

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14399

研究課題名（和文）イネのファイトアレキシン生産に関与するジャスモン酸受容体複合体の同定

研究課題名（英文）Identification of jasmonate receptor complex involved in phytoalexin production in rice

研究代表者

宮本 皓司 (MIYAMOTO, Koji)

帝京大学・理工学部・講師

研究者番号：90721514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、イネの抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシンの生産の制御に注目した。これまでにイネのファイトアレキシン生産に関与することが明らかになっていたOsCO12を足掛かりとして、OsCO12と特異的に相互作用するOsJAZaおよびOsJAZbを見出した。また、OsJAZbがファイトアレキシン生産を制御するマスター転写因子の発現を抑制することも明らかにした。以上のことから、OsCO12-OsJAZb複合体がイネの抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシンの生産の制御に関与するジャスモン酸受容体であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、イネの3つのCOIが異なる生理機能を示すことを明らかにするとともに、ファイトアレキシン生産の制御に関与するCOI-JAZ受容体複合体の候補を明らかにした。この成果は、植物における生理活性分子の受容・シグナル伝達機構の理解に貢献するものである。また、ジャスモン酸が持つ植物の生育阻害などの負の作用を引き起こさずに、病害抵抗性のみを誘導する技術、分子の開発の際の基礎的な知見となりうる。このため、新規な病害抵抗性賦活技術への応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the regulatory mechanism of the production of phytoalexins, which are antimicrobial secondary metabolites in rice. OsCO12 is involved in phytoalexin production in rice. Here, we found OsJAZa and OsJAZb that specifically interact with OsCO12. We also found that OsJAZb represses the expression of a master transcription factor that regulates phytoalexin production. These results suggest that the OsCO12-OsJAZb complex is a jasmonic acid receptor regulating phytoalexin production in rice.

研究分野：植物化学

キーワード：イネ ファイトアレキシン 植物ホルモン ジャスモン酸 受容体 タンパク質間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンであるジャスモン酸は、稔性、老化の促進、伸長成長の抑制などに関与するとともに、病虫害などに対するストレス応答に関与する。イネにおいて、抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシンの生産は代表的な病害抵抗性反応の一つである。イネにおけるファイトアレキシン生産の制御においては、ジャスモン酸シグナル伝達が重要な働きをすることが知られている。

ジャスモン酸の活性型であるジャスモン酸イソロイシン (**JA-Ile**) は、**COI-JAZ** 受容体複合体によって認識される。**JA-Ile** が高濃度で存在すると、**COI** が **JAZ** と **JA-Ile** を介して複合体を形成する。すると、**JAZ** がユビキチン化を受けた後にプロテアソームにおいて分解される。**JAZ** はコリプレッサーとしても機能しており、**JAZ** が分解されることにより、**MYC2** などの下流転写因子が活性化する。その結果、ジャスモン酸応答性遺伝子の転写が誘導される。

イネにおいては、3つの **COI** 遺伝子 (**OsCOI1a**, **OsCOI1b**, **OsCOI2**) がゲノム上に存在している。これらの3つの **COI** 遺伝子の変異株をゲノム編集により作製したところ、**oscoi2** 変異株において、**JA** 誘導的なファイトアレキシン生産が顕著に抑制されていた。このことから、イネのファイトアレキシン生産の制御に3つの **COI** のうち **OsCOI2** が必須であることが明らかになっていた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、イネのファイトアレキシン生産の **OsCOI2** を介した制御機構の解明を目的とした。まず、**OsCOI2** と特異的に相互作用するイネ **JAZ** の同定を行った。次に、同定した **JAZ** がイネのファイトアレキシン生産の制御に関与するか検討を行った。

また、稔性、老化の促進、伸長成長の抑制について、イネの3つの **COI** が関与するかをそれぞれ検討することにした。

## 3. 研究の方法

### (1) **COI-JAZ** の相互作用の解析

**COI-JAZ** の相互作用の解析は、共免疫沈降法により行った。**COI** タンパク質は、昆虫細胞において、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (**GST**) との融合タンパク質として発現させた。**JAZ** は、**COI** との相互作用に関与する **Jas** ドメインを含む部分ペプチドを人工合成して用いた。**JAZ** ペプチドはフルオレセインで標識を行った。

**GST-COI** および **JAZ** を混合し、さらにリガンドとして **JA-Ile** を加えた。その後、抗フルオレセイン抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降後のタンパク質をウェスタンブロッティングに供して、抗 **GST** 抗体によって **GST-COI** が回収されているかを解析した。

### (2) **JAZ** のファイトアレキシン生産の抑制機能の解析

イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン生産を誘導するマスター転写因子として **DPF** が知られている。そこで、**DPF** 遺伝子の上流域にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターを用いて、**DPF** の転写活性を評価することにした。**DPF** 遺伝子の転写は **OsMYC2** 転写因子によって誘導されるため、エフェクターとして **OsMYC2** を共導入することで、レポーター活性の上昇が誘導される。ここに二つ目のエフェクターとして **JAZ** を導入することによって、**OsMYC2** による **DPF** の転写誘導が **JAZ** によって抑制されるかを解析した。

イネの葉身に対して、レポーターおよびエフェクターコンストラクトをパーティクルガンにより一過的に導入した。そして、1日後の葉身由来の粗タンパク抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定することで、**DPF** の転写活性を評価した。

### (3) イネの3つの **COI** の生理機能の解明

イネの3つの **COI** について、ゲノム編集を用いて作製したそれぞれの変異株を用いた。稔性については、それぞれの変異株の種子の稔実率で評価した。老化の促進については、それぞれの変異株の葉身に対して、ジャスモン酸メチルを処理した後に、クロロフィルの含有量を測定することで評価した。また、伸長成長の抑制については、それぞれの変異株の種子をジャスモン酸を含む寒天培地で生育させ、芽生えの第二葉鞘および根の長さを測定した。

## 4. 研究成果

### (1) **COI-JAZ** の相互作用の解析

イネの3つの **COI** (**OsCOI1a**, **OsCOI1b**, **OsCOI2**) に対して、**JAZ** が相互作用するかを共免疫沈降法によって解析を行った。その結果、2種の **JAZ** (**OsJAZa** および **OsJAZb**) が、**OsCOI2** と **JA-Ile** 依存的に結合するのに対し、**OsCOI1a** および **OsCOI1b** とは結合しないことを見出した (図1)。**OsJAZc** をはじめとするその他の **JAZ** は、イネの3つの **COI** のいずれとも **JA-Ile** 依存的に結合した (図1)。このことから、**OsCOI2** は **JA** 誘導的なファイトアレキシン生産に

必須であることから、**OsCOI2** 選択的に結合する **OsJAZa** および **OsJAZb** がファイトアレキシン生産の制御に関与することが予想された。

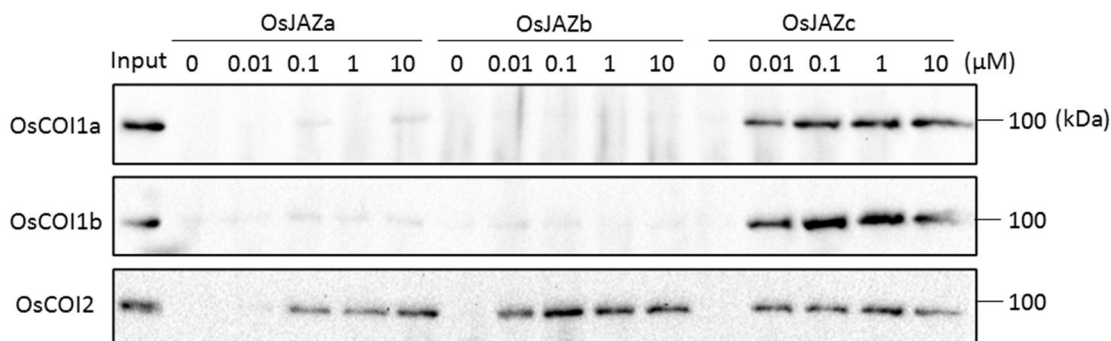


図1 共免疫沈降法による **COI** と **JAZ** の相互作用解析  
リガンドとして、(+)-7-*iso*-ジャスモン酸イソロイシンを **0~10 μM** の濃度で加えた。

## (2) **OsJAZb** のファイトアレキシン生産の抑制機能の解析

**DPF** 遺伝子の upstream にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターの活性を指標にして、**OsMYC2** による **DPF** の転写誘導が **JAZ** によって抑制されるかを評価した。まず、レポーターを単独で導入した場合と比較して、**OsMYC2** をエフェクターとして導入することによって **DPF** の転写活性が顕著に誘導された。そして、**OsMYC2** とともに **OsJAZb** をエフェクターとして共導入したところ、**OsMYC2** 単独の場合と比較して **DPF** の転写活性が抑制された。このことから、**OsJAZb** は **OsMYC2** の機能を抑制することにより、ジテルペン型ファイトアレキシン生産を誘導するマスター転写因子をコードする **DPF** 遺伝子の転写を抑制することが示唆された。

(1) および (2) の成果から、イネのファイトアレキシン生産の制御には、**OsCOI2/OsJAZb** が関与することが強く示唆された。

## (3) イネの3つの **COI** の生理機能の解明

イネの3つの **COI** (**OsCOI1a**, **OsCOI1b**, **OsCOI2**) の変異株について、種子の稔実率を計測した。その結果、*oscoi2* 変異株では稔実率が数%程度に低下していた。一方で、*oscoi1a* 変異株および *oscoi1b* 変異株については、稔実率は野生型株と同程度であった。以上のことから、稔性についても、**OsCOI2** が主要に関与することが明らかになった。

次に、それぞれの変異株におけるジャスモン酸メチルを添加した後の老化の促進について解析した。*oscoi2* 変異株では、ジャスモン酸メチルを添加した後のクロロフィルの分解が野生型株と比較して顕著に抑制されていた。一方で、*oscoi1a* 変異株および *oscoi1b* 変異株については、ジャスモン酸メチル添加後に野生型株と同程度にクロロフィルの分解が見られた。これらのことから、ジャスモン酸による老化の促進についても、**OsCOI2** が主要に関与することが明らかになった。

また、それぞれの変異株をジャスモン酸を添加した寒天培地で生育させた後の第二葉鞘および根の長さを測定した。第二葉鞘の長さについては、いずれの変異株においても野生型株と比較して大きな差はなかった。このことから、第二葉鞘の伸長成長の制御に複数の **COI** が冗長的に関与している可能性が考えられた。そこで、稔性を保持している *oscoi1a* 変異株および *oscoi1b* 変異株を交配させることで、*oscoi1a/b* 二重変異株を作製した。*oscoi1a/b* 二重変異株をジャスモン酸を添加した寒天培地で生育させた場合、第二葉鞘の伸長の抑制が緩和されていた。このことから、第二葉鞘の伸長成長の制御に **OsCOI1a** および **OsCOI1b** が冗長的に関与している可能性が考えられた。

一方、根の長さについては、*oscoi2* 変異株で伸長の抑制が見られなかった。しかし、*oscoi1a* 変異株および *oscoi1b* 変異株については、野生型株と同程度に根の伸長が抑制されていた。これらのことから、根の伸長成長の制御には **OsCOI2** が主要に関与していることが明らかになった。

以上のことから、イネの芽生えにおけるジャスモン酸による伸長成長の抑制について、葉鞘と根でジャスモン酸の受容およびシグナル伝達機構が異なる可能性が考えられた。(1) で見出した **JAZ** との結合特異性の差が、これらのイネ **COI** の生理機能の違いの原因となっている可能性が考えられる。

その他の組み合わせの多重変異株についても、ゲノム編集を用いて作製しており、二重変異株と **OsCOI** 三重変異株の再分化個体を得ている。これらの変異株はイネのジャスモン酸シグナル伝達機構を解明する今後の研究において有用なツールとなりうる。

## (4) ハイゴケにおける **OPDA** シグナル伝達因子の機能解析

イネが生産するファイトアレキシンであるモミラクトン類は、コケ植物であるハイゴケも生産することが知られている。そこで、関連研究としてハイゴケにおけるモミラクトン生産の制御機構について解析を行った。この関連研究から得られる成果は、イネのファイトアレキシン生産

の制御機構を理解するのに役立つだけでなく、植物における化学防御機構の進化の解明に資すると考えられる。

ハイゴケにおいては、ジャスモン酸処理によってモミラクトン生産は誘導されない。しかし、種子植物におけるジャスモン酸の前駆体であるオキシフィットジエン酸(**OPDA**)を処理することで、ハイゴケのモミラクトン生産が誘導される。コケ植物のモデルであるゼニゴケにおいては、**OPDA**よりも炭素数が2つ少ない**dinor-OPDA**が**COI-JAZ**受容体のリガンドとして認識され、下流の応答を誘導することが知られている。そこで、ハイゴケにおける**OPDA**および**dinor-OPDA**の機能を解析するとともにハイゴケの**OPDA**シグナル伝達因子の探索と機能解析を行った。

まず、ハイゴケに対して傷害処理を行った後の**OPDA**類および**JA**の内生量を測定した。その結果、**OPDA**および**dinor-OPDA**が傷害応答的に蓄積していた。**JA**についても検出されたが、その内生量は**OPDA**の1/100程度であった。また、ハイゴケに対して**OPDA**もしくは**dinor-OPDA**を処理すると、ハイゴケ**JAZ**遺伝子の転写が誘導された。以上のことから、ハイゴケにおいても**OPDA**類がシグナル分子として機能する可能性が考えられる。

また、ハイゴケにおける**COI**、**JAZ**、**MYC2**をクローニングするとともに、**JAZ-MYC2**が相互作用することを示した。このことから、ハイゴケにおいても**OPDA**シグナル伝達因子が機能的に保存されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Miyamoto Koji, Matsumoto Tomoharu, Yumoto Emi, Sakazawa Tomoko, Yokota Takao, Yamane Hisakazu, Uchida Kenichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Facile preparation of optically active jasmonates and their biological activities in rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 876 ~ 881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1569500	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 Inagaki Hideo, Miyamoto Koji, Ando Noriko, Murakami Kohei, Sugisawa Koki, Morita Shion, Yumoto Emi, Teruya Miyu, Uchida Kenichi, Kato Nobuki, Kaji Takuya, Takaoka Yousuke, Hojo Yuko, Shinya Tomonori, Galis Ivan, Nozawa Akira, Sawasaki Tatsuya, Nojiri Hideaki, Ueda Minoru, Okada Kazunori	4. 巻 12
2. 論文標題 Deciphering OPDA signaling components in the momilactone-producing moss Calohyphnum plumiforme	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 688565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.688565	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲垣 秀生, 湯本 絵美, 朝比奈 雅志, 内田 健一, 林 謙吾, 加治 拓哉, 高岡 洋輔, 上田 実, 岡田 憲典, 山根 久和, 宮本 皓司
2. 発表標題 イネにおけるCOI1-JAZ受容体複合体の機能解析
3. 学会等名 第62回植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣 秀生, 湯本 絵美, 朝比奈 雅志, 内田 健一, 林 謙吾, 加治 拓哉, 高岡 洋輔, 上田 実, 岡田 憲典, 山根 久和, 宮本 皓司
2. 発表標題 イネにおけるジャスモン酸イソロイシン受容体COI1-JAZの機能分化に関する研究
3. 学会等名 植物化学調節学会第55回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣秀生、伊藤響、福本有貴、矢島彩花、Xi Chen、下里美由紀、八セツ絵美、畠山幸大、平栗優子、石塚祐伸、酒澤智子、湯本絵美、朝比奈雅志、内田健一、林謙吾、大浦早紀、齊藤里菜、加治拓哉、石丸泰寛、高岡洋輔、上田実、岡田憲典、山根久和、宮本皓司
2. 発表標題 イネのジャスモン酸受容体COI1ホモログの機能解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第54回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲垣秀生、伊藤響、福本有貴、矢島彩花、Xi Chen、石塚祐伸、酒澤智子、湯本絵美、朝比奈雅志、内田健一、林謙吾、大浦早紀、齊藤里菜、加治拓哉、石丸泰寛、高岡洋輔、上田実、岡田憲典、山根久和、宮本皓司
2. 発表標題 イネにおける3種のCOI1ホモログの機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣秀生、伊藤響、福本有貴、矢島彩花、Xi Chen、下里美由紀、八セツ絵美、畠山幸大、平栗優子、石塚祐伸、酒澤智子、湯本絵美、朝比奈雅志、林謙吾、石丸泰寛、高岡洋輔、上田実、岡田憲典、山根久和、宮本皓司
2. 発表標題 イネにおけるジャスモン酸受容体構成因子COI1ホモログの機能解析
3. 学会等名 第60回植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲垣秀生、伊藤響、福本有貴、矢島彩花、Xi Chen、下里美由紀、八セツ絵美、畠山幸大、平栗優子、石塚祐伸、酒澤智子、湯本絵美、朝比奈雅志、朝比奈雅志、森昌樹、岡田憲典、山根久和、山根久和、宮本皓司
2. 発表標題 ジャスモン酸受容体OsCOI1cを介したイネのファイトアレキシン生産の制御機構の解明
3. 学会等名 植物化学調節学会第53回大会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------