵母 two-hybrid 法や免疫沈降法を用いて検討したが、*RIM1* タンパク質がウイルスタンパク質と直接相互作用するという結果は得られなかった。

以上の結果から、*RIM1* タンパク質は、RDV の増殖をサポートする因子であることが裏付けられた。現在のところ、*RIM1* タンパク質は NAC ドメインを有する新規転写制御因子として RDV の感染に間接的に作用し、*RIM1* タンパク質の下流で発現制御される何らかのタンパク質がウイルス感染に直接的に関与している可能性が最も有力であると考えられる。

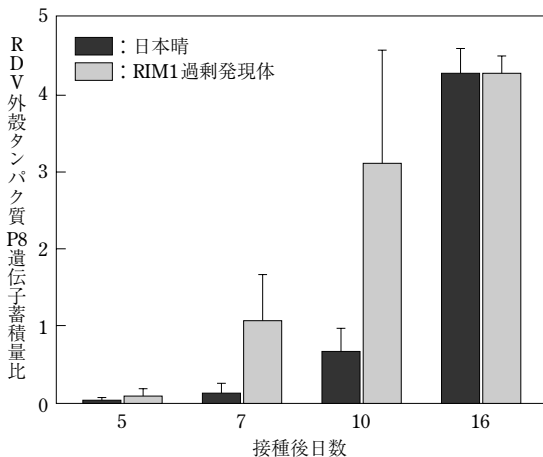


図-6 RIM1 過剰発現による RDV 増殖の促進
引用文献 8) より転載。

おわりに

近年、シロイヌナズナなどの各種ウイルス感受性変異株を用いた遺伝学的なアプローチによって、ウイルスの感染過程に関与する様々な宿主遺伝子が単離され始めている。個々の植物ウイルスの宿主因子については、佐藤・渡辺 (2006) による総説を参照されたい。

一般に、ウイルス病の防除に最も有効な方法は抵抗性品種の利用である。しかし、抵抗性品種が実用化され防除が可能となっているイネのウイルス病害は、現在のところ、イネ縞葉枯病とイネツングロ病に限られる。イネ

萎縮病の抵抗性品種については、15年にわたる1,500以上の品種からの探索でも実用的な抵抗性遺伝資源は得られていない。そのため、現在もなお、本ウイルス病が大発生した場合には、農業による媒介昆虫の駆除などの手段に頼る以外に方法がない。

本稿で概説した研究成果は、植物ウイルスは限られた遺伝情報しかもたないためその感染過程において宿主の因子を流用しているはずであるという発想から得られたものであり、実用作物では国際的にも初めての報告である。しかしながら、得られた *rim1* 系統は、ウイルスの複製は十分に抑制するが、原品種と比較すると生育がやや劣る。したがって、イネの生育にほとんど影響が出ないようにするためには、なお一層の改良研究が必要である。従来、自然条件下では全く抵抗性遺伝資源がなかった本ウイルス病防除の研究領域に新たな概念による抵抗性導入手法の可能性がもたらされたことから、本稿で紹介したようなコンセプトによって新規防除技術が開発されていくことを期待したい。

本研究の一部は、(独)生研センター「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の一環として行われたものです。

引用文献

- 1) HIROCHIKA, H. (2001): Curr. Opin. Plant Biol. 4: 118 ~ 122.
- 2) MIYAO, A. et al. (2003): Plant Cell 15: 1771 ~ 1780.
- 3) OLSEN, A. N. et al. (2005): Trends Plant Sci. 10: 79 ~ 87.
- 4) OMURA, T. and J. YAN (1999): Adv. Virus Res. 54: 15 ~ 43.
- 5) OOKA, H. et al. (2003): DNA Res. 10: 239 ~ 247.
- 6) 佐藤昌直・渡辺雄一郎 (2006): ウイルス 56: 155 ~ 164.
- 7) SHIMIZU, T. et al. (2007): Mol. Plant-Microbe Interact. 20: 247 ~ 254.
- 8) YOSHI, M. et al. (2009): Plant J. 57: 615 ~ 625.

新しく登録された農薬 (21.11.1 ~ 11.30)

掲載は、**種類名**、登録番号：**商品名**（製造者又は輸入者）登録年月日、有効成分：含有量、**対象作物**：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、**適用作物**、適用雑草等を記載。（登録番号：22499 ~ 22526）下線付きは新規成分。

「殺虫剤」

●クロルフルアズロン乳剤

22507：MIC アタブロン乳剤（三井化学アグロ）

クロルフルアズロン：5.0%

かんしょ：ハスモンヨトウ：収穫7日前まで

だいず：ハスモンヨトウ：収穫14日前まで

えだまめ：ハスモンヨトウ：収穫14日前まで

さやえんどう：シロイチモジヨトウ：収穫前日まで

すいか：ミナミキイロアザミウマ、ハスモンヨトウ：収穫14日前まで

メロン：ミナミキイロアザミウマ、タバココナジラミ類（シルバーリーフコナジラミを含む）、ウリノメイガ：収穫14

日前まで

トマト：ハスモンヨトウ、オオタバコガ、タバココナジラミ類（シルバーリーフコナジラミを含む）：収穫前日まで

ミニトマト：ハスモンヨトウ、オオタバコガ、タバココナジラミ類（シルバーリーフコナジラミを含む）：収穫前日まで

なす：ミナミキイロアザミウマ、ハスモンヨトウ、オオタバコガ：収穫前日まで

ピーマン：ミナミキイロアザミウマ、ハスモンヨトウ、オオタバコガ：収穫前日まで

キャベツ：アオムシ、コナガ、ヨトウムシ、ハスモンヨトウ、タマナギンウワバ、ハイマダラノメイガ：収穫7日前まで
(18ページに続く)