

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450067

研究課題名(和文) イネ病害抵抗性におけるサリチル酸の合成・蓄積を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism for synthesis of salicylic acid on defense responses in rice

研究代表者

高橋 章 (TAKAHASHI, AKIRA)

国立研究開発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：20414914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：イネにおいて、病害抵抗性の誘導にサリチル酸(SA)経路が関与していることは強く示唆されているが、その機能に関する知見は乏しい。我々はこれまでの変異体の解析から、イネにおける一連の防御応答(壊死斑の形成や防御遺伝子群の発現)が、SAの蓄積に依存している可能性を見出した。そこで、これまでに特定した過剰にSAの蓄積を誘導するイネ変異体ならびにフェニルプロパノイドの生合成関連遺伝子を制御する転写因子に着目し、イネにおけるSA合成に関わる酵素候補遺伝子の特定を試みた。また、シロイヌナズナで防御応答時のSA合成に必須なイソコリスミ酸シンターゼ1遺伝子のイネ相同遺伝子について機能解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：Salicylic acid (SA) is an important inducer of defense responses in plants. In rice, however, it is unknown whether SA has a direct role to trigger defense responses. Furthermore, the synthesis pathway of SA is not clear in rice. Previously, we reported the possibility that the activation of defense responses, including expression of defense related genes and HR-like lesion formation, depends on the accumulation of SA in rice. Here, we examined the molecular mechanism of SA synthesis in defense responses using the rice mutant which over-accumulates SA compared with the wild type siblings. We also focused on isochorismate synthase (ICS) gene which is a key enzyme for SA synthesis in Arabidopsis. We identified the rice ICS homologous gene and analyzed the contribution of it on the activation of defense responses in rice.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：イネ サリチル酸 ICS

1. 研究開始当初の背景

植物も病原体や病害虫に対して積極的に防御反応を引き起こし、身を守っている。その誘導には、植物ホルモン的一种であるサリチル酸(SA)が重要な機能を果たしていることが、双子葉植物での研究から示されている。双子葉植物のシロイヌナズナやタバコでは、病原体の感染時に SA の合成が速やかに誘導され、それに伴い防御応答遺伝子である PR 遺伝子群の発現が誘導される。さらに、感染部位から離れた非感染部位でも SA の蓄積が誘導され二次的な免疫応答が引き起こされる。

植物における SA の生合成経路はまだ完全には明らかにされていないが、シキミ酸経路よりフェニルアラニンを経由するフェニルプロパノイド経路と、イソコリスミ酸を経由する経路の二つの合成経路が提唱されている(図1)。シロイヌナズナにおいては、病原体感染により感染部位のみならず周辺の非感染部位でイソコリスミ酸シンターゼ1(*AtICS1*)遺伝子の発現が誘導され、イソコリスミ酸を経由する経路により SA の合成が急速かつシステム的に誘導されることが示されている。一方、単子葉植物であるイネにおいても、SA 経路に作用し病害抵抗性を高める植物活性化剤は十分に効果が認められること、また細菌由来の SA 分解酵素である *NahG* 遺伝子の導入により病害抵抗性が著しく低下することから、SA の重要性は強く示唆されている。しかしながら、イネでは内在の SA 蓄積量が恒常的に高く、感染後の SA の蓄積量が植物体全体として変動しないことや、外部から SA を投与しても PR 遺伝子群の発現や抵抗性の誘導があまり顕著でないことから、イネにおける SA の機能や合成制御は双子葉植物とは異なっていると考えられるが、その詳細は不明である。

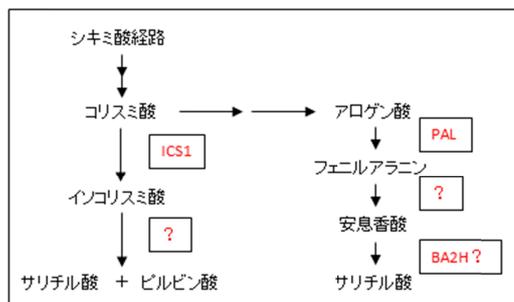


図1 サリチル酸合成経路

シロイヌナズナにおける感染応答時の SA の蓄積は、*AtICS1* 遺伝子のシステム的な発現の誘導に依存している。しかし、イネの *ICS1* 相同遺伝子 (*OsICS*) については、感染応答時における明瞭な誘導は見られない。また、*OsICS* の機能欠損変異体や Loss-of-function の機能解析について報告がなく、*OsICS* の関与は不明である。一方、フェニルアラニンを経由するフェニルプロパノイド経路の鍵酵素であるフェニルアラ

ニンアンモニアリラーゼ(*PAL*)遺伝子群は、病原体感染により速やかに発現が強く誘導される。このことから、イネにおける SA の合成は、イソコリスミ酸ではなくフェニルアラニンを経由する経路が主要な役割を果たしていると推測された。フェニルアラニンを介する SA の合成は、タバコで酵素活性があることは報告されているが、その遺伝子は未だ単離されていない。

2. 研究の目的

我々がこれまでに特定した過剰に SA の合成・蓄積を誘導するイネ変異体 (*ospti1a*)、*OsICS* 遺伝子、ならびにフェニルプロパノイドの生合成関連遺伝子を制御する転写因子に着目し、イネにおける SA の合成・蓄積を制御する分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) イネ病害抵抗性応答における SA の合成に関わる遺伝子の同定

これまでに特定した、過剰に SA の合成・蓄積が誘導されている *ospti1a* 変異体、植物の感染受容体の安定性に関与する *RAR1* 遺伝子の発現を抑制した *ospti1a* 形質転換イネ (*ospti1a-rar1*)、SA の分解酵素である *NahG* 遺伝子を導入した *ospti1a(ospti1a NahG)* を材料に用いて、マイクロアレイ解析を行い、三者間で比較することにより、イネにおける SA の合成にかかわる遺伝子の同定を試みる。

申請者らが新規に同定した、フェニルプロパノイド合成酵素遺伝子を特異的に制御する転写因子を一過的に発現させたイネでは、SA 応答性遺伝子の発現が誘導される。そこで、この転写因子の誘導により SA の合成・蓄積が引き起こされるか確認するとともに、マイクロアレイ解析を行い、*ospti1a* 変異体を用いた解析と比較することにより SA 合成に関与する酵素遺伝子の候補遺伝子の絞り込みを進める。

SA 合成に関わる酵素群の候補遺伝子が得られた場合、*ospti1a* 変異体を用いて発現抑制体の作成を進め、イネにおける SA 合成に関与するか確認する。

(2) イソコリスミ酸経路を介した SA 合成経路の評価

シロイヌナズナでは、病原体の認識により *AtICS1* 遺伝子が強く誘導され、SA の合成が促進される。イネにおいては、*OsICS* は、いもち病菌の感染時に発現誘導は見られず、イネで過剰発現しても SA の合成が誘導されない。そのため、イネにおいては感染応答時における *ICS1* を介した特異的な SA 合成の促進機構の存在は懐疑的である。しかしながら、定常的に高蓄積する SA の合成への *OsICS* の

関与は否定できない。そこで、まず OsICS がシロイヌナズナの AtICS1 と同等の ICS 酵素活性を有しているか確かめるため、シロイヌナズナの *sid2(atics1)* 変異体に *OsICS* を導入し、病原細菌感染による SA の蓄積を相補できるか解析する。

OsICS がシロイヌナズナの *sid2* 変異体を相補できなかった場合、OsICS は ICS 活性を有していない可能性が考えられるため、シロイヌナズナやタバコの ICS と比較し、ICS1 活性に必須のドメインの同定を試みる。

イネにおける ICS1 経路が病害抵抗性に関与しているか明らかとするため、イネの変異系統群から、*osics* 変異体を探索し、SA 合成への関与ならびに病害抵抗性への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) イネ病害抵抗性応答における SA の合成に関わる遺伝子の同定

イネの *ospti1a* 変異体及び野生型(WT)の葉から抽出した全 RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、WT に比べ *ospti1a* 変異体で強く誘導される遺伝子を 2,975 個同定した。この遺伝子群の中から、SA の生合成に関与する遺伝子を絞り込むため、*ospti1a* 変異体の遺伝背景にも関わらず、SA の蓄積に変化が見られる 2 種類の形質転換イネ (*ospti1a-rar1*、*ospti1a NahG*) を用いて同様にマイクロアレイ解析を行った。これらの形質転換イネでは、*ospti1a* 変異体で強く誘導される 2,975 個の遺伝子うち、約 2,299 個(77%)で発現の誘導が抑制されることが明らかになった。

フェニルプロパノイド合成酵素遺伝子を特異的に制御する転写因子の一過的過剰発現体では、PAL をはじめ一連のフェニルプロパノイド合成酵素遺伝子の誘導が見られたが、SA の新たな合成・蓄積は認められなかった。このことから、この転写因子の発現だけでは誘導されない遺伝子が、SA の合成・蓄積に重要であることが示された。そこで、この過剰発現体から得られた遺伝子の発現データと、これまでに同定した *ospti1a* 変異体で SA の過剰な蓄積に合わせて強く誘導される遺伝子群と発現パターンを比較し、SA 合成に関与する酵素遺伝子の候補遺伝子を絞り込んだ。これらの酵素は、病害抵抗性が誘導される際に発現が特異的に誘導され、局所的な SA の合成に関与することが期待される。

イネにおける SA の合成は、イソコリスミ酸ではなくフェニルアラニンを経由する経路が主要な役割を果たしていると推測される。しかしながら、イネにおいてはフェニルアラニンを経由する SA 合成経路において、PAL 酵素の下流で働く BA2H 酵素はまだ同定されていない(図1)。阻害剤を用いた解析から、イネの BA2H は p450 であることが示唆されている。そこで、絞り込んだ遺伝子群の中から、BA2H 候補としての p450 遺伝子 4 つ、老化に

関与することが示唆される遺伝子 1 つについて、*ospti1a* 変異体を背景として、発現抑制した形質転換体を作成した。T1 世代種子を採取次第 *ospti1a* 変異体における SA 合成ならびに抵抗性反応に対する影響を解析することとした。

(2) イソコリスミ酸経路を介した SA 合成経路の評価

OsICS がシロイヌナズナの AtICS1 と同等の ICS1 酵素活性を有しているか確かめるため、シロイヌナズナの *sid2* 変異体に *OsICS* 遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナ (*sid2-OsICS*) を作成した。*sid2-OsICS* の細菌病に対する抵抗性を調べたところ、OsICS による *sid2* 変異体の相補は見られなかった(図2)。

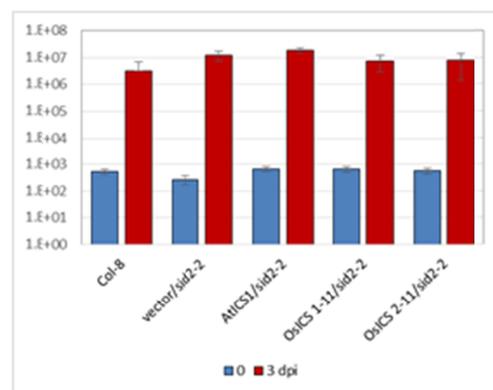


図2 シロイヌナズナ *sid2* 変異体相補試験

OsICS では ICS 酵素として必要なドメインは完全に保存されている。そこで、OsICS が *sid2* 変異体を相補しない理由として、これらのタンパク質が細胞内で安定的に発現しない可能性について調べた。タグをつけたコンストラクトを作成し、そのタンパク質の安定性を調べたところ、*sid2* 変異体に導入した OsICS の蓄積がほとんど検出されず、OsICS が *sid2* 変異体を相補できない理由が、タンパク質の安定性が損なわれていることが考えられた。

近年、葉緑体タンパク質の輸送システムについて知見が得られ、葉緑体タンパク質が葉緑体に行くまでの段階(細胞内輸送)で、選抜される可能性が示唆されている。そこで、ICS の塩基配列からシグナルペプチドを予測し、シロイヌナズナの AtICS1 と、OsICS でシグナルペプチドを入れ替えたキメラ ICS(AOO, OAA) タンパク質作成し(図3)、タンパク質の安定性を調べた。

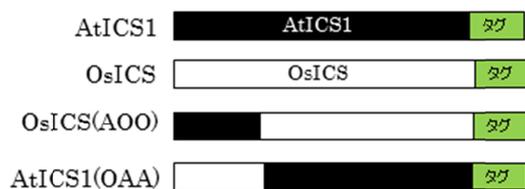


図3 ICSキメラタンパク質コンストラクション

その結果、AtICS1 のシグナルペプチドを結

合した OsICS (A00) は、AtICS1 と同様にタンパク質の蓄積が観察された。そこで、これらの形質転換体について、病原細菌感染試験ならびに PR 遺伝子の発現解析を行ったところ、いずれの試験でも OsICS(A00)は *sid2* 変異体を相補しないことが明らかとなった。すなわち、ICS は ICS1 活性を有していない可能性が高い。このことは、イネにおける感染応答時に *OsICS* 遺伝子の発現が誘導されないだけでなく、ICS1 活性も有さない(あるいは非常に小さい)ことから、定常時の SA の高蓄積にもイソコリスミ酸を経由する SA 合成経路は利用されていない可能性を示唆している。

イネにおける ICS1 経路が病害抵抗性に関与しているか明らかとするため、イネにおいてもこれらのキメラタンパク質を発現させた形質転換体を作成し、タンパク質の発現量を調べたところ、OsICS、AtICS1 とともに OsICS (A00)、AtICS1(OAA) も安定して発現していた。このことから、イネにおいては葉緑体への移行とタンパク質の安定性の制御には、シロイヌナズナとは異なる機構があると考えられる。これらの形質転換体について、いもち病菌の接種を行い抵抗性応答への影響を解析したが、全ての系統で有意な差は得られなかった。この結果は、抵抗性における SA 合成にイソコリスミ酸経路が関与していない事を裏付けている。さらに、イネ変異体系統群から *OsICS* 遺伝子について、変異が生じている変異体を Tilling 法によりスクリーニングを行った。その結果、*OsICS* 遺伝子に変異を生じた系統を 33 系統選抜し、そのうち、12 系統において、アミノ酸置換が起こった変異を見出した。現在、これらの変異系統について圃場で展開し、ホモ個体の選抜ならびに戻し交配により試験材料の準備を進めている。

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)

[学会発表](計 3 件)

- 横尾尚平、天川奈穂、松井英譲、中神弘史、高橋章、光原一郎、加藤新平、シロイヌナズナ、タバコおよびイネのイソコリスミン酸合成酵素(様)タンパク質の比較解析。第 55 回 日本植物生理学会年会 2014 年 3 月(富山 富山大学五福キャンパス)
- 鈴木那奈、松井英譲、中神弘史、高橋章、光原一郎、新井亮一、加藤新平、AtICS1 の顕著な ICS 活性およびベンサミアナタバコにおける高蓄積に必要な領域の同定。平成 27 年度日本植物病理学会大会 2015 年 3 月(東京 明治大学駿河台キャンパス)
- 井上成也、松井英譲、中神弘史、高橋章、光原一郎、新井亮一、加藤新平、イネのイソコリスミ酸合成酵素様タンパク質

OsICS のイソコリスミ酸合成酵素活性とコリスミ酸ムターゼ活性の解析。平成 28 年度日本植物病理学会大会 2016 年 3 月(岡山 岡山大学)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 章 (TAKAHASHI Akira)

国立研究開発法人 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：20414914