

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24年 5月28日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22780044

研究課題名（和文）

生細胞経時観察法を用いたイネのいもち病抵抗性応答におけるミトコンドリアの機能解析
研究課題名（英文）Live-imaging analysis of mitochondrial movement in rice cells during rice-*Magnaporthe oryzae* interactions

研究代表者

望月 進 (MOCHIZUKI SUSUMU)

農業生物資源研究所・遺伝子組換え研究センター耐病性作物研究開発ユニット・特別研究員

研究者番号：40567020

研究成果の概要（和文）：いもち病菌侵入初期のイネ細胞と菌細胞を生かしたまま経時的に観察する蛍光イメージング法を開発し、同一視野で菌の付着器形成直後から多細胞伸展までを観察することに成功した。また、この方法を用いてイネミトコンドリアの菌方向への凝集反応には2つのタイプがあることを示し、菌の変異体を用いた観察結果からいずれの凝集反応もイネ細胞の抵抗性反応と密接に関連することを示した。さらに本観察法を応用し、菌侵入時や傷害応答時の反応の蛍光イメージングを行った。

研究成果の概要（英文）：I improved the live and real-time imaging method using trimmed and sliced leaf-sheath to analyze the structural changes and the intracellular reactions both in a single cell of rice and blast fungus during the early infection process. Using this method, two types of alteration of mitochondrial distribution were observed. Observation using some mutants of the rice blast fungus revealed that both of types of the alteration were closely related to resistant reaction of rice cells to the blast. Moreover, I applied the imaging method to observe some cellular reactions during the infection and wounding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：ミトコンドリア・イネ・いもち病菌・病害抵抗性・ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

イネいもち病はイネの病害の中でも特に被害が大きく、国内はもとより世界的に研究されている。近年、双方のゲノム情報が公開され、マイクロアレイなどの解析ツールが整

備されたことによって、イネといもち病菌の相互作用は遺伝子レベルで解析されるようになってきた。一方で、いもち病菌の感染過程は形態学的に詳しく研究されてはいるが、これまでの細胞生物学的な解析は固定切片

での定点観察がほとんどであり、生細胞を用いた経時的な観察の報告は、いもち病菌の侵入を受けたイネ細胞の膜構造の変化や侵入したいもち病菌の核の移動を蛍光観察した Kankanala らによる解析のみであった。一般に生細胞での観察には、細胞内の応答を空間的、半定量的に把握し、さらに、経時的な変化を捉えることができる利点がある。すなわち、生細胞観察では一過的な細胞の応答や構造変化を同一細胞で詳細に解析することができる。また、組織の固定処理が無いため、蛍光プローブなどの検出試薬の利用が制限されない。このように多くの利点があるにも関わらず、いもち病感染過程の生細胞観察がほとんど行われていない原因は、(1) 植物は他の生物と比較して自家蛍光が強く、蛍光観察が難しい、(2) 植物組織は乾燥に弱いものに対し、いもち病菌は感染に一定の乾燥(通気性)が必要である、(3) 観察には感染部位に光を照射する必要があるが、光はいもち病菌の感染を阻害する、(4) いもち病菌の植物細胞への侵入や伸展は不均一であり、細胞応答を同調させることが困難である、などが挙げられる。これらの中で(1)の問題は、高強度で多様な蛍光タンパク質や蛍光プローブの開発と顕微鏡や画像解析ソフトの改良などの近年のイメージング技術の進歩により解決されつつある。そこで私は、前述の(2)~(4)の問題点を克服して同一感染部位を生細胞のまま経時的に観察する系を構築し、イネ-いもち病菌の相互作用を解析することを考えた。

本課題着手前に西澤洋子博士らとの共同研究で、ミトコンドリア、細胞核、F-アクチン、液胞膜の4器官を蛍光標識した各種イネを作出し、その葉鞘裏面細胞を用いていもち病菌接種48時間後に定点観察を行って、付着器や侵入菌糸に向かってミトコンドリアが凝集する傾向があることを見出していた。ミトコンドリアは代謝に関わる重要な細胞内小器官であり、プログラム細胞死に関与することが知られている。また、ある種の植物病原菌の生産する宿主特異的毒素がミトコンドリアを標的にすることは古くから知られており、いもち病菌でもミトコンドリアを初期作用点とする毒素の生産が確認されていた。しかしながら、基礎的抵抗性や過敏応答におけるミトコンドリアの直接的な関与はほとんど知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究はイネの生細胞を用いていもち病菌侵入初期におけるイネおよび菌双方の反応、特に抵抗性反応のリアルタイムイメージング解析を行う方法を確立すること、また、定点観察で見つかった侵入した菌へのイネ

ミトコンドリアの凝集反応といもち病抵抗性反応との関連性を明らかにすることを主目的とした。加えて、蛍光プローブの適用条件の検討や確立した生細胞蛍光経時観察法を応用したイメージング解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

ミトコンドリア局在シグナルを付加した GFP タンパク質を発現させたイネ(日本晴 BL 2号と BL 5号)と野生型いもち病菌稲 86-137 (BL 2号に親和性、BL 5号に非親和性)、Guy11 (BL 2号、BL 5号ともに非親和性)とそのイネ細胞への侵入能欠損変異体 *sdhT06* (野生型、稲 86-137)、*mst12* (同、Guy11)、イネ細胞に過敏反応を誘導する変異体 *ssd1* (同、稲 86-137) および mCherry を過剰発現させた変異体 TmC1=16-1 (同、稲 86-137) を用いた。

(2) 生細胞経時蛍光観察法の改良

葉鞘裏面表皮切片を用いた生細胞経時蛍光観察法の改良は、ミトコンドリア蛍光標識イネの GFP 蛍光を指標にイネ細胞の生存を、蛍光標識いもち病菌の mCherry 蛍光を指標に菌の生存を確認しつつ、条件検討を行った。

(3) 蛍光観察システム

蛍光観察はライカ社の DM6000 正立型蛍光顕微鏡システムに横河電機社の CSU 共焦点蛍光観察システムを設置し、488 nm レーザーと GFP フィルターで GFP 蛍光を、561 nm レーザーと RFP フィルターで mCherry 蛍光を検出して共焦点蛍光像を構築した。

4. 研究成果

(1) 生細胞経時蛍光観察法の改良

イネ葉鞘裏面表皮切片を用い、寒天培地上でいもち病菌を接種して付着器を形成させ、その後、シリコンオイルを重層してカバーガラスで封入する方法を採用し、同一視野を生細胞で、かつ、経時的に追うことに成功した。この方法でいもち病菌が付着器を形成した直後から菌が伸展する様子を観察することが出来るようになった。このように植物と菌の両方の反応を植物細胞への侵入初期から伸展期までの長時間に渡って同一視野、かつ、経時的に観察した報告例はない。よって本方法は植物の防御応答や菌の感染メカニズムを時空間的、半定量的に把握するための技術となり得ると考えられる。

(2) イネミトコンドリアの凝集反応の観察 上記方法と定点観察を組み合わせ、ミトコ

ンドリアを蛍光標識したイネにイもち病菌の親和性菌や非親和性菌および侵入能欠損変異イもち病菌を接種した葉鞘裏面表皮細胞を観察した。その結果、イネミトコンドリアの凝集反応は、非親和性組み合わせで菌の形成した付着器に向かって起こる凝集と菌の侵入に伴って誘導された過敏反応を起こしたイネ細胞に向かって起こる凝集の2種類があることがわかった。これらの凝集反応はいずれも侵入能を欠損した変異体菌 (*sdhT06* や *mst12*) では起こらないことから、菌のイネ細胞への侵入により誘導されることがわかった。また、これらの凝集反応は親和性菌を接種した場合には起こらないが、イネ細胞に過敏反応を誘導する親和性菌の変異体 (*ssd1*) を接種した場合には起こることから、抵抗性反応と密接に関連していることがわかった。イネ-イもち病菌相互作用によるイネ側の細胞構造変化としてはアクチン繊維の再編成が知られているが、本研究成果はイネの抵抗性反応時に、もしくはイネの抵抗性反応によってミトコンドリアも動的に変化する細胞内小器官の1つであることを示唆している。ミトコンドリアは動物細胞ではプログラム細胞死に関与することが知られており、さらに解析することによって抵抗性反応の1つである過敏細胞死におけるミトコンドリアの働きが明らかになるのではないかと考えている。

(3) 蛍光プローブの適応条件の検討

いくつかの蛍光プローブの適用条件を検討し、その中の1つである蛍光標識した小麦胚芽レクチンを用いた観察により、侵入したイもち病菌のキチンの露出が侵入第1細胞と第2細胞以降で異なることを示した。具体的には侵入第1細胞では、初期はキチンが露出しているが、時間とともに露出が少なくなるのに対して、侵入第2細胞以降ではキチンが露出したままとなっていた。キチンは遊離するとイネ細胞に防御応答を誘導する。イもち病菌は感染を成立させるため、侵入第1細胞でのキチンの露出を抑えるとともに、第1細胞と第2細胞以降で異なる細胞壁組成にしている可能性が考えられた。本研究はこれまでわかっていなかった侵入細胞におけるイもち病菌表層のキチンの分布を初めて明らかにした。

(4) 生細胞経時観察法の応用へ向けて

以上の成果に加えて、本研究では生細胞経時観察法を応用して菌侵入時における様々な反応を蛍光イメージングするための条件

検討や観察に用いる形質転換植物の作出を行った。

- ① イもち病菌侵入細胞周辺でのジャスモン酸の分布を調べる観察系の構築を試みた。その前段階としてジャスモン酸応答性プロモーター下で GFP を発現するイネを用い、傷害応答時の GFP の発現パターンの観察を行った。
- ② イネ細胞の生理反応を調べるために、過酸化水素およびカルシウムイオン検出用蛍光タンパク質を細胞質およびミトコンドリアで発現するイネを作出した。
- ③ mCherry 蛍光タンパク質を細胞質で発現するイもち病菌のレースを増やし、様々なイネ-イもち病菌の組み合わせでの蛍光観察を可能にした。

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)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Koji Miyamoto, Takafumi Shimizu, Susumu Mochizuki, Yoko Nishizawa, Eiichi Minami, Hideaki Nojiri, Hisakazu Yamane and Kazunori Okada Stress-induced expression of the transcription factor RERJ1 is tightly regulated in response to jasmonic acid accumulation in rice *Protoplasma* 《査読あり》, *in press* (2012) DOI 10.1007/s00709-012-0400-z
- ② Yusuke Kouzai, Susumu Mochizuki, Akihiro Saito, Akikazu Ando, Eiichi Minami and Yoko Nishizawa Expression of a bacterial chitinase in rice plants improve disease resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell Reports* 《査読あり》, 31, 629-636 (2012) DOI: 10.1007/s00299-011-1179-7
- ③ Susumu Mochizuki, Ken-ichiro Saitoh, Eiichi Minami and Yoko Nishizawa Localization of probe-accessible chitin and characterization of genes encoding chitin-binding domains during rice-*Magnaporthe oryzae* interactions. *Journal of general plant pathology* 《査読あり》, 77, 163-173 (2011) DOI: 10.1007/s10327-011-0310-5

[学会発表] (計7件)

- ① 望月進, 齋藤憲一郎, 久保康之, 南栄一,

- 西澤洋子
イネいもち病菌感染初期過程におけるミトコンドリア凝集反応の観察
日本植物病理学会、福岡、2012年3月
- ② 香西雄介, 望月進, 齋藤明広, 安藤昭一, 南栄一, 西澤洋子
細菌キトサナーゼを発現するイネの作製とそのいもち病抵抗性の解析
日本農芸化学会、京都、2012年3月(ポスター)
- ③ 望月進, 中島恵美, 軸丸祐介, 神谷勇治, 南栄一, 西澤洋子
高濃度窒素条件下におけるイネユビキチンリガーゼ EL5 の機能解析
日本植物生理学会、京都、2012年3月(ポスター)
- ④ 香西雄介, 望月進, 齋藤明広, 安藤昭一, 南栄一, 西澤洋子
キトサン分解能を付与した形質転換イネの作出とそのいもち病抵抗性の解析
日本植物病理学会関東部会、つくば、2011年9月(口頭)
- ⑤ Kazunori Okada, Koji Miyamoto, Takafumi Shimizu, Tatsuya Kitajima, Koichi Kawamoto, Tetsuya Chujo, Rika Ozawa, Junji Takabayashi, Susumu Mochizuki, Yoko Nishizawa, Akio Miyao, Hirohiko Hirochika, Hideaki Nojiri, Hisakazu Yamane
Biological Function of the JA-inductive bHLH Transcription Factor RERJ1 in Rice Terpenoids Synthesis
10th International Meeting: Biosynthesis and Functional Isoprenoids in Plants, Microorganisms and Parasites (TERPNET2011; Kalmar, Sweden), May, 2011
- ⑥ 望月進, 南栄一, 西澤洋子
イネ剥離葉鞘裏面細胞を用いたいもち病菌感染初期における細胞内構造変化のリアルタイムイメージング法の構築
日本植物病理学会、東京、2011年3月(震災の影響により書誌発表)
- ⑦ 望月進, 南栄一, 西澤洋子
いもち病菌感染初期におけるイネの細胞内構造変化の可視化
日本植物病理学会、京都、2010年4月

[図書] (計1件)

Yoko Nishizawa, Susumu Mochizuki, Ken-ichiro Saitoh, Kyutaro Kishimoto, Yusuke Kouzai, Eiichi Minami, The American Phytopathological Society Press, Defense mechanisms mediated by chitin in rice-blast interactions. Genome-Enabled Analysis of Plant-Pathogen Interactions, pp. 121-129 (2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 進 (MOCHIZUKI SUSUMU)
農業生物資源研究所・耐病性作物研究開発ユニット・特別研究員
研究者番号：40567020

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

西澤 洋子 (NISHIZAWA YOKO)
農業生物資源研究所・耐病性作物研究開発ユニット・上級研究員
研究者番号：40355756

久保 康之 (KUBO YASUYUKI)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：80183797

山根 久和 (YAMANE HISAKAZU)

帝京大学・理工学部バイオサイエンス学科・教授
研究者番号：80090520

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