

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07410

研究課題名(和文) ストレス環境下でのイネ耐病性の頑強化

研究課題名(英文) The biotic stress response in rice under abiotic stress conditions

研究代表者

上野 宜久 (Ueno, Yoshihisa)

龍谷大学・農学部・実験助手

研究者番号：20335011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネのサリチル酸(SA)シグナルに応答した遺伝子発現において、WRKY45は中心的役割を果たす転写因子であり、自身の発現もSAに応答する。しかし、どのような機構でSA応答が実現しているかは未だによくわかっていない。ストレス環境下で大きな影響を受ける遺伝子発現のSA応答機構において、以下を見出した。SAに応答した発現制御シス領域はWRKY45遺伝子内に存在することが示唆された。さらに、このシス領域に結合する可能性のある候補転写因子を複数見出した。加えて、イネ細胞内でのWRKY45タンパク質はジスルフィド結合を介して大型化していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

寒いと病気に罹りやすいという現象は植物にも認められる。国内の例では、冷夏におけるイネいもち病被害が有名である。しかしその機構がわからなかったために、これまでは有効な対策は講じられずにきた。私たちはこれまでに、環境ストレスが病原抵抗性を抑制することを見出してきた。さらに、その抑制を実行する分子OsPTP1/2をも見出してきた。OsPTP1/2によって抑制される病原抵抗性反応はサリチル酸経路と呼ばれ、この経路の分子機構を明らかにしてきた。

研究成果の概要(英文)：WRKY45 is a central transcription factor involved in the salicylic acid-responsive gene expression in rice. The expression of WRKY45 itself is also under the regulation of salicylic acid signaling. However, it is still unknown how the expression is regulated. Recently, I found that the regulatory cis-element is probably in the gene body. Furthermore, I searched and picked up the candidate transcription factors those could bind with the region of the gene. None of them are not reported as the factor(s) regulating the salicylic acid-dependent gene expression. These results suggest that the mechanism(s) differing from that of Arabidopsis is/are underlying the regulation of gene expression depending on salicylic acid signaling in rice. In addition, the currently developed antibody showed the molecules with lower mobility in gel under the non-reducing condition, suggesting disulfide bond(s) of WRKY45 in plant cells.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：サリチル酸 イネ いもち病 WRKY45 チロシンリン酸化 脱リン酸化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

寒いと病気に罹りやすい。このような現象は植物にも認められる。国内では冷夏におけるイネいもち病被害の拡大が有名である。しかし、その機構がわからなかったためにこれまで有効な対策は講じられずにきた。研究代表者らはこれまでに、非生物学的ストレス応答シグナリングと生物学的ストレス応答シグナリングの結節点といえる分子 OsPTP1/2 を見出してきた。OsPTP1/2 はチロシン脱リン酸化酵素 (PTPase) であり、アブシジン酸 (ABA) シグナリングによって活性化されることが示唆される。すなわち、非生物学的ストレスに晒され ABA シグナリングが活性化されると、OsPTP1/2 が耐病性において重要なサリチル酸 (SA) シグナリングを不活性化する。なお、他に植物 PTPase の活性化については既報がない。

具体的には、OsPTP1/2 は MAP キナーゼの一つ OsMPK6 のチロシン残基を脱リン酸化することで SA シグナリングを抑制することを見出した。また、SA によって OsMPK6 が活性化すること、OsMPK6 が WRKY45 を直接リン酸化して活性化することも見出していた。

WRKY45 は、SA の代わりとして植物に作用することで耐病性を向上させる農薬である植物活性化剤の一つベンゾチアジアゾール (BTH) に応答して発現が上昇する転写因子として単離された。過剰発現及びノックダウンした植物の解析と網羅的発現解析とから、WRKY45 は SA に応答して発現する遺伝子 (SA 応答遺伝子) の大半を制御するマスター転写因子であることがわかってきている。さらに、実際に WRKY45 過剰発現イネ植物体はいもち病を含めた複数の病害に対して強い抵抗性を示す。しかし、WRKY45 タンパク質が具体的にどのように働いて SA 応答遺伝子を制御しているのかについては不明な点が多い。更に WRKY45 遺伝子自身が SA に応答して発現する機構もほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、いもち病抵抗性において中心的な役割を担う SA シグナリング系である OsMPK6-WRKY45-SA 応答遺伝子群発現の作用機構の解明と、このシグナリング系を環境ストレスが抑制する中心的機構を担う OsPTP1/2 に対して阻害的効果のある薬剤探索、さらには OsPTP1/2 のノックアウトとから、イネの耐病性の頑強化を目指す基礎研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

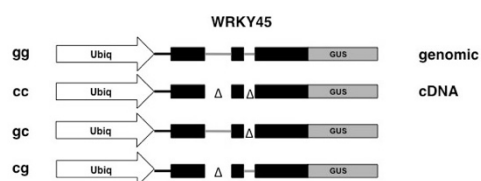
分子生物学の手法による。詳細は省略。

トランス因子の一次スクリーニングは、酵母 1 ハイブリッドスクリーニングによった。イネ葉肉細胞プロトプラストでの一過的発現は、PEG 法でプラスミドを導入することで行った。GUS 染色には、イネ形質転換個体を用いた。

4. 研究成果

(1) WRKY45 のイントロンには SA 応答において決定的に重要なシス領域が存在する

WRKY45 遺伝子のゲノム DNA 配列に読み枠を合わせてレポーター遺伝子 GUS を融合タンパク質が産生されるように連結すると (WRKY45p-WRKY45g-GUS)、内在性 WRKY45 遺伝子の発現と同様に SA 投与に応答して GUS 活性の誘導が認められた。ところが、このレポーター遺伝子から WRKY45 タンパク質をコードする領域 (WRKY45g) を除き 5' 制御領域を直接 GUS に連結すると (WRKY45p-GUS)、SA 投与しなくても強い GUS 活性が認められた。これらから、常時は発現を抑制し SA シグナルを受容するとその抑制が解除される様式で発現を制御するシス領域が WRKY45g に存在することが示唆された。しかし、WRKY45 cDNA を構成的に発現させる Ubq プロモーターでドライブさせた場合、SA 投与に関係なく WRKY45 cDNA の発現は強く認められた。従って、SA に応答して発現を制御するシス領域はイントロン内に存在することが強く示唆された。

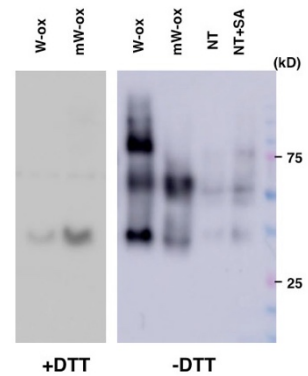


(2) SA 応答を決定づけるシス領域に結合する候補トランス因子を複数見出した

共同研究で行なった酵母 1 ハイブリッドスクリーニングと葉肉細胞プロトプラストへの一過的遺伝子導入およびレポーターアッセイにより、WRKY45 のイントロンに結合する DNA 結合型転写因子をスクリーニングし、候補因子を複数見出した。興味深いことに、これらはいずれも SA による遺伝子発現制御因子としてシロイヌナズナで提唱されているものとは異なっていた。このことは、シロイヌナズナで提唱されている SA 受容及び応答の機構とは少なくとも部分的には異なる機構がイネにおいて重要な役割を担っていることを暗示するものと考えられた。

(3) 植物細胞内での WRKY45 タンパク質分子には大型化しているものがあった

WRKY45 は SA 応答の鍵転写因子である。WRKY45 タンパク質の挙動は SA 応答にとって中心的であるがその詳細についてはほとんどわかっていなかった。そのため、この調査のツールとして必要な抗体を作成した。作成した抗体は良好な反応性を示した。この抗体を用いてイネ抽出液のウェスタン解析を非還元下で行ったところ、WRKY45 タンパク質に由来するシグナルは、本来の分子量に相当するシグナルに加えてそれ以外にも、より大きな分子量に相当する強いシグナルが複数認められた。しかし、還元剤を添加するとこれらの大きな分子量に相当するシグナルは全て検出限界以下になり、単量体のサイズに収斂した (未発表)。これらの結果から、植物細胞内では WRKY45 タンパク質の約半分がそれ以上の分子は、ジスルフィド結合により大型化した分子として存在していることが示唆された。興味深いことに、シロイヌナズナの NPR1 タンパク質が類似の制御を受けていることが知られている。



(4) その他の進捗

レポーター系統の形質転換イネを用いた化合物ライブラリーのスクリーニングを行っている。まだ完了していない。

CRISPR/Cas9 を用いたノックアウトは、個々の遺伝子について予定通り完了した (共同研究)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ueno Yoshihisa, Matsushita Akane, Inoue Haruhiko, Yoshida Riichiro, Jiang Chang-Jie, Takatsuji Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 WRKY45 phosphorylation at threonine 266 acts negatively on WRKY45-dependent blast resistance in rice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 e1356968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15592324.2017.1356968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi M, Inoue SI, Ueno Y, Kinoshita T.	4. 巻 7
2. 論文標題 A Raf-like protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 45586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep45586.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 UENO Yoshihisa, SAWADA Kazuhiko, IWAHORI Hideaki, TAGA Masaru	4. 巻 60
2. 論文標題 Observations of Soil Nematodes Obtained via a Simplified Collection Method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Research in Science Education	6. 最初と最後の頁 279 ~ 289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11639/sjst.19004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ueno Yoshihisa, Yoshizawa-Kumagaye Kumiko, Emura Junji, Urabe Tomoko, Yoshiya Taku, Furumoto Tsuyoshi, Izui Katsura	4. 巻 2072
2. 論文標題 In Vivo Phosphorylation: Development of Specific Antibodies to Detect the Phosphorylated PEPC Isoform for the C4 Photosynthesis in Zea mays	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 217 ~ 240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-9865-4_18	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----