

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05648

研究課題名(和文) イネ白葉枯病抵抗性機構に重要な新規ジャスモン酸シグナル伝達複合体の解明

研究課題名(英文) Study on a novel jasmonic acid-regulating complex in rice disease resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

研究代表者

五味 剣二 (Gomi, Kenji)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：50511549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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(OsSR01a, OsFHA1)見出し、両タンパク質がジャスモン酸シグナルの負の制御因子として機能することを明らかにした。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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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多く、特に植物ホルモンによって制御されている病害抵抗性機構はほとんど明らかとなっていない。本研究のように、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を制御する因子を一つ一つ解明し、イネにおけるジャスモン酸シグナル伝達機構を詳細に解明していくことにより、将来の分子育種技術を生かした耐病性イネ作出時に非常に重要な知見を提供できるようになる。

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. Rice diseases caused by phytopathogens have always had a huge damage on rice production. In this study, we revealed the importance of a plant hormone, jasmonate (JA), in rice defense response. We further identified two key regulators, OsSR01a and OsFHA1, which have important role in rice JA signaling. It has been revealed that OsSR01a and OsFHA1 form a complex with OsNINJA1 and act as negative regulators in rice JA-mediated defense response. Taken together, we revealed a novel JA signaling pathways regulated by OsSR01a and OsFHA1 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：植物感染生理 植物ホルモン 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、その機構の多くはいまだ未解明である。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。その他の揮発性物質においても成果を挙げている。さらに、揮発性物質の合成が JA 依存的に制御されていることも明らかにしている。このように、イネの病害抵抗性機構の厳密な制御には JA シグナルが必須であることが明らかとなっているが、その制御機構は未解明な部分が多い。

これまでの研究により、イネ JA シグナル伝達機構において、OsJAZ8/OsNINJA1 複合体が転写因子である OsMYC2 等の活性を不活化状態にし JA シグナルを抑制していることや、JA シグナルがオンになると、OsJAZ8 を分解させることによって、OsMYC2 が活性化し、続けてシグナルの下流で働く揮発性物質の生合成等が活性化し、イネ白葉枯病抵抗性機構が発動していることが明らかとなっている(図 1)。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 シグナル伝達機構における OsMYC2 の重要性は徐々に証明されているが、OsMYC2 を直接・間接的に制御している複合体因子に関しては未解明な部分が多かった。

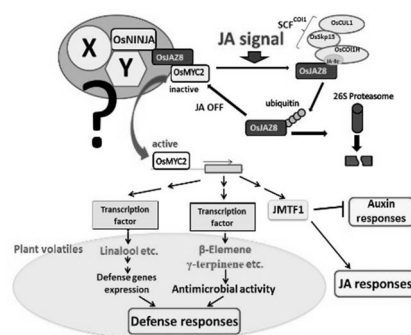


図 1. 当研究室で明らかにしたジャスモン酸シグナル伝達機構

2. 研究の目的

これまでの申請者の研究により、イネの JA シグナルにおいて、転写因子である OsMYC2 が JA 早期応答を制御していることが明らかとなっており、さらに負の制御因子である OsJAZ8 タンパク質が OsMYC2 の活性制御に重要であることが明らかにされている。さらに、OsJAZ8 と複合体を形成する OsNINJA1 と相互作用する新規複合体構成タンパク質を複数個同定しているが、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。そこで本研究では、これら機能未知な OsNINJA1 複合体候補因子のイネ JA シグナル伝達機構における詳細な役割解析を行う。具体的には OsNINJA1 複合体候補因子のうち、シロイヌナズナの知見から、イネにおいても JA シグナルに関与する可能性が高い因子(OsSR01a)と、全く研究例がない因子(OsFHA1)を選抜し、これら 2 つの OsNINJA1 相互作用タンパク質の JA シグナル伝達機構における役割を分子レベルで解明し、イネ JA シグナル伝達機構に対する独自の・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奇抵抗性誘導機構の発掘を行う(図 2)。

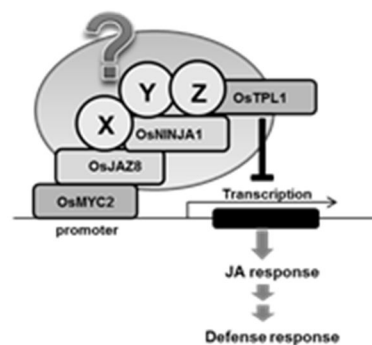


図 2. 本研究の目的
OsNINJA1 相互作用タンパク質の解析を行い、イネ JA シグナル伝達機構を制御する新奇複合体因子の発掘を行う

3. 研究の方法

(1) OsNINJA1 相互作用タンパク質 OsSR01a の解析

主に分子生物学的手法を駆使して研究を行った。まず、OsSR01a 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、OsSR01a 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した。Yeast Two-Hybrid 等による各種 OsMYC2 複合体因子との相互作用の解析を行った。次に、OsSR01a がどのような遺伝子を制御しているのかを明らかにし、最終的には OsSR01a の OsMYC2 制御機構を明らかにし、イネ病害抵抗性における OsSR01a の病理学的役割を明らかにした。

(2) OsNINJA1 相互作用タンパク質 OsFHA1 の解析

主に分子生物学的手法を駆使して研究を行った。まず、OsFHA1 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、OsFHA1 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した。Yeast Two-Hybrid(Y2H)等による各種 OsMYC2 複合体因子との相互作用の解析を行った。次に、OsFHA1 がどのような遺伝子を制御しているのかを明らかにし、最終的には OsFHA1 の OsMYC2 制御機構を明らかにし、イネ病害抵抗性における OsFHA1 の JA シグナルにおける役割を明らかにした。

4. 研究成果

(1) OsNINJA1 相互作用タンパク質 OsSR01a の解析

JA 処理後の OsSR01a 遺伝子の発現挙動を解析したところ、処理後 24 時間後にその発現量のピークが来ることが明らかとなった。イネの JA 応答は、処理後 12 時間までの早期応答と、12 時間以降の後期応答に分かれることが明らかとなっているので、OsSR01a 遺伝子は JA 後期応答性の遺伝子であることが明らかとなった。次に、*OsSR01a* 過剰発現体を用いた JA 感受性試験を行ったところ、地上部および地下部とも JA に対して非感受性の表現型を示すことが明らかになった。また、*OsSR01a* 過剰発現体は JA によって誘導されるイネ白葉枯病に対する抵抗性が誘導されなかった(図3)。さらに、本過剰発現体では、OsMYC2 応答性防御関連遺伝子の JA による発現誘導が見られなかった(図4)。このことから、本過剰発現体の JA によるイネ白葉枯病抵抗性の低下は OsMYC2 依存性シグナル伝達機構の低下に起因することが明らかとなった。さらに、病害抵抗性以外にも、本過剰発現体は暗条件下における JA 依存性の葉の老化応答も抑制されていた(図5)。これらの結果より、OsSR01a はイネにおいて、JA シグナルの負の制御因子であることが明らかとなった。また、OsSR01a は OsMYC2 と OsNINJA1 と異なった領域で相互作用していることも明らかとなり(図6)、複雑な複合体形成の一端を解明することができた。本研究により、OsSR01a は、JA シグナルの後期に誘導され、早期 JA シグナル応答の中心的な転写因子である OsMYC2 と負の制御因子である OsNINJA1 等との複合体形成を仲介することによって、活性化された OsMYC2 依存的早期防御応答を JA 応答後期において不活性化するために必須な制御因子であることが証明できた(図7)。これらの研究成果をまとめた論文が国際誌に受理され(Kashihara et al., Plant Cell Reports, 39, 489-500,2020)、イネの新奇病害抵抗性機構を世界に発信することができた。

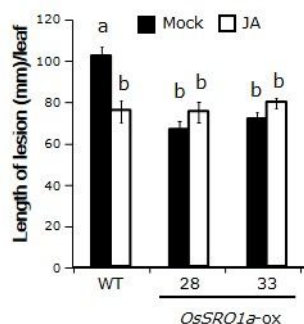


図3 .*OsSR01a* 過剰発現体は JA によるイネ白葉枯病抵抗性が誘導されない

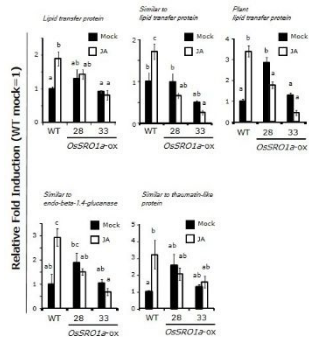


図4 .*OsSR01a* 過剰発現体は OsMYC2 応答性防御関連遺伝子の JA による誘導が見られない

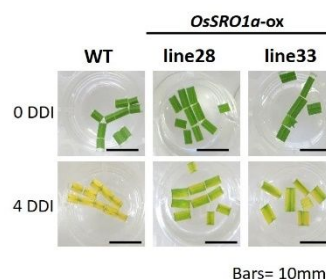


図5 .*OsSR01a* 過剰発現体による葉の老化遅延
暗下4日目の写真

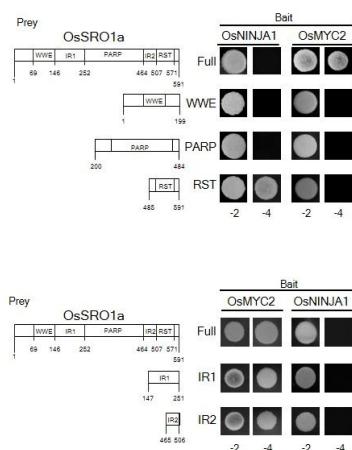


図6 .OsSR01a は OsMYC2 と OsNINJA1 と異なる領域で結合する

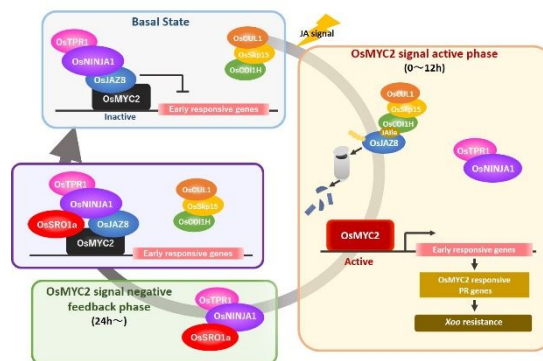


図7 .まとめ
OsSR01a は OsMYC2 と OsNINJA1 複合体の仲介役として JA シグナルに関与する

(2) OsNINJA1 相互作用タンパク質 OsFHA1 の解析

酵母細胞内で確認された OsNINJA1 と OsFHA1 の相互作用を、植物細胞内でも再現できるかを、玉ねぎ上皮細胞を用いた Bimolecular Fluorescence Complementation (Bi-Fc) 法で検証し植物細胞内での相互作用も確認した (図 8)。また、Y2H 法により、OsNINJA1 以外の因子との相互作用を解析したところ、OsJAZ2 と相互作用することが明らかとなった。次に、*OsFHA1* 過剰発現体を用いて JA による根の伸長抑制作用を検証したところ、抑制がみられず JA 非感受性の表現型を示した。このことから、OsFHA1 は 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、暗条件下における葉の JA 依存的な老化応答についても本過剰発現体では遅延が見られた (図 9)。しかしながら、JA 誘導性のイネ白葉枯病抵抗性に関しては、野生型イネと同様の表現型を示し、同程度の抵抗性が誘導されていた (図 10)。そこで、*OsFHA1* 過剰発現体における OsMYC2 依存性早期防御関連遺伝子と OsMYC2 非依存性防御関連遺伝子の JA 応答性発現挙動を解析したところ、OsMYC2 依存性防御関連遺伝子は JA による発現誘導が低下していたが、OsMYC2 非依存性防御関連遺伝子においては、野生型イネと同様に JA による発現誘導が見られた (図 11)。

以上のことから、OsFHA1 は OsMYC2 非依存的な後期応答性 JA シグナルには直接関与しないが、暗条件下における老化応答経路には深く関与を示すことが明らかとなり、JA シグナルの上流で働く OsSR01a とは異なり、JA シグナルの早期応答時と老化応答に特化した制御因子である可能性が示された。

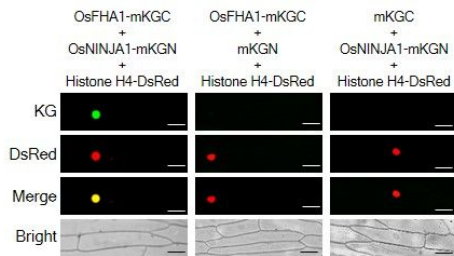


図 8 . OsFHA1 は OsNINJA1 と植物細胞内でも相互作用する

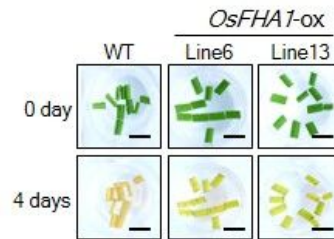


図 9 . *OsFHA1* 過剰発現体による葉の老化遅延

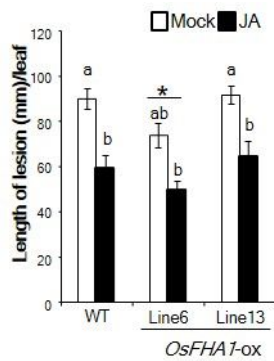
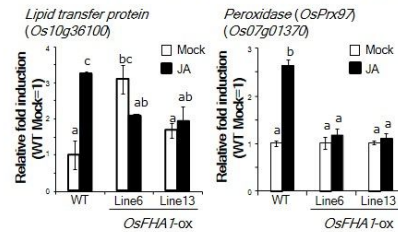


図 10 . *OsFHA1* 過剰発現体による JA 誘導性白葉枯病

OsMYC2-dependent defense-related genes



OsMYC2-independent defense-related genes

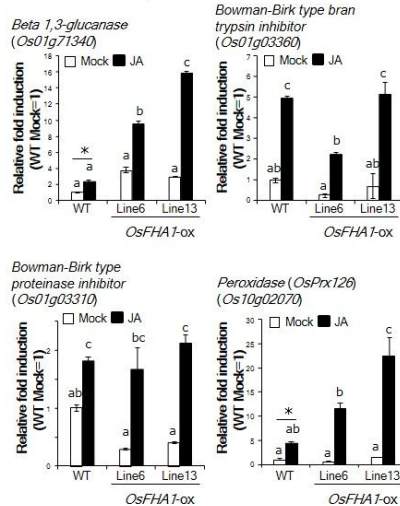


図 11 . *OsFHA1* 過剰発現体による OsMYC2 依存性・非依存性防御関連遺伝子の JA 応答性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kashihara Keita, Onohata Tomonori, Yariuchi Rina, Tanaka Suzumi, Akimitsu Kazuya, Gomi Kenji | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 The overexpression of OsSR01a, which encodes an OsNINJA1- and OsMYC2-interacting protein, negatively affects OsMYC2-mediated jasmonate signaling in rice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Plant Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 489-500 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00299-019-02504-z | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kashihara Keita, Onohata Tomonori, Okamoto Yuki, Uji Yuya, Mochizuki Susumu, Akimitsu Kazuya, Gomi Kenji | 4. 巻 232 |
| 2. 論文標題 Overexpression of OsNINJA1 negatively affects a part of OsMYC2-mediated abiotic and biotic responses in rice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Plant Physiology | 6. 最初と最後の頁 180 ~ 187 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jplph.2018.11.009 | 査読の有無 有 |
| 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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 柏原啓太 |
| 2. 発表標題 ジャスモン酸シグナル制御因子であるOsNINJA1と相互作用するOsSR01aの病理学的役割 |
| 3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柏原啓太 |
| 2. 発表標題 ジャスモン酸誘導性イネ白葉枯病抵抗性機構におけるOsSR01aの役割 |
| 3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会関西支部会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡本祐季 |
| 2. 発表標題 OsNINJA1結合タンパク質OsFHA1のイネジャスモン酸シグナル伝達機構における役割 |
| 3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会関西部会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柏原啓太 |
| 2. 発表標題 イネのジャスモン酸シグナルを負に制御するOsNINJA1と相互作用するOsSR01aの解析 |
| 3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柏原啓太 |
| 2. 発表標題 OsNINJA1相互作用タンパク質であるOsSR01aはJA誘導性イネ白葉枯病抵抗性を負に制御する |
| 3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西部会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔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 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|