

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010年4月1日～2013年3月31日

課題番号：22770048

研究課題名（和文） いもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pb1* の抵抗性発現機構の解析研究課題名（英文） The activation mechanism of field resistance gene, *Pb1*

研究代表者

井上晴彦（HARUHIKO INOUE）

独立行政法人農業生物資源研究所・耐病性作物研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：10435612

研究成果の概要（和文）：穂いもち病圃場抵抗性 *Pb1* は、すでに育種利用されているいもち病圃場抵抗性遺伝子であり、真性抵抗性に関わる R タンパク質と類似の構造を有する。本研究では、*Pb1* によるシグナル伝達が、WRKY45 への直接的なタンパク質間相互作用を介していることを明らかにした。また、このタンパク質間相互作用により WRKY45 のタンパク質が安定化し、その結果防御応答が亢進することが示された。

研究成果の概要（英文）：*Panicle blast1 (Pb1)* is useful gene for rice breeding, and its protein structure is similar to that of true resistance proteins. In this study, we identified that *Pb1* directly interacts with WRKY45 transcription factor and the interaction is required for the resistance. The interaction stabilizes WRKY45 protein, and enhances the defense activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：植物分子生物・生理学

科研費の分科・細目：

キーワード：抵抗性遺伝子、いもち病

1. 研究開始当初の背景

いもち病は全国的に発生する稲の最重要病害である。*Pb1* は、すでに育種利用されているいもち病圃場抵抗性遺伝子であり、真性抵抗性に関わる R タンパク質と類似の構造を有する(Fujii et al 1999, Hayashi et al 2010)。しかしながら、*Pb1* による抵抗性は、真性抵抗性とは異なり安定で菌系特異性も認められない。このような抵抗性の特性を決定する要因を分子レベルで明らか

にし、真性抵抗性との違いを明らかにすることは、*Pb1* 遺伝子の育種利用に重要である。多年に渡る QTL マッピングによる *Pb1* 遺伝子単離によって、今まで未知であった圃場抵抗性メカニズム解析が可能となった。

2. 研究の目的

Pb1 による抵抗性の特性を規定する要因の一つとして、感染認識から抵抗性発現に至るシグナル伝達が重要と考えられる。酵母を用いたタンパク質間相互作用解析から、

Pb1 と WRKY 転写因子と相互作用することが示唆されていた。本研究では、Pb1 から WRKY へのタンパク質間相互作用を介したシグナル伝達の検証、およびその分子機構の詳細な解明によって、Pb1 による抵抗性の安定性の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)Pb1-WRKY45 のタンパク質間相互作用の検証

両者のタンパク質が相互作用するか検証するために、Pb1 およびイネの WRKY 転写因子の部分長および全長領域を用いた。 *in vitro* の実験として Yeast two hybrid、GST-pull down 法、免疫沈降法、および *in vivo* の実験として Split Luciferase assay 法を行った。

(2)いもち病接種による Pb1 抵抗性発現

日本晴および Pb1 過剰発現体にいもち病を接種し、経時的にタンパク質および RNA を抽出し、その発現解析を行った。

(3)Pb1 抵抗性の WRKY45 への依存性の解析

Pb1 遺伝子を有するイネ系統に、WRKY45 遺伝子の発現を抑制する形質転換植物を作成した。この形質転換植物を用いて、穂いもち病抵抗性を検定し、Pb1 抵抗性が WRKY45 に依存するか否かを検証した。また、Pb1-WRKY45 相互作用能が低下した Pb1 変異体 (Pb1-Quad) を過剰発現する形質転換イネを同様に作成し、いもち病抵抗性を評価した。

(4)Pb1 による WRKY45 活性化機構の解析

Pb1 による WRKY45 への活性化機構を分子レベルで明らかにするために、Pb1 と WRKY45 をイネプロトプラスト内で共発現させることによって、WRKY45 の挙動を解析した。また、共発現による WRKY45 の転写活性化能を解析した。

4. 研究成果

(1)Pb1 は WRKY45 と相互作用する

Pb1 の Coiled coil (CC) ドメインを用いて Yeast two hybrid 法で、イネの数種の WRKY 転写因子との相互作用を検証した。その結果、Pb1 の CC ドメインは、WRKY45 と相互作用することが明らかになった。さらに、大腸菌で発現させた Pb1-CC ドメインと、小麦胚芽抽出液で発現させた WRKY45 の相互作用を GST-Pull down 法により確認した。Pb1-CC ドメインのうち WRKY45 と相互作用に必要なアミノ酸を予測して、アミノ酸置換を導入し WRKY45 との相互作用を調べた。その結果、4 つのアミノ酸置換を導入した Pb1-Quad において、相互作用が低下していた。Pb1 および Pb1-Quad の全長タンパク質を、小麦胚芽抽出

液を用いて合成し、全長の WRKY45 との相互作用を免疫沈降法により調べた。その結果、Pb1 で相互作用が確認され、Pb1-Quad では相互作用能が著しく低下していた。さらに、Split Luciferase assay 法により、植物体内での Pb1-WRKY45 の相互作用を確認し、Pb1-Quad-WRKY45 では相互作用能力が低下していることを確認した。

(2)Pb1 過剰発現体では WRKY45 の経路が亢進する

日本晴および Pb1 過剰発現体に、いもち病を接種し経時的に WRKY45 および、その下流の遺伝子の発現を解析した。その結果、WRKY45 タンパク質および RNA は、Pb1 過剰発現体において対照の日本晴に比べて強い発現を示した。WRKY45 の下流遺伝子である WRKY62 および RDX 遺伝子の発現も同様に、Pb1 過剰発現体において発現量が亢進していた。これらの結果から、Pb1 抵抗性は WRKY45 に依存していることが強く示唆された。

(3)Pb1 抵抗性は WRKY45 に依存しており、その抵抗性は相互作用に依存している

Pb1 抵抗性が WRKY45 に依存しているかを検証するために、Pb1 系統および Pb1 過剰発現体の WRKY45 を発現抑制する形質転換イネを作成した。これらの植物を用いて、いもち病抵抗性検定を行うと、Pb1 遺伝子が発現しているにもかかわらず、その抵抗性が著しく低下していた。さらに、Pb1-Quad を過剰発現する形質転換イネも、その抵抗性が低下していた。これらの結果から、Pb1 抵抗性は WRKY45 に依存しており、その抵抗性発動にはタンパク質間相互作用が必須であることが明らかになった。

(4)Pb1 は WRKY45 を安定化させ抵抗性反応を亢進する

WRKY45 は転写活性化因子であり、過剰発現体はいもち病にきわめて強い抵抗性を示す (Shimono et al 2007; Shimono et al 2012)。また、WRKY45 の研究から、ユビキチンプロテアソーム分解系により、タンパク質蓄積に負の制御がなされていることが明らかにされた (Matsushita et al 2012)。このことから、Pb1 は WRKY45 のタンパク制御機構に関与する仮説を立て、研究を進めた。その結果、イネ培養細胞において、Pb1 と WRKY45 を共発現させると WRKY45 タンパク質の蓄積が増加した。一方で、Pb1-Quad と WRKY45 を共発現させても、WRKY45 の蓄積は限定的であった。さらに、WRKY45 の転写活性化能を、Pb1 共発現下で測定すると、WRKY 単独に比較して約 4 倍程度に上昇していた。これらのことから、Pb1 抵抗性メカニズムは、ユビキチンプロテアソーム分解から WRKY45 を保護し、タンパク質の蓄

積を促進することで、WRKY45 に依存した防御応答を亢進していることが示唆された。

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)

- ① Shimono M, Koga H, Akagi A, Hayashi N, Goto S, Sawada M, Kurihara T, Matsushita A, Sugano S, Jiang C-J, Kaku H, Inoue H, Takatsuji H (2012) Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance *Molecular Plant Pathology* 査読有 13(1):83-94
- ② Matsushita A, Inoue H, Goto S, Nakayama A, Sugano S, Hayashi N, Takatsuji H (2013) Nuclear ubiquitin proteasome degradation affects WRKY45 function in the rice defense program *The Plant Journal* 査読有 73(2):302-313
- ④ Jiang C-J, Shimono M, Sugano S, Kojima M, Liu X, Inoue H, Sakakibara H, Takatsuji H (2013) Cytokinins act synergistically with salicylic acid to activate defense gene expression in rice *Molecular Plant-Microbe Interactions* 査読有 26(3):287-296
- ⑤ Inoue H, Hayashi N, Matsushita A, Xinqiong L, Nakayama A, Sugano S, Jiang C-J, Takatsuji H (2013) Blast resistance of CC-NB-LRR protein Pb1 is mediated by WRKY45 through protein-protein interaction *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 査読有 110(23):9577-9582

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 井上晴彦, 林長生, 松下茜, 中山明, 菅野正治, 姜昌杰, 高辻博志 (2011) Pb1 による穂いもち抵抗性は転写因子 WRKY45 の翻訳後制御を介している? *第 52 回日本植物生理学会年会講演*
- ② 松下茜, 井上晴彦, 後藤新悟, 中山明, 高辻博志 (2011) イネ複合病害抵抗性遺伝子 WRKY45 はユビキチン-プロテアソームによる分解制御を受ける *第 52 回日本植物生理学会年会講演*
- ③ 林長生, 井上晴彦, 高辻博志 (2011) 穂

いもち圃場抵抗性遺伝子 *Pb1* はゲノムのタンデム重複によって成立した *Journal of General Plant Pathology* 77(3)

- ④ Jiang C-J, Shimono M, Sugano S, Kojima M, Liu X, Inoue H, Sakakibara H, Takatsuji H (2011) Cytokinins act synergistically with salicylic acid to activate defense gene expression in rice *9th International Symposium of Rice Functional Genomics*
- ⑤ Matsushita A, Inoue H, Goto S, Takatsuji H (2011) Post-transcriptional regulation of WRKY45 by ups-mediated protein degradation *9th International Symposium of Rice Functional Genomics*
- ⑥ 井上晴彦, 林長生, 松下茜, 中山明, 菅野正治, 姜昌杰, 高辻博志 (2012) いもち圃場抵抗性遺伝子 *Pb1* の抵抗性は WRKY45 を介している *第 53 回日本植物生理学会年会講演*
- ⑦ 松下茜, 井上晴彦, 後藤新悟, 中山明, 菅野正治, 高辻博志 (2012) イネの WRKY45 の機能発現はユビキチン/プロテアソームにより 2 つのモードで制御されている *第 53 回日本植物生理学会年会講演*
- ⑧ Inoue H, Hayashi N, Matsushita A, Liu X, Nakayama A, Sugano S, Jiang C-J, Takatsuji H (2012) Blast resistance by panicle blast resistant gene *Pb1* is mediated by WRKY45 *XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*

- ⑨ Matsushita A, Inoue H, Goto S, Nakayama A, Sugano S, Hayashi N, Takatsuji H (2012) The nuclear ubiquitin proteasome regulates WRKY45 function in a dual mode in the rice defence program *XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*

[学会発表] (計 9 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

井上晴彦(HARUHIKO INOUE)
農業生物資源研究所・主任研究員
研究者番号:10435612

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：