

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 2 月 6 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07722

研究課題名(和文) イネのファイトアレキシン生産制御系におけるサイトカイニンとジャスモン酸の相互作用

研究課題名(英文) Involvement of cytokinin and jasmonate in production of phytoalexins in rice

研究代表者

山根 久和 (YAMANE, Hisakazu)

帝京大学・理工学部・客員教授

研究者番号：80090520

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、イネの病害抵抗性反応の制御に関与する2種の植物ホルモンであるサイトカイニン(CK)とジャスモン酸(JA)の相互作用を解明することを目的とした。イネにおいて、病原菌感染等のストレスにより誘導されるCK生成の鍵遺伝子を同定するとともに、JA生成変異体 $cpm2$ を用いたゲノム編集によりCK欠損変異体やCK・JA二重欠損変異体を作製した。さらに、これらの変異体を用いて、イネの病害抵抗性の制御にCKとJAが協調的に作用していることを明らかにした。また、イネにおけるファイトアレキシン生産などの病害抵抗性が暗黒下で抑制されることを示すとともにこの抑制がショ糖の外生投与で回復することも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネにおいて、ファイトアレキシン生産などの病害抵抗性反応の制御にジャスモン酸(JA)やサイトカイニン(CK)などの植物ホルモンが関与することが示唆されていたが、その詳細は不明であった。本研究では、JA生成変異体である $cpm2$ を用いたゲノム編集によりCK欠損変異体やCK・JA二重欠損変異体を作製し、それらの変異体を用いて、JAとCKがイネの病害抵抗性の制御において協調的に機能していることを実証した。本研究によって得られた成果は、病害抵抗性の制御機構に新規な知見をもたらしただけでなく、植物ホルモンを用いた環境保全型の新たな病害抵抗性付与技術開発のための基盤となる知見を提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In our preceding studies, it had been suggested that the plant hormone cytokinin (CK) is involved in disease resistance to pathogens in rice such as phytoalexin production together with another plant hormone jasmonate (JA). In this project, a single mutant deficient in CK and a double mutant deficient in CK and JA were generated by CRISPR-Cas9-mediated genome editing using the JA-deficient mutant $cpm2$ to demonstrate that CK and JA synergistically enhance disease resistance in rice. In addition, phytoalexin production in rice was repressed in darkness and the repression was recovered by exogenous application of sucrose. These results provide fundamental knowledge for the development of new environmental protection type disease resistance technology through plant hormone utilization.

研究分野：生物有機化学

キーワード：イネ 病害抵抗性 ファイトアレキシン サイトカイニン ジャスモン酸 シグナル伝達 ゲノム編集
環境保全型病害抵抗性制御技術

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イネに病原菌が感染するとエリシターと総称される病原菌の細胞表層由来の成分が感染シグナルとして機能し、細胞膜に存在する受容体と結合する。それが引き金となり、二次シグナルとして機能するジャスモン酸(JA)などの植物ホルモンの生成を含むシグナル伝達系が活性化し、最終的に抗菌性タンパク質の発現やファイトアレキシンと総称される抗菌性二次代謝産物の生産などの様々な防御応答が誘導される()。イネにおいては、病原菌感染のシグナル伝達の初期過程において、JAの生成が誘導されることがよく知られているが()、最近、サイトカイニン(CK)の蓄積が誘導されることも報告された()。CKは、当研究室の先行研究により、外生投与でジテルペン型ファイトアレキシンの生産を誘導することが示されているものの()、イネの防御応答における機能はほとんどわかっていなかった。また、JAも抗菌性タンパク質の発現やファイトアレキシンの生産などを誘導することは示されているが()、イネの病原菌に対する防御応答における機能の詳細については多くが未解明であった。

2. 研究の目的

(1) 病原菌感染等のストレスにより発現が誘導されるCK生合成遺伝子を同定するとともに、JA欠損変異体 *cpm2* を用いてゲノム編集によりCK欠損変異体、CK・JA二重欠損変異体を作製する。

(2) ゲノム編集により得られたCK欠損変異体、CK・JA二重欠損変異体に、野生型、*cpm2* 変異体を加えた4つの遺伝子型のイネに対して、いもち病菌接種を行い、イネの病害抵抗性におけるCKとJAの機能を詳細に解析する。

3. 研究の方法

(1) 野生型イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nihonmasari: NMWT)、JA欠損変異体 *cpm2* の葉身切片に非親和性 [P91-15B (以下15Bと略記)] 親和性いもち病菌 (Ina86-137) 接種、あるいは病害抵抗性を誘導することが知られているCuCl₂処理を行い、蓄積するCKを内部標準を用いてLC-MS/MS法により分析した。

(2) 既存のRNA-seqデータ () といもち病菌接種したイネを用いたqRT-PCR解析により、ストレス誘導のCK蓄積に関与する鍵酵素遺伝子を同定した。

(3) CRISPR-Cas9法を用いたゲノム編集により *cpm2* ヘテロ接合体からCK欠損変異体、CK・JA二重変異体を作製した。これらの変異体における、15B接種後のCKの蓄積量はLC-MS/MS法により解析した。

(4) イネの病害抵抗性におけるCKとJAの機能について知見を得るため、4種の遺伝子型イネ (NMWT、*ipt3*、*cpm2*、*cpm2/ipt3*) の葉身切片に15Bをスポット接種し、病斑の実体顕微鏡観察と病斑部に侵入したいもち病菌のqPCRによるDNA (*Mo28S*)の定量を行った。また、4種の無傷イネの第4葉に15Bを噴霧接種し4日、あるいは5日後に病斑の顕微鏡観察と写真撮影を行った。

さらに15Bを噴霧接種した4種のイネ葉身切片において誘導される抵抗性反応を調べるため、接種後2日、4日のファイトアレキシン蓄積量をLC-MS/MS法で分析した。また、接種後2日における防御関連遺伝子の発現解析をqRT-PCRを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 野生型イネ NMWT、JA欠損変異体 *cpm2* の葉身切片において、非親和性 (15B) 親和性 (Ina86-137) いもち病菌接種、あるいはCuCl₂処理に応答して蓄積するCKをLC-MS/MS法により

分析し、NMWT と *cpm2* の両方において、活性型 CK の 1 つである isopentenyladenine (iP) が同等のレベルで一過的に蓄積することを示した。

(2) iP の生合成経路における鍵酵素の 1 つとして isopentenyltransferase (IPT) が考えられたため、*IPT1-8* 遺伝子の発現を既存の RNA-seq データ () を用いて解析したところ、いもち病菌接種に *IPT3* が応答性を示すことが示唆された。そこで、野生型 (NMWT) 及び *cpm2* の葉身切片に非親和性のいもち病菌 (15B) 接種を行い、接種後 2、3、4 日における *IPT3* の発現を qRT-PCR を用いて解析した。その結果、CK の蓄積レベルに対応した *IPT3* の発現が確認され、ストレス誘導の CK 蓄積を制御する鍵酵素遺伝子として *IPT3* を同定した。

(3) CRISPR-Cas9 法を用いたゲノム編集により *cpm2* ヘテロ接合体を用いて、*IPT3* の遺伝子破壊を行い *ipt3* 変異体、*cpm2/ipt3* 二重変異体を作製した。こうして得られた 2 種の CK 欠損変異体と野生型の NMWT、*cpm2* の 4 つの遺伝子型イネについて 15B 接種後の CK の蓄積量を調べた。その結果、*ipt3*、*cpm2/ipt3* における iP の蓄積量は接種後 2 日では野生型、*cpm2* と比較し顕著に減少していることが確認された。

(4) 15B をスポット接種し、5 日後のいもち病菌バイオマスを定量したところ、NMWT と *cpm2* においては差は見られなかったが、*ipt3* では微弱な増加、*cpm2/ipt3* においては顕著な増加が見られ、CK 欠損変異体ではいもち病菌に対する抵抗性が低下したことが示唆された。また、15B 噴霧接種 5 日後に顕微鏡観察したところ、NMWT では過敏細胞死による茶褐色の病斑が見られるのに対し、*cpm2/ipt3* では白い壊死病斑が見られた。こうして CK・JA 二重欠損変異体では、いもち病菌に対する抵抗性の顕著な低下が確認され、イネの病害抵抗性発現に JA と CK が、協調して重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

(5) 4 種の遺伝子型イネにおいて機能する、いもち病菌に対する防御機構に関する知見を得るため、15B 接種した場合のファイトアレキシン蓄積量、及び防御関連遺伝子の発現レベルの解析を行った。フラボノイド型ファイトアレキシンのサクラネチン生産には JA が必須であることが確認され、CK が抑制的に働いていることを示唆する結果が得られた。ジテルペン型ファイトアレキシンであるファイトカサン類の生産には CK、JA がともに部分的に関与しており *cpm2/ipt3* では NMWT の 1/5 程度に蓄積量が減少していた。もう 1 種のジテルペン型ファイトアレキシンであるモミラクトン類の生産には CK、JA の影響を確認することができなかった。防御関連遺伝子の発現解析では 4 種の遺伝子型イネにおいて、防御応答遺伝子の発現を負に制御することが示されている転写因子である *WRKY76* () の発現レベルが、mock 処理と 15B 接種とともに *cpm2/ipt3* > *ipt3* > *cpm2* NMWT であり、15B のイネ植物体に対する侵入レベルときわめてよく対応していることが判明した。今回観察された *cpm2/ipt3* 変異株における病害抵抗性の部分的な崩壊には、ファイトカサン蓄積量の部分的な低下、及び *WRKY76* の発現増強が要因になっている可能性が考えられる。

(6) 一方、本研究を行う過程で、CK や JA 処理、病原菌感染等のストレスにより誘導されるジテルペン型ファイトアレキシンの生産が暗黒下では顕著に抑制され、この抑制は光合成産物であるショ糖の外生投与で回復することを見出した。病害抵抗性を制御する因子としてのショ糖の機能についても、今後、詳細な解析を行う必要があると考えている。

<引用文献>

Yamane H (2013) Biosynthesis of Phytoalexins and Its Regulatory Mechanisms in Rice. Biosci Biotechnol Biochem, 77: 1141-1148

Wakuta S, Suzuki E, Saburi W, Matsuura H, Nabeta K, Iwai R, and Matsui H (2011) OsJAR1

- and OsJAR2 are jasmonyl-L-isoleucine synthases involved in wound- and pathogen-induced jasmonic acid signalling. *Biochem Biophys Res Commun*, **409**: 634-639
- Riemann M, Haga K, Shimizu T, Okada K, Ando S, Mochizuki S, Nishizawa Y, Yamanouchi U, Nick P, Yano M, Minami E, Takano M, Yamane H, and Iino M (2013) Identification of rice ALLENE OXIDE CYCLASE mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*, *Plant J*, **74**: 226-238
- Jiang CJ, Shimono M, Sugano S, Kojima M, Liu X, Inoue H, Sakakibara H, and Takatsuji H (2013) Cytokinins act synergistically with salicylic acid to activate defense gene expression in rice. *Mol Plant Microbe Interact*, **26**: 287-296
- Ko KW, Okada K, Koga J, Nojiri H, and Yamane H (2010) Effects of cytokinin on production of diterpenoid phytoalexins in rice. *J Pestic Sci*, **35**: 412-418
- Kawahara Y, Oono Y, Kanamori H, Matsumoto T, Itoh T, and Minami E (2012) Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. *PLoS ONE*, **7**: e4942
- Yokotani N, Sato Y, Tanabe S, Chujo T, Shimizu T, Okada K, Yamane H, Shimono M, Sugano S, Takatsuji H, Kaku H, Minami E, and Nishizawa Y (2013) WRKY76 is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. *J Exp Botany*, **64**: 5085-5097

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

宮本 皓司, 相良 朋宏, 阿部 昌太, 舘 夏美, 吉永 修平, 石塚 祐伸, 南 栄一, 湯本 絵美, 岡田 憲典, 篠村 知子, 山根 久和, イネのファイトアレキシン生産の光制御へのスクロースの関与. 植物化学調節学会第53回大会, 2018年11月2日~4日, 北海道大学農学部(北海道札幌市)

宮本 皓司, 石塚 祐伸, 南 栄一, 西澤 洋子, 加来 久敏, 湯本 絵美, 柴田 恭美, 酒澤 智子, 横田 孝雄, 朝比奈 雅志, 飯野 盛利, 岡田 憲典, 山根 久和, イネのいもち病抵抗性反応におけるサイトカイニンとジャスモン酸の関与, 第59回日本植物生理学会年会, 2018年3月28日~30日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

石塚 祐伸, 宮本 皓司, 南 栄一, 西澤 洋子, 湯本 絵美, 柴田 恭美, 酒澤 智子, 横田 孝雄, 朝比奈 雅志, 飯野 盛利, 岡田 憲典, 山根 久和, イネの病害抵抗性におけるサイトカイニンとジャスモン酸の関与, 第52回植物化学調節学会, 2017年10月27日~29日, 鹿児島大学農学部(鹿児島県鹿児島市)

相良 朋宏, 阿部 昌太, 舘 夏美, 吉永 修平, 宮本 皓司, 石塚 祐伸, 南 栄一, 湯本 絵美, 横田 孝雄, 朝比奈 雅志, 森 昌樹, 岡田 憲典, 篠村 知子, 稲垣 言要, 高野 誠, 山根 久和, イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン生産の光制御, 第52回植物化学調節学会, 2017年10月27日~29日, 鹿児島大学農学部(鹿児島県鹿児島市)

石塚 祐伸, 宮本 皓司, 篠崎 征喜, 平山 琢朗, 本江 匡, 酒澤 智子, 湯本 絵美, 柴田 恭美, 横田 孝雄, 朝比奈 雅志, 飯野 盛利, 岡田 憲典, 山根 久和, イネのフ

ファイトアレキシン生産におけるサイトカイニンの生理機能，日本農芸化学会2017年度大会，京都，2017年3月17日～20日，京都女子大学（京都府京都市）

石塚 祐伸，宮本 皓司，篠崎 征喜，平山 琢郎，本江 匡，酒澤 智子，湯本 絵美，柴田 恭美，横田 孝雄，朝比奈 雅志，飯野 盛利，岡田 憲典，山根 久和，イネのファイトアレキシン生産におけるジャスモン酸とサイトカイニンのクロストーク，第51回植物化学調節学会，2016年10月28日～30日，高知大学農林海洋科学部（高知県南国市）

本江 匡，宮本 皓司，石塚 祐伸，古賀 仁一郎，酒澤 智子，柴田 恭美，朝比奈 雅志，横田 孝雄，飯野 盛利，岡田 憲典，山根 久和，イネにおけるセレプロシド誘導のジテルペン型ファイトアレキシン生産におけるサイトカイニンの関与，第51回植物化学調節学会，2016年10月28日～30日，高知大学農林海洋科学部（高知県南国市）

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

[その他]

特になし

6．研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：岡田 憲典

ローマ字氏名：(OKADA, kazunori)

所属研究機関名：東京大学

部局名：生物生産工学研究センター

職名：准教授

研究者番号：20312241

研究協力者氏名：宮本 皓司

ローマ字氏名：(MIYAMOTO, koji)

所属研究機関名：帝京大学

部局名：理工学部

職名：講師

研究者番号：90721514

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。