

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06065

研究課題名(和文)新規イネAAA-ATPase 遺伝子の病害防御応答における機能の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of a new AAA-ATPase gene in rice defense response

研究代表者

姜 昌杰 (JIANG, Chang-Jie)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主席研究員

研究者番号：80370659

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)：イネイモチ病菌感染に対してサリチル酸依存的に発現応答するOsAAA-ATPase1 遺伝子を見いだした。OsAAA-ATPase1はSAに特異的に発現応答し、OsNPR1 およびWRKY45の制御下にあること、そのタンパク質産物はATPase活性を有し、細胞質に局在していることが示された。この遺伝子をイネに過剰発現するとイモチ病および白葉枯病に対する抵抗性が顕著に向上し、発現抑制すると病抵抗性が低下した。トランスクリプトーム解析の結果から、OsAAA-ATPase1 はエチレンシグナル伝達経路を含む様々なシグナル伝達および代謝経路を活性化することにより病害抵抗性を誘導す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

本研究で初めてサリチル酸シグナル伝達経路におけるAAA-ATPase ファミリー遺伝子(OsAAA-ATPase1)の機能を明らかにされた。これらの成果は植物防御応答におけるサリチル酸シグナル伝達機構の全容を解明する上で重要な新知見をもたらすものである。また、新規に見出されたOsAAA-ATPase1遺伝子はイネ病害抵抗性を正に制御することが明らかになり、耐病性分子育種への活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：A novel AAA-ATPase family gene OsAAA-ATPase1 was identified which responded to rice blast fungus infection in a salicylic acid (SA)-dependent manner. The expression of OsAAA-ATPase1 showed an SA-specific response under the control of OsNPR1 and WRKY45. OsAAA-ATPase1 protein was shown to have ATPase activity and be localized in the cytoplasm. Overexpression of this gene in rice plants markedly enhanced resistance to blast and bacterial leaf blight, while suppression of its expression reduced the resistance. Furthermore, transcriptome analysis showed that OsAAA-ATPase1 induces disease resistance by activating various signaling and metabolic pathways including ethylene signaling pathways.

研究分野：植物保護科学

キーワード：OsAAA-ATPase サリチル酸 イネ いもち病 防御応答

1. 研究開始当初の背景

サリチル酸 (Salicylic Acid, SA) を介するシグナル伝達は、植物の病害防御応答において最も重要な経路のひとつであり、病原菌感染に際し、感染特異タンパク質 (PR) の発現誘導など一連の防御反応を活性化させる。イネにおける SA シグナルは主に *OsNPR1* および *WRKY45* により媒介されることが示されている。しかし、SA シグナルによる PR 遺伝子の発現誘導などの防御機構の活性化機構についてはまだ未知の部分が多い。

他方、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の一種である *OsSSI2* を欠損 (*Osssi2*) または発現抑制 (*OsSSI2-kd*) すると SA シグナル経路が活性化し、イモチ病および白葉枯病に対する抵抗性が顕著に向上する。また、*OsSSI2-kd* では一群の AAA-ATPase ファミリー遺伝子 (*OsAAA-ATPase1-6*) の発現が顕著に上昇していることがこれまでの研究で見出され、イネ病害抵抗性において何らかの役割を果たしていることが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、*OsAAA-ATPase1* のイネ SA シグナル伝達経路における機能を明らかにし、病原菌侵入に対する防御活性化機構の全容解明に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) イネの葉片に様々なホルモン処理を行い、*OsAAA-ATPase1* の発現を解析し、各種ホルモンに対する応答を解析する。

(2) イネ幼苗 (日本晴) にイモチ病菌を接種し、*OsAAA-ATPase1* 発現を経時的に測定する。また、SA 分解酵素遺伝子 *NahG* 発現イネを用いて同様な発現解析を行い、*OsAAA-ATPase1* 発現制御における SA の作用を明らかにする。

(3) His(6)-*OsAAA-ATPase1* 融合タンパク質を大腸菌内で合成し ATPase 酵素活性を測定する。また、*OsAAA-ATPase1-GFP* DNA をイネ細胞に導入し、細胞内分布を観察する。

(4) *OsAAA-ATPase1* を過剰発現 (*OsAAA-ATPase1-ox*) または発現抑制 (*OsAAA-ATPase1-kd*) させた遺伝子組換えイネを用いてイモチ病抵抗性の検定を行い、*OsAAA-ATPase1* の機能を解析する。

(5) 野生型 (日本晴)、*OsAAA-ATPase1-ox* および *OsAAA-ATPase1-kd* イネにイモチ病菌を接種し経時的にサンプリングした感染葉を用いて RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を行う。

4. 研究成果

(1) イネ幼苗 (日本晴) に、植物ホルモンのオーキシシン、ジベレリン、サイトカイニン、エチレン、アブシジン酸、ジャスモン酸およびサリチル酸を24時間水耕処理し、*OsAAA-ATPase1* の発現をqPCR法により調べた。その結果、*OsAAA-ATPase1* はサリチル酸に特異的に発現応答することが明らかになった (図1)。

(2) *OsAAA-ATPase1* はイモチ病菌感染に反応して発現誘導した。一方、*NahG* イネでは *OsAAA-ATPase1* の発現誘導が顕著に抑制されていた (図2)。これらの結果から、*OsAAA-ATPase1* はイモチ病菌感染に対してSA依存的に発現応答することが明らかになった。さらに、*OsAAA-ATPase1* はSA下流において *OsNPR1* および *WRKY45* により制御されていることが明らかになった。

(3) *OsAAA-ATPase1* タンパク質はATPase活性を有し (図3A)、イネ細胞内では細胞質に局在していることが示された (図3B)。

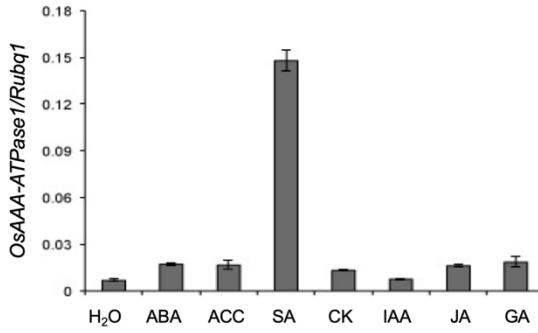


図1: *OsAAA-ATPase1* はサリチル酸に特異的に発現応答する。ABA: アブシジン酸; ACC: エチレン前駆体; SA: サリチル酸; CK: サイトカイニン; IAA: インドール酢酸; JA: ジャスモン酸; GA: ジベレリン酸。

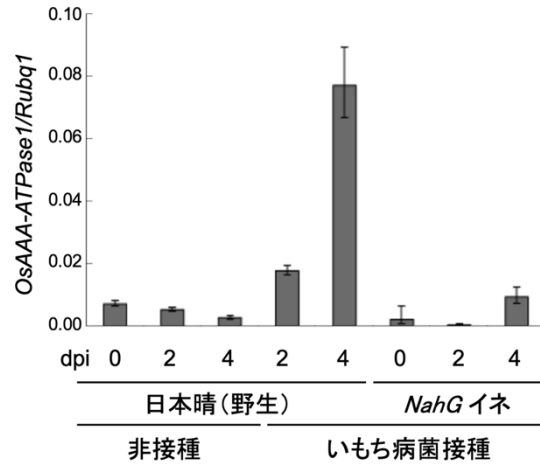


図2: *AAA-ATPase1* はいもち病菌感染に対してSA依存的に発現応答する。SA分解酵素遺伝子 *NahG* 発現イネでは *AAA-ATPase1* の発現誘導は見られない。

(4) イネで *OsAAA-ATPase1* を過剰発現させる (*OsAAA-ATPase1-ox*) とイモチ病抵抗性が顕著に向上し (図4)、RNAi 法により発現抑制すると (*OsAAA-ATPase1-kd*)、イモチ病抵抗性が低下した。

(5) トランスクリプトーム解析の結果、エチレン合成やシグナル伝達に関わる遺伝子、MAPK や WRKY、熱ショック、PR 等の防御関連遺伝子、糖代謝や糖輸送に関わる遺伝子の発現が *OsAAA-ATPase1* に依存して発現上昇していることが示された。

以上の結果から、*OsAAA-ATPase1* は SA シグナル伝達経路により制御されており、エチレンシグナル伝達経路を含む様々なシグナル伝達や代謝経路を活性化することにより病害抵抗性を正に制御することが明らかになった。

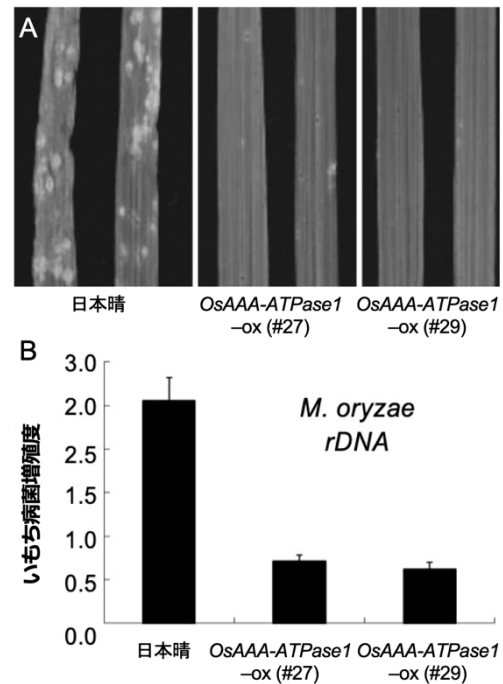
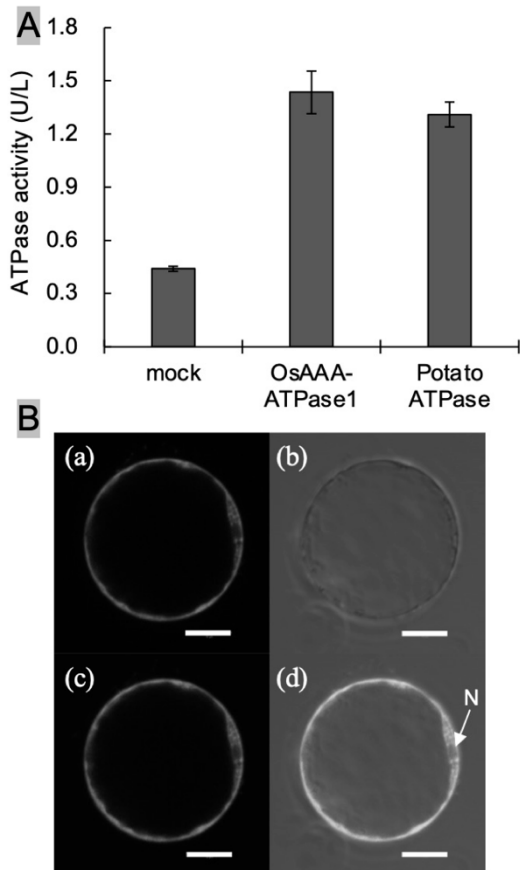


図4: *OsAAA-ATPase1* 過剰発現 (-ox) イネは強いイモチ病抵抗性を示す。A, 感染葉の観察像; B, 感染葉におけるいもち病菌のDNA定量値。

図3: *OsAAA-ATPase1* はATPase活性を有し (A)、細胞質に局在する (B)。(a), EGFP-*OsAAA-ATPase1*; (b), 明視野像; (c), mCherry (細胞質局在); (d), (a)と(c)の合成像。N, 細胞核; Bar, 20 μ m。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Liu Xinqiong, Inoue Haruhiko, Tang Xianying, Tan Yanping, Xu Xin, Wang Chuntai, Jiang Chang-Jie	4. 巻 21
2. 論文標題 Rice OsAAA-ATPase1 is Induced during Blast Infection in a Salicylic Acid-Dependent Manner, and Promotes Blast Fungus Resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1443 ~ 1443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21041443	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Liu Xinqiong, Jiang Chang-Jie
2. 発表標題 RICE OSAAA-ATPASE1, AN AAA-TYPE ATPASE FAMILY GENE, IS INDUCED DURING BLAST INFECTION IN A SALICYLIC ACID-DEPENDENT MANNER AND PLAYS A POSITIVE ROLE IN BLAST RESISTANCE
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Plant Growth Substances, June 25-29 2019, Paris-France（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------	---------