

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成 23 年度～平成 27 年度）
「環境調和を志向した革新的植物アグリバイオ技術の統合型研究拠点の形成」

アグリバイオ・シンポジウム 2014

生物学的および非生物的環境との調和を志向した
植物アグリバイオ技術革新

講演要旨集

日時：2014 年 11 月 29 日（土）13：00～17：30

場所：近畿大学農学部新教室棟 311 教室

はじめに

一昨年以来、我々は、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「環境調和を志向した革新的植物アグリバイオ技術の統合型研究拠点の形成」の支援を受け、アグリバイオ・シンポジウム2012「未来を切り開くアグリバイオ技術：植物機能の基盤解明と人類へのアウトプット」、アグリバイオ・シンポジウム2013「構造生物学が推進するアグリバイオ技術革新」という主題のシンポジウムを、近畿大学農学部において開催してきました。いずれのシンポジウムにおきましても、我々のプロジェクトを効果的に推進するために、また大学院生たちのモチベーションを高く保つために、大きな役割を果たしてきたと考えます。そこで、このたび、アグリバイオ・シンポジウム2014「生物のおよび非生物的環境との調和を志向した植物アグリバイオ技術革新」と題するシンポジウムを企画いたしました。

シンポジウムのタイトルに示す通り、このたびのアグリバイオ・シンポジウムは「環境との調和」に焦点をあてております。それほど新鮮味を感じない言葉かもしれませんが、多角的な視点からみると、なかなか難しい問題であることも確かです。まず、川口先生（基生研）からはマメ科植物と根粒菌との共生について、阪井先生（京大・院農）からはC1微生物との共生について、それらの分子基盤に関する話題提供がなされます。イネといもち病菌との相互作用解析から見出された新たな情報は西澤先生（生物資源研）から、光合成能強化に伴う植物代謝や形態に対する影響については田茂井先生（近畿大院農）からお話ししていただきます。村田先生（岡山大院）には気孔運動によるストレス耐性機構に関する話題を、また羽鹿先生（作物研）にはゲノム情報に基づいた大豆育種技術の開発に関する話題を提供していただきます。このようにいくつかのトピックスを聞きながら、植物を取り巻く環境を多角的に捉え直し、新たなアグリバイオ技術革新の可能性について、皆さんとともに考えてみたいと思います。

プロジェクトメンバーはもちろんのこと、特に若い院生の皆さんの質疑討論への参加を歓迎いたします。話し合いの中から新たな方策やアイデアが引き出されることによって、このプロジェクトの活性化につながるものと心から期待する次第です。どうぞ積極的な参加をお願いいたします。

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「環境調和を志向した革新的植物アグリバイオ技術の統合型研究拠点の形成」

代表 深溝 慶

プログラム

- 13:00-13:05 はじめに 深溝 慶 近畿大・院・農学研究科
- 13:05-13:45 「GLE ペプチドとサイトカイニンを介した根粒形成の長距離制御」
川口 正代司 基生研・共生システム
座長：川崎 努
- 13:45-14:25 「C1 微生物-植物系による炭素固定：共役代謝・葉面環境と共生」
阪井 康能 京大・院農・応用生命科学
座長：内海 龍太郎
- 14:25-15:05 「病原菌の感染戦略から考える植物免疫力の強化」
西澤 洋子 農業生物資源研・耐病性作物開発ユニット
座長：大沼 貴之
- 休憩（15:05-15:20）
- 15:20-16:00 「栄養シグナルによる植物の代謝・形態形成制御機構」
田茂井 政宏 近畿大・農・バイオ
座長：山口 公志
- 16:00-16:40 「孔辺細胞における植物ホルモン信号伝達」
村田 芳行 岡山大・院・環境生命科学
座長：松田 一彦
- 16:40-17:20 「ゲノム情報を活用した大豆育種のイノベーションと課題：
低アレルギー化等の付加価値賦与を目指して」
羽鹿 牧太 農研機構・作物研
座長：森山 達哉
- 17:20-17:30 おわりに 川崎 努 近畿大・院・農学研究科

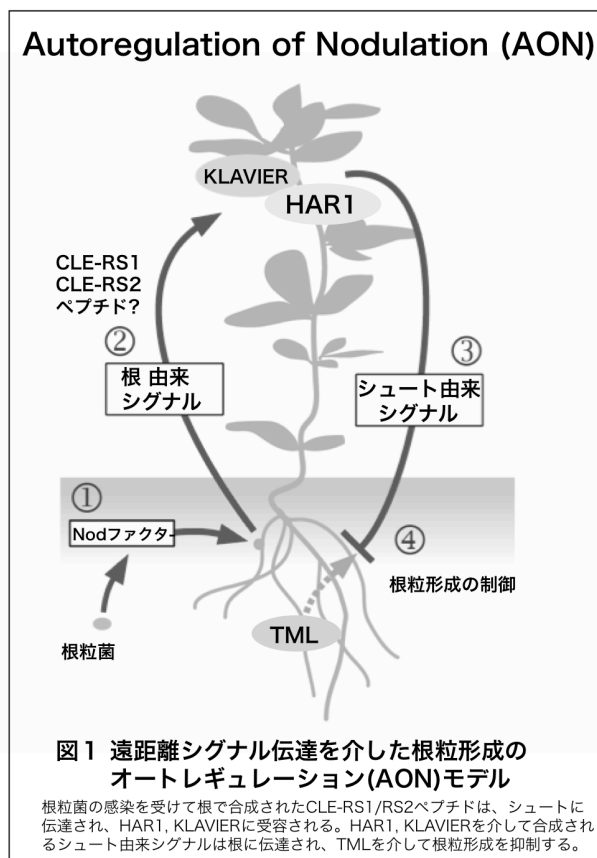
懇親会（近畿大農学部ログハウス2階 18:00-20:00）

CLE ペプチドとサイトカイニンを介した根粒形成の長距離制御

○川口正代司（基礎生物学研究所・共生システム、総研大）

1. 緒言

マメ科植物の根に形成される根粒は、根粒菌が分泌する Nod ファクターによって誘導される。Nod ファクターはサイトカイニンシグナリングを介して根粒原基を誘導するとともに、遠距離シグナル伝達経路を介した全身的な負の制御系を駆動し、根粒の過剰形成を抑制する。この全身的な制御系は根粒形成のオートレギュレーション (Autoregulation of Nodulation; AON) と呼ばれ、根からシュートへ伝達される「根由来シグナル」と、シュートから根に伝達される「シュート由来シグナル」より構成されている (図 1)。本シンポジウムでは、「根由来シグナル (CLE ペプチド)」と「シュート由来シグナル」に関する新しい知見を中心に紹介する。また最近関心を持っている現代アートについてもふれる。



1. 「HAR1」

ミヤコグサ *Lotus japonicus* は、アジアの温帯地域に広く自生するマメ科の草本である。岐阜県と宮古島由来のミヤコグサが広く使われている。

私たちはヤコグサを用いて共生変異体の大規模スクリーニングを行い、Nod ファクターシグナル伝達や根粒制御に必要なとされる 26 の遺伝子座を特定した。

その中の *har1* 変異体は、根に根粒を過剰に着生する変異体である。接ぎ木実験から、HAR1 はシュートで機能し、「シュート由来シグナル」が合成できない変異体であることが示された。原因遺伝子を特定したところ HAR1 は LRR 型レセプターキナーゼをコードしており、シロイヌナズナでは茎頂メリステム (SAM) の発生を負に制御する *CLAVATA1* と最も高い相同性が検出された。¹⁾

2. 「根由来シグナル」

HAR1 のリガンドは根からシュートへと伝達される「根由来シグナル」であることが推測される。私たちはミヤコグサのゲノム情報と発現解析等から「根由来シグナル」の有力候補として CLE ペプチドをコードする *CLE-RS1*, *CLE-RS2* を特定した。²⁾ しかしながら、化学合成した CLE ペプチドは、全く根粒形成を抑制しなかった。そこで *CLE-RS1/RS2* を過剰発現させたシロイヌナズナとミヤコグサを液体培養し、培養液から LC-MSMS を用いて成熟型 CLE ペプチドの分子構造を決定した。それは、数個のアラビノースが付加された CLE ペプチドであった。修飾を受けた CLE ペプチドの生理活性を評価するために、松林嘉克博士より糖修飾された *CLE-RS1/RS2* ペプチドを化学合成していただき、それらを野生型のミヤコグサと *har1* 変異体に与えた。その結果、糖修飾された CLE ペプチドは、システミックに根粒形成を抑制することが示された。³⁾

さらに、この *CLE-RS1/2* を誘導する因子は、NIN (Nodule Inception) と呼ばれる根粒形成に必須の転写因子であることを、農業生物資源研究所及びかずさ DNA 研究所との共同研究により明らかにした。⁴⁾

3. 「シュート由来シグナル」

シュート由来シグナルの実体は、遠距離シグナル物質の存在が想定されてから 20 年以上明らかとされていない。私たちは、理化学研究所榊原均博士らとの共同研究により、マメ科植物において、植物ホルモンとして知られるサイトカイニンが、根から輸送される CLE ペプチドシグナルを受けて葉で合成され、葉から根に長距離移動して根粒の数を制御していることを発見した。⁵⁾

4. 結論

サイトカイニンは細胞分裂を誘導する植物ホルモンとして知られており、また根粒形成においては、根において皮層の細胞分裂と根粒原基を誘導する正の制御因子であることが知られている。これに対し私たちは、地上部由来のサイトカイニンが根粒形成を長距離抑制する働きがあることを初めて示した。このことは、サイトカイニンが根粒形成において二つの相反する役割を担っていることを現している。一連の発見は、根粒形成の新しい全身的な制御機構の理解のみならず、植物の葉と根の長距離コミュニケーションの理解にも貢献することが期待される。

5. 引用文献

- 1) Nishimura, R. *et al.*, *Nature* **420**, 426-9 (2002)
- 2) Okamoto, S. *et al.*, *Plant Cell Physiol.* **50**, 67-77 (2009)
- 3) Okamoto, S. *et al.*, *Nat. Commun.* **4**, 2191 (2013)
- 4) Soyano, T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 14607-12 (2014)
- 5) Sasaki, T. *et al.*, *Nat. Commun.* **5**, 4983 (2014)

C1微生物-植物系による炭素固定：共役代謝・葉面環境と共生

○阪井康能、由里本博也（京大・院農・応用生命科学）

1. 緒言

C1微生物はメタンやメタノールなどのC-C結合を持たないC1化合物（C1炭素分子）を単一の炭素・エネルギー源として、自らの細胞構成成分となるあらゆる生体高分子を合成して生育する。この時、C1炭素分子の酸化で得られるエネルギーがその生育に十分であることは、C1微生物がCO₂よりもエネルギー準位の高いホルムアルデヒドを固定するという効率のよいエネルギー代謝を持っていることに一因がある。例えば炭素固定経路のひとつであるリブローズモノリン酸経路は、炭素固定反応以外はカルビンサイクルに酷似しているものの、ホルムアルデヒド固定反応は発エルゴン反応である。一方、光合成生物はその生体高分子合成をCO₂を原料として行うが、この場合には光エネルギーが必要である。

一方、様々なC1微生物が環境中に、しかも普遍的に存在することは、20世紀中頃から知られていたが、C1微生物と植物の親密な関係が明らかになってきたのは近年のことである。木精とも呼ばれるメタノールはその名の通り、細胞壁成分のペクチンメチルエステルの加水分解物で、植物から放出されるメタノールの総量は年間1億トンに達する。植物からのメタノール放出(1995)、そしてメタノール資化性細菌の植物葉面での優先的棲息(2002)、中でも *Methylobacterium* 属細菌などの pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM) がもつ植物生長促進効果と相利共生関係が、近年になってようやく明らかになってきた。根圏などの植物地茎部とは異なり、葉面など植物地上部の環境では、光・温度・日周性などの環境要因の他、植物光合成代謝や植物免疫など、生きた植物自身からも影響を受け、そこに住む微生物にとっての環境も大きく変化している。このような場面における微生物-宿主相互作用の生理学には、まだまだ謎が多い。一方、植物から炭素源としてメタノールをもらい、その表層に共生しながら植物を生長促進しているならば、C1微生物はあたかも植物細胞の一部のように光合成による炭素固定を促進していることになる。炭素循環・食糧増産を目的にC1微生物とその宿主相互作用の機能開発を考える上でも、植物地上部環境とその変化、それに伴う微生物生理を知ることは極めて重要な課題である。

本講演では植物地上部とそこに棲息するC1微生物の古くて長い密接な関係と、植物への定着・生長促進に関する我々の基盤的研究について紹介する。

2. C1微生物固定代謝系 RuMP 経路の遺伝子操作による共役

C1微生物のホルムアルデヒド固定経路の一つであるリブローズモノリン酸（RuMP）経路では、3-ヘキサロース-6-リン酸シンターゼ（HPS）、6-ホスホ-3-ヘキサロイソメラゼ（PHI）の2つの鍵酵素による連続反応により、リブローズ 5-リン酸（Ru5P）

とホルムアルデヒドからフルクトース 6-リン酸 (F6P) が生じる。HPS によるホルムアルデヒド固定反応は発エルゴン反応であり、補酵素類やその他の低分子化合物を必要とせず、HPS/PHI 反応の基質となる Ru5P および生成物である F6P は、ペントースリン酸経路やカルビン回路の反応基質である。そのため、HPS/PHI をコードする遺伝子 *hps/phi* を異種発現することにより、宿主にペントースリン酸経路やカルビンサイクルと共役したホルムアルデヒド固定系路を構築することが可能である (図 1)。これまでに *hps/phi* 遺伝子を、タバコ、シロイヌナズナ、ゼラニウムに遺伝子工学的に導入することで、ホルムアルデヒドを直接、吸収・固定する植物体の開発に成功した^{1,2)}。

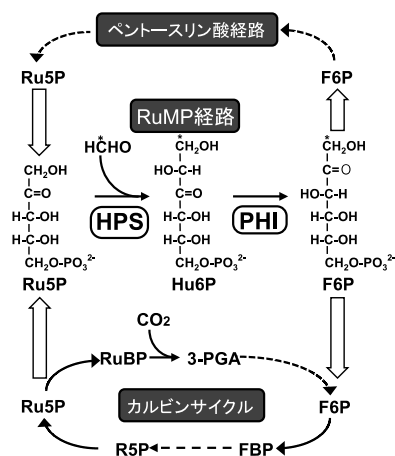


図 3. RuMP 経路とペントースリン酸経路およびカルビンサイクルの共役代謝

3. 植物に共生する C1 微生物にとっての葉面環境と生長促進効果

植物からのメタノール放出はよく知られているが、実際、植物表層にはメタノールがどの程度の濃度で存在するのであろうか。我々は、メタノール資化性酵母を用い、植物葉上の局所的なメタノール濃度を直接計測する“細胞センサー”を構築した。その結果、発芽 2～3 週間後の若いシロイヌナズナ葉上のメタノールは、昼間はほとんどなく、夜には 25 mM 程度と高濃度存在し、昼夜で大きく変動していることがわかった。一方、老化した葉では、さらに高濃度 (数百 mM 相当) のメタノールが、昼夜変動なく存在した³⁾。このような環境において、メタノール資化性酵母は葉上のメタノールを炭素源として利用して増殖可能であることを明らかにした。さらに、葉上で利用可能な窒素源については、植物の生長に伴って変化することがわかってきた。このようにメタノールが想像以上に高濃度で存在する葉面には、メタノール資化性 *Methylobacterium* 属細菌が優占化しているが、植物と葉面 C1 微生物との間には特異性があり、特定の植物には特定の種の *Methylobacterium* 属細菌が優占化していること⁴⁾、*Methylobacterium* 属細菌が示す植物生長促進効果にも種レベルでの特異性があることが明らかになってきた。現在、植物共生および生長促進効果に必要な葉面 C1 微生物の代謝生理機能に関する解析を進めている。

4. 引用文献

- 1) Chen, L., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 627-635 (2010)
- 2) Song, Z., et al., *Biotechnol. Lett.* **32**, 1541-1548 (2010)
- 3) Kawaguchi, K., et al., *PLoS ONE* **6**, e25257 (2011)
- 4) Mizuno, M., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1533-1538 (2013)

病原菌の感染戦略から考える植物免疫力の強化

○西澤洋子・南栄一（農業生物資源研究所・遺伝子組換え研究センター・耐病性作物研究開発ユニット）

1. 緒言

10,000種類以上におよぶ既報の病原微生物のうち、例えば、稲作に被害をもたらす病原菌は10前後に過ぎない。これは植物が非常に優れた免疫力をもつこと、そして病原菌はそれぞれの宿主の免疫力を打破する独自の能力を獲得してきたことを意味する。したがって植物の免疫力を人為的に高めるためには、植物の免疫メカニズムの解明とともに病原菌の感染戦略を知ることが重要である。我々はイネと、イネに最も甚大な被害をもたらすイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) を対象に研究を行っている。本講演では、キチンを介したイネといもち病菌の相互作用解析を基にした免疫力強化の試みと、感染に必須のいもち病菌のエフェクターについて紹介したい。

2. キチンオリゴ糖受容体の改変による免疫力強化

キチンは菌類細胞壁の構成成分であり、多くの植物に対し活性酸素や抗菌物質の生成などの免疫反応を誘導する分子パターンの一つである。そのシグナルは、イネの場合、細胞膜に存在するキチンエリシター（以下、CE）結合タンパク質 CEBiP と受容体キナーゼ OsCERK1 の協働によって受容される。CEBiP 遺伝子や OsCERK1 遺伝子を破壊したイネでは CE 応答性が消失し、いもち病抵抗性が低下した。^{1,2)} また、いもち病菌接種後の OsCERK1-GFP 発現イネの蛍光観察から、イネ細胞内に侵入した菌糸周辺に OsCERK1 が存在することが強く示唆された。²⁾ したがって、感染部位において CE が生成し、その CE シグナルをイネが受容していると考えられる。一方、いもち病菌は感染時に細胞壁表層構造を変化させキチンの露出性を低下させるほか、CE 結合性エフェクターを大量に分泌して CEBiP による認識を回避する病原性メカニズムを持つ。そこで、CE シグナルをより強い免疫発動シグナルに変換するために、CEBiP の CE 結合領域とイネの受容体キナーゼ XA21 の細胞内領域を融合させたキメラタンパク質 CRXA を発現するイネを作出した（図1）。XA21 は *avrXa21* 遺伝子を持つイネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae*) を認識

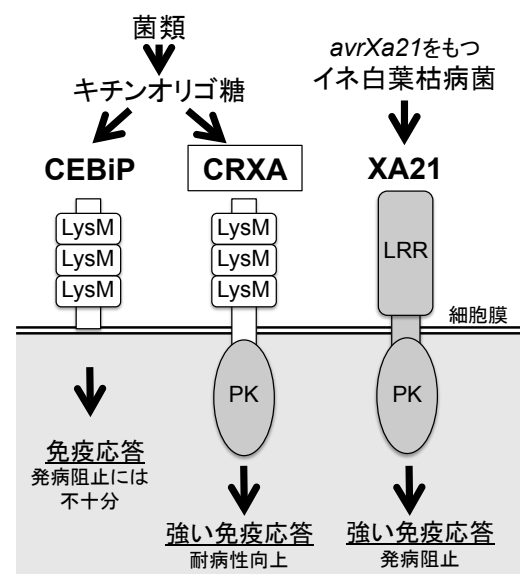


図1 キメラ受容体による菌類病に対する免疫力の強化法

して感染を阻止する免疫反応を起動する受容体キナーゼである。CRXA を細胞膜上に発現させた培養細胞では CE 特異的に免疫反応が亢進した。また、CRXa 発現イネではいもち病菌侵入部位における活性酸素蓄積が亢進し、病斑形成が抑制された。³⁾ これらの効果は Xa21 の代わりに、AvrPid2 遺伝子を持ついもち病菌に対して特異的に機能するイネ受容体キナーゼ遺伝子 Pid2 を用いた場合でも同様に認められた。⁴⁾

3. いもち病菌の新規エフェクターの機能解析

RBF (*Required for BIC Formation*) はいもち病菌特異的に存在する遺伝子であり、Rbf タンパク質内には分泌シグナル配列のほかは機能性ドメイン等が見当たらない。RBF を破壊したいもち病菌株 (*rbf* 株) では葉身における病原性が消失することを見出した。RBF の発現は、付着器からイネ細胞に侵入する時期のほか、菌糸が隣接するイネ細胞に侵入する直前に一過的かつ強く誘導され、Rbf はイネ細胞内に移行することがわかった。*rbf* 株を接種したイネではファイトアレキシン合成酵素遺伝子などの防御応答遺伝子の発現誘導が亢進した。一方、*rbf* 株はサリチル酸量を低下させた NahG イネや、ファイトアレキシン合成が顕著に抑制される *OsWRKY76* 過剰発現イネには感染することができた (図 2)。これらの結果から、Rbf はイネの免疫メカニズムを抑制することで感染を成立させるいもち病菌の病原性に必須のエフェクターであることが明らかになった。

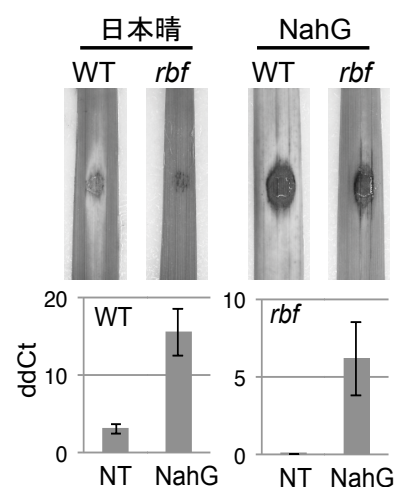


図 2 接種 5 日後の病徴と PCR による菌定量

4. 結論

本研究によって、分子パターン認識受容体を改変することで免疫力を高めることが可能であることが示された。今後、各種分子パターン認識受容体の単離や、より強い免疫反応を起動するタンパク質の同定が望まれる。また、イネ細胞内に移行するエフェクターのうち、Rbf ほど病原性に大きく関与するものはほかに知られていないことから、Rbf の作用メカニズムとその遺伝子発現制御メカニズムの解明は、新たないもち病防除技術の開発に役立つと期待される。

5. 引用文献

- 1) Kouzai, Y. *et al.*, *Plant Mol. Biol.* **84**, 519-528 (2014)
- 2) Kouzai, Y. *et al.*, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **27**, 975-982 (2014)
- 3) Kishimoto, K. *et al.*, *Plant J.* **64**, 343-354 (2010)
- 4) Kouzai, Y. *et al.*, *Plant Mol. Biol.* **81**, 287-295 (2013)

栄養シグナルによる植物の代謝・形態形成制御機構

○田茂井政宏、重岡 成（近畿大院・農・バイオ）

1. 緒言

我々の体の構成成分を含め、地球上に存在する有機化合物のほとんどは光合成生物（植物、藻類）が光合成によって獲得した炭素によるものである。つまり、植物を用いて物質生産を行う場合のポテンシャルは、光合成による二酸化炭素から炭水化物への合成能力に依存しており、植物での物質生産を考える上で、光合成機能の向上は重要な戦略となる。

光合成の過程において、カルビン回路により大気中の CO_2 を固定してショ糖やデンプンに変換するまでに多くのプロセスを含んでおり、植物の炭素代謝はソース（光合成）能力、シンク（貯蔵）能力および転流能力のバランスによって成り立っている。従って、植物の収量を増大させるには、これらをバランス良く強化することが望ましいが、まずはソース器官での光合成能力を向上させることが最も重要となると考えられる。一方、光合成により葉で作成した糖と、根から吸収した窒素は、いずれもアミノ酸、タンパク質、核酸、二次代謝産物の主要な構成成分であり、植物細胞における炭素・窒素代謝物の相対量比（C/N バランス）は厳密に制御を受けていること、また光合成増大により生育や細胞数が増加するという事実から、光合成炭素代謝は窒素代謝、形態形成など様々な代謝系に大きく影響を及ぼすと思われる。

そこで、これら光合成炭素代謝に関連した酵素遺伝子を導入した形質転換植物を用いて、光合成能およびソース・シンク器官の炭素代謝、さらには窒素代謝、形態形成などに及ぼす影響を検討し、光合成増大および生育促進に関連する因子を網羅的に解析した。

2. 窒素代謝系に及ぼすカルビン回路強化の影響

藻類由来カルビン回路関連酵素 (FBPase, SBPase, FBP/SBPase) を葉緑体で発現させたタバコやレタスは光合成活性が上昇し生育が促進する¹⁻⁴⁾。これら形質転換植物では C/N バランスを維持していたため、 CO_2 固定能の増大に伴い N 代謝系が促進したと考えられる。我々は C/N バランス制御機構を明らかにするために、葉緑体で FBP/SBPase を発現させたシロイヌナズナ (ApFS 株) を作出し、成育段階別に解析を行った。その結果、ApFS 株では光合成能強化に伴い 2 週齢（生育初期）にデンプンが増加、5 週齢（成熟期）ではデンプンに加えショ糖が増加していた。一方、遊離アミノ酸は 2 週齢では減少していたが 5 週齢では増加し、さらに 2 週齢で変化がなかった亜硝酸量が 5 週齢で増加していた。そこで硝酸同化系への影響を検討したところ、2 週齢では変化がなかった NR 活性および遺伝子発現量は、いずれも 5 週齢で増加しており、硝酸トランスポーター (NRT) ファミリー *NRT1.1* と *NRT2.1* の遺伝子発現量は 2

週齢で減少し5週齢では増加していた。これらの結果より、生育初期では光合成能の上昇による生育の促進に伴って一時的にアミノ酸が不足し、C/NアンバランスがNRやNRTsの発現量を調節することによって窒素同化能を向上させることにより、C/Nバランスが維持されると考えられる。

3. 側枝形成に及ぼすソース・シンク器官における炭素分配の影響

ショ糖合成系の律速因子である細胞質FBPaseを強化した形質転換タバコは、通常CO₂環境下では野生株と有意な差が見られないが、高CO₂環境下では側枝数、葉数が野生株より増加することを明らかにしてきた⁵⁾。このことは、植物体内におけるショ糖分配の変化がシグナルとなり、側枝数、葉数を制御することを示唆している。そこで、ショ糖分配の変化が側枝形成に及ぼす影響を分子レベルで明らかにするために、ラン藻由来FBPaseを細胞質で発現させたシロイヌナズナ(AcF)を作出し、形態形成に関わる植物ホルモン関連遺伝子群の発現解析を行った。その結果、AcF株は通常CO₂(360 ppm)環境下では野生株と同様の生育を示したが、高CO₂(1000 ppm)環境下では側枝数が野生株と比較して有意に増加し、生重量は野生株の1.2~1.5倍に増大していた。このとき、AcF株におけるヘキソース量、ショ糖量は野生株と比較して増加していた。そこで、形態変化が見られる直前(5週齢)のロゼッタ葉からRNAを単離し、側枝形成に関与する植物ホルモンの生合成および応答遺伝子群の発現量をReal-time PCRにより比較した。AcF株ではオーキシンの貯蔵に関与するGH3が増加し、ストリゴラクトンの合成遺伝子であるMAX4や応答遺伝子MAX2が減少していた。また、サイトカニン活性化に関与するAtLOG2が増加、レスポンスレギュレーターのARR7が減少していた。さらに、サイトカニンやストリゴラクトンと関連して側枝形成を抑制することが明らかとなっているBRC1が減少していた。これらの遺伝子発現の変化が、FBPase導入による糖分配の変化に起因していること確かめるために、通常CO₂環境下で4週間水耕栽培したシロイヌナズナの野生株を、ショ糖、グルコース、フルクトースを含む水耕液で24時間処理し、同様に解析を行った。その結果、全ての糖処理によりBRC1、MAX4の発現量は減少していた。これらの結果から、側枝形成は、ソース・シンク器官の糖分配の変化により、サイトカニンやストリゴラクトンなどの植物ホルモン代謝を介してBRC1などの形態形成に関連する遺伝子発現を制御することにより調節されていることが示唆された。

4. 引用文献

- 1) Miyagawa et al. *Nature Biotechnol.* **19**, 965-969 (2001)
- 2) Tamoi et al. *Plant Cell Physiol.* **47**, 380-390 (2006)
- 3) Yabuta et al. *Plant Cell Physiol.* **49**, 375-385 (2008)
- 4) Ichikawa et al. *GM Crops* **1**, 322-326 (2010)
- 5) Tamoi et al. *Photosynth. Res.* **108**, 15-23 (2011)

孔辺細胞における植物ホルモン信号伝達

○村田芳行* (岡山大院・環境生命科学)

1. 緒言

一对の孔辺細胞によって形成される気孔は、様々なストレス（生物的ストレスと非生物的ストレス）に応答して開閉を行い、二酸化炭素の取り込みと蒸散の厳密な制御や病原菌侵入に対する防御を行っている。

2. 植物ホルモン信号伝達

植物は、乾燥ストレス下におかれるとアブシジン酸 (ABA) を蓄積する。蓄積したアブシジン酸は、気孔閉口を誘導し、蒸散による水損失を抑制する。孔辺細胞における植物ホルモン信号伝達の中で ABA 信号伝達は最もよく研究されている。ABA 受容体に ABA が結合すると、タンパク質脱リン酸化酵素 2C (PP2C) が不活性化し、タンパク質リン酸化酵素 (SnRK2 : OST1) が活性化する。OST1 は、NADPH オキシダーゼ (RBOH) やアニオンチャネル Slow Anion Channel-Associate 1 (SLAC1) をリン酸化し、これらの活性を調節する。そして、RBOHD と RBOHF を介して、活性酸素種 (ROS : スーパーオキシドアニオンや過酸化水素) が産生する。この ROS 産生と原形質膜の過分極によって、原形質膜カルシウム透過性 (I_{Ca}) チャネルが活性化し、細胞質内のカルシウム濃度が上昇する。さらに、このカルシウム上昇によって、カルシウム依存性タンパク質キナーゼ (CDPK) 活性や S 型アニオンチャネル (SLAC1) 活性が上昇し、膜の脱分極が引き起こされ、外向き整流性カリウムチャネルが活性化する。また、同時に内向き整流性カリウムチャネルが抑制される。そして、孔辺細胞からカリウムイオンが流出し、水が流出し、孔辺細胞が収縮し、気孔が閉口する。

傷害や摂食などのストレスによって産生されるジャスモン酸やジャスモン酸メチルは気孔閉口を誘導する。孔辺細胞でのジャスモン酸メチル信号伝達経路は、ABA 信号伝達経路といくつかの信号伝達因子 (NADPH オキシダーゼ、CDPK、種々のイオンチャネル) を共有している。しかし、どのように信号が合流するかは明らかにされていない。

ウイルスやバクテリアなど様々な病原微生物に対する抵抗性 (全身獲得抵抗性) を誘導する鍵となる植物ホルモンであるサリチル酸も気孔閉口を誘導する。しかし、サリチル酸誘導気孔閉口において、ROS 産生は、NADPH オキシダーゼではなく、salicylhydroxamic acid 感受性ペルオキシダーゼによって媒介されている。

3. 新規信号伝達因子

気孔閉口における NADPH オキシダーゼやペルオキシダーゼが産生する ROS の重

要性は広く認識されているにも関わらず、ROS の蓄積を下流の信号へ変換するメカニズムは十分に解明されていない。孔辺細胞において、ABA によって誘導された ROS 産生の下流で、Reactive Carbonyl Species (RCS) が産生されることを明らかにしたので、発表する。

4. 気孔運動の制御を介したストレス耐性調節

1) 内向き整流性カリウムチャンネルは、孔辺細胞へカリウムイオンの流入を媒介する。このチャンネル活性の抑制は、カリウムイオンの流入を抑制し、気孔開口を阻害する。内向き整流性カリウムチャンネル KAT1 の Dominant Negative Mutant は、光誘導気孔開口が阻害されており、その結果、乾燥ストレス耐性が向上していた。

2) 2-alkenal reductase 過剰発現体は、RCS の蓄積が阻害され、気孔閉口が阻害されていた。その結果、過剰発現体は、野生株よりも早く萎れる表現型を示した。

5. 結論

植物は、気孔の開閉を行うことによって、二酸化炭素の取り込みと蒸散を制御し、また、病原菌侵入に対する防御を行っている。その気孔運動の制御によって、植物のストレス耐性を変化させることができる。また、その気孔運動は、信号伝達因子の遺伝学的または化学的な制御を介して制御できる。よって、孔辺細胞の信号伝達因子に着目した変異体の作出や選抜ならびに成長調節剤の開発が期待される。

ゲノム情報を活用した大豆育種のイノベーションと課題 —低アレルゲン化等の付加価値賦与を目指して—

○羽鹿 牧太* (農研機構・作物研究所)

1. 緒言

近代的な大豆の品種育成は我が国でも 100 年以上の歴史を持っている。当初は在来品種からの純系分離が主であったが、交雑育種法の導入とともに大きく発展し、現在商業栽培されているほとんどの大豆品種は交雑育種の成果と言っても過言でない。最近育成された多くの品種は倒伏抵抗性や病虫害抵抗性を付与されており、以前に比べて非常に栽培しやすく、大豆生産の向上に大きく寄与している。

大豆の高付加価値化を目指した品種育成は、かつては大粒化などの外観品質が主であったが、近年の分析技術の発達に伴ってタンパク質の改変や機能性成分の強化など、成分改良が活発に行われている。特に大豆の青臭みを欠失したりポキシゲナーゼ欠失大豆、貯蔵タンパク質を改変した高 7S 大豆や高 11S 大豆、機能性成分を高めた高イソフラボン大豆、高オレイン酸大豆等はずでに実用化され、最近では高 α -トコフェロール系統や高ルテイン系統なども見いだされている。また食の安全への関心が高まり、低アレルゲン大豆や低カドミウム大豆も重要な育種目標となってきている。

こうした病虫害抵抗性品種や成分改良品種は主に従来型の交配と表現型による選抜によって育成されてきたが、現在大豆の育種は従来型の交雑育種を基本としながらも質的に大きく変化しようとしている。近年の分子遺伝学的研究の発展は遺伝子組換えや DNA マーカー選抜などの育種技術の革新をもたらし、育種現場を変えつつある。

本講演ではこうした新たな育種技術の開発の現状と課題を、大豆の成分改良育種を軸に紹介する。

2. ゲノム情報を活用した新たな育種技術の開発

大豆は 2010 年に全ゲノムが解読¹⁾されて以降、遺伝子の特定や機能解明などが以前に比べてはるかに容易となり、過去 100 年の育種の成果を凌駕する研究成果が得られつつある。特に DNA マーカーは日常的に使われる重要な選抜技術となっている。

DNA マーカー選抜は従来表現型による選抜と異なって、目的遺伝子の内部またはごく近傍に設定した DNA 配列を目印にする選抜技術である。表現型による選抜では熟練や広い圃場が必要であるが、マーカー選抜では精度の高いマーカー情報があれば、誰でも簡単に目的形質を選抜することが可能であり、表現型として現れないヘテロの劣性遺伝形質も遺伝子の有無で選抜することができる。現在のところ成分改変に利用可能な DNA マーカーは多くないが、7S 完全欠失性、高カドミウム蓄積性などが開発されている。ゲノム情報の充実に伴い今後有用なマーカーが次々に開発されてい

くと思われる。

なお DNA マーカーと連続戻し交雑を組み合わせて、特定の形質を導入できるピンポイント改良は、温室での世代促進やマーカーによる不要領域の削り込みを併用することで、2-3 年で戻し交雑を完了できるため迅速な品種開発を可能としており、すでに病虫害抵抗性などを付与した品種が実用化されている。

TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes)法²⁾は、ゲノム情報を利用した突然変異の効率的スクリーニング法である。従来の突然変異育種が表現型のスクリーニングで行われるのに対し、TILLING では個体別にサンプリングしたゲノム DNA を対象形質の遺伝子情報に基づいてスクリーニングする。一度 DNA をサンプリングすれば同じ変異集団に対していくつもの形質を対象にスクリーニングできる上に、表現型として現れないヘテロの劣性遺伝形質も見いだすことが可能なため、スクリーニング効率が高い。また複数の遺伝子や合成経路を持つ成分でも合成系が明らかになれば、TILLING で見いだした変異遺伝子を交配で集積することで改変が可能であり、新規の成分改変には非常に有用と考えられる。

3. 遺伝子組み換え技術の可能性

遺伝子組換え技術は除草剤耐性など遺伝資源にない新たな形質を付与できることから、有用物質の生産など新規形質の作出においても活用が期待されている。しかし遺伝子組換え大豆は現在のところ食品用として消費者から受け入れられていないため、国内での育種利用の見通しは立っていない。

最近 NBT(New Plant Breeding Techniques)³⁾と総称される組み換え遺伝子の痕跡を残さない新たな遺伝子組換え技術が開発されている。NBT による育成品種が非遺伝子組み換え作物としての扱いになるかどうかは今後の議論を待たねばならないが、ゲノム上の狙った位置への変異の挿入など、実質的に突然変異と変わらない変異の作出も可能であることから、研究の進展によってはこれまで以上に育種の方向に大きな影響を与える可能性がある。

4. 終わりに

ゲノム情報を活用した育種技術の変革は大豆に限ったことではなく、様々な作物で進んでおり、モデル植物を含めて遺伝子情報の相互活用も当たり前になっている。こうした新しい育種技術は予想もつかない品種開発の可能性を秘めており、育種の現場でもゲノム情報をいかに利用していくかが成果を左右する時代になっている。

5. 引用文献

- 1) Schmutz, J., *et al.* Nature **463**, 178-120 (2010).
- 2) McCallum, C.M. *et al.*(2000)Nature Biotech. 18: 455-457.
- 3) <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002tccm-att/2r9852000002tcgt.pdf>