

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：21301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660037

研究課題名(和文) イネいもち病抵抗性特異的に蓄積する新規フラボノイド化合物の同定と機能解明

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of flavonoids in the resistance to rice blast fungus infection

研究代表者

岩井 孝尚 (Iwai, Takayoshi)

宮城大学・食産業学群(部)・教授

研究者番号：90510636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：イネのいもち病抵抗性におけるフラボノイド化合物の役割はあまりわかっていない。いもち病菌感染に対して抵抗性を示すイネと罹病性を示すイネにおいて、フラボノイド化合物の合成に関わる酵素遺伝子の発現を調べると、フラボノイド化合物のうちフラボン類の合成が活発に行われることが明らかとなった。更に、イネが持つ3つのフラボン合成酵素遺伝子の中でOsFNS 1-3遺伝子の発現のみが抵抗性で強く誘導され、その発現を抑制した組換えイネではいもち病抵抗性が打破された。これらのことから、フラボン合成酵素OsFNS 1-3が合成する何らかのフラボンがいもち病抵抗性に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The role of flavonoids in resistance to infection with *Magnaporthe oryzae* (blast fungus) in rice is poorly understood. We first examined the expression profile of flavonoid biosynthesis enzyme genes after the inoculation using young rice plants cv. Nipponbare (WT) and its isogenic plant (IL7) which contains Pii resistance gene. In both WT and IL leaves, the reactions to flavone synthesis were enhanced by the infection of rice blast fungus. Among three FNS (flavone synthase) genes found in the rice genome, OsFNS 1-1 and 1-2 were expressed after infection in both WT and IL7, and OsFNS 1-3 was strongly after infection only in IL7. Recombinant OsFNS 1-3 protein showed the activity of flavone synthase, which converted flavanone into flavone. And furthermore, Pii-mediated resistance was compromised in transgenic rice lines, in which OsFNS 1-3 was silenced. These results suggest that a flavone produced by OsFNS 1-3, contributes to the resistance to rice blast fungus infection.

研究分野：植物病理学

キーワード：いもち病抵抗性 フラボノイド化合物 フラボン合成酵素 菌の増殖抑制

1. 研究開始当初の背景

イネいもち病菌等の病原菌に対する植物の病害抵抗性では、病原菌の感染部位において過敏反応が引き起こされ、最終的に植物体内に侵入した病原菌の増殖が抑制される。病原菌の感染した植物では、新たな低分子の抗菌性物質(ファイトアレキシン)や高分子の抗菌性 PR タンパク質の蓄積が行われることが知られているが、これらの蓄積と病害抵抗性との直接的な関係性は見出されていない。また、病害抵抗性における病原菌の増殖抑制には感染細胞の細胞死が重要であると考えられてきたが、シロイヌナズナの変異体の解析等から、現在は過敏反応における細胞死とは別に病原菌の増殖抑制のしくみが存在することが推定されている。

本課題着手前に、我々は、イネいもち病抵抗性において、過敏反応に伴った一過的なエチレン・シアン合成反応が引き起こされること、薬剤による合成反応の阻害は抵抗性を打破して罹病化させることを見出していた。さらに、過敏反応に伴ったエチレン・シアンの合成に関与が示唆された *OsACO7* 遺伝子をノックダウンしたイネでは、過敏反応による褐点の拡大が見られ、いもち病抵抗性が打破された。これらのことから、エチレン・シアンの合成反応がいもち病抵抗性に必要であることが示されていた。又、*OsACO7* ノックダウン植物にいもち病菌を接種し、24 時間後にエチレンを発生するエテホン又はシアンを処理すると、シアン処理のみでいもち病抵抗性が回復した。このことから、非常に強い呼吸阻害活性を有するシアンがいもち病抵抗性に重要であることを明らかとなった。一方で、いもち病菌はシアン耐性呼吸を有していることが報告されており、培地へシアンの添加を行ってみても、いもち病菌の増殖が抑制されなかった。このことから、いもち病抵抗性における菌増殖抑制には、シアンと共にシアン耐性呼吸を抑える何らかの物質も必要であることが示唆されていた。

シアン耐性呼吸抑制作用を持つ物質について調べると、植物界に広く存在するフラボノイド化合物も含まれていた。培地中にシアンと市販のフラボンを添加していもち病菌の増殖を調べると、ほぼ完全に増殖が抑制されるのが確認された。一方で、同じフラボン類のアピゲニンやルテオリンをシアンと共に培地へ添加しても、いもち病菌の増殖抑制作用は見られなかった。これらのことから、いもち病抵抗性においては、シアンと特定のフラボノイド化合物が協調的に菌の増殖抑制を行っていると考えられた。

2. 研究の目的

いもち病抵抗性における菌増殖抑制のしくみを明らかにするため、いもち病菌感染に伴ったフラボノイド化合物の合成に着目して研究を進めた。本研究では、はじめに、いもち病菌感染イネ葉におけるフラボノイド

化合物の合成に関わる酵素遺伝子の発現特性を明らかにし、いもち病抵抗性との関連が推定される酵素遺伝子についてノックダウン植物を作出し、いもち病抵抗性への寄与を明らかにすること、更に見出した酵素遺伝子の酵素活性を調べると共に、いもち病抵抗性反応の過程で感染葉に蓄積する物質の変化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

植物材料として、イネ品種「日本晴」及びいもち病抵抗性遺伝子 *Pii* を有する準同質遺伝子系統 IL7 を用いた。いもち病菌はレース 003 の *Kyu89-246* 株を用い、IL7 へ噴霧接種を行うと、過敏反応を伴った抵抗性を示した。

(2) フラボノイド合成関連遺伝子の発現解析

イネのフラボノイド化合物の合成に関わる 11 種類の酵素 CHS (Chalcon synthase), CHI (Chalcon isomerase), F3H (Flavanone 3-hydroxylase), F3'H (Flavonoid 3'-hydroxylase), DFR (Dihydroflavonol reductase), FLS (Flavonol synthase), ANS (Anthocyanidin synthase), NOMT (Naringenin 7-O-methyltransferase), FNS I (Flavone synthase I), FNS II (Flavone synthase II) について、いもち病菌感染イネ葉における遺伝子発現を RT-PCR により調べた。調べた酵素遺伝子は、サクラネチン、フラボノール、アントシアニン、フラボンの合成に関わるものである。

(3) フラボン合成酵素活性の検出

GST (グルタチオン S-トランスフェラーゼ) との融合タンパク質をつくる発現ベクター pGEX6p-3 に *OsFNS I-1* 又は *I-3* 遺伝子を組み込み、大腸菌にて各酵素との融合タンパク質を作らせた。既にフラボン合成酵素として報告されている *OsFNS I-1* の酵素活性測定条件にて、*OsFNS I-1* と共に *OsFNS I-3* の酵素活性を調べた。酵素活性の反応は、10 μ M Tris/HCl buffer (pH 8.0), 1 mM ascorbate, 50 μ M FeSO₄, 100 mg/ml catalase, 160 μ M oxoglutarate, 基質として 60 μ M of S 又は R-naringenin を含む反応液 500 μ l に組換えタンパク質を加え、37 °C で 3 時間反応後、HPLC にて反応産物である apigenin の生成を確認した。

(4) *OsFNS I-3* ノックダウン植物の作出と解析

アグロバクテリウム法を用いて、エンハンサーを 7 反復持つ 35S プロモーターの元で *OsFNS I-3* を標的とした amiRNA (artificial micro RNA) を恒常的に発現するイネ (IL7) を作出した。自殖により導入遺伝子をホモに

持つ個体を選抜後、T2 世代種子を用いていもち病抵抗性検定を行った。

(5) *OsFNS I-3* ノックダウン植物のいもち病菌感染葉における蓄積物質の変化
イネ品種「日本晴」、「IL7」及び *OsFNS I-3* ノックダウン植物へいもち病菌接種後、経時的に菌感染葉をサンプリングし、80%メタノールにて蓄積物質の抽出を行った。抽出液は、日本分光製 HPLC (LC-4000) を用いて内容物の分析を行った。分析には、C18 カラム(ジューエルサイエンス C18-AQ 4.6 x150mm)を用いて、A 液: 0.1%リン酸、B 液: メタノール/アセトニトリル (50:50) として 10% から 55% を 50 分間、流速 1 ml/min で分析を行った。物質の検出は、UV/Vis 検出器を用いて 280nm と 340nm の波長で行った。

4. 研究成果

(1) いもち病菌感染に伴ったフラボノイド化合物の合成

イネのフラボノイド合成に関わる 11 種類の酵素 14 遺伝子について、イネ葉におけるいもち病菌感染に伴った遺伝子発現を調べた。その結果、抵抗性、罹病性に関係なく感染に伴って *OsCHS1*, *OsCHI1*, *OsFNS I-1*, *OsFNS I-2* のフラボン類の合成に至る酵素遺伝子の発現が誘導された。更に、接種後 48 時間目以降には、*OsFNS I-3* の抵抗性特異的発現が見られた。このことは、感染に伴ってフラボン類の合成が積極的に行われ、更に抵抗性では、何らかの特別なフラボンが合成されることが推測された。また、ファイトアレキシンであるサクラネチンの合成を行う *OsNOMT* の発現は、抵抗性では 48 時間目から、罹病性では 72 時間目から誘導され、感染によって誘導される PR タンパク質と類似した発現パターンを示した。サクラネチンの蓄積についても遺伝子発現パターンと同様に見られたが、いもち病菌によるサクラネチンの分解も明らかとなった。これらのことから、抵抗性における感染初期の局所的なサクラネチン蓄積は、菌の増殖抑制に一定程度の寄与が推測された。

(2) *OsFNS I-3* のフラボン合成酵素活性
OsFNS I-1 との GST 融合タンパク質はフラボン合成酵素活性を示すことが報告されている。*OsFNS I-1* とアミノ酸配列で 70% の相同性を示す *OsFNS I-3* についての GST 融合タンパク質を作成し、精製後にフラボン合成酵素活性を調べると、*OsFNS I-1* と同様に、ナリンゲニンからアピゲニンへの反応を触媒するフラボン合成酵素活性が示された。

(3) *OsFNS I-3* 遺伝子のいもち病抵抗性への寄与

amiRNA による *OsFNS I-3* 遺伝子ノックダウン植物を作成し、いもち病菌を接種して抵

抗性の評価を行った。はじめに、組換えによって得られた *OsFNS I-3* ノックダウン候補植物から、RT-PCR により、導入した amiRNA が発現している個体を選抜した。いもち病菌の接種を行ったところ、選抜個体は IL7 と同様に接種後 3 日目までに褐点を生じたが、4 日目以降も褐点が拡大し、6 日目には更に拡大した褐色部分の周縁で黄変が見られ、いもち病抵抗性の打破が示された。(図 1)。更に、抵抗性が打破された植物では、

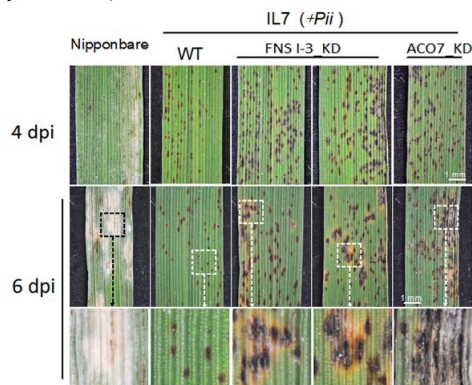


図1 *OsFNS I-3*又は*OsACO7*をノックダウンしたイネにおけるいもち病菌に対する反応。*FNS I-3_KD*及び*ACO7_KD*は、抵抗性を示すIL7に*OsFNS I-3*及び*OsACO7*遺伝子を標的としたamiRNAを導入した植物。

OsFNS I-3 の発現が抑制されていたことから、*OsFNS I-3* は、いもち病抵抗性における菌の増殖抑制に関わる物質を生産していると考えられた。

(4) *OsFNS I-3* ノックダウン植物のいもち病菌感染葉における蓄積物質の変化

いもち病菌をイネへ接種し、経時的に感染葉に含まれる物質を分析した。その結果、過敏反応による抵抗性を示すイネ葉 (IL7) では、感染が成立する接種後 24 時間目から新たな物質の蓄積が観察されたが、罹病性を示すイネ葉 (日本晴) では新たな物質の蓄積がほとんど見られなかった。接種後 72 時間目においては、抵抗性特異的に検出される 15 のピークと、罹病性特異的に検出される 2 つのピークが見出された。更に *OsFNS I-3* ノックダウン植物においては(図 2)、検出された

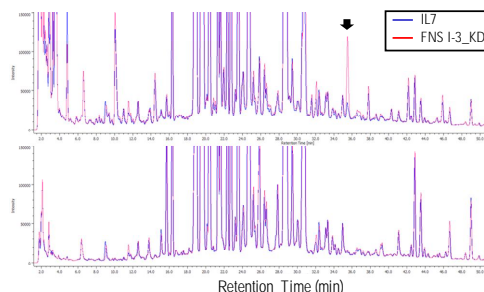


図2 *OsFNS I-3* ノックダウン植物 (*FNS I-3_KD*) とIL7における蓄積物質の比較
矢印: ノックダウン植物で特徴的なピーク

ピークは遺伝子導入に用いた抵抗性の IL7 とほぼ同様であったが、罹病性特異的に検出さ

れたピークの1つが新たに検出された。
罹病性品種及びノックダウン植物において、
共通に蓄積が見られたピークの 200nm ~
500nm の範囲の吸収波長を調べると、いず
れも同一のパターンの吸収波長を示し、フラ
ボン合成酵素の基質と考えられるフラバノ
ン類の特徴を備えていることが示された。
今後は、見出された基質と考えられる物質の
精製、構造解析を通して、OsFNSI-3 の産物
の同定、更には、いもち病抵抗性における菌
増殖抑制のしくみを明らかにすることがで
きると思われる。

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 1件)

Hasegawa M, Mitsuahara I, Seo S,
Okada K, Yamane H, Iwai T, Ohashi Y
Analysis on blast fungus-responsive
characters of a flavonoid phytoalexin
sakuranetin; accumulation in infected
rice leaves, antifungal activity and
detoxification by fungus.
Molecules 《査読有り》 19, 11404-11418
(2014)

[学会発表](計 5件)

外田友佳子・古澤みづき・岩井孝尚
CRISPR/Cas9 システムによる OsACO7
及び OsFNSI-3 のノックアウト植物作
出
日本植物病理学会東北部会, 弘前, 2017
年 9 月(口頭)

岩井孝尚, 今香菜絵, 光原一朗, 瀬尾茂
美
いもち病抵抗性における菌の増殖抑制
に関わる物質の探索
日本植物病理学会, 盛岡, 2017 年 4 月
(口頭)

岩井孝尚, 小野太遵, 瀬尾茂美, 光原一朗
いもち病抵抗性に寄与する
2-oxoglutarate dependent dioxygenase
遺伝子
日本植物病理学会, 岡山, 2016 年 3 月
(口頭)

岩井孝尚, 菰田俊一, 板井恒篤, 光原一
朗, 瀬尾茂美, 大橋祐子, 津志田藤二
郎
イネいもち病抵抗性に関わるフラボノ
イド化合物の探索
植物生理化学会, 仙台, 2014 年 11 月(口
頭)

フラボン合成酵素 I 遺伝子の発現はいも
ち病抵抗性に伴って誘導される

岩井孝尚, 板井恒篤, 瀬尾茂美, 大橋祐
子, 光原一朗
日本植物病理学会(植物感染生理談話
会), 作並, 2014 年 8 月(ポスター)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩井 孝尚 (Iwai, Takayoshi)
宮城大学・食産業学部・教授
研究者番号: 90510636

(2)研究分担者

菰田 俊一 (KOMODA, Toshikazu)
宮城大学・食産業学部・准教授
研究者番号: 50404843

津志田藤二郎 (TSUSHIDA, Tojiro)

宮城大学・食産業学部・教授
研究者番号: 00353920

(平成 27 年 3 月 26 日 資格喪失のため削除)

(3)連携研究者

光原 一朗 (MITSUHARA, Ichiro)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研
究機構・主席研究員
研究者番号: 80370683

瀬尾 茂美 (SEO, Shigemi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研
究機構・主席研究員
研究者番号: 80414910