

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008~2010

課題番号：20780081

研究課題名 (和文) イネにおけるジャスモン酸情報伝達の分子機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of molecular mechanisms of jasmonate signaling in rice

研究代表者

岡田憲典 (OKADA KAZUNORI)

東京大学・生物生産工学研究センター・助教

研究者番号：20312241

研究成果の概要 (和文)：本研究では、活性型シグナル分子であるジャスモノイルイソロイシンの欠損変異体イネを用いた解析から、イネの病害抵抗性発現にいたる JA シグナル伝達において JA-Ile が重要な働きを担うことを示すと共に、JA-Ile 依存性、非依存性の二つの経路が存在することも明らかにした。また、*OsCOI1a, b, c* の発現抑制株、過剰発現株を用いた解析から、*OsCOI1a, b, c* がイネにおいても JA シグナル伝達に必要な F-box タンパク質の COI1 として機能している可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：In this study, from the analysis of *osjar1* mutant defective in jasmonoyl isoleucine production, it was suggested that JA-Ile is an actual signal molecule responsible for the expression of rice defense reaction through JA signaling, and that there are at least two JA signaling pathways, one is dependent on JA-Ile and the other is not. Based on the analysis of *OsCOI1a, b, c* repressed or overexpressed transgenic plant, these F-box gene are shown to be involved in JA signaling in rice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,100,000	630,000	2,730,000
21年度	600,000	180,000	780,000
22年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：植物成長調節物質

1. 研究開始当初の背景

病原体に感染した植物は、病原体の細胞表層由来の物質などを感染シグナル物質 (エリシター) として細胞膜上の受容体により認識する。その後、このエリシター受容が引き金となり、JA、活性酸素、ホスファチジン酸等の二次シグナル物質の生成、エリシター応答性の転写因子群の活性化を経て、最終的に抗菌性タンパク質生産、ファイトアレキシンと総称される抗菌性二次代謝産物の生産など

様々な抵抗性反応が誘導される。これらの抵抗性発現の中でも、イネのエリシターによるファイトアレキシンの誘導的生産においては、エリシターの認識後に二次シグナル物質として JA の一過的な蓄積が必須であることが明らかとなっており、エリシター受容→ジャスモン酸生成→ファイトアレキシン生産といったシグナル伝達が示唆されている。これまでに、申請者らによって、イネのエリシター誘導性の JA 生合成遺伝子 *OsOPR7*(12 - オ

キソフィットゼン酸還元酵素遺伝子)の同定 (Tani *et al.*, 2008)、イネの JA 誘導性 bHLH 転写因子 RERJ1 の機能解析 (Kiribuchi *et al.*, 2004, 2005)、およびファイトアレキシン生合成遺伝子群 (*OsKSL4* など) のエリター応答性を含めた機能解析 (Okada *et al.*, 2007; Shimura *et al.*, 2007) 等が進められ、JA シグナルとファイトアレキシン生産を結ぶシグナル伝達経路のアウトラインが見えてきた。しかしながら、これらシグナル経路間の詳細な分子機構解明については、さらなる解析が必要な状況であった。

2. 研究の目的

植物の病害抵抗性反応を司る植物ホルモンとして知られているジャスモン酸 (JA) を介したシグナル伝達について、重要穀物の 1 つでありながら未だその大部分が未解明な、イネの JA シグナル伝達経路の分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

ジャスモン酸シグナル伝達における活性型分子の JA-Ile を生合成できない *osjar1* 変異体を用い研究を進めるため、まず、この変異体の性状解析として、変異体内における *OsJAR1* の mRNA を調べた。さらに、この株における *OsJAR1* 遺伝子の JA-Ile 生産への寄与を調べるため、ジャスモン酸類の定量実験を行った。その後、この株におけるジャスモン酸応答性を調べるため、マイクロアレイ解析を行うと共に、ファイトアレキシン生産誘導実験、いもち菌接種試験等を行い、イネの病害抵抗性発現における JA-Ile の役割を追究した。また、JA-Ile 受容体であると思われる *OsCOI1* の発現抑制株および過剰発現株を作製し、それらを用いて表現型の解析を行った。

4. 研究成果

(1) *osjar1* の性状解析として、まず、変異体における *OsJAR1* mRNA のレベルを測定した。傷害処理後 0, 0.5, 1, 2 時間の葉における発現量をノザン解析により野生型株と比較したところ、野生型株の処理後 0.5 時間で見られる発現誘導が、変異体では見られなかった。このことから、この変異体は *OsJAR1* mRNA の発現が低下した *osjar1* 遺伝子破壊株であることが明らかとなった。さらに、JA のシグナル伝達変異体で見られる JA に対する耐性試験を行ったところ、この変異体では JA 耐性が増加していることも明らかとなった (図 1)。

次にイネの JA-Ile 生合成変異体 *osjar1* の特徴づけを行うため、まず、傷害処理時のジャスモン酸類の定量を行った。傷害処理後 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 時間後の JA, JA-Ile 蓄積量を測定したところ、JA は野生型株で見られた

処理後 2 時間での蓄積量のピーク (167 ng/gFW) と比較して、変異体ではさらに高い蓄積量 (296 ng/gFW) が同様の処理時間において見とめられた。一方で、JA-Ile については、野生型株において処理後 0.5 時間で 62 ng/gFW となるのに対し、変異体では処理後の時間に関わらず 2 ng/gFW に満たない蓄積量となった (図 2)。

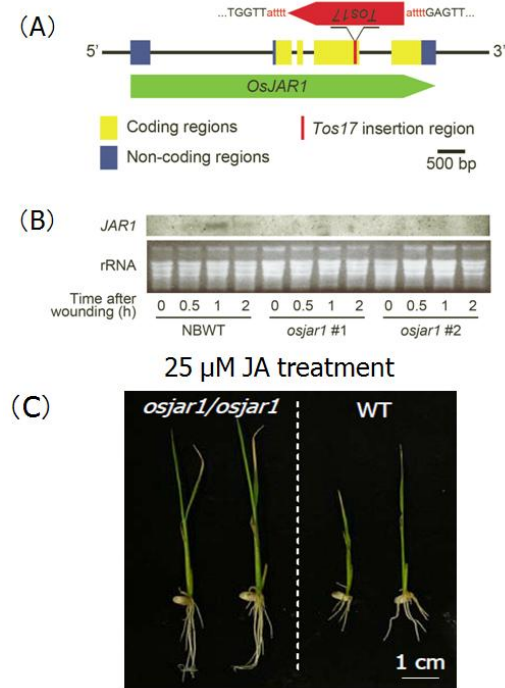


図1 *osjar1*変異体の性状解析
(A) *Tos17osjar1*変異体における *Tos17*断片の挿入位置
(B) *OsJAR1* mRNA発現量の確認(ノザン解析)
(C) *osjar1*変異体のJA耐性試験

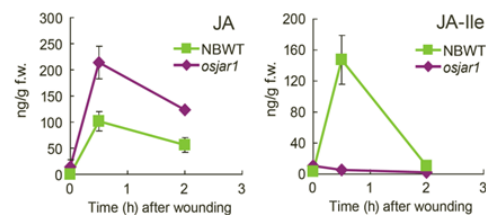


図2 *osjar1*変異体におけるジャスモン酸類の蓄積

さらに、この変異体に対し、35S プロモーターにより *OsJAR1* 遺伝子を発現させる相補実験を行ったところ、*OsJAR1* 遺伝子の発現が確認された形質転換体ラインにおいて、JA, JA-Ile 共に野生型株と同等の蓄積レベルまで回復した。これらのことからイネにおいて、*OsJAR1* 遺伝子が傷害処理時の JA-Ile の生合成に関与していることが明らかとなった。

(2) JA-Ile 欠損株 *osjar1* における JA 応答遺伝子の発現解析を行ったところ、JA 早期応答性の bHLH 転写因子 RERJ1 の JA 処理、傷害処理両方における発現誘導は顕著に低下することが判明した。さらに、JA 早期応答性遺伝子の OsJAR1 依存性を網羅的に調べるため、*osjar1* ホモ接合体と野生型株の葉を用いて 100 μ M JA 処理後 0, 0.5, 1, 2 h の経時点で RNA の調整を行い、マイクロアレイ解析に供した。WT の定常状態に対し JA 処理後 0.5, 1, 2, 4 h において発現誘導されている遺伝子数は 673, 1515, 2413, 2526 個、発現抑制されている遺伝子数は、96, 477, 1770, 2178 個であった。これら JA 応答性遺伝子数の和集合を取ると、いずれかの経時点において発現誘導されている遺伝子数は 3475 個、発現抑制されている遺伝子数は 3075 個であった。また、抽出された JA 応答性遺伝子群には、JA 早期応答性遺伝子 *RERJ1* や *OsJAZ2*, *OsJAZ3*, JA 生合成遺伝子 *OsAOS1*, *OsAOC* など、既知の JA 応答性遺伝子が含まれていることが確認された。

次に JA 処理による誘導条件下において *osjar1* 変異体で発現変動を示す遺伝子群をピックアップした。WT に対し *osjar1* 変異株で JA 処理後 0.5, 1, 2 h において発現が誘導されている遺伝子数は 571, 808, 1314 個見いだされ、逆に発現が抑制されている遺伝子は 761, 1208, 1648 個であった。ここまで得られたアレイデータを重ね合わせたところ、JA 誘導性遺伝子のうち、OsJAR1 依存的に発現誘導される遺伝子の割合は、0.5, 1, 2 h の各経時点において、52.2, 50.3, 55.9% となり、JA 誘導性遺伝子のおよそ半数が OsJAR1 依存的に発現し、残りの半数が OsJAR1 非依存的に発現誘導されることが示された。

(3) *osjar1* 変異体におけるファイトアレキシン生産を調べるため、野生型株において生産誘導が起こる 100 μ M JA 処理を変異体に対して行ったところ、ジテルペン型ファイトアレキシンとフライボノイド型ファイトアレキシンのどちらについても、野生型株において見とめたファイトアレキシンの蓄積が、*osjar1* 変異体においては見られなかった。一方で、同様の濃度の JA-Ile 処理を行うと、*osjar1* 変異体においても、野生型株同様に生産の蓄積が見られたことから、イネの JA 処理によるファイトアレキシン生産誘導において、JA-Ile がシグナル物質の活性体であることが示された (図 3)。

(4) *osjar1* 変異体の病害抵抗性を調べるため、変異体に対し非親和性もち病接種試験を行い病斑を観察したところ、変異体と野生型親株とで同様に多数の抵抗性病斑が観察されたが、その病斑サイズは *osjar1* で大きく

なる傾向が見られた。そこで、病斑の長軸方向の長さを計測し、0.2 mm ごとのサイズで分類しその存在比率をまとめたところ、野生型株と比較して *osjar1* 変異体では大きな病斑が増える傾向が見とめられ、またその結果は、T 検定により有意な差であることが明らかとなった (図 4)。

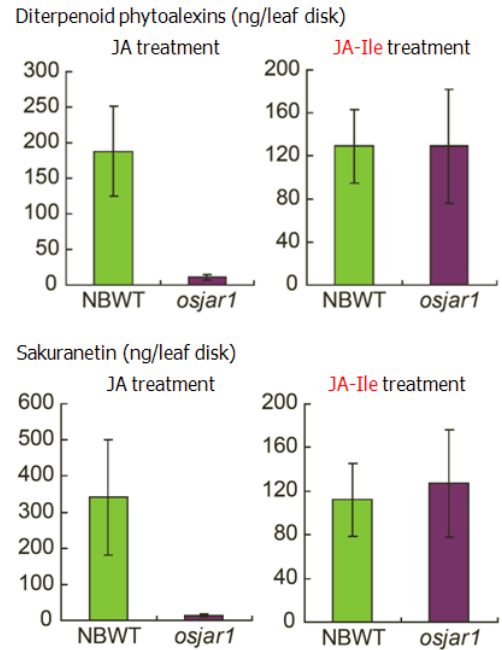


図3 *osjar1*変異体におけるジャスモン酸類の蓄積

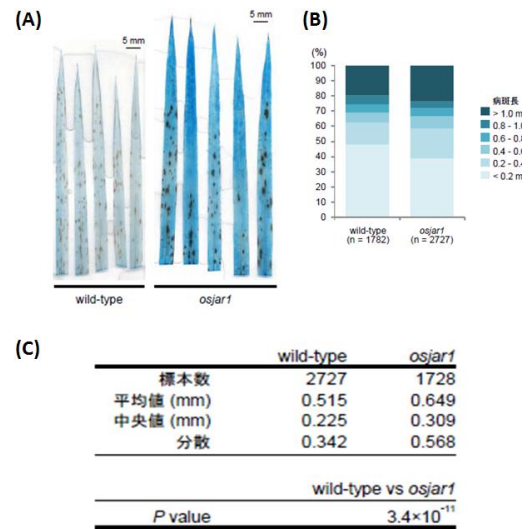


図4 *osjar1* におけるkyu77 葉身噴霧実験
(A) 各株にkyu77 を噴霧接種した際の病斑の様子
(B) 各株にkyu77 を噴霧接種した際の病斑の長軸方向の長さの割合
(C) 病斑長測定から得られた統計値とT 検定結果

(5) *OsCOI1* 遺伝子の発現を変化させた形質転換体を用いた解析を進めるため、*OsCOI1a, b, c* の3種をそれぞれ過剰発現させた株と、*OsCOI1a, b, c* 全ての発現を抑制したRNAi株の作製を行った。過剰発現については、3種の*OsCOI1*それぞれの発現量が野生型株と比較して増加した形質転換体細胞を得たことから、それらにおけるファイトアレキシン生産を調べた。その結果、3種の*OsCOI1*過剰発現体それぞれにおいて、キチンエリシター処理時のジテルペン型ファイトアレキシンの蓄積量が野生型株と比較して、顕著に増加した(図5)。また、*OsCOI1*の発現抑制株においては、相同性の極めて高い*OsCOI1a*と*OsCOI1b*の発現が抑制された二重抑制株を得た。このRNAi株の解析から、幼葉鞘が徒長

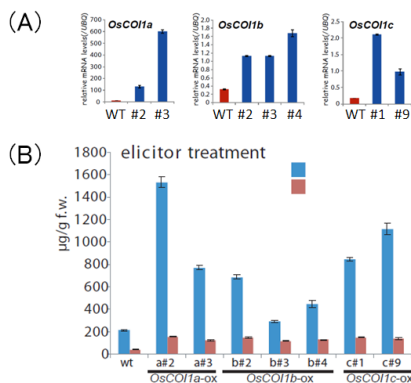


図5 *OsCOI1*過剰発現体におけるファイトアレキシン生産量
(A) *OsCOI1a, b, c*の各過剰発現体細胞における*OsCOI1*遺伝子の発現
(B) *OsCOI1a, b, c*の各過剰発現体細胞におけるキチンエリシター処理後72時間におけるファイトアレキシン生産量

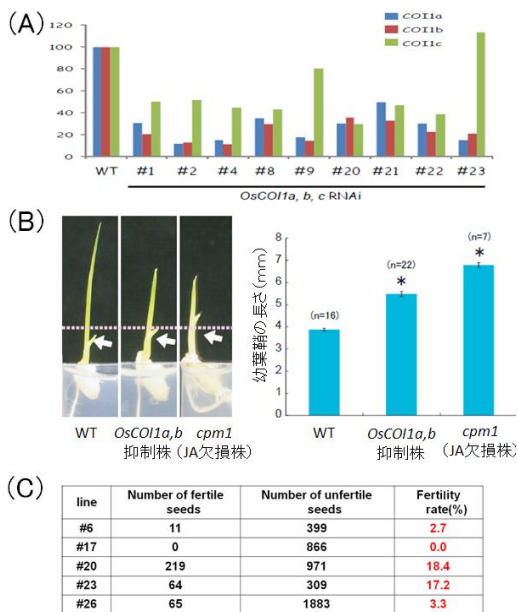


図6 *OsCOI1*発現抑制株の表現型観察
(A) *OsCOI1a, b, c* RNAi発現抑制株における各*OsCOI1*遺伝子の発現
(B) *OsCOI1a, b*二重発現抑制株における幼葉鞘の徒長
(C) *OsCOI1a, b*二重発現抑制株における稔性の低下

する表現型が見られること、また、種子の稔実率が極めて低いことが明らかとなった(図6)。これらの表現型は、JA合成変異体で報告されていることから、イネの*OsCOI1*ホモログが、他の植物と同様にJAシグナル伝達経路で機能することが示唆された。

得られた結果は、国内外の学会で発表しており、現在、論文投稿準備中の状況である。

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)

[学会発表](計 6件)

①○清水 崇史、安藤 杉尋、岡田 敦、古賀 仁一郎、芳賀 健、飯野 盛利、南 栄一、岡田 憲典、野尻 秀昭、山根 久和 「イネのファイトアレキシン生産におけるジャスモン酸類の関与」日本農芸化学会 2010.3.27 (東京)

②○岡田 憲典 「イネのテルペン生合成におけるジャスモン酸シグナルの役割」日本農芸化学会シンポジウム 2010.3.27 (東京)

③○清水崇史、岡田 敦、岡田憲典、安藤杉尋、南 栄一、芳賀 健、飯野盛利、古賀仁一郎、野尻秀昭、山根久和 「イネのファイトアレキシン生産におけるジャスモン酸類の役割」植物化学調節学会第44回大会 2009.10.29 (仙台)

④○菊池香菜子、太田光一、岡田憲典、古賀仁一郎、渋谷直人、野尻秀昭、山根久和 「イネのジャスモン酸シグナル伝達経路における*OsCOI1*の役割」日本農芸化学会 2009.3.27 (福岡)

⑤T. SHIMIZU, A. Okada, K. Okada, K. Haga, M. Iino, J. Koga, H. Nojiri, H. Yamane. 「The role of jasmonic acid (JA) in phytoalexin production in rice.」MPMI 2009.7.19 (Quebec)

⑥清水崇史、岡田 敦、軸丸裕介、芳賀健、飯野盛利、長村吉晃、渋谷直人、岡田憲典、野尻秀昭、山根久和 「イネのファイトアレキシン生産におけるジャスモン酸の機能—ジャスモン酸合成変異体 *cpm2* を用いた解析—」植物化学調節学会 43 回大会 2008.10.29-10.30 (つくば)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田憲典 (OKADA KAZUNORI)

研究者番号: 20312241