

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02953

研究課題名(和文)植物の広範な病虫害抵抗性機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of broad-spectrum disease and insect resistance in plants

研究代表者

森 昌樹 (Mori, Masaki)

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・再雇用職員

研究者番号：50192779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：イネの病害抵抗性遺伝子BSR1の高発現が、広範な病害や虫害に対し抵抗性をもたらすことを示した。またBSR1は植物の病虫害認識・応答シグナル伝達系に関与していること、及びそのシグナルの上流、下流で関わっている因子を明らかにした。さらに、もう1つのイネの病害抵抗性遺伝子BSR2も高発現すると、イネのみならずトマトやトレンニアでも抵抗性を示すこと等を明らかにし論文発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BSR1は受容体様細胞質リン酸化酵素(RLCK)に分類されるが、虫害シグナル伝達にRLCKが関与していることを示す報告は、単子葉植物では本研究が初めてである。また、RLCKの高発現が虫害抵抗性をもたらすことを示したのも、本研究が初めてである。一方BSR2は病害抵抗性のみならず花を大きくする性質もあるので、農業上有用性が期待される。本成果は農業現場でBSR1、BSR2を利用する上での基盤となる。

研究成果の概要(英文)：We showed that overexpression of the rice disease-resistance gene BSR1 confers resistance to a wide range of diseases and an insect. BSR1 is involved in the plant disease recognition and response signaling pathways, and factors upstream and downstream of the signaling pathway were identified. In addition, we showed that overexpression of BSR2, another rice disease resistance gene, confers resistance not only to rice, but also to tomato and torenia, and presented our findings in papers.

研究分野：農芸化学・植物病理学

キーワード：イネ 病害抵抗性 虫害抵抗性 ファイトアレキシン 活性酸素 花 シトクロームP450 シグナル伝達

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国内外におけるこれまでの植物免疫増強による抵抗性付与の試みは、ほとんどが *R* 遺伝子と呼ばれる抵抗性遺伝子の導入によりなされてきた。しかしながら *R* 遺伝子はごく限られたレースの病害虫にしか効果がなく、打破される可能性が高い点が問題であった。そのため農業的には様々な病害虫に対し強力で持続的な抵抗性を示す遺伝子が求められていた。

我々がイネより見出した *BSR1* (*Broad-Spectrum Resistance1*) は、高発現することで単子葉植物、双子葉植物の両方で、糸状菌病と細菌病の重要病害に強力な抵抗性を付与できる(文献

)。このように広範な抵抗性を付与する遺伝子は稀有である。また同様にイネより見出した *BSR2* についても、イネでいもち病に次いで問題になっている紋枯病等に抵抗性を示すこと、さらに双子葉植物では糸状菌病と細菌病の重要病害に抵抗性を付与することを明らかにしている(文献)。 *BSR1*、*BSR2* は前者が受容体様細胞内タンパク質リン酸化酵素(RLCK)、後者がシトクローム P450 と全く異なり、抵抗性を示す病害も特異性がやや異なる。また、両遺伝子とも機能抑制により抵抗性が弱まることから、両遺伝子による広範な抵抗性は植物本来が有する植物免疫を増強した結果得られたものである。植物免疫増強による抵抗性付与に向けて、*BSR1* 及び *BSR2* の有する広範な病原菌に対する抵抗性のメカニズムを解明する必要がある。

一方、害虫に対する効率的な抵抗性付与には、虫害応答に関わる認識系、シグナル伝達系の解析が重要であるが、同定された関連シグナル因子は限られており、認識する受容体の報告は未だない。

2. 研究の目的

本研究では、*BSR1*、*BSR2* の有する広範な病害に対する抵抗性のメカニズムの解明を目的とする。*BSR1* は病原菌由来分子(PAMPs)への応答だけでなく、昆虫由来分子(HAMP)への応答にも寄与することが示唆されている。よって、*BSR1* を介した植物の害虫認識・シグナル伝達機構を明らかにし、病害抵抗性機構との融合、統合的理解を図る。さらに、*BSR1* 高発現により害虫抵抗性の強化が可能であるかについても検証する。

3. 研究の方法

隔離温室でのいもち病菌の接種は、compatible の菌 Kyu89-246(MAFF101506, race003.0)を用い、噴霧接種により行った。隔離圃場でのいもち病抵抗性評価は、畑晩播で葉いもち病についてのみ実施し、穂いもち病については実施していない。ROS 生産はイネ懸濁培養細胞に OsPep などを処理後、発生する過酸化水素を経時的にルミノール法で(化学発光を)定量することにより評価した。*BSR1* 相互作用タンパク質候補は、タグ化 *BSR1* 発現イネよりブルダウンされたタンパク質をショットガン解析することにより同定した。モミラクトン B のクサシロキヨトウへの効果は、人口餌にモミラクトン B を混入した餌、混入していない餌を摂食後体重変化を 3 日間測定することにより評価した。

イネ以外の作物の病害抵抗性評価には、それぞれの重要病害、サトウキビで黒穂病菌、トマトで青枯病菌、斑葉細菌病菌、灰色カビ病菌、リゾクトニア病菌、トレニアで灰色カビ病菌、リゾクトニア病菌を用いた。

4. 研究成果

(1) *BSR1* による、広範な病害に対する抵抗性機構の解明

BSR1-OX/OsCERK1-KO イネを作出したところ、*BSR1-OX* と比較していもち病抵抗性が低下した。よって *BSR1* による抵抗性には *OsCERK1* が必要なことが明らかになり、論文発表を行った(Kanda

et al., 2020)。一方 *BSR1-OX/OsRbohB-KO* イネについては WT と抵抗性レベルは同等だったので、*OsRbohB* 依存性は見いだせなかった。

次にタグ化 *BSR1* とタグ化 *OsCERK1* を同時発現するイネを用いたプルダウン実験を実施したが、相互作用は認められなかった。そこで、*BSR1* 相互作用候補タンパク質を網羅的解析により同定し、さらに酵母ツーハイブリッド法による相互作用の確認実験を実施したが、相互作用は確認できなかった。

BSR1 と他の類似の RLCK についてタンパク質の安定性を比較した。プロトプラストで各タグ化タンパク質を一過的に発現させ蓄積量を比較したが、顕著な差は認められなかった。

病虫害による損傷の際生じる植物細胞由来物質 (DAMPs) としてイネでは *OsPeps* が知られており、ROS 生産を活性化することが報告されている。そこで *BSR1-KO* イネの *OsPep3&4* 処理後の ROS 生産を解析し、*BSR1* が *OsPeps* への応答にも関与していることを明らかにした (Kanda and Shinya et al., 2023)。

応用的な視点から、発現レベルが中程度の *OsUbi7* プロモーターで *BSR1* を高発現したイネの隔離圃場栽培を実施し、圃場環境 (畑晩播) でも (葉) いもち病抵抗性を示すことを明らかにした。同イネは隔離温室で、穂いもち病に対しても抵抗性を示した。

BSR1 高発現が、サトウキビ、トマト、トレニアでもそれぞれの重要病害に対し抵抗性をもたらしことを論文発表した (Maeda et al., 2023)。

(2) *BSR1* を介した植物の害虫認識機構、害虫抵抗性機構の解析

我々は多くの害虫を含む鱗翅目 (チョウ目) 昆虫であるクサシロキヨトウの吐き戻し液 (OS; HAMP) に対する応答が *BSR1-KO* で低下することから、HAMP 認識・シグナル伝達への *BSR1* の関与を明らかにしている。本研究では *BSR1-OX* イネで、鱗翅目害虫の食害を模した傷 + 吐き戻し液処理条件下で二次代謝産物、植物ホルモン、揮発性物質の定量を行った。WT に比べ *OX* イネでは 2 種のフェノールアミド及びジテルペン系ファイトアレキシンの生産が亢進していることを明らかにした。一方で発生量の減少しているモノテルペン、セスキテルペン、芳香族化合物もそれぞれ見出した。植物ホルモンは JA, SA, ABA は WT と同等だったが、エチレン発生量が WT より増大することを明らかにした。さらに、*BSR1-OX* イネの葉における物理・化学的な変化の有無について、トライコームやリグニン量に着目し、顕微鏡観察やフルオログルシノール染色を行ったが、WT と顕著な差は認められなかった。さらに、害虫抵抗性を評価するためにクサシロキヨトウをイネに接種したところ、体重変化から *BSR1-OX* イネは害虫抵抗性を示した。また、ジテルペン系ファイトアレキシンであるモミラクトン B をクサシロキヨトウに摂食させたところ、生育抑制効果を示した。*BSR1* を介したイネの害虫認識機構の概要について図 1 に示した (Kanda and Shinya et al., 2023)。

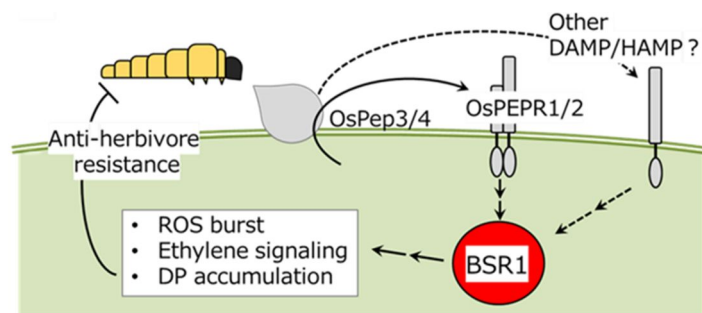


図1. *BSR1*高発現によりもたらされる害虫抵抗性

なお、虫害シグナル伝達に RLCK が関与していることを示す報告は、単子葉植物では我々の研究が初めてである。また、RLCK の高発現が虫害抵抗性をもたらしことを示したのも、本研究が初めてである。本成果は農業現場で *BSR1* を利用する上での基盤となる。

(3)BSR2 による、広範な病害に対する抵抗性機構の解析

過去に BSR2-OX イネのメタノール抽出物をイネに噴霧処理することにより、紋枯病抵抗性を誘導する活性が認められていたため、溶媒分画後の抽出物に対しシリカゲルカラムやグラフアイトカーボンカラムによる分画を行い、バイオアッセイ(紋枯病抵抗性評価)を実施した。しかしながら、残念ながら活性はどこにも認められなかった。BSR2-OX シロイヌナズナは斑葉細菌病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)に抵抗性を示すことから、同様にシロイヌナズナにおいて抽出物処理後に同菌への抵抗性を誘導するかについても調べたが、これまで誘導活性は認められていない。

そこで BSR2 高発現により生産される化合物についての情報を得るために、ベンサミアナタバコで BSR2 とコントロールタンパク質を一過的に発現し、カーボンカラムで分画後各画分の GC-MS 解析を実施した。3 反復でピーク強度に有意差のあるピークを見出したが、現在までのところ既知物質は見つかっていない。また、基質化合物が想定された際の検証実験用に、BSR2 の酵母への導入・発現を行った。

さらに BSR2 高発現トマトが 4 種の重要病害に抵抗性になること (Maeda et al., 2020)、BSR2 高発現トレニアが 2 種の重要病害に抵抗性になりかつ花も大きくなること(図 2 ; Maeda et al., 2022)に関する論文発表を行った。本成果は農業現場で BSR2 を利用する上での基盤となる。

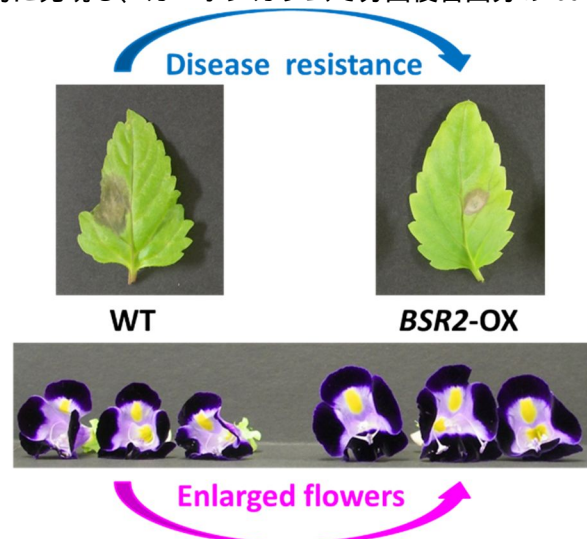


図2 BSR2高発現トレニアの表現型

<引用文献>

Dubouzet J.G. et al., (2011) Screening for resistance against *Pseudomonas syringae* in rice-FOX Arabidopsis lines identified a putative receptor-like cytoplasmic kinase gene that confers resistance to major bacterial and fungal pathogens in *Arabidopsis* and rice *Plant Biotechnology Journal* 9(4): 466-485

Maeda S, et al., (2016) Overexpression of *BSR1* confers broad-spectrum resistance against two bacterial diseases and two major fungal diseases in rice *Breeding Science* 66(3):396-406

Maeda S, et al., (2019) The rice CYP78A gene BSR2 confers resistance to *Rhizoctonia solani* and affects seed size and growth in *Arabidopsis* and rice *Scientific Reports* 9(1): 587.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Momotaka Uchida, Takahiro Konishi, Ayaka Fujigasaki, Kotetsu Kita, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka, Yasukazu Kanda, Masaki Mori, Takayuki Arazoe and Takashi Kamakura.	4. 巻 -
2. 論文標題 Dysfunctional Pro1 leads to female sterility in rice blast fungi	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.107020.	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 Yasukazu Kanda, Tomonori Shinya, Satoru Maeda, Kadis Mujiono, Yuko Hojo, Keisuke Tomita, Kazunori Okada, Takashi Kamakura, Ivan Galis, Masaki Mori	4. 巻 24
2. 論文標題 BSR1, a Rice Receptor-like Cytoplasmic Kinase, Positively Regulates Defense Responses to Herbivory	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10395 ~ 10395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms241210395	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 Maeda Satoru, Ackley Wataru, Yokotani Naoki, Sasaki Katsutomo, Ohtsubo Norihiro, Oda Kenji, Mori Masaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Enhanced Resistance to Fungal and Bacterial Diseases Due to Overexpression of BSR1, a Rice RLCK, in Sugarcane, Tomato, and Torenia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3644 ~ 3644
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24043644	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 Maeda Satoru, Sasaki Katsutomo, Kaku Hisatoshi, Kanda Yasukazu, Ohtsubo Norihiro, Mori Masaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Overexpression of Rice BSR2 Confers Disease Resistance and Induces Enlarged Flowers in Torenia fournieri Lind	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4735 ~ 4735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23094735	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 Desmedt Willem, Kudjordjie Enoch Narh, Chavan Satish Namdeo, Zhang Juan, Li Riqing, Yang Bing, Nicolaisen Mogens, Mori Masaki, Peters Reuben J., Vanholme Bartel, Vesterg?rd Mette, Kyndt Tina	4. 巻 -
2. 論文標題 Rice diterpenoid phytoalexins are involved in defence against parasitic nematodes and shape rhizosphere nematode communities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18152	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

1. 著者名 Kanda Yasukazu, Nishizawa Yoko, Kamakura Takashi, Mori Masaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Overexpressed BSR1-Mediated Enhancement of Disease Resistance Depends on the MAMP-Recognition System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5397 ~ 5397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155397	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 Maeda Satoru, Yokotani Naoki, Oda Kenji, Mori Masaki	4. 巻 39
2. 論文標題 Enhanced resistance to fungal and bacterial diseases in tomato and Arabidopsis expressing BSR2 from rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1493 ~ 1503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00299-020-02578-0	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12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masaki Mori
2. 発表標題 Conferring broad-spectrum disease resistance by potentiating plant signal transduction
3. 学会等名 The 4th Wuhan International Symposium on Biological Signal Transduction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神田 恭和 1, 2, 新屋 友規 3, 前田 哲 1, Mujiono Kadis 3, 北條優子 3, 富田啓介 4, 岡田 憲典 4, 鎌倉 高志 2, Galis Ivan 3, 森 昌樹 1, 2
2. 発表標題 イネ複合病害抵抗性遺伝子BSR1の過剰発現は植食性昆虫に対するファイトアレキシン蓄積および抵抗性を向上させる
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神田 恭和, 新屋友規、前田哲、Galis Ivan、鎌倉高志、森 昌樹
2. 発表標題 イネ複合病害抵抗性遺伝子BSR1は食害昆虫に対する防御応答にも関与する
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神田 恭和 , 井上晴彦 , 西澤 洋子, 鎌倉 高志, 森 昌樹
2. 発表標題 BSR1高発現により生じる病害抵抗性の増強にOsCERK1が必要である
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田 恭和 , 井上晴彦 , 西澤 洋子, 鎌倉 高志, 森 昌樹
2. 発表標題 イネプロテインキナーゼBSR1の過剰発現が付与する複合病害抵抗性はMAMP受容体OsCERK1を介している
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊藤晋作、森昌樹、浅見忠男	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 8
3. 書名 バイオスティミュラントハンドブック（「根圏のストレス応答に関わる植物ホルモン」の項目を担当）	

〔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
研究分担者	Ivan Galis (Galis Ivan) (90360502)	岡山大学・資源植物科学研究所・教授 (15301)	
研究分担者	野村 崇人 (Nomura Takahito) (60373346)	宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授 (12201)	
研究分担者	井上 晴彦 (Inoue Haruhiko) (10435612)	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・上級研究員 (82111)	

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
---------	---------