

平成 30 年 4 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07313

研究課題名(和文) イネ病害抵抗性誘導時に重要な新規ジャスモン酸シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Identification of a novel jasmonate-induced signaling pathway in rice defense response

研究代表者

五味 剣二 (gomi, kenji)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：50511549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：イネの病害抵抗性研究は、世界の約30億人の主食の収量増加に直結する重要な研究であるが、その病害抵抗性誘導機構に関しては、未解明な部分がいまだに数多く存在する。本研究により、イネ病害抵抗性機構に重要な植物ホルモンであるジャスモン酸のシグナルを制御する重要なタンパク質を2つ(JMTF1, OsSR01a)を見出し、JMTF1は正の制御因子、OsSR01aは負の制御因子として機能することを明らかとした。また、JMTF1に関しては、他の植物ホルモンであるオーキシンのシグナルも負に制御していることが明らかとなった。これらの研究により、イネの複雑なジャスモン酸シグナル伝達機構の一端を解明することができた。

研究成果の概要(英文)：Rice is one of the most important staple food crop. It has been estimated to be as the main source of nutrition for 50% (about 3.5 billion people) of the world population. Diseases caused by phytopathogens have always had a huge damage on rice production. In this study, we revealed the importance of jasmonate (JA), a plant hormone, in rice defense response. We further identified two key regulators, JMTF1 and OsSR01a, which have important role in rice JA signaling. It has been revealed that JMTF1 works as a positive regulator and OsSR01a works as a negative regulator in rice JA-mediated defense response, respectively. Furthermore, JMTF1 also works as a negative regulator against auxin signaling, which affects negatively to rice defense. Taken together, we revealed a novel JA signaling pathways regulated by JMTF1 and OsSR01a in rice. These findings provide further insight into the mechanism of JA-induced defense response in rice.

研究分野：植物病理学

キーワード：感染生理 植物病理 植物病害抵抗性

1. 研究開始当初の背景

植物はその生活環から、病原体の攻撃から動いて回避することができない。その為植物は、病原体への対抗手段として、動物とは違った独自の免疫機構を進化させてきたが、その機構の多くははまだ未解明である。世界の主要作物であるイネでさえ、毎年の予想収穫量の 20~30% を病害で失っていると考えられている。イネの重要病害であるいもち病や白葉枯病に対するこれまでの抵抗性研究は、「遺伝子対遺伝子」による真性抵抗性の研究が主であり、それによって得られた成果は品種改良に利用されてきたが、このような強い抵抗性は、病原体の共進化を誘起し、崩壊することが既に明らかとなっている。その為、現在の分子育種は、持続性があり、かつ、崩壊しにくい圃場抵抗性の強化にも重点がおかれ、それに関する研究も発展している。申請者らはこれまでに、植物ホルモンの一つであるジャスモン酸 (JA) によって誘導される圃場抵抗性反応が、イネ白葉枯病抵抗性誘導機構において重要な役割を持っていることを世界で初めて明らかにした。また、JA によって誘導される揮発性物質が、イネ白葉枯病抵抗性誘導機構において重要な役割を持っていることを世界で初めて直接的に明らかにするとともに、その合成酵素遺伝子を利用した耐病性強化イネの作出に成功している。さらに、多くの植物で JA シグナルとサリチル酸シグナルは拮抗関係にあるが、イネにおいてはむしろ、同じ病害抵抗性システムを“共有”していることを網羅的な遺伝子発現解析から見出し、イネ独自の新規病害抵抗性メカニズムを初めて明らかにしてモデル化し、その共有システムを common defense system として提唱した。このように、申請者らの研究により、イネ病害抵抗性誘導機構における JA の重要性は証明され、そのシグナル伝達経路も明らかにされつつあるが、その詳細なシグナル伝達メカニズムは不明な点が多い (図 1)。

2. 研究の目的

申請者らの研究によって、JA シグナルにおいて、OsJAZ8 タンパク質が重要であることは明らかにされているが、イネにおいては基本的な JA シグナル伝達機構の大部分が未解明なままである。申請者はこれまで、OsJAZ8 によって直接的または間接的に制御されている転写因子 (OsMYC2, JMTF1) や、OsJAZ8 と複合体を形成する OsNINJA1 と結合する新規タンパク質を複数同定しているが、それらの機能解析は始まったばかりで、病理学的役割についてはほとんど解明されていない (図 1)。そこで、本研究では、それらのうち、新規性の高い 2 つの因子 (JMTF1, OsNINJA1) に対する研究小課題、(1) 新規 JA シグナル制御因子 JMTF1 の植物病理学的役割と、(2) 新規 OsNINJA1 結合タンパク質の同定を設定し、それら因子の JA シグナル伝達機構における役割を遺伝子

レベルで解明し、イネ JA シグナル伝達機構に対する独創的・先駆的な研究を格段に発展させ、イネ病害抵抗性における新規抵抗性誘導機構の発掘を行う (図 1)。

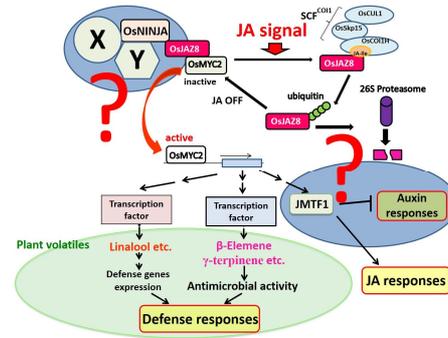


図 1. イネ JA シグナル伝達機構 (推定)

3. 研究の方法

(1) 新規 JA シグナル制御因子 JMTF1 の植物病理学的役割

主に分子生物学的手法を駆使して研究を行った。まず、JMTF1 過剰発現体を用いて JA 感受性試験やイネ白葉枯病に対する耐病性実験等を行い、JMTF1 が JA シグナルにおける正の制御因子なのか、負の制御因子なのか明らかにする。次に、JMTF1 がどのような遺伝子を制御しているのかを明らかにし、さらには、その遺伝子の病理学的役割を解析する。最終的には JMTF1 の転写因子としての生化学的機能と、イネ病害抵抗性における生物学的機能を明らかにする。

(2) 新規 OsNINJA1 結合タンパク質の同定

主に分子生物学的手法を駆使して研究を行った。これまでの酵母を用いた screening によって、複数の OsNINJA1 結合候補タンパク質が既に選抜されている。そこで、細胞内の局在が明らかとなっていないこれら候補タンパク質について、GFP タグによるイネ細胞内での局在解析を行い、OsNINJA1 と同じ核に局在するタンパク質を絞り込む。次に、絞り込んだタンパク質を用いた BiFC 法によって、植物細胞内での OsNINJA1 との結合検定を行い、真に OsNINJA1 と結合するタンパク質を選抜する。選抜した遺伝子の JA シグナルにおける役割を解析するために、過剰発現イネを作出し、そのイネを用いて JA 感受性試験等を行い、JA シグナルにどのような役割を持っているか等を検証する。

4. 研究成果

(1) 新規 JA シグナル制御因子 JMTF1 の植物病理学的役割

JMTF1 過剰発現体を用いて、JA の生理作用の一つである、クロロフィル分解作用を調べたところ、通常イネよりも早くクロロフィルの分解が起こることが明らかとなり、JMTF1 が JA シグナルの正の制御因子である可能性

が示された。また、JMTF1 過剰発現体はイネ白葉枯病(*Xoo*)に対して強い抵抗性を示した。さらに、この過剰発現体では、JA 応答性の防御関連遺伝子の一つであり、peroxidase をコードする *OsPrx26* 遺伝子の発現が有意に誘導されていた。*OsPrx26* の詳細な機能及び、病理学的役割は明らかとされていなかったため詳しく解析した。まず初めに、*OsPrx26* の細胞内局在解析をしたところ、細胞壁に局在していた(図2)。

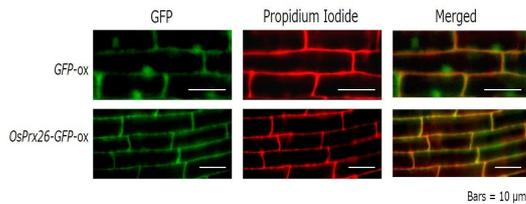


図2. *OsPrx26* の細胞内局在解析

一般的に、細胞壁に局在する peroxidase は、細胞壁のリグニン合成を触媒する酵素であることが多い。そこで、*OsPrx26* 過剰発現体を作成し、その過剰発現体の葉のリグニン含量を測定したところ、有意に蓄積していることが明らかとなった。リグニン含量の増加は、イネ白葉枯病抵抗性に重要な因子であることが既に報告されていたため、本過剰発現体におけるイネ白葉枯病抵抗性を検証したところ、抵抗性が強化されていることが明らかとなった。また、クロマチン免疫沈降法(ChIP)を用いた解析により、JMTF1 が *OsPrx26* 遺伝子を直接制御していることも明らかとなった。以上のことから、JMTF1 は JA シグナルを正に制御し、リグニン合成に重要な *OsPrx26* を直接制御する転写因子として、JA 誘導性のイネ白葉枯病抵抗性に寄与していることが明らかとなった。

JMTF1 過剰発現体は、JA シグナル応答だけでなく、葉の開度や重力応答性のように、オーキシシンシグナル応答性にも異常を持っていることが明らかとなった(図3)。

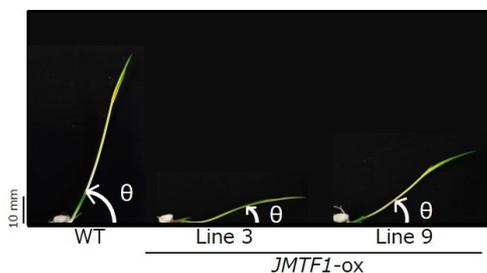


図3. JMTF1 過剰発現体の重力応答性異常

そこで、JMTF1 過剰発現体におけるオーキシシンシグナル応答性遺伝子の発現挙動を解析したところ、多くのオーキシシン応答性遺伝子の発現が抑制されていた。さらに、オーキ

シンシグナルの負の制御因子である *OsIAA13* 遺伝子の有為な発現誘導が認められた。そこで、機能獲得型変異体である *Osiaa13* 変異体を用いてイネ白葉枯病抵抗性を検証したところ、抵抗性が強化されていた。ChIP 解析により、JMTF1 は *OsIAA13* 遺伝子を直接は制御しておらず、間接的に制御していることが明らかとなった。

以上のことから、JMTF1 は JA シグナルの正の制御因子として機能すると同時に、オーキシシンシグナルの負の制御因子としても機能し、イネ白葉枯病抵抗性に重要な転写因子である可能性が示された(図4)。

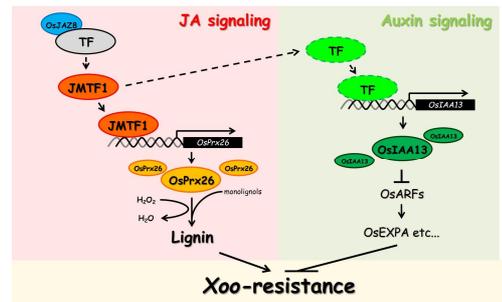


図4. 本研究で明らかとなった JMTF1 の役割

これまで、イネ病害抵抗性における JA シグナルとオーキシシンシグナルのホルモン間相互作用は報告されておらず、本研究が初めてと思われる。さらには、両ホルモンシグナルを同時に制御する転写因子も報告例がないため、本研究により、イネ耐病性機構に非常に重要な因子を同定することができたと考えられる。

(2) 新規 *OsNINJA1* 結合タンパク質の同定

OsNINJA1 結合タンパク質の研究に先立ち、*OsNINJA1* の病理学的役割を解析したところ、*OsNINJA1* は JA シグナルの負の制御因子であり、JA シグナルの正の制御因子である *OsMYC2* の活性を抑制することによって、イネ白葉枯病抵抗性を低下させることが明らかとなった。

これまでの研究により同定した、複数の *OsNINJA1* 結合タンパク質を本研究の初期の段階で、24 種類まで絞り込むことができた。さらに、細胞内局在解析をすることにより、*OsNINJA1* と同様に、核に局在する遺伝子を 14 種類同定することに成功した。(図5)。

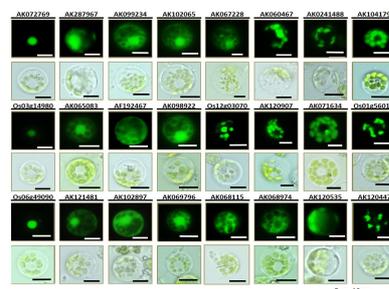


図5. *OsNINJA1* 結合タンパク質の細胞内局在解析

本研究では、核局在を示した遺伝子のうち、新規性の高い OsSR01a(AK072769)遺伝子を選抜し、解析を進めることにした。

OsSR01aとOsNINJA1は植物細胞内でも相互作用することが、BiFc解析によって明らかとなったが、酵母細胞内では全長領域同士では相互作用しないことが明らかとなったことから、OsSR01aとOsNINJA1との相互作用は、植物細胞内での何らかの修飾等による構造変化が必要である可能性が示された。

次に、OsSR01a 過剰発現体を作成し、イネでの役割を解析した。まず、JAの生理作用である、クロロフィル分解と、根の伸長阻害作用を検証した結果、本過剰発現体が、JAに対して低感受性の表現型を示すことが明らかとなり、OsSR01aがJAシグナルの負の制御因子である可能性が示された。また、本過剰発現体のJA処理後のイネ白葉枯病抵抗性を検証したところ、有意に弱くなっていることが明らかとなった。以上のことから、OsSR01aは、JAシグナルの負の制御因子として機能するOsNINJA1と複合体を形成し、協働的にJAシグナルを負に制御する因子であることが明らかとなった。これまで、OsSR01aによるJAシグナルの制御の知見は報告されたいないため、本研究により、イネにおける新規のJAシグナル制御因子を見出すことに成功した。

また、OsSR01aはOsNINJA1によって負の制御を受ける転写因子であるOsMYC2とも直接相互作用することが植物細胞内及び、酵母細胞内で確認された。そこで、OsMYC2の制御下で起こる暗条件下による葉の老化作用について、OsSR01a過剰発現体を用いて検証したところ、葉の老化の遅延が認められた(図6)。

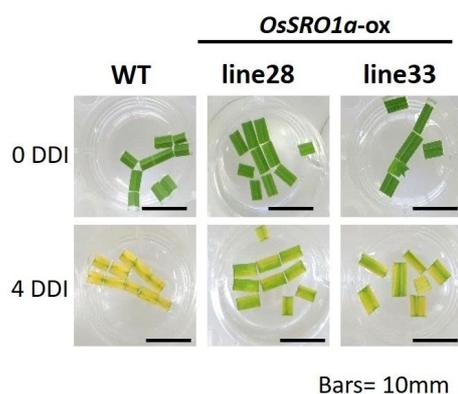


図6 .OsSR01a 過剰発現体による葉の老化遅延

以上のことから、OsSR01aはOsMYC2を介するJAシグナルを負に制御する因子で、その制御時には、OsNINJA1と相互作用することによってJAシグナルの負の複合体を呼び寄せる、「仲介者」として機能している可能性が示された(図7)。

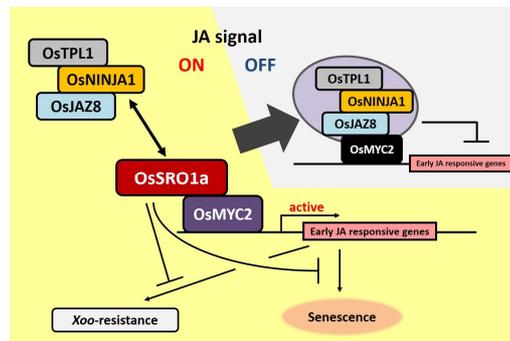


図7 . OsSR01aのJAシグナルにおける役割(推定)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計21件)

五味剣二 他、イネジャスモン酸シグナルにおけるOsSR01aの機能解析、第59回日本植物生理学会年会、2018年

五味剣二 他、ジャスモン酸誘導性イネ白葉枯病抵抗機構におけるOsNINJA1相互作用因子OsSR01aの役割、平成30年度日本植物病理学会年会、2018年

Gomi et al.、Function analysis of OsNINJA1 interacting protein, OsSR01a in rice jasmonate signaling pathway, Phytogene Symposium IX, 2017年

Gomi et al.、Functional analysis of OsNINJA1 binding protein OsFHA1 in rice jasmonate signaling, Phytogene Symposium IX, 2017年

Gomi et al.、Jasmonate-induced transcription factor JMTF1 positively regulates resistant response to rice bacterial blight.、Phytogene Symposium IX, 2017年

五味剣二 他、イネのジャスモン酸シグナル伝達機構におけるOsNINJA1結合タンパク質であるOsSR01aの解析、平成29年度日本植物病理学会関西部会、2017年

五味剣二 他、イネジャスモン酸シグナル伝達機構におけるOsNINJA1結合タンパク質OsFHA1の機能解析、平成29年度日本植物病理学会関西部会、2017年

五味剣二 他、ジャスモン酸によって誘導されるイネ白葉枯病抵抗機構に重要な転写因子であるJMTF1の機能解析、平成29年度日本植物病理学会関西部会、2017年

五味剣二 他、ジャスモン酸シグナル制御因子であるOsNINJA1のイネ白葉枯病抵抗機構における役割、平成29年度日本植物病理学会年会、2017年

五味剣二 他、ジャスモン酸によって誘導されるイネ白葉枯病抵抗機構において重要な転写因子JMTF1の役割、平成29年度日本植物病理学会年会、2017年

五味剣二 他、Role of OsNINJA1 in jasmonate-induced resistance to rice bacterial

blight in rice、第 58 回 日本植物生理学会年会、2017 年

五味剣二 他、Role of a transcription factor JMTF1 in jasmonate-induced resistance to rice bacterial blight in rice. 、第 58 回 日本植物生理学会年会、2017 年

五味剣二、イネ白葉枯病抵抗性における植物ホルモンの役割、第 27 回 植物細菌病談話会、2016 年

Gomi et al.、Identification of the novel OsNINJA1-interacting protein OsSRO1a in rice、Phytogene Symposium VIII、2016 年

Gomi et al.、Jasmonate-induced transcription factor JMTF1 negatively regulates the auxin signaling and confers the resistance to bacterial blight in rice、Phytogene Symposium VIII、2016 年

Gomi et al.、Role of OsNINJA1 in jasmonate signaling in rice、Phytogene Symposium VIII、2016 年

Gomi et al.、Role of a transcription factor JMTF1 in jasmonate-induced resistance to rice bacterial blight in rice、Phytogene Symposium VIII、2016 年

五味剣二 他、ジャスモン酸誘導性転写因子 JMTF1 はオーキシシンシグナルを負に制御し、イネ白葉枯病抵抗性に寄与する、平成 28 年度日本植物病理学会関西西部会、2016 年

五味剣二 他、ジャスモン酸によって誘導されるイネ白葉枯病抵抗機構における転写因子 JMTF1 の役割、平成 28 年度日本植物病理学会関西西部会、2016 年

五味剣二 他、イネ白葉枯病誘導抵抗性に重要なジャスモン酸シグナルを制御する OsNINJA1 の解析、平成 28 年度日本植物病理学会関西西部会、2016 年

④五味剣二 他、ジャスモン酸誘導性転写因子である JMTF1 を過剰発現させたイネの解析、平成 27 年度日本植物病理学会関西西部会、2015 年

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ag.kagawa-u.ac.jp/plantpathology/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

五味 剣二 (GOMI, Kenji)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：5 0 5 1 1 5 4 9