

機関番号：15201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780037

研究課題名 (和文) トリプタミン経路を利用したイネいもち病菌エリシターの探索

研究課題名 (英文) Search for elicitor of *Magnaporthe oryzae* using tryptamine pathway

研究代表者

上野 誠 (UENO MAKOTO)

島根大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：00403460

研究成果の概要 (和文)：イネいもち病菌に対するレース特異的なイネの抵抗性発現におけるトリプタミン経路の役割とそれに関わるイネいもち病菌のレース特異的エリシターの分離を試みた。その結果、変異型イネ及び野生型イネへのイネいもち病菌の接種によりトリプタミン経路を介した抵抗性反応が誘導された。また、イネいもち病菌から得た孢子発芽液中にエリシター活性を示す物質が存在し、その因子は熱安定な分子量1万以上のマンノースを含む物質であることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we investigated that tryptamine pathway plays an important role in race-specific resistance of rice to *M. oryzae*. Tryptamine pathway-dependent induction of rice blast race specific resistance was observed by *M. oryzae* inoculation. Tryptamine pathway mediated phenomena such as tryptamine accumulation, increase tryptophan decarboxylase and monoamine oxidase activities were also observed in rice treated with spore germination fluid (SGF) of incompatible *M. oryzae* strain, but not compatible *M. oryzae* strain. The factor was an oligosaccharide (molecular weight >10000) mainly composed of mannose, which is consistent with chemical structure of the factors proposed by some chemical treatments of SGF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：病害抵抗性

1. 研究開始当初の背景

植物疾病の特異性は、品種・レース間における病原菌の非病原性遺伝子と、それに対する植物の抵抗性遺伝子により支配されている「遺伝子対遺伝子説」で説明されている。イネいもち病におけるイネの抵抗性及び感受性も品種とレースの組み合わせにより決定されることが知られているが、本病ではそ

れを説明できるような物質の同定には至っていない。

近年、感染時の細胞死誘導機構を遺伝子レベルで解析する手段として病原体感染を伴わずに自然発生的に病斑類似の斑点を生じる擬似病斑形成変異体 (LMM, Lesion Mimic Mutant) が用いられるようになり、シロイヌナズナ、トウモロコシなどでは細胞死の発現

制御に関わる遺伝子のクローニングとその解析が行われ、多くの知見が得られている。LMM には葉身に小斑点を生ずる開始型と大型の斑点を生ずる進行型の2つのタイプが知られている。

本研究には進行型擬似病斑形成変異イネであるイネ品種関口朝日を用いる。この変異イネは、病原体の感染を伴わずに、関口病斑と呼ばれる大型不整形の特異な病斑を形成し、関口病斑内にはトリプタミンと呼ばれる植物ホルモンであるインドール酢酸の中間産物が蓄積されると共に、DNA ラダーを伴ったアポトーシス様の反応が誘導される。この、SL の形成には単一の劣性遺伝子 *spl1* が関与していることが知られており、その遺伝子の同定には至っていないが、*SPL1* から *spl1* への変異がトリプタミン蓄積、SL 形成アポトーシス様反応の制御に関与していると考えられている。一方、関口病斑形成前の幼齢期の変異型イネに親和性いもち病菌レースを接種するといもち病斑が多数形成されるが、非親和性いもち病菌レースを接種すると野生型イネで形成される褐点病斑とは異なる関口病斑が形成され、病斑内での孢子形成や菌の侵入菌糸の伸展もいずれも認められない。このことは、関口病斑形成が品種・レース間における遺伝子対遺伝子説に基づいたレース特異的な抵抗反応の産物であることを示している。

本研究は、これまで非親和性いもち病菌レース感染で形成された小さな褐点病斑で起こる抵抗性反応を進行型擬似病斑形成変異イネが形成する大型の抵抗性病斑である関口病斑を用いて解明し、さらに関口病斑をマーカーにしてこれまで明らかにされていないレース特異的なエリシターを探索しようとしている点に学術的な特色・独創性があると考えられる。また、この研究を遂行することによりイネの重要病害であるイネいもち病菌の特異的なエリシターが解明でき、得られた基礎植物病理学の成果は、抵抗性品種の育成、有効防除剤の開発による病害防除等の植物保護技術の開発戦略にも利用できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では進行型擬似病斑形成変異イネである関口朝日を用いて、これまで明らかにしたトリプタミン経路を介した関口病斑形成機構が非親和性イネいもち病菌の非親和性レース特異的に誘導されることを確認し、非親和性イネいもち病菌が感染初期に放出する物質を孢子発芽液中から探索する。さらに、

野生型イネにおける抵抗性発現におけるトリプタミン経路の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

2009 年度は、進行型擬似病斑形成変異イネ（品種：関口朝日）を用いて、非親和性イネいもち病菌レース特異的に誘導される大型・不整形の関口病斑形成にトリプタミン経路が関与するか否かを調査し、レース特異的なイネいもち病に対する抵抗性におけるトリプタミン経路の重要性を明らかにするために、非親和性イネいもち病菌レースと親和性イネいもち病菌レースを接種した関口朝日のイネ葉でのトリプタミン蓄積、トリプタミン関連酵素活性（トリプタミン脱炭酸酵素活性、モノアミン酸化酵素活性、カタラーゼ活性）、過酸化水素生成及びアポトーシス反応（DNA 崩壊）について調査すると共に、非親和性イネいもち病菌レースと親和性イネいもち病菌レースのイネいもち病菌から調整した孢子発芽液によってもトリプタミン蓄積、トリプタミン関連酵素活性及びアポトーシス反応がレース特異的に誘導されるかを調査した。

2010 年度は、関口朝日を用いて関口病斑形成及びトリプタミン関連酵素の活性をマーカーにしてイネいもち病菌の生産する抵抗性誘導に関わるエリシターの探索と分離について調査すると共に、野生型イネ（品種：朝日）を用いて、イネいもち病菌に対する抵抗性におけるトリプタミン経路の関与について、トリプタミン蓄積、トリプタミン関連酵素活性（トリプタミン脱炭酸酵素活性、モノアミン酸化酵素活性、カタラーゼ活性）、過酸化水素生成及びアポトーシス反応（DNA 崩壊）を調査した。

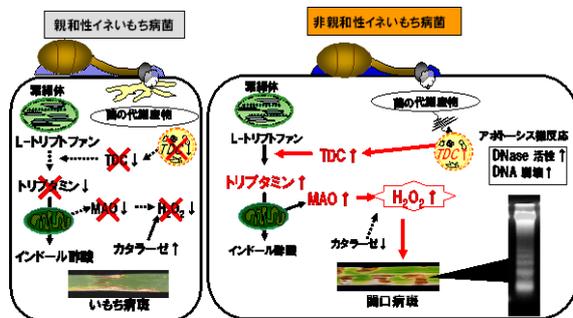
4. 研究成果

2009 年度は関口朝日におけるイネいもち病菌に対する抵抗性誘導にはトリプタミン経路が関与しており、イネいもち病菌が感染時に放出する物質を関口朝日が認識することにより抵抗性を誘導していることを示唆した。

まず、関口朝日に親和性又は非親和性イネいもち病菌レースを接種して、イネ葉におけるトリプタミン蓄積、トリプタミン関連酵素活性（トリプタミン脱炭酸酵素活性、モノアミン酸化酵素活性、カタラーゼ活性）、過酸化水素生成及びアポトーシス反応（DNA 崩壊）を調査した。その結果、非親和性イネいもち病菌レースを接種したイネ葉で親和性イネいもち病菌レースよりも高いトリプタミン蓄積、トリプタミン脱炭酸酵素活性及びモノアミン酸化酵素活性がイネいもち病菌の侵入前から増加することが明らかになった。ま

た、非親和性イネいもち病菌レース接種ではイネ葉でのカタラーゼ活性の低下が原因と考えられる過酸化水素の生成が認められ、その生成された過酸化水素によりアポトーシス様の DNA 崩壊が観察された。これらの結果は関口朝日での関口病斑形成がレース特異的に起こり、抵抗性のマーカーとして関口病斑形成、トリプタミン蓄積及びトリプタミン関連酵素活性を利用できる可能性を示した。

そこで次に親和性又は非親和性イネいもち病菌レースの孢子懸濁液をバット内で発芽させ 1/100 に濃縮した孢子発芽液 (SGF) を用いて、関口病斑形成、トリプタミン蓄積及びトリプタミン関連酵素活性をマーカーにしてイネの抵抗性誘導に関わるエリシターの探索を行った。その結果、非親和性イネいもち病菌レースの SGF 処理で親和性のそれよりも関口病斑形成及びトリプタミン蓄積が高まり、それに伴ってトリプタミン脱炭酸酵素活性とモノアミン酸化酵素活性も増加した。さらに、非親和性イネいもち病菌レースの SGF 処理では過酸化水素生成によるアポトーシス様の DNA 崩壊も観察された。これらの結果は、関口朝日ではイネいもち病菌に対する抵抗性にトリプタミンが深く関与しており、イネが菌側の因子を認識することでトリプタミン経路を活性化させることと示した。さらに生成されたトリプタミンがモノアミン酸化酵素により酸化され生成された過酸化水素によりアポトーシス様の DNA 崩壊を誘導するために半活物寄生菌であるイネいもち病菌の感染は阻害されたと示唆された。



2010 年度は関口朝日にトリプタミン経路を介した抵抗性を誘導する非親和性イネいもち病菌レース SGF 中に存在するエリシターの性質と野生型イネである朝日における抵抗性誘導でのトリプタミンの関与について示唆した。

まず、非親和性イネいもち病菌レース SGF 中に存在するエリシターの性状解析を行うために SGF を酢酸エチルによる分配抽出を行った。その結果、酢酸エチルに不溶部にエリシター活性が認められた。次に透析膜を用いて分子量 1 万以上及び 1 万以下に分離して活性を調査した。その結果、分子量 1 万以上にエリシター活性が認められた。また、熱処理

(熱安定性) 及び過ヨウ素酸処理 (糖分解処理) も行った。その結果、121°C の熱処理によっても SGF 中のエリシター活性は低下しなかったが、過ヨウ素酸処理によりその活性は著しく低下した。そこで糖分解酵素であるガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ及びマンノシダーゼを SGF に処理してエリシター活性を調査した。その結果、ガラクトシダーゼ及びグルコシダーゼ処理した SGF によるエリシター活性の低下は認められなかった、一方、マンノシダーゼを処理した SGF ではエリシター活性が著しく低下した。これらの結果は、非親和性イネいもち病菌レースの SGF 中に含まれるエリシター活性を示す物質が、熱安定な分子量 1 万以上の物質であり、マンノースを含む物質であることを示した。

次に変異イネである関口朝日で認められるトリプタミン経路を介した抵抗性が野生型イネ (品種: 朝日) においても認められるかを調査した。

まず、朝日のイネ葉にイネいもち病菌を接種し、トリプタミン蓄積及びトリプタミン関連酵素活性を調査した。その結果、朝日においてもイネいもち病菌に対する抵抗性発現時において一過的にトリプタミン蓄積及びトリプタミン関連酵素活性が感受性時と比較して増加した。これらの結果は、野生型イネである朝日におけるイネいもち病菌に対する抵抗性にもトリプタミン経路が関与していることを示した。

今回の研究により、イネにおけるイネいもち病に対する抵抗性にはトリプタミン経路が深く関与していることが明らかになった。さらにその誘導には菌側の熱安定な分子量 1 万以上のマンノースを含む物質 (エリシター) が関与していることが明らかになった。この 2 点についてはこれまでに報告がない大きな成果であると考えられる。また、これまでに野生型イネで認められる抵抗性反応である褐点形成のメカニズムは明らかにされていない。今回の研究で、トリプタミンを処理した野生型イネでは褐点が誘導された。これは野生型イネにおける褐点形成にはトリプタミンが関与している可能性を示した。さらに、トリプタミンはファイトアレキシンを誘導する可能性も示唆されており、研究を進展させることによりイネの抵抗性誘導機構を明らかにできると考えられる。

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 4 件)

① Ueno, M., Kumura, Y., Ueda, K., Kihara, J., Arase, S. Indole-derivatives enhance resistance against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*.

Journal of General Plant Pathology. (in press).

(査読有り) (2011)

②荒瀬榮, 上野 誠, 木原淳一. 赤色光照射による病害抵抗性誘導と病害防除への応用. 64:15-18. (2010). (査読無し)

③Rahman, MZ., Kanam, H., Ueno, M., Kihara, J., Honda, Y. and Arase, S. Suppression of *Corynespora* leaf spot of cucumber caused by *Corynespora cassicola* by red light irradiation. 158:378-381. (2010). (査読有り)

④Ueno, M., Kumura, Y., Kihara, J. and Arase, S. Role of tryptamine accumulation and DNA fragmentation in induced resistance of Sekiguchi lesion mutant of rice infected with *Bipolaris oryzae*. 14:3-8. (2009). (査読無し)

[学会発表] (計3件)

①上野 誠, 久村由美子, 上田加奈, 灰田亜海, 荒瀬榮, 木原淳一, 吉清恵介. 関口病斑形成変異イネに光依存的に蓄積するトリプトミン関連物質について. 平成22年度日本植物病理学会大会. 2010年4月18日. 京都国際会議場 (京都府).

②Ueno, M., Kumura, Y., Ueda, K., Imaoka, A., Kihara J., Arase, S., Oshima, A., Yoshikiyo, K. Role of tryptamine pathway in light-dependent resistance of rice to *Magnaporthe grisea* infection. 2009 KSPP Fall Meeting and the 1st Japan-Korea Joint Symposium. 2009, October, 29. Jeju (Korea).

③上野 誠, 久村由美子, 上田加奈, 木原淳一, 荒瀬榮, 吉清恵介, 大島朗伸. 関口病斑形成変異イネの光誘導抵抗性に関与するイネいもち病菌の因子の探索. 平成21年度日本植物病理学会関西支部会. 2009年10月18日. 神戸大学 (兵庫県).

[図書] (計1件)

①Islam, S. Z., Rahman, M. Z., Khanam, N. N., Ueno, M., Kihara, J., Honda, Y., Arase, S. Current Topics in Plant Biology. Research Trend. (2011). (印刷中).

[その他]

ホームページ

<http://www.ipc.shimane-u.ac.jp/blast/index.html>

受賞

日本植物病理学会学術奨励賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 誠 (Ueno Makoto)

島根大学・生物資源科学部・助教

研究者番号: 00403460

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし