

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14469

研究課題名(和文) 紋枯病に対する植物の抵抗性発現機構の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of plant disease resistance to sheath blight

研究代表者

香西 雄介 (Kouzai, Yusuke)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：50783502

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)：植物ホルモンであるサリチル酸(SA)は、イネ科植物に紋枯病抵抗性を誘導する。本研究では、SA依存性な紋枯病抵抗性の分子基盤の解明を目的とした。BTHはSAの機能アナログであるが、植物種によってはSAの機能を単純に模倣せず、特異的な転写変化を介して紋枯病抵抗性をかく乱する可能性があることを明らかにした。また、ミナトカモジグサの紋枯病菌抵抗性系統ではWRKY転写因子が制御する防御応答が菌接種に迅速に活性化することを見出した。形質転換植物を用いた解析により、BdWRKY38はSAシグナル経路の下流で系統特異的な紋枯病抵抗性を正に制御する主要な調節因子として機能することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紋枯病はイネ科植物の重要病害であるが、抵抗性の品種や系統が同定されていなかったことから植物側の抵抗性機構は不明であった。本研究により、ミナトカモジグサの系統特異的な紋枯病抵抗性は、植物ホルモンであるサリチル酸依存性であり、その実体はWRKY転写因子が制御する免疫応答の速やかな活性化であることを明らかにした。これらの現象は非親和性病原菌に対する宿主植物の応答性と類似しており、広範な宿主域を持つ殺生菌である紋枯病菌に対しても非親和性の抵抗性反応が起こりうることを示唆する。本研究は、殺生菌に対する植物免疫システムの基礎的知見を拡大し、防除策開発に向けて近縁種を利用した抵抗性遺伝資源の探索を促進する。

研究成果の概要(英文)：Sheath blight, caused by *Rhizoctonia solani*, is a major disease in grass plants. We previously identified that the phytohormone salicylic acid (SA) induces *R. solani* resistance in grass plants. Here, we aimed to reveal the molecular basis of the SA-dependent *R. solani* resistance through a combinatorial approach of genetics and transcriptomics. Benzothiadiazole, a functional analog of SA, did not work as a simple mimic of SA in *Brachypodium*, and thus it may cause unfavorable side effects on *R. solani* resistance through its specific transcriptional alteration. A time-series comparative transcriptome analysis of *Brachypodium* accessions during *R. solani* infection revealed that *R. solani*-resistant accessions activated WRKY transcription factor-dependent immunity faster than susceptible accessions. We also illuminated that BdWRKY38 may positively regulate the accession-specific *R. solani* resistance by mediating the SA signaling pathway in *Brachypodium*.

研究分野：植物病理学

キーワード：病害抵抗性 紋枯病 イネ科植物 サリチル酸 トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

糸状菌 *Rhizoctonia solani* が原因となる「紋枯病」はイネの2大病害の1つである( )。本菌は高温・多湿環境を生育に至適とし、大気中の CO<sub>2</sub> 濃度の上昇によっても被害が拡大されるため、地球環境変動に伴う多発生と被害の深刻化が予測されている( )。

一般に作物の病害防除は、抵抗性品種・抵抗性誘導剤・殺菌剤が主な手段である。しかし、本菌に対して完全な抵抗性を示すイネ品種は存在せず、既存の抵抗性誘導剤も効果がないため、防除策は殺菌剤に限られる。近年、殺菌剤に対する耐性菌が観測され始めたことから( )、新たな防除策の開発は急務である。これを実現するためには防除策開発の基盤となる植物の紋枯病抵抗性機構を理解する必要がある。

研究代表者は、イネとその近縁の小型モデル植物であるミナトカモジグサを用いた解析から、「植物ホルモンであるサリチル酸(SA)が紋枯病菌に対する侵入後抵抗性を誘導すること」、「内生の SA を欠失させたイネでは罹病性が増加すること」、「ミナトカモジグサには紋枯病抵抗性システムが存在し、それらのシステムでは菌感染後に SA シグナル経路が活性化すること」を見出した( )。一方、SA の機能アナログであるアシベンゾラル S メチル(BTH)は抵抗性を誘導しなかった。SA と BTH に対するミナトカモジグサの応答性の違いをトランスクリプトーム解析により調べたところ、BTH は SA が制御する遺伝子群の約 80% を SA と同様に制御するが、SA および BTH それぞれで特異的に誘導される遺伝子群も存在した( )。すなわち、SA 特異的に誘導される遺伝子群が紋枯病抵抗性に寄与する可能性と、BTH 特異的に誘導される遺伝子群が紋枯病抵抗性をかく乱する可能性が示唆された。以上の事実は、植物の SA シグナル経路が紋枯病抵抗性に寄与することを示しており、この分子基盤は新たな防除策の開発への応用が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、イネ科植物の SA シグナル経路の下流において、紋枯病抵抗性に寄与する「シグナル経路の調節因子」と「免疫応答」を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) BTH が紋枯病抵抗性に与える影響の解析

BTH 特異的に発現変動する遺伝子群が紋枯病抵抗性をかく乱する可能性を検証するため、上述のトランスクリプトームデータを再解析する。また、BTH がミナトカモジグサの紋枯病抵抗性システム Bd3-1 および Gaz-4 に罹病性を誘導するか調べる。

### (2) ミナトカモジグサの SA シグナル調節因子の同定

植物の SA シグナル経路は、シロイヌナズナを用いた解析により、Non-expressor of Pathogenesis-Related 1 (NPR1) と、そのパラログからなる NPR1 ファミリーによって調節されると考えられている( )。ミナトカモジグサにおける各 NPR1 ファミリー遺伝子の RNAi ラインを作成し、トランスクリプトーム解析により SA 処理後の遺伝子発現変動に影響を与える調節因子を同定する。

### (3) システム特異的な紋枯病抵抗性機構の解析

ミナトカモジグサ Bd21 は紋枯病菌に対して罹病性であるが、Bd3-1 および Tek-3 は顕著な抵抗性を示す。これら 3 システムについて菌感染過程における時系列比較トランスクリプトーム解析を行い、抵抗性システムで特徴的な免疫応答を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) BTH が紋枯病抵抗性に与える影響の解析

まず、BTH を低濃度で処理した場合にミナトカモジグサの紋枯病罹病性システム Bd21 へ抵抗性を誘導できるか否かを調べた。この結果、SA は 100  $\mu$ M 以上の濃度域で Bd21 に紋枯病抵抗性を誘導したが、BTH は 1~500  $\mu$ M の濃度域で抵抗性を誘導しなかった。次に、BTH を抵抗性システム Bd3-1 および Gaz-4 に処理し、システム特異的な紋枯病抵抗性が変化するか調べた。SA は Bd3-1 および Gaz-4 の紋枯病抵抗性に影響しなかったが、BTH を処理すると病斑の形成および接種葉内の菌体量が顕著に増加し、両システムに紋枯病に対する罹病性が誘導された。これらの結果は、BTH が紋枯病抵抗性を誘導しない理由として、BTH 特異的に発現変動する遺伝子群が抵抗性をかく乱することを示唆する。

そこで、SA および BTH を処理した Bd21 システムにおけるトランスクリプトームデータセットを再解析した。SA および BTH 処理による発現変動遺伝子群(DEGs)の 2020 遺伝子について、これらの遺伝子産物の細胞内局在を Target P( )により推定した。この結果、BTH 特異的に誘導された 722 遺伝子のセットには、葉緑体局在のタンパク質をコードする遺伝子群が顕著に含まれていることがわかった。また、遺伝子オントロジー(GO)解析により、この DEG セットに光合成や非メバロン酸経路などの葉緑体活動に関わる遺伝子群が顕著に含まれることを明らかにした。一方、植物ホルモンであるジャスモン酸(JA)の生合成やシグナル伝達に関連する GO term も、同じ DEG セットに顕著に蓄積していた。GO 解析の結果を裏付ける目的で葉緑体活動および JA シグナル経路の

マーカー遺伝子の発現解析を行ったところ、これらのマーカー遺伝子は SA には応答しないが、BTH 処理により誘導されることを確認した。すなわち、BTH はミナトカモジグサにおいて、葉緑体活動を誘導することで defense-growth のトレードオフを攪乱する、または 紋枯病罹病性を誘導する JA シグナル経路を活性化すること、が示唆された。以上の結果から、BTH は植物種によっては SA の単純な機能アナログとしては機能せず、BTH 特異的な遺伝子発現変動を介して病害抵抗性に好ましくない副作用を引き起こす可能性が明らかになった。

### (2) ミナトカモジグサの SA シグナル調節因子の同定

公開ゲノム情報を利用したシテニー解析およびシロイヌナズナとイネの NPR1 ファミリー遺伝子のアミノ酸配列を用いた相同性解析により、ミナトカモジグサにおける NPR1 ファミリー遺伝子(BdNPR1, BdNPR3, BdNPR4)をそれぞれ同定した。pANDA システム( )を用いて各遺伝子の RNAi ラインを作成し、SA 処理後の遺伝子発現変動を 3'mRNA-seq 法(Quant-seq)により解析した。この結果、RNAi を誘導することで顕著に SA 依存的な遺伝子発現変動を低下させる BdNPR1 ファミリー遺伝子を同定した。この結果は、NPR1 ファミリーを介した SA シグナル経路の制御がミナトカモジグサにおいても保存されていることを示唆する。

### (3) 系統特異的な紋枯病抵抗性機構の解析

紋枯病菌接種後のミナトカモジグサの葉内における菌体量の時系列変化から、Bd3-1 および Tek-3 は接種後 20 時間(20 hours post inoculation, hpi)までに菌の伸展が抑制されていることを明らかにした。すなわち、Bd3-1 と Tek-3 では接種後の比較的早いタイミングで菌感染を抑制する抵抗性反応が起こっていると考えられた。この実体を明らかにする目的で、Bd3-1、Tek-3、Bd21(罹病性)について菌接種後 24 時間までの感染過程における時系列比較トランスクリプトーム解析を行った。3 系統、5 時点(0, 4, 8, 16, 24 hpi)、3 反復の合計 45 サンプルについて、RNA-seq により遺伝子発現プロファイルを取得した。菌感染に応答する遺伝子群として、時系列でダイナミックな発現変動パターンを示す遺伝子群(Dynamically expressed genes, DYGs)を同定した。罹病性系統と抵抗性系統の DYG を比較したところ、両者の大部分(>75%)が共通していることが明らかになった。これらの結果から、抵抗性系統に特異的な防御応答遺伝子群の発現誘導が最終表現型に影響を与えるのではなく、防御応答遺伝子群の発現誘導タイミングが重要であると考えられた。

そこで、各系統の DYGs を発現データに基づいて 6 つのクラスターに分類し、発現パターンをヒートマップにより可視化した(Fig. 1)。いずれの系統でも 8 hpi を境界として強く発現する遺伝子群が切り替わることから、抵抗性・罹病性に関わらずミナトカモジグサは 8 hpi までに菌感染を認識していることが示唆された。次に、GO 解析により防御応答遺伝子群の発現タイミングを調べた。

Figure 2 のヒートマップは、防御応答関連の GO term が

どの DYG のクラスターに蓄積したかを示しており、間接的に防御応答遺伝子群の発現パターンを表している。罹病性の Bd21 では、防御応答関連の GO term が接種後 16~24 時間で強く発現する DYG クラスター(Cluster5, 6)に蓄積しているのに対し、抵抗性の Bd3-1 と Tek-3 では、接種後 8~16 時間で強く発現する DYG クラスター(Cluster3, 4)に顕著に蓄積していた。そこで、防御応答遺伝子群の発現を制御する転写因子を明らかにする目的で、植物免疫に関与する転写因子ファミリーの発現タイミングを超幾何分布検定により調べた。この結果、WRKY 転写因子の蓄積パターンが防御応答関連の GO term の蓄積パターンと一致することが明らかとなった。以上の結果から、ミナトカモジグサは紋枯病菌の接種に応答して WRKY が関与する防御応答を誘導し、抵抗性系統ではそれが罹病性系統より速やかに起こることが強く示唆された。

次に、Bd3-1 と Tek-3 の紋枯病抵抗性に寄与する WRKY 転写因子を明らかにする目的で遺伝子制御ネットワーク(GRN)解析を行った。DYGs の時系列発現データを基に機械学習により各系統の GRN を推定し、ハブを構成する WRKY 転写因子とそれらの推定ターゲット遺伝子群を同定した。BdWRKY38 は、抵抗性系統の GRN で特異的にハブを構成すること、抵抗性系統で 8 hpi までに強く誘導されること、SA 誘導性であること、

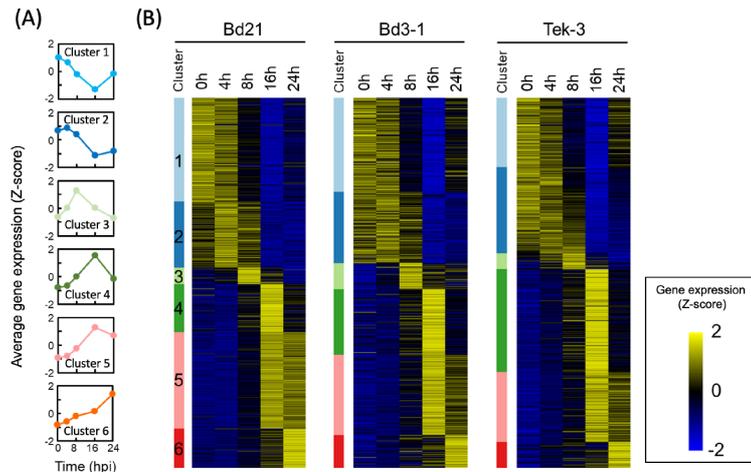


Figure 1. 紋枯病菌感染過程におけるミナトカモジグサ各系統のDYGの発現パターン

からミナトカモジグサの系統特異的な紋枯病抵抗性において重要な役割を果たすことが示唆された。そこで、Bd3-1においてBdWRKY38のRNAiライン(*BdWRKY38-kd*)およびSA加水分解酵素(*NahG*)を強発現するライン(*NahG-ox*)を作成した。LC/MS/MSを用いた解析により、*NahG-ox*では内生のSAレベルが野生型のBd3-1と比較して1/4程度に低下していることを確認した。これらの系統について紋枯病菌接種試験を行った結果、*BdWRKY38-kd*および*NahG-ox*では病斑の形成および接種葉内の菌体量が野生型のBd3-1と比べて有意に増加し、罹病性系統のBd21と同程度まで紋枯病抵抗性が低下していた。以上の結果から、Bd3-1における系統特異的な紋枯病抵抗性はSA依存的であり、BdWRKY38はSAシグナル経路の下流で抵抗性の主要な調節因子として機能することが示唆された。

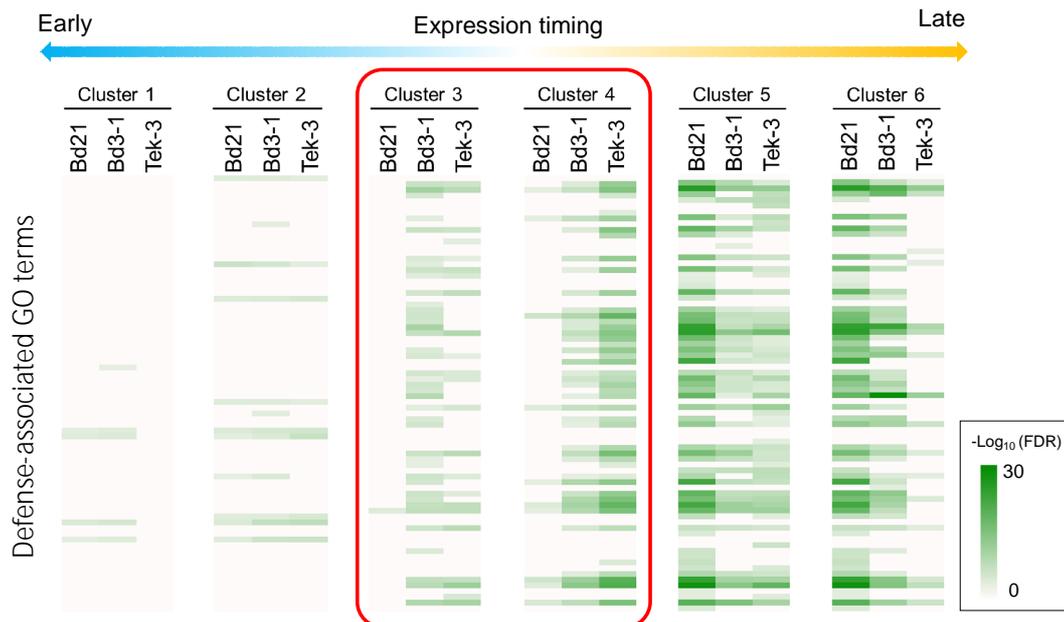


Figure 2. 防御応答関連のGO termの各DYGクラスターにおける蓄積パターン

#### < 引用文献 >

- Groth DE, Bond JA. 2007. Effects of cultivars and fungicides on rice sheath blight, yield, and quality. *Plant Dis.* 91:1647-1650.
- Olaya G, Buitrago C, Pearsaul D, Sierotzki H, Tally A. 2012. Detection of resistance to QoI fungicides in *Rhizoctonia solani* isolates from rice. *Phytopathology* 102: S4.88
- Kobayashi T, Ishiguro K, Nakajima H, Kim HY, Okada M, Kobayashi K. 2006. Effects of Elevated Atmospheric CO<sub>2</sub> Concentration on the Infection of Rice Blast and Sheath Blight. *Phytopathology* 96:425-431.
- Kouzai Y, Kimura M, Watanabe M, et al. 2018. Salicylic acid-dependent immunity contributes to resistance against *Rhizoctonia solani*, a necrotrophic fungal agent of sheath blight, in rice and *Brachypodium distachyon*. *New Phytologist* 217: 771–783
- Ding Y, Sun T, Ao K, Peng Y, Zhang Y, Li X, Zhang Y. 2018. Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. *Cell* 173(6):1454-1467.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* 300(4):1005-16.
- Miki D, Shimamoto K. 2004. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol.* 45(4):490-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kouzai Yusuke, Noutoshi Yoshiteru, Inoue Komaki, Shimizu Minami, Onda Yoshihiko, Mochida Keiichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Benzothiadiazole, a plant defense inducer, negatively regulates sheath blight resistance in <i>Brachypodium distachyon</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-018-35790-w">https://doi.org/10.1038/s41598-018-35790-w</a>	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7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 香西雄介、井上小慎、清水みなみ、高萩航太郎、能年義輝、持田恵一
2. 発表標題 紋枯病菌感染過程におけるミナトカモジグサの 時系列比較トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 香西雄介
2. 発表標題 紋枯病に対するイネ科植物の免疫機構
3. 学会等名 第13回ムギ類研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小笠原翼、松井英謙、山本幹博、一瀬勇規、豊田和弘、香西雄介、能年義輝
2. 発表標題 微生物分子パターンに対するミナトカモジグサの活性酸素種生成特性の解析
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Kouzai
2. 発表標題 Rapid activation of WRKY-dependent immunity facilitates native resistance against the sheath blight pathogen, <i>Rhizoctonia solani</i> , in <i>Brachypodium distachyon</i>
3. 学会等名 4th International Brachypodium Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Kouzai, Komaki Inoue, Minami Shimizu, Yukiko Uehara-Yamaguchi, Kotaro Takahagi, Yoshiteru Noutoshi, Keiichi Mochida
2. 発表標題 Time-series transcriptome analysis of <i>Brachypodium distachyon</i> in response to infection by <i>Rhizoctonia solani</i>
3. 学会等名 2019 IS-MPMI XVIII CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sobhy S. H. Abdelsalam, Satoshi Isoya, Megumi Watanabe, Yusuke Kouzai, Hidenori Matsui, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose, Kazuhiro Toyoda, Seiji Tsuge and Yoshiteru Noutoshi
2. 発表標題 Characterization of expression profiles of effector genes of <i>Rhizoctonia solani</i> on <i>Brachypodium distachyon</i>
3. 学会等名 2019 IS-MPMI XVIII CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 香西雄介
2. 発表標題 ミナトカモジグサを用いたイネ紋枯病の研究
3. 学会等名 日本植物病理学会関東部会第14回若手の会 (招待講演)
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
研究協力者	持田 恵一 (Mochida Keiichi) (90387960)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー  (82401)	
研究協力者	能年 義輝 (Noutoshi Yoshiteru) (70332278)	岡山大学・農学部・准教授  (15301)	
研究協力者	清水 みなみ (Shimizu Minami)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・テクニカルスタッフ  (82401)	
研究協力者	上原 由紀子 (Uehara Yukiko)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・テクニカルスタッフ  (82401)	
研究協力者	井上 小慎 (Inoue Komaki)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・テクニカルスタッフ  (82401)	