

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07782

研究課題名（和文）イネ転写因子DPFによるファイトアレキシン生合成を介したストレス抵抗性機構の解析

研究課題名（英文）Characterization of stress resistance mechanism via biosynthesis of phytoalexins by rice transcription factor DPF

研究代表者

森 昌樹 (Mori, Masaki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・ユニット長

研究者番号：50192779

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：DPFノックアウト（KO）イネを用いて、塩化銅、UV、いもち病菌感染によるストレス応答的なDP生合成について、それぞれDPFに依存することを明らかにした。つぎに、DPFがイネ本来のいもち病抵抗性に関与していることを明らかにした。さらに、DPFの下流のDPがいもち病抵抗性に関与しているのかどうかを明らかにするために、4種のDP生合成初期遺伝子のKOイネを作出した

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでDPFがDP生合成のキーとなる転写因子であることは明らかになっていたが、生物的作用についての知見はなかった。本研究によりDPFはイネ本来のいもち病抵抗性に関与していることが明快に示された。また、本研究で得られた各種DP生合成変異体は、将来、イネの各DP（モミラクトン、ファイトカサン、オリザレキシン）の生物学的役割の違いを評価するうえで極めて有用なツールとなる。

研究成果の概要（英文）：We showed that abiotic stress (copper chloride treatment or UV irradiation)- and biotic stress (blast infection)-inducible expressions of DP biosynthetic genes are mediated by DPF, and that DPF is involved in innate immunity to blast fungus, using DPF-knockout (KO) rice. Moreover, rice plants knocking out four DP biosynthetic genes, respectively, were generated to reveal biological activity of each DP.

研究分野：農芸化学

キーワード：ファイトアレキシン イネ 病害抵抗性 いもち病

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

1. 研究開始当初の背景

(1)イネのジテルペン系ファイトアレキシン(DP)はいもち病感染や UV、塩化銅処理等のストレスに応答して生合成されること、抗菌活性のみならず雑草に対する成長抑制活性を有することが報告されている。

(2)我々は近年、DP 生合成のキーとなる転写因子 DPF をイネより見出し、DPF 高発現イネでは DP 生合成遺伝子群の転写活性化を介して DP を蓄積するのに対し、DPF ノックダウンイネでは根において逆に DP 生合成遺伝子の発現レベル及び DP 蓄積量が WT よりも低下することを明らかにしている (Yamamura et al., 2015)。

2. 研究の目的

本研究では上記のストレス応答的な DP 生合成が DPF に依存しているのかどうか、また、種々のストレスに対する抵抗性や雑草抵抗性に内在性の DPF や DP が関与しているのかどうかについて明らかにして抵抗性育種への可能性を探る。

3. 研究の方法

(1)各種ストレス応答的な DP 生合成が DPF に依存しているかどうかの検証

いもち病菌、塩化銅、UV 等のストレスにより DP 生合成が誘導されるので、DPF-KO イネ及び WT に各種ストレス処理し、DP 生合成遺伝子の発現量を定量することにより、各種ストレス応答的な DP 生合成が DPF に依存しているかどうかを明らかにする。遺伝子の発現量はリアルタイム PCR により定量した。

(2)非生物的ストレス抵抗性評価

塩化銅処理或いは UV 照射後の植物体の生育を比較することにより抵抗性を評価した。塩化銅処理は、水耕栽培で根から各濃度 (5, 10, 15, 20, 25 μ M) の塩化銅を吸収させることにより行った。UV は植物体に UV-C を 30cm の距離で短時間(10, 20, 30 min)照射した。

(3)病虫害ストレス抵抗性評価

病虫害抵抗性が WT に比べ増減するかどうか評価した。病原菌として、いもち病菌と紋枯病菌を用いた。いもち病菌抵抗性は噴霧処理後病斑数を計測することにより評価した。紋枯病菌抵抗性は、出穂前のイネの葉身の切葉に菌液をスポット接種し、数日後に病斑長或いは菌の DNA 量を比較することにより評価した。虫害ストレスについては農研機構・田村泰盛博士の協力により行い、イネで最重要の害虫であるトビイロウンカに対する抵抗性検定を幼苗を用いて実施した。オカボノアブラムシに対する抵抗性検定は高知大学手林博士の協力により実施した。

(4)DP の定量

DP の定量は LC-MS/MS により、東京大学・生物生産工学研究センター・岡田憲典准教授 (連携研究者) の協力により行った。

(5)雑草抵抗性評価

モミラクトンにはイヌビエ (水田雑草)、シロイヌナズナ、レタス等に対する生育抑制活性が報告されているので、まず DPF-OX/KO イネ、WT イネを栽培した水耕液を用いてそれぞれ作製した培地上でそれらの植物を栽培し、生育抑制活性を評価する。生育抑制活性は幼根の長さ等を測定することにより評価した。

(6)DP 生合成の初期遺伝子の KO イネの作製

KO イネの作製には、ゲノム編集法の CRISPR/Cas9 法を利用し実施した。モミラクトン欠損イネ、ファイトカサン欠損イネをそれぞれ作出するために、DP 生合成の初期の CPS2, CPS4, KSL7, KSL4

遺伝子 (図 1) について ORF にフレームシフト変異を導入することにより KO イネを作製した。

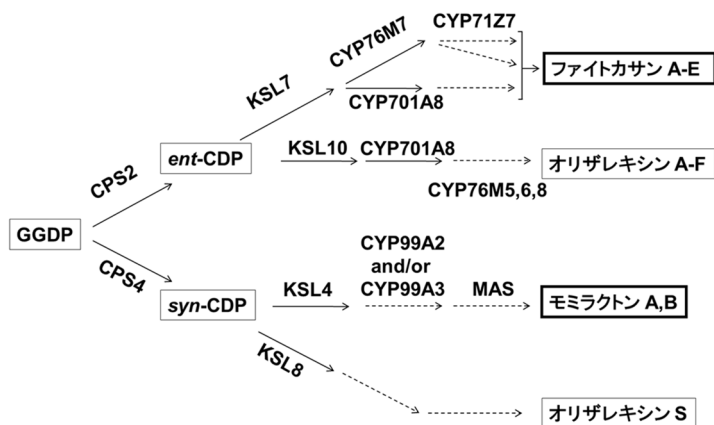


図 1 イネにおけるジテルペン系ファイトアレキシンの生合成経路と生合成遺伝子

4. 研究成果

(1) 各種ストレス応答的な DP 生合成が DPF に依存しているかどうかの検証

塩化銅、UV、いもち病菌感染等のストレスにより誘導される DP 生合成が、DPF に依存しているかどうかを検証するために、DPF-KO イネ及び WT に同ストレス処理を行い、DP 生合成遺伝子の発現量を定量した。WT イネでは DP 生合成遺伝子 CPS2 及び CPS4 の遺伝子発現が増大したのに対し、KO イネではほとんど増大しなかったため、塩化銅、UV、いもち病感染により誘導される DP 生合成は、DPF に依存することが明らかになった。

(2) DPF の非生物的ストレス抵抗性への関与

塩化銅処理及び UV 照射に対する抵抗性検定を DPF-KO イネで実施した。両処理共に処理後の植物体の生育を比較したが、WT と比較して抵抗性に顕著な差は認められなかった。

(3) DPF の病虫害ストレス抵抗性への関与

病害抵抗性への寄与については、紋枯病抵抗性評価を実施したが、WT と KO イネで大きな差は認められなかった。害虫のトビイロウンカ、オカボノアブラムシの吸汁に対しても同様に抵抗性は認められなかった。一方、DPF-KO イネではいもち病抵抗性が低下していたため、DPF はイネが本来有するいもち病に対する抵抗性にも関与していることが明らかになった (図 2)。

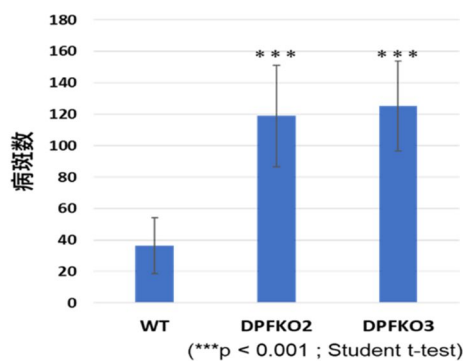


図 2 DPF-KO イネにおけるいもち病抵抗性

(4) DP の根からの滲出量の定量

モミラク톤は自然界でイネの根から土壌中に滲出しているため、本来は根への病原菌感染や土壌病原菌に対する防御物質として作用している可能性が考えられる。よって DP の根からの滲出量を水耕栽培を行い定量したところ、OX イネでは WT に対しモミラク톤の顕著な増大が認められた。

(5) DPF の雑草抵抗性への関与

DPF-OX/KO イネ、WT イネを栽培した水耕液を用いてそれぞれ作製した寒天培地上でイヌビエや

シロイヌナズナを栽培し、生育抑制活性を根の伸長で評価した。しかしながら WT に比べ有意な差を見出すことはできなかった。つぎに寒天培地中に *DPF-KO*、*DPF-OX* 或いは WT イネを植え、周りにレシーバー植物としてシロイヌナズナを配置するプラントボックス法でアレロパシー活性（生育抑制活性）を評価したが、やはり *DPF-KO/OX* と WT で顕著な差は認められなかった。

(6) DP 生合成の初期遺伝子の KO イネの作製

(3)で示された *DPF-KO* イネにおけるいもち病抵抗性の低下に、どの DP の欠損が関与しているのかを明らかにするために、モミラクトン欠損イネ、ファイトカサン欠損イネ等を作成することとした。DP 生合成の初期の *CPS2*、*CPS4*、*KSL7*、*KSL4* 遺伝子について、CRISPR/Cas9 法のターゲット配列を各 2-3 種類設計し、それぞれの遺伝子について 2 種類ずつ KO イネを作成した。さらに、得られた KO 系統の多くで、CRISPR/Cas9 配列を除去した変異ホモ系統を取得し採種した。

(7) 各種 KO イネにおける DP の定量

まず *DPF-KO* イネについて塩化銅処理後の DP 蓄積量を定量したところ、WT では MLs および PCs が蓄積しているのに対し、*DPF-KO* では MLs、PCs 共にほとんど蓄積が認められなかったことから、ロックアウトが想定通りに機能していることが示された。つぎに、DP 生合成の初期遺伝子 *CPS2*、*CPS4* の KO イネについて、同様に DP 蓄積量を定量した。すると *CPS2-KO* では MLs は蓄積しているものの PCs 蓄積は認められず、逆に *CPS4-KO* では PCs は蓄積しているものの MLs 蓄積が認められなかったため、ロックアウトが想定通りに機能していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Maeda Satoru, Dubouzet Joseph G., Kondou Youichi, Jikumaru Yusuke, Seo Shigemi, Oda Kenji, Matsui Minami, Hirochika Hirohiko, Mori Masaki	4. 巻 9
2. 論文標題 The rice CYP78A gene BSR2 confers resistance to Rhizoctonia solani and affects seed size and growth in Arabidopsis and rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-018-37365-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 MORI Masaki	4. 巻 55
2. 論文標題 イネのファイトアレキシン生合成を制御する新たな転写因子の発見	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 230～231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.55.230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Miki Wada, Tomonori Shinya, Ivan Galis, Rika Ozawa, Gen-ichiro Arimura, Masaki Mori, Hideaki Nojiri, Kazunori Okada
2. 発表標題 Regulators of stress-inducible prenyldiphosphate synthases that define types of terpenoids production in Rice
3. 学会等名 TERPNET 2019 - The 14th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic Biology of Isoprenoids（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川一輝・山村千紘・和田美樹・富山詩歩・前田哲・岡田憲典・鎌倉高志・○森昌樹
2. 発表標題 イネのジテルペン系ファイトアレキシン生合成遺伝子のノックアウトイネの作出と解析
3. 学会等名 植物化学調節学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川一輝・山村千紘・和田美樹・富山詩歩・前田哲・岡田憲典・鎌倉高志・○森昌樹
2. 発表標題 転写因子DPFのイネ本来のいもち病抵抗性への関与
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 石川一輝 ^{1,2} ・山村千紘 ^{1,2} ・田淵雄夢 ³ ・前田哲 ¹ ・岡田憲典 ³ ・鎌倉高志 ² ・森昌樹 ¹
2. 発表標題 イネの転写因子DPFは非生物的ストレス誘導的なジテルペン型ファイトアレキシンの生合成に関与している
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プレスリリース：Scientific Reports の論文発表後、2019.3に「イネ紋枯病に強くなり、かつ花が大きくなる遺伝子を発見」というプレスリリースを行い、2019年度農業技術10大ニュースの第9位に選ばれた。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	岡田 憲典 (Okada Kazunori) (20312241)	東京大学・生物生産工学センター・准教授 (12601)	