

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14850

研究課題名（和文）植物の花色決定因子による新奇耐病性機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of flower color determinant gene-mediated disease resistance in plants

研究代表者

Dominguez John・Jewish (Dominguez, John Jewish)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究員

研究者番号：60881555

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、フラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子 (F3'5'H) の機能解析によって、農業現場で重要な形質とされている花色および耐病性の関係性を調べた。リンドウでは、F3'5'Hの機能を欠損させると花色が青からピンクに変わると共に、複数の病原糸状菌に対する耐性が低下することがわかった。しかしながら、同じ病原菌を花に接種したところ、耐病性の変化は見られなかったため、F3'5'Hの耐病性への機能は葉に限られることが示唆された。オミクス解析、生化学的解析、および逆遺伝学的解析の結果から、F3'5'Hが花卉での色素合成における既知の機能とは別に、葉の耐病性に関わる新規機能を持つことが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花卉作物において、花に関わる形質と耐病性はどちらも農業上の重要な形質でありながら、その詳細な関係性は明らかになっていない。特に、F3'5'H遺伝子は青色決定因子として知られており、ピンク花品種の開発などに重要な遺伝子である。一方で、花の色を変化させた際に植物にどのような影響があるのかについては、研究報告が少ない。本研究では、これまで知られている機能とは別に、F3'5'Hが葉の耐病性に関わっていることを証明し、花色と耐病性の関係性を踏まえた園芸作物育種戦略構築のための有用な基礎情報を提供するだけでなく、園芸学、植物病理学、植物生理学などの分野においても先導的な知見を得たと考えている。

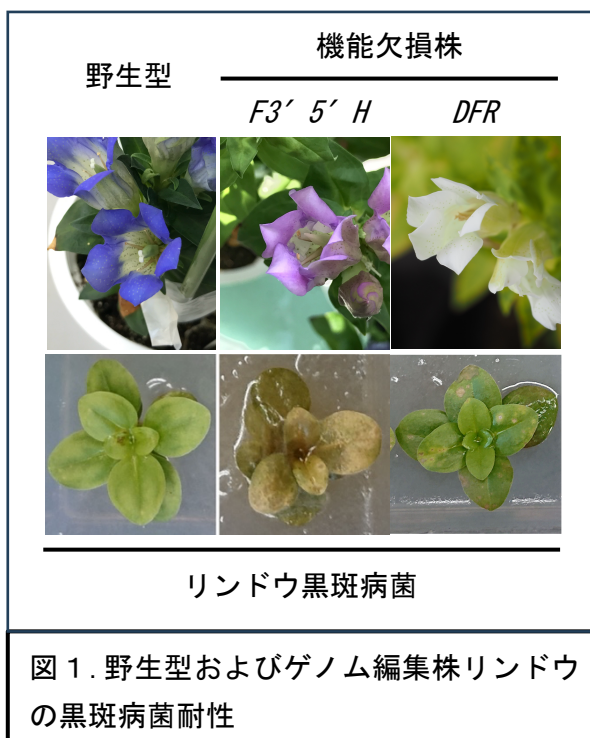
研究成果の概要（英文）：In this study, the relationship between two important agronomic traits, flower color and disease resistance, has been investigated through the functional analysis of flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) gene. In gentian, loss-of-function mutation of F3'5'H resulted not only to a change in flower color from blue to pink, but also to an increased susceptibility of leaves against fungal pathogens. This change of disease resistance was not observed in petals suggesting that this function of F3'5'H is restricted only to the leaves. Transcriptome analysis, biochemical tests, reverse genetic approach, and measurement of known F3'5'H products suggest that this disease-related function of F3'5'H is independent with its previously known role in flavonoid biosynthesis and thus present a novel function that remains to be elucidated. Overall, this study present compelling evidence that flower color and foliar disease resistance could be linked through the F3'5'H gene.

研究分野：園芸科学

キーワード：リンドウ 耐病性 花色 糸状菌病 フラボノイド-3',5'-水酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

フラボノイド-3', 5'-水酸化酵素 ($F3' 5' H$) は、花および果実の青色色素の生合成に重要な酵素である。花卉作物のリンドウなどでは、 $F3' 5' H$ の機能を欠損することで青花品種からピンク花品種が開発されている。研究代表者らは、リンドウの $F3' 5' H$ が機能欠損すると、植物の糸状菌耐性が弱くなることを発見した。CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子破壊により、 $F3' 5' H$ はリンドウの防御応答に留まらず、*Curtobacterium* sp. という抗真菌活性を持つ細菌をはじめとした葉の微生物叢の形成に影響を及ぼす可能性を見出した。興味深いことに、ジヒドロフラボノール4-還元酵素 (DFR) の機能欠損株



では、 $F3' 5' H$ より下流の色素合成経路が動かずに白花リンドウになるが、リンドウ黒斑病菌耐性への影響はほとんど認められなかった (図1)。このことから、色素合成経路の活性化とは独立した $F3' 5' H$ の新規機能が植物の耐病性を決定している可能性が示唆された。

研究の目的

本研究は、花色決定因子として知られる $F3' 5' H$ が介在する植物防御応答および微生物叢の機能を解析することで、まだ詳細が明らかでない植物の花色素決定機構と耐病性機構の関連性を解明し、植物耐病性機構の未知の側面を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の方法

(1) 既知植物防御応答への $F3' 5' H$ 機能欠損の影響評価

野生型および $F3' 5' H$ 編集体のリンドウを利用し、病原体感染時および非感染時における継時的な活性酸素の測定、RNA-seq によるトランスクリプトームの比較解析を行い、 $F3' 5' H$ 機能欠損の影響を受ける防御機構などを同定する。同時に、SA、JA 処理時のリンドウにおける遺伝子発現変動との比較、および LC-MS による SA、JA、その他各種植物ホルモンの定量を行い、 $F3' 5' H$ 機能欠損の影響を受けるシグナル経路とその作用過程 (ホルモン生合成の上流か下流かなど) に関する情報を得る。また、カロース沈着や Pathogenesis-related (PR) 遺伝子の発現といった指標を用いて、 $F3' 5' H$ 機能欠損株の防御応答を生化学的なアプローチで評価する。

(2) $F3' 5' H$ 機能が微生物叢への影響の評価

Curtobacterium sp. をはじめとした単離菌を対象に、 $F3' 5' H$ 機能欠損が菌数に与え

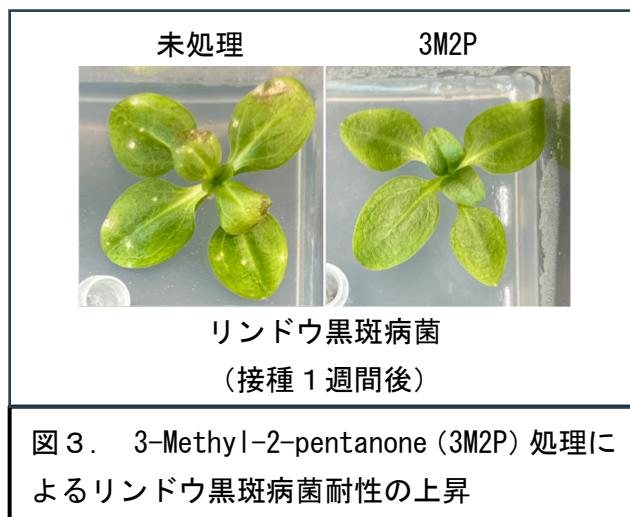
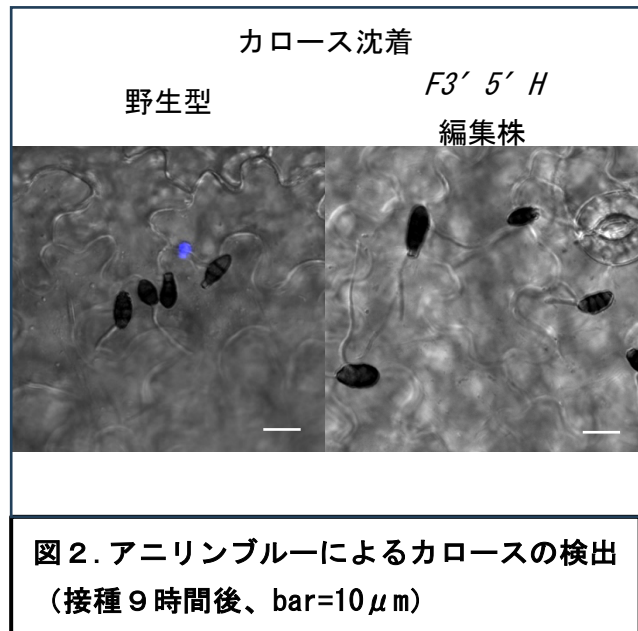
る影響、植物との相互作用（局在、定着、病原性、生長促進活性、植物免疫活性など）、およびリンドウ黒斑病菌感染への影響を調べる。また、*Curtobacterium* 属菌で見出された揮発性抗菌物質を GC-MS により同定する。

3. 研究成果

リンドウはつの $F3' 5' H$ 遺伝子を持っており (Nishihara et al., 2011)、そのうち一つは花卉の色素合成に関わる $F3' 5' H1$ であり、もう一つは機能が不明で葉で多く発現されている $F3' 5' H2$ である。本研究で利用した「アルビレオ」品種はハイブリッドであり、四つの $F3' 5' H$ 遺伝子を持っている。葉の耐病性に関わる遺伝子を同定するために、糸状菌耐性が低下した $F3' 5' H$ 機能欠損株の 3 株を対象に、遺伝子型および表現型の関連性を調べた。その結果、 $F3' 5' H2$ が壊れていないにも関わらず糸状菌耐性が低下していたため、葉の耐病性に関わる遺伝子は $F3' 5' H1$ であることが示唆された。

$F3' 5' H$ 欠損株の防御応答を調べたところ、野生型に比べて $F3' 5' H$ 欠損株は菌の侵入を防ぐカロースの沈着率が低く、菌の侵入を妨げる防御機構が阻害されていることが示唆された (図 2)。さらに、葉の RNA-seq の Gene Ontology 解析を行い、リンドウの $F3' 5' H$ の機能欠損が植物の自然免疫に影響を与えることが示唆された。興味深いことに、同じ病原菌を花に接種したところ、耐病性の変化は見られなかったため、 $F3' 5' H$ の耐病性への機能は葉に限られることがわかった。これに加え、C 末端に緑色蛍光タンパク質を結合させた $F3' 5' H$ をリンドウのプロトプラストで一過的に発現させたところ、葉肉細胞および花卉の色素細胞での局在が異なっており、局在と関連する機能も異なることが考えられる。これらの結果は、 $F3' 5' H$ が花卉での色素合成における既知の機能とは別に、葉の耐病性に関わる新規機能を持つことを支持するものである。

微生物叢の解析については、*Curtobacterium* 属菌の菌数の変動は他の花色決定因子 (*DFR*, *F3H* 等) を含む様々な形質転換体で観察され、 $F3' 5' H$ 特異的作用を支持する結果を得るには至らなかった。しかし、本研究を通して独自に単離した *Curtobacterium* 属菌をはじめとするいくつかの細菌を対象に、植物免疫



誘導活性を持つ揮発性有機化合物 (VOCs) の同定を GC-MS で行い、3-Methyl-2-pentanone をはじめとした活性物質の同定に成功した (図 3)。

<引用文献>

① Nishihara et al., A single-base substitution suppresses flower color mutation caused by a novel miniature inverted-repeat transposable element in gentian, *Molecular Genetics and Genomics*, 286(5-6), 371-382.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Dominguez John Jewish A., Iwai Mari, Fujisaki Sayaka, Abe Yoshiko, Iwadate Yasuya, Fujisaki Koki	4. 巻 -
2. 論文標題 Establishment of an infection system for gentian (<i>Gentiana</i> spp.) sclerotial flower blight disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Phytopathology	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） 10.1094/phyto-04-24-0122-sc	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 該当する

1. 著者名 Dominguez, John Jewish A.	4. 巻 108(8)
2. 論文標題 見た目を超えた花色を巡る研究	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 生物工学会誌	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） なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Dominguez, J.J.A., Tateda, C., Iwai, M., Abe, Y., Obara K., Nishihara, M., Abe, A., Matsuura, T., Hirayama, T., Fujisaki, K.
2. 発表標題 青色花色決定因子F3 5 H によるリンドウの糸状菌耐性機構の解析
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Dominguez, J.J.A., Iwai, M., Abe, Y., Fujisaki, K.
2. 発表標題 培養リンドウを用いた炭疽病菌（Colletotrichum acutatum）の発病機構の解析
3. 学会等名 第57回日本植物病理学会東北支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 John Jewish A. Dominguez, 小澤 理香, 岩井 摩莉, 阿部 善子, 有村 源一郎, 西原 昌宏, 藤崎 恒喜
2. 発表標題 リンドウ共存細菌を利用した糸状菌病制御技術の開発
3. 学会等名 第32回植物微生物研究会研究交流会(令和5年)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 John Jewish A. Dominguez, 小澤 理香, 岩井 摩莉, 阿部 善子, 有村 源一郎, 西原 昌宏, 藤崎 恒喜
2. 発表標題 リンドウ共存細菌由来揮発性有機化合物(VOC)による病害制御機構の解析
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会
4. 発表年 2024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