

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08191

研究課題名(和文)細胞壁マーカーによる病害診断系と抵抗性穀類作出の技術基盤構築

研究課題名(英文) Development of disease diagnosis system using cell wall markers and production of disease resistant cereals

研究代表者

岩井 宏暁 (Iwai, Hiroaki)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：30375430

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)：病害による植物の生体防御機構の理解は、植物の資源利用効率の向上に必須である。現在までに、病害による植物の生体防御機構の細胞壁空間についての知見は、その細胞壁構造の複雑さ故に、ほとんど明らかにされてこなかった。本研究課題の目的は、細胞壁バイオマーカーの同定と細胞壁改変新規病害抵抗性作物作出の技術基盤構築にある。細胞壁改変イネライブラリーから病害抵抗性向上に有効な株をスクリーニングし、病害応答性の向上したペクチンとヘミセルロースの改変イネ2種類を得た。また、いもち病感染細胞ダイセクションマイクロアレイによる網羅解析により、病害応答性にリンクする有力な受容体キナーゼ(RLCK)を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いもち菌等の原系状菌は宿主である植物細胞の細胞壁を、酵素分解や物理的圧力等によって侵入する。侵入した後、どのように細胞壁が変化するかについて多くの報告があり、現在まで細胞壁はいもち菌が侵入した後の“結果”にすぎないと考えられてきた。しかし本研究により、ペクチンとヘミセルロースという細胞壁を改変した植物に対していもち菌を感染させた場合、その抵抗性が向上した。このことから、細胞壁構造は単なる“結果”ではなく、いもち菌の抵抗性を得る“原因”となっていることが示された。また網羅的解析から、新たな細胞壁マーカーである受容体キナーゼが同定できた。これらを通して新たな細胞壁を用いた病害対策育種が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Understanding the defense mechanism of plants against diseases is important for improving the resource utilization efficiency of crops. The cell wall space on the defense mechanism against diseases of plants were not well understood because of the complexity of the cell wall structure. The aim of this research is to identify the biomarkers of cell wall in the defence systems and to produce the new disease-resistant crops via cell wall modification. Rice effective for improving disease resistance were screened from the cell wall modified rice library. We identified the pectin and hemicellulose-modified rice were improved for disease responsiveness. We also identified candidate receptor kinase (RLCK) linked to disease responsiveness by comprehensive analysis using blast-infected cell dissection microarray.

研究分野：植物生理学

キーワード：細胞壁 いもち病 病害応答 イネ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球規模の気候変動を背景とした食料の安定供給のためには、植物の環境応答機構を理解すると同時に、その成果を下にデザインされた遺伝子組換え植物の作成と利用が必須となると考えられている。環境応答機構の中でも、特に病害による植物の生体防御機構の理解は、植物の資源利用効率の向上に大きく貢献するものと考えられている。現在までに、植物の防御応答に関して様々な抵抗性遺伝子について解析が行われてきた。しかし、細胞内でのプログラムについての研究がほとんどである。細胞外つまり細胞壁空間についての植物の病害抵抗性についての知見は、ここ30年大きな進歩がなされてきていないのが現状である。

宿主植物の細胞外から攻撃をかける植物病原体との最初の攻防は細胞壁で行われる。宿主細胞は細胞外で病原体を認識し、即座にそのフロントラインを固めなければならない。一方で病原体はその認識を避けるために、病原体由来物質をマスキングしたり、固められたフロントラインを攻撃するために加水分解酵素等を細胞壁に送り込んだりする。しかし、これまでに同定された因子は数少なく、細胞外での攻防の機構については、ほとんど明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

病害による植物の生体防御機構の理解は、細胞外つまり細胞壁空間についての知見は、その細胞壁構造の複雑さ故に、ほとんど明らかにされてこなかった。本研究課題の目的は、細胞壁バイオマーカーの同定と作物の病害抵抗性診断系の構築、そして細胞壁改変することにより新規病害抵抗性作物作出の技術基盤構築にある。戦略として、1)いもち病感染細胞ダイセクションマイクロアレイによる網羅解析により有望な細胞壁マーカーを同定し、それらに関連した細胞壁改変イネを作成、2)申請者が既に有している細胞壁改変イネライブラリーから病害抵抗性向上に有効な株をスクリーニング、3)これらの結果をもとに細胞壁と病害抵抗性との関連性について数理予測モデルを構築することにより、新たな病害応答性向上基盤技術構築を目指す。

3. 研究の方法

農林水産省農業生物資源研究所、南栄一博士との共同研究で、レーザーマイクロダイセクションによるサンプリングにより、いもち菌(*Magnaporthe oryzae*)に感染された細胞におけるマイクロアレイによる網羅的解析を用い、感染後、24時間以内の初期に誘導されてくる細胞壁ネットワーク関連遺伝子の調査を行うことにより、新規の病害応答に重要な細胞壁マーカーのスクリーニングと同定を行った。また病害応答向上に寄与すると考えられた細胞壁マーカーを用いた新規細胞壁改変イネの作出を行った。また、先行しているアラビノフラノシダーゼ(GH51)過剰発現イネにおいて、物理的強度、塩ストレス応答、いもち病害抵抗性が向上することについてさらなる解析を行った。また、ペクチン関連23遺伝子、ヘミセルロース関連12遺伝子、細胞壁構造タンパク質関連5遺伝子についての細胞壁改変イネライブラリーを用いて、病害抵抗性に重要な細胞壁改変イネを用いた病害抵抗性試験を行なった。また、これらの結果をもとに細胞壁と病害抵抗性との関連性について数理予測モデルを構築を計画した。

4. 研究成果

いもち病感染細胞レーザーマイクロダイセクションマイクロアレイ網羅的解析による新規病害抵抗性細胞壁マーカーの同定と病害抵抗性向上細胞壁改変イネの作出

農林水産省生物研の南栄一博士のご協力のもと、レーザーマイクロダイセクションによるサンプリングにより、いもち菌に感染された細胞におけるマイクロアレイによる網羅的解析を行こ

とで、感染後、24 時間以内の初期に誘導されてくる細胞壁ネットワーク関連遺伝子の調査を行った。その結果、病害応答性にリンクする有力なレセプタータイプキナーゼ(RLCK)を 2 遺伝子まで絞り込んだ。これら 2 つのレセプタータイプキナーゼは、オリゴガラクトuron酸とキシロオリゴ糖によって、誘導がかかることを示した。

細胞壁改変イネライブラリーを用いた病害抵抗性向上細胞壁改変イネの選抜

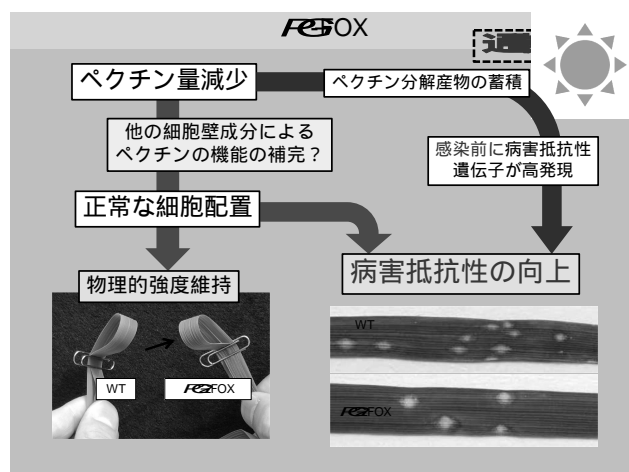
現在までに、ペクチン関連 23 遺伝子、ヘミセルロース関連 12 遺伝子、細胞壁構造タンパク質関連 5 遺伝子についての種々の細胞壁改変イネライブラリーを用いて、病害抵抗性に重要な細胞壁改変イネを用いた病害抵抗性試験を行なった。その結果、イネのヘミセルロースであるキシランを減少させることにより、いもち病抵抗性が変化した。アラビノフラノシダーゼによるキシラン改変では、いもち病抵抗性は向上し、キシロシダーゼによる改変では逆に低下した。また、ペクチンや細胞壁タンパク質といった他の細胞壁成分は、いもち病抵抗性に影響するのかどうかについて確認するため、キシラン以外の細胞壁成分 (Mix-linked グルカン、ペクチン、細胞壁タンパク質: グリシンリッチプロテイン、プロリンリッチプロテイン、スレオニンリッチプロテイン) についてもいもち病抵抗性の調査を行ったところ、ペクチン分解酵素を過剰発現させたイネにおいて、いもち病抵抗性が向上していた。以上により、ペクチンとキシランが、いもち菌への抵抗性反応に貢献している可能性が示唆された。

アラビノフラノシダーゼ過剰発現イネを用いた防御応答機構の解析

細胞壁改変イネの中でも既にアラビノフラノシダーゼ(GH51)過剰発現イネにおいて、セルロース含量が増加していたことが原因で、物理的強度 (PLoS ONE (2013))、いもち病害抵抗性が向上することを確認された。このイネでは、感染前から WARKY などの抵抗性遺伝子が発現していた。このイネは、セルロース含量が高いこともありバイオマス原料としても利用価値が高い。感染する前から抵抗性遺伝子が増加していたことから、細胞壁改変により増加したキシラン分解物質がエリター活性を有するのかどうかについて、イネ培養細胞を用いて分解物を投与して調べたところ、病害応答性の指標である活性酸素の発生が確認された。

その他細胞壁改変イネの作出と解析

細胞壁改変イネライブラリーを用いた病害抵抗性向上細胞壁改変イネの選抜により、キシランの他に、ペクチン分解酵素の過剰発現イネが病害抵抗性が向上していたことから、より詳細に解析した。ペクチン分解酵素 (OsPG) をユビキチンプロモーターにより恒常的に高発現させたイネ OsPG-FOX では OsPG 遺伝子の高い発現量と約 4 倍の PG 酵素活性が確認された。弱光条件下ではペクチン量が約 70%減少し、葉に細胞間隙が多く観察され、葉の物理的強度も低下していた。イネいもち病菌の感染試験では、病斑の出現頻度が増加するが、重症化しにくい傾向が観察された。一方、通常光条件下では、細胞間隙も観察されず、物理的強度も変化なく正常な生育を示した。一方で、いもち病を感染試験では、病害抵抗性が向上していた。また OsPG-FOX では病感染前から病害抵抗



性遺伝子が高発現していた。またイネ培養細胞においてオリゴガラクトン酸による病害応答および抵抗性遺伝子発現も確認された。以上の結果から、ペクチンはその含量が少ないイネにおいても細胞接着性や病害応答性にも機能していたが、弱光下で特に影響が強いことが示唆された。

細胞壁マーカー vs 病害抵抗性数理予測モデルの構築および検証

病害抵抗性に有効な細胞壁マーカーの同定結果では、ペクチンおよびキシランが有力であり、レセプタータイプキナーゼ(RLCK)が関与することまでは明らかとなったが、数理予測モデルを構築までには至らず今後の重要な課題である。

いもち菌等の原糸状菌は宿主である植物細胞の細胞壁を、酵素分解や物理的圧力等によって侵入する。侵入した後、どのように細胞壁が変化するかについて多くの報告があり、現在まで細胞壁はいもち菌が侵入した後の“結果”にすぎないと考えられてきた。しかし本研究により、ペクチンとヘミセルロースという細胞壁を改変した植物に対していもち菌を感染させた場合、その抵抗性が向上した。このことから、細胞壁構造は単なる“結果”ではなく、いもち菌の抵抗性を得る“原因”となっていることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Honta Hideyuki, Inamura Takuya, Konishi Teruko, Satoh Shinobu, Iwai Hiroaki	4. 巻 131
2. 論文標題 UDP-arabinopyranose mutase gene expressions are required for the biosynthesis of the arabinose side chain of both pectin and arabinoxyloglucan, and normal leaf expansion in <i>Nicotiana tabacum</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 307 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-017-0985-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Tadashi, Matsuoka Keita, Ono Hiroshi, Ohnishi-Kameyama Mayumi, Yaoi Katsuro, Nakano Yoshimi, Ohtani Misato, Demura Taku, Iwai Hiroaki, Satoh Shinobu	4. 巻 176
2. 論文標題 Characterization of xylan in the early stages of secondary cell wall formation in tobacco bright yellow-2 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 381 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2017.08.108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagayama Teruki, Nakamura Atsuko, Yamaji Naoki, Satoh Shinobu, Iwai Hiroaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Changes in the Distribution of Pectin in Root Border Cells Under Aluminum Stress.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1216 ~ 1223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01216. eCollection 2019	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8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村 郷子, 豊田 一希, 小原 崇司, 中村 敦子, 住吉 美奈子, 出崎 能丈, 渋谷 直人, 賀来 華江, 南 栄一, 佐藤 忍, 岩井 宏暁
2. 発表標題 wall-associated kinase を介したキシロオリゴ糖誘導性病害応答機構の探索
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊田 一希, 竹内 春樹, 木村 郷子, 小原 崇司, 佐藤 淳也, 中村 敦子, 出崎 能丈, 渋谷 直人, 賀来 華江, 南 栄一, 佐藤 忍, 岩井 宏暁
2. 発表標題 ペクチン分解酵素過剰発現イネを用いたオリゴラクツロン酸誘導性病害応答
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内 春樹, 木村 郷子, 小原 崇司, 佐藤 淳也, 中村 敦子, 出崎 能丈, 渋谷 直人, 賀来 華江, 横山 隆亮, 西谷 和彦, 南 栄一, 佐藤 忍, 岩井 宏暁
2. 発表標題 異なる光条件におけるペクチン分解酵素過剰発現イネを用いたオリゴラクツロン酸誘導性病害応答
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村 郷子, 小原 崇司, 中村 敦子, 住吉 美奈子, 出崎 能丈, 渋谷 直人, 賀来 華江, 南 栄一, 佐藤 忍, 岩井 宏暁
2. 発表標題 キシラン改変イネを用いたキシロオリゴ糖による病害応答機構の探索
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長山 照樹, 中村 敦子, 山地 直樹, Jianfeng Ma, 佐藤 忍, 古川 純, 岩井 宏暁
2. 発表標題 イネのアルミニウム耐性における根冠脱落細胞のペクチンの機能
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田 一希, 竹内 春樹, 木村 郷子, 小原 崇司, 佐藤 淳也, 中村 敦子, 出崎 能丈, 渋谷 直人, 賀来 華江, 南 栄一, 佐藤 忍, 岩井 宏暁
2. 発表標題 イネにおけるオリゴガラクトン酸により誘導される Wall- associated kinaseを介した病害 応答性機構の探索
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 佑哉, 木村 郷子, 豊田 一希, 小原 崇司, 中村 敦子, 住吉 美奈子, 出崎 能丈, 渋谷 直人, 賀来 華江, 南 栄一, 佐藤 忍, 岩井 宏暁
2. 発表標題 wall-associated kinase を介したキシロオリゴ糖誘導性病害応 答機構の探索
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長山 照樹, 中村 敦子, 山地 直樹, Jianfeng Ma, 佐藤 忍, 古川 純, 岩井 宏暁
2. 発表標題 イネの根冠脱落細胞のペクチンによるアルミニウム毒性緩和機構
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----