

機関番号：17201
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580016
 研究課題名 (和文) イネ紋枯病抵抗性・感受性系統における炭素分配制御メカニズムの解明
 研究課題名 (英文) Studies on regulating mechanisms of carbon distribution in rice lines of resistant and susceptible to sheath blight disease.
 研究代表者
 野瀬 昭博 (NOSE AKIHIRO)
 佐賀大学・農学部・教授
 研究者番号：80045137

研究成果の概要 (和文) : イネ紋枯病抵抗性は、解糖系の炭素分配クロスロードと名付けた、解糖系からのスクロース合成・澱粉合成・フェニルプロパノイド代謝への分岐部の炭素分配制御によってもたらされていることが明らかとなり、今後この部分における制御特性についての解明が代謝工学的な紋枯病抵抗性の実現に向けたターゲットであることが示唆された。また、現有するイネ紋枯病抵抗性を交配育種的に活用する 2 種類の QTL が同定され、抵抗性イネ育種に大きな可能性があることも明らかとなった。さらに、現有する抵抗性系統に多収性をもたらす遺伝子の連鎖が示唆され、紋枯病抵抗性と多収性の両立も可能である。

研究成果の概要 (英文) : It was appeared that a resistance to the sheath blight disease (SBD) was resulted from a regulation in the carbon distribution named as a carbon crossroad in the glycolysis, from the glycolysis to sucrose, starch and phenylpropanoid metabolisms, and also suggested that elucidations on the regulating mechanism become the next target of metabolic engineering studies to develop the SBD resistance. Also, the existence of two QTLs in the SBD resistant rice line showed a possibility to improve resistant varieties. In addition, the gene linkage between SBD resistance and a heterosis of the yield in our improved SBD resistant rice line suggests a possibility to achieve both of the SBD resistance and the high yield.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：作物学・雑草学

キーワード：イネ、紋枯病、炭素分配、抵抗性、感受性、解糖系

1. 研究開始当初の背景
 イネ紋枯病はイモチ病に次ぐ重要病害で高

温多湿条件下で多発することから地球温暖化

が進行する中で発生地域や被害の拡大が懸念されている。イネ紋枯病には真正抵抗性遺伝子は存在しないとされ、薬剤や疎植栽培等の耕種的対策がとられてきた。我々の属する研究室においては、メジャージーンによる耐病性品種の育成は、病原の適応変異の容易さから、耐病性品種の育成⇒適応病原の発生⇒耐病性品種の育成という永遠のループが形成され、真の耐病性品種の開発には至らないという発想から、抵抗性の程度は真性抵抗性に較べ劣るものの病原体の変異が生じにくいポリジーン由来の耐病性イネ品種の開発を試み、インディカ品種「Tepep」、「中国45号」及びジャポニカ品種「日本晴」の交配から「日本晴」の特性を維持しながら紋枯病抵抗性と感受性を有する系統を選抜・育成してきた（和佐野ら、1985）。育成系統の抵抗性については佐賀県を含む複数の地域で確認されている（中嶋ら、1997）。さらに、抵抗性メカニズムの生化学的解析では、抵抗性系統では罹病後に細胞壁へのリグニン沈着が全身的に生じ、リグニン合成が行われるイソプロパノイド代謝を含む複数の関連する代謝系の制御酵素の活性が増大することを明らかにしてきた（Danson, 2000a, b; 野瀬2002）。

近年、イネ紋枯病に関してはメジャージーン抵抗性の存在が示唆されている（Che et al., 2003）が、本研究で用いる抵抗性系統はメジャージーン由来の抵抗性分離比を示さないことから（和佐野ら、1985）、取り上げる抵抗性はポリジーン由来と考えた。また、イネ紋枯病罹病に伴うシグナル物質（Chen et al., 2000）や β -1, 3-グルカナーゼやキチナーゼといった糖代謝から派生する二次代謝合成に関する病害関連タンパク（PRタンパク）の発現も示され（Datta et al., 2001; Shanmugan et al., 2001）、本研究と同様な

視点での研究が活発化しつつある。

我々は、以上のような経緯を踏まえ、育成した抵抗性系統と感受性系統についてプロテオーム解析とマクロアレイ解析を行い、カルビン回路、OPP回路及び解糖系が重複する部分においてフラクトースビスリン酸（FBP）アルドラーゼを中心とした代謝制御が重要な役割を果たしている可能性を推察するに至った。

2. 研究の目的

イネにおいてイモチ病に次ぐ重要病害である紋枯病のポリジーン由来抵抗性・感受性について、関連する炭素分配制御部の分子生物学的メカニズムを明らかにする。特に、抵抗性と感受性の原因がイソプロパノイド代謝におけるリグニン合成系への炭素分配の制御によるものと考えられることから、カルビン回路、酸化的ペントースリン酸（OPP）回路及び解糖系が重複する部分に存在する「イソプロパノイド・澱粉・スクロース代謝への炭素分配分岐部」（炭素分配クロスロード）の制御メカニズムについて解明する。また、現有する抵抗性系統を用いた抵抗性実用品種を開発するためにQTL解析を行うとともに収量及び初期生育の低温感受性に関する特性についても明らかにする。

1) 紋枯病抵抗性関連遺伝子の発現特性の解明：リグニン合成による紋枯病抵抗性に関与する予想される解糖系・イソプロパノイド・澱粉・スクロース代謝への炭素分配分岐部に関する酵素遺伝子の発現関係を明らかにする。

2) イソプロパノイド・澱粉・スクロース代謝への炭素分配分岐部における代謝制御の *in vivo* 特性の解明：関連する代謝中間体を分光光度計を用いて正確に定量・評価し、代謝中間体間の質量作用比を求め、*in vivo* における炭素分配メカニズムの実像を明らかにし、

分配制御部を特定する。

3) イネ紋枯病抵抗性遺伝子の QTL 解析：現有する抵抗性系統を用いた抵抗性実用品種を開発するために抵抗性 QTL を同定する。

4) イネ紋枯病抵抗性イネ系統の収量特性に関する研究：現有する抵抗性系統を用いた抵抗性実用品種を開発するために F1 交雑系統におけるヘテロシス効果について検討を加える。

5) イネ紋枯病抵抗性・感受性系統の低温反応特性に関する研究：現有する抵抗性系統が示す低温抵抗性特性を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 紋枯病抵抗性関連遺伝子の発現特性の解明：RT-PCR 法を用い解糖系・ソプロパノイド・澱粉・スクロース代謝に関わる 30 種類の酵素遺伝子について、抵抗性系統と感受性系統の 2 系統のイネについて、菌接種後 1、2、4 日目の mRNA 発現特性の推移を解析した。

2) イソプロパノイド・澱粉・スクロース代謝への炭素分配分岐部における代謝制御の *in vivo* 特性の解明：抵抗性系統と感受性系統の 2 系統のイネについて、菌接種後 1、2、4 日目に解糖系の中間代謝産物 10 種類、シキミ酸経路の初発物質の E4P、代謝エネルギー物質の ATP、ADP、NAD、NADH の濃度、及び 10 種類の解糖系関連酵素、解糖系と酸化的ペントースリン酸経路の仲介をするトランスケトラーゼ、イソプロパノイド代謝の律速酵素として知られる PAL、また、リグニン合成に関わるペルオキシダーの活性変化について解析を行った。また、中間代謝産物の濃度から質量活性比を算出し *in vivo* での解糖系制御の実際を評価した。

3) イネ紋枯病抵抗性遺伝子の QTL 解析：紋枯病抵抗性系統と日本晴の交雑 F2 世代集団を作成し、1071 種類のマーカーを用いて紋枯

病抵抗性に関する QTL 解析を行った。

4) イネ紋枯病抵抗性イネ系統の収量特性に関する研究：紋枯病抵抗性系統と日本晴の交雑 F1 世代集団における収量形質の変異について圃場試験を実施した。

5) イネ紋枯病抵抗性・感受性系統の低温反応特性に関する研究：紋枯病抵抗性系統と感受性系統の初期生育に対する温度の影響を 6 種類の温度条件（昼夜温度、14/14、19/14、25/20、31/26、37/32、37/37℃）下で、生長形質、光合成特性について解析を行った。

4. 研究成果

1) 紋枯病抵抗性関連遺伝子の発現特性の解明：2F18-7-32 (32)、*Rhizokutonia solani* 抵抗性系統と 2F21-21-19 (19) 感受性系統の 2 系統のイネを用いて、*R. solani* を接種した後の mRNA 発現の経時変化を 30 種類の代謝酵素について解析した。それらは、8 種類の解糖系酵素、3 種類の酸化的ペントースリン酸回路 (OPPP) 酵素、6 種類の還元的ペントースリン酸回路 (RPPC) 酵素、スクロース合成に関わるスクロースリン酸シターゼ (SSase, EC 3.1.3.24)、澱粉合成に関わる ADP グルコースピロホスホリラーゼ (ADPase, EC 2.7.7.9) とスターチシターゼ (SS, EC 2.4.1.21)、トリカルボン酸 (TCA) 回路の 6 種類の酵素、二次代謝に関わる 4 酵素である。結果は、菌接種後 1 日目に有意な変化が認められ、解糖系に関与する 6 ホスホフルクトキナーゼ、ホスホグリセレートキナーゼ、エノラーゼ、ピルビン酸キナーゼ、二次代謝に関与する 3 デオキシ D アラビノヘプチュロースホスフェートシターゼ、フェニルアラニンアンモニアリアーゼにおいて抵抗性系統での発現が感受性系統に比べて有意 (>5%) に高かった。また、*R. solani* に感染した植物体では、解糖系、OPPP、TCA 及び二次代謝が活性化されることが認められた。RPPC 関係及び ADPase

と SS の mRNA の発現は、澱粉合成が *R. sonlani* を接種した抵抗性及び感受性の両系統の植物体で低下することが認められた。*R. sonlani* の感染は、解糖系、OPPP、二次代謝、TCA 回路を活性化させ、澱粉合成を低下させるものと考えられる。

2) イソプロパノイド・澱粉・スクロース代謝への炭素分配分岐部における代謝制御の *in vivo* 特性の解明：*R. sonlani* に感染したイネにおける解糖系中間代謝産物の濃度、その質量活性比 (MAR)、酵素活性について調査した。さらに、紋枯病抵抗性に関与すると予想されるメカニズムについても検討を加えた。フルクトース 6 リン酸、デヒドロキシアセトンリン酸、グリセルアルデヒド 3 リン酸、ホスホエノールピルビン酸、ピルビン酸、エリスロース 4 リン酸、ATP 含量が経時的に有意に増大した。さらに、アルドラーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、エノラーゼ、ピルビン酸キナーゼの活性が、*R. sonlani* に感染した植物体で高かった。トランスケトララーゼ、PAL、パーオキシダーゼの高い活性と H2O2 の高い含量も *R. sonlani* への抵抗性に関与していた。PFK、TPI、GAPDK + PGK、PK によって仲介される反応の MAR は、これらの反応が *R. sonlani* に感染した植物体の *in vivo* レベルで平衡状態から離れた状態にあることを示していた。つまり、これらの部分が抵抗性系統における解糖系の律速部位になっているものと考えられる。

3) イネ紋枯病抵抗性遺伝子の QTL 解析

1071 のマーカーを用いて、紋枯病抵抗性系統 32R と日本晴との交雑 F2 世代における遺伝的多系の解析を行い、紋枯病抵抗性に関する QTL 解析を行った。病斑指数との関係で解析した QTL として第 3 及び第 7

染色体に座乗する 2 及び 9 個の QTL 遺伝子の中で、Tepep (32R 系統の親品種) 由来の第 3 染色体上に座乗する RM7180 と第 7 染色体上に座乗する RM214 の有効性が高いことが明らかになった。つまり、これらの QTL を用いた紋枯病抵抗性品種を交雑育種によって開発する可能性が示された。

4) イネ紋枯病抵抗性イネ系統の収量特性に関する研究

イネ紋枯病に対する抵抗性を示す 2F18-7-32 系統 (32R) を交配親に用いた時のヘテロシス効果について形態形質と収量形質を解析した。収量形質については、1000 粒重は 24.7g と中間親に比べ 10% のヘテロシスを、一穂粒数は 118 粒と優勢親より 15% のヘテロシスを、ha 当たりの収量は 12.5t と優勢親の日本晴の 9.5t を 31.6% 上回るヘテロシスを示した。成熟期の全乾物は 5.5g と優勢親・日本晴 4.1g より 34% 高いヘテロシスを示し、一穂粒重は 2.48g と優勢親・日本晴 2.30g を 7.8% 上回るヘテロシスを示した。収穫指数については 45.0% と中間親と同様であった。出穂日は F1 系統で 1 週間遅く、稈長は 18.3% 優勢親より高かった。最上位から 2 番目の葉身の面積は優勢親よりも 4.5% のヘテロシスが認められ、その出葉角は 19.9° と日本晴と同様に直葉型を示した。分けつ角は 15.8° と 32R と同様であった。分けつ数は 32.2 と 32R と同様であった。

5) イネ紋枯病抵抗性・感受性系統の低温反応特性に関する研究

紋枯病抵抗性系統 32R と感受性系統 29S は、特に幼少期において低温下での生育に違いが見られることが観察されてきた。14°C から 37°C にわたり 6 種類の温度条件下で、これら 2 系統の生育特性と光合成特性について解析した。20°C 以下の条件下で 32R の生育が 29S に比べて優位に大きく、光合成特性 (光反応、

温度反応、CO2濃度反応)及び成長関数 (RGR、NAR) のいずれも32Rで優れていることが観察された。さらに、これらの違いをもたらす原因のひとつが地下部の生育量の違いであることも明らかになった。つまり、32Rが示すポリジーン由来の紋枯病抵抗性が低温下における根の生育を活性化するQTLと関連するものであることを示唆している。今後、前述の研究で同定したQTLとの関係を解析する予定であるが、本成果は幼少期の低温と生育旺盛期の高温という今後の地球温暖化にもなう気温変化に32Rで見られる紋枯病抵抗性の遺伝的背景が極めて有効であることを示唆している。

以上の結果は、イネ紋枯病抵抗性は、解糖系からのスクロース合成・澱粉合成・フェニルプロパノイド代謝への分岐部の炭素分配制御によってもたらされていることを示し、今後この部分における制御特性についての解明が代謝工学的な紋枯病抵抗性の実現に向けたターゲットであることを示している。また、現有するイネ紋枯病抵抗性を交配育種的に活用する2種類のQTLが同定されたことは、抵抗性イネ育種に大きな可能性があることを示す結果であった。さらに、現有する抵抗性遺伝子には多収性をもたらすQTLの連鎖が示唆され、紋枯病抵抗性と多収性の両立も可能である。

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)

[雑誌論文] (計1件)

Mutuku JM, A Nose *Rhizoctonia solani* infection in two rice lines increases mRNA expression of metabolic enzyme genes in glycolytic, oxidative pentose phosphate pathways and secondary metabolism. *Tropical Agriculture and Development* 査読有 54, 2010, 119-131.

[学会発表] (計1件)

Mutuku J. M., Nose A Gene expression analysis of the mechanism of resistance to sheath blight fungus (*Rhizoctonia solani*) on selected rice lines using semi-quantitative RT-PCR, The 14th Australasian Plant Breeding Conference and 11th Society for the Advancement of Breeding Research in Asia and Oceania (SABRAO) Congress 2009年8月10~14日、オーストラリア・ケアンズ

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野瀬 昭博 (NOSE AKIHIRO)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：80045137

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：