

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02923

研究課題名（和文）生物ストレス耐性の向上を目指したイネのケモダイバーシティの解明と利用

研究課題名（英文）Analysis of chemodiversity of rice for enhancement of stress tolerance

研究代表者

石原 亨（Ishihara, Atsushi）

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：80281103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、イネのケモダイバーシティとその分子基盤を解明し、生態学的意義について考察した。具体的な成果は以下の通りである。1)ジテルペノイド型ファイトアレキシンの組成に大きな種内多様性があることを見出した。2) 特定の品種が、芳香族ジテルペノイド、アビエトリジン類をファイトアレキシンとして蓄積することを発見した。3) 品種特異的ファイトアレキシン、オリザラクトンの生合成酵素遺伝子を同定し、その誕生と進化を解明した。4) インディカ亜種特異的フラボノイドを見いだした。5) 代謝プロファイリングに基づき、非線形次元削減法を適用することで、イネの集団構造を解析することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の知見は、ストレスに強い作物の育種や栽培体系の創出に利用できる。本研究では、新規ファイトアレキシンを多数発見した。これらを利用して特定の病原菌に強い系統を育種することが可能となった。また、異なるファイトアレキシンを蓄積する系統を一つの品種の中に混在させて栽培する、いわゆるマルチラインによる栽培を行うことも想定できる。さらに、本研究では、新規二次代謝経路の誕生と変遷を明らかにしており、学術的にも大きな意義を有する。オリザラクトン合成酵素遺伝子KSLXは、2つの遺伝子の融合によって誕生し、さらに、平衡選択によって維持されてきたものと推定することができた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the chemodiversity in rice and attempted to clarify its molecular basis. Additionally, we discussed the ecological significance of the chemodiversity from an evolutionary perspective. Our new findings were as follows: 1) There is a large diversity in the composition of diterpenoid phytoalexins in both cultivated and wild rice. 2) Aromatic diterpenoid phytoalexins, abietoryzines, accumulate in the specific, but many rice cultivars. 3) We identified the biosynthetic gene for the cultivar-specific phytoalexin oryzalactone and clarified its creation and inheritance during the evolution of the *Oryza* genus. 4) We found a flavonoid glycoside specifically accumulated in the Indica subspecies. 5) Using metabolic profiling approach and a non-linear dimensionality reduction method, we analyzed the population structure of rice cultivars. These results provide an overall picture of rice chemodiversity.

研究分野：天然物化学

キーワード：イネ 二次代謝 ケモダイバーシティ ナチュラルバリエーション ファイトアレキシン ジテルペノイド フラボノイド アビエトリジン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一つの作物は祖先野生種から一度の(あるいはごく少数回の)栽培化によって作出された。したがって、作物の創出に利用されたのは祖先野生種のごく一部の集団であり、野生種が持っていた多くの遺伝的変異がふるい落とされてしまったと考えられる。また栽培化が行われた後、現在に至るまで選抜が繰り返されてきた。特に、近代以降は多収・食味といった形質が優先されたため、在来品種が持っていた地域に適合した独自の形質が失われ、現在ではよく似た品種群が大規模に栽培されるに至っている。その結果、病害虫の発生という新たな脆弱性を抱えることになってしまった。このような状況を打開するためには、作物の多様性を回復させることが必要となる。植物は、病原菌の感染や昆虫の食害を回避するために様々な二次代謝産物を利用している。二次代謝産物の中で病原菌感染によって誘導される抗菌性物質は、ファイトアレキシンと呼ばれる。私たちは、イネのファイトアレキシンを在来品種や近縁野生種を含む多くの系統で分析した。その結果、イネの代表的なファイトアレキシンであるサクラネチンやオリザレキシン A を蓄積しない品種が多数存在することを見出した。イネにはファイトアレキシンの蓄積に関する複数のケモタイプが存在していたのである。さらに、ごく最近、これまで知られていないファイトアレキシンを蓄積する在来品種が存在することを発見した。イネの在来品種や近縁野生種は、現代の品種が失った二次代謝の大きな変異を残している可能性が浮かび上がってきたのである。しかし、どれほどの多様性があるのか、これまでのところわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究では、イネという種が有しているケモダイバーシティの把握を目的とした。特に病害抵抗性に関連する抗菌性二次代謝産物、ファイトアレキシンや、昆虫による食害抵抗性に関連するフラボノイドを対象にイネの幅広い品種で分析を行った。さらに、これらの化合物に多様性が見出されたため、遺伝学的手法を駆使して多様性をもたらす分子基盤の解明を目指した。このために、多様性を示す化合物の生合成酵素遺伝子を発現させた遺伝子組換え植物の作成もおこなった。くわえて、近縁野生種でもこの遺伝子の存在を調べ、進化の観点から、ケモダイバーシティが有する生態学的意義について考察することも目的として研究をおこなった。

### 3. 研究の方法

#### (1)分析機器

LC-MS 分析は、ACQUITY UPLC (Waters、ミルフォード、マサチューセッツ州、アメリカ)に接続した Quatro Micro API (Waters) を用いて行った。HPLC 分析には、Shimadzu LC-10AT システム(島津製作所、京都)を使用した。NMR スペクトルは、Bruker Avance 600 (Bruker、マサチューセッツ州、アメリカ)もしくは JNM-ECZ600 (JEOL, Tokyo, Japan)を用いて測定した。高分解能マスマスペクトルは、Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific、ウォルサム、マサチューセッツ州、アメリカ)を用いて測定した。

#### (2)生物材料

農林水産省農業生物資源ジーンバンクの世界のイネ・コアコレクション(69 品種)を用いた。また、アフリカイネ *Oryza glaberrima* の種子も農業生物資源ジーンバンクから入手した。野生イネ (*Oryza rufipogon*, *Oryza barthii*, *Oryza glumaepatula*, *Oryza meridionalis*, *Oryza punctata*, および *Oryza brachyantha*) の種子は国立遺伝学研究所から分譲を受けた。さらに、染色体断片置換系統 (CSSLs) 組換え自殖系統 (RILs) なども入手し、実験に使用した。

イネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*, MAFF 305067)、イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, MAFF 210548)、イネ籾葉枯れ病菌 (*Burkholderia glumae*, MAFF 106501) は、農業生物資源ジーンバンクから分譲を受けた。イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*, レース 007, 長 69-150) は、島根大学・植物病理学研究室から分譲を受けた。

#### (3)病原菌の接種と誘導性化合物の分析

イネごま葉枯れ病菌は、V8 培地で、25℃、14 日間ブラックライト (FL15BLB、日立製作所) から紫外線を照射し、胞子を形成させた。胞子濃度が  $5 \times 10^5$  個/mL になるように胞子懸濁液を調製し、5  $\mu$ L ずつ 1 cm 間隔でイネの第 3 葉に滴下接種した。その後、ビニール袋で包み高温条件とし 24 時間インキュベートした後、生育時と同条件で 48 時間インキュベートした。

イネごま葉枯れ病菌を接種し、72 時間後にイネの葉を長さ 1 cm に切断した。これを 10 倍量の 80%メタノールに 48 時間浸漬した後、葉を取り除いた。抽出液を LC-MS で分析した。

### 4. 研究成果

#### (1)栽培化イネと野生イネにおけるジテルペノイド型ファイトアレキシンの種内多様性の解明

多様なイネの系統を含む世界のイネ・コアコレクション (WRC) を用いて、紫外線照射葉における、主要なファイトアレキシン、モミラクトン A と B、およびファイトカサン A と D の蓄積量を分析した。これらのファイトアレキシンはほとんどの品種から検出されたが、その蓄積量は品種によって大きく異なっていた。モミラクトン A および B の蓄積量は、インディカ品種よりもジャポニカ品種の方が高い傾向にあった (図 1)。しかし、ファイトカサンの蓄積量は亜種の違いとは無関係であった。また、7 種の野生 *Oryza* 属植物では、ファイトアレキシンの組成は大きく異なっていた。

これらの分析の過程で 'Jaguary' と 'Basilanon' から 2 つの未知の化合物が検出されたため、これらの化合物を紫外線照射した葉から単離し、構造を解析した。品種 Jaguary から単離された化合物は、モミラクトン A の異性体でアビエタン骨格を持つ化合物であった。新規化合物だったため、オリザラクトンと名付けた (図 2)。一方、品種 Basilanon から単離された化合物はファイトカサン A に水素が付加したものであったため、ファイトカサン G と命名した。これらの結果から、イネのファイトアレキシン組成には大きな種内変異が存在することが明らかになった。

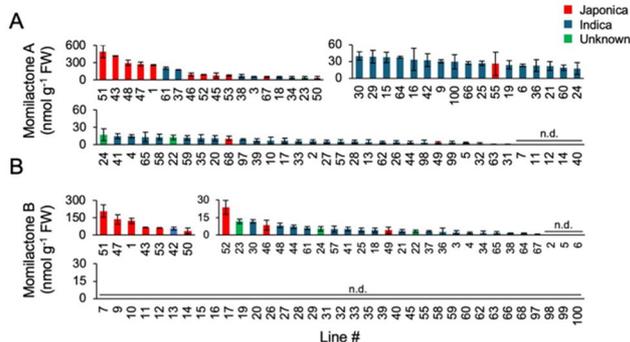


図 1 世界のイネ・コアコレクションにおけるモミラクトン A (A) および B (B) の蓄積

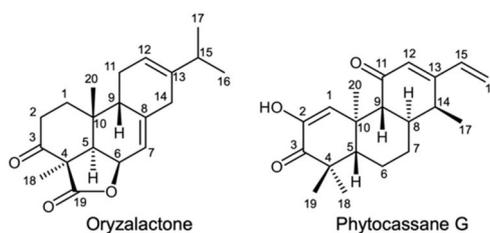


図 2 オリザラクトンとファイトカサン G の化学構造

(2) イネの特定の系統は芳香族ジテルペノイド、ファイトアレキシンを蓄積する

様々な品種においてジテルペノイド系ファイトアレキシンを調べたところ、品種 'Jinguoyin' は検出可能な濃度で既知のジテルペノイド系ファイトアレキシンを蓄積していないことが明らかになった。そこで本研究では、イネごま葉枯病菌 *Bipolaris oryzae* を接種した 'Jinguoyin' の葉から新しいタイプのファイトアレキシンの発見を試みた。その結果、'Jinguoyin' の葉には、ジャポニカおよびインディカの代表品種である '日本晴' および 'カサラス' の葉に蓄積しない、5 種類の化合物が蓄積することが見いだされた (図 3)。その後、紫外線を照射した葉からこれらの化合物を単離し、分光分析と結晶スポンジ法によりその構造を決定した。化合物はすべてベンゼン環を持つジテルペノイドであり、病原菌に感染したイネの葉から初めて検出されたものであった。これらの化合物はイネごま葉枯病菌およびイネいもち病菌に対して抗菌活性を示したことから、イネにおけるファイトアレキシンとして機能すると考え、abietoryzins A-E と命名した。アビエトリジン類は、紫外線照射後に既知のジテルペノイド系ファイトアレキシンをあまり蓄積しない品種に、高濃度に蓄積する傾向があった。世界のイネ・コアコレクションの全 69 品種のう

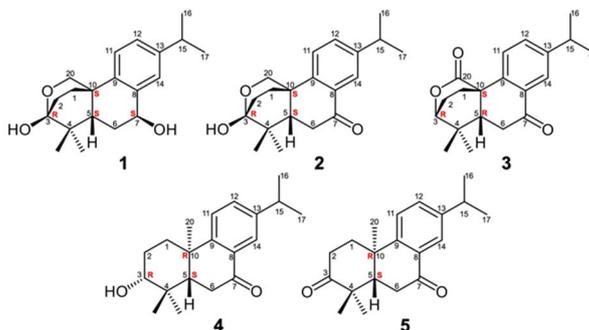


図 3 新規ファイトアレキシン、アビエトリジン類の化学構造

世界のイネ・コアコレクションの全 69 品種のうち、高濃度に蓄積する傾向があった。世界のイネ・コアコレクションの全 69 品種のう

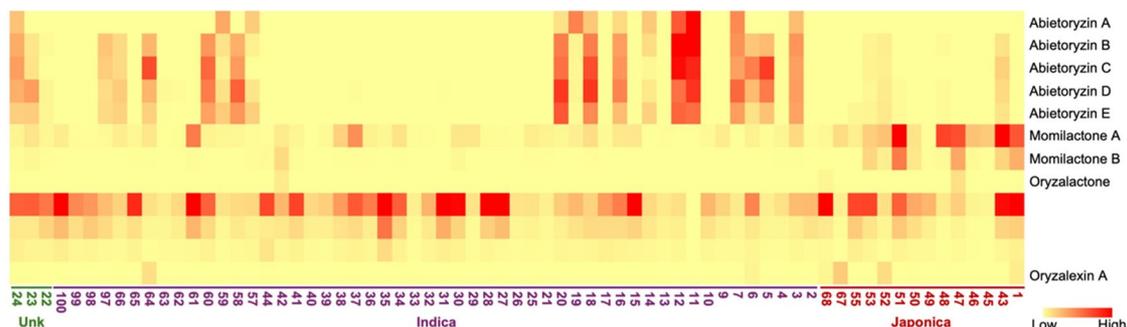


図 4 世界のイネ・コアコレクションに含まれる品種におけるファイトアレキシンの蓄積量の違い

ち、30 品種が少なくとも 1 種類のアビエトリジン蓄積し、そのうち 15 品種では、いずれかのアビエトリジンが検出されたファイトアレキシンの中で最も多く蓄積していた (図 4)。したがって、アビエトリジンはこれまで見過ごされてきたものの、イネの主要なファイトアレキシンであることが明らかになった。

### (3) オリザラクトン生合成遺伝子の同定とその進化の解明

これまでの研究から、主要なイネのファイトアレキシン (モミラクトンとファイトカサン) は、ほとんどの栽培品種に蓄積するが、オリザラクトンは特定の栽培品種にのみ蓄積するファイトアレキシンであることが明らかになった。オリザラクトンを蓄積する品種は世界のイネ・コアコレクション 69 系統のなかでわずか 3 系統であったことから、イネの進化の過程でごく最近獲得されたのではないかと推定された。そこで、オリザラクトンの生合成遺伝子を解析することにより、ファイトアレキシンの多様化の進化的軌跡を明らかにすることができると考えた。オリザラクトンを蓄積する品種に特異的に存在する一塩基多型を調べたところ、染色体 11 の長腕に集中して存在することがわかった。このゲノム領域に存在する遺伝子を調べると、オリザラクトン蓄積品種には、他の品種と異なり、ジテルペンの生合成に関与すると推定される KSLX-OL が存在することが見出された (図 5)。さらに、KSLX-OL を過剰発現させた *Nicotiana benthamiana* とイネ

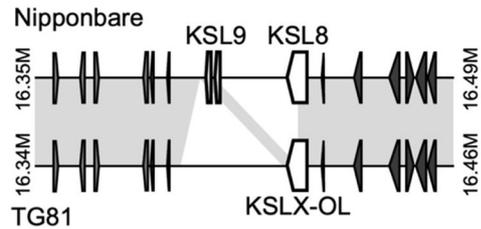


図 5) オリザラクトン蓄積系統 (TG81) と非蓄積系統 (Nipponbare) における KSL-8, KSL-9, および KSLX-OL 周辺のゲノム配列の比較

の代謝物分析から、KSLX-OL がオリザラクトンの生合成に関与していることが明らかになった (図 6)。オリザラクトンを蓄積しない品種では、ゲノム上の対応する領域に、別のジテルペノイド系ファイトアレキシン、オリザレキシン S の生合成に関与する KSL8 が存在した。さらに、広く野生イネにおいて、KSLX, KSL8, および関連偽遺伝子 (KSL9) について調べた。その結果、KSLX にはさらに、KSLX-NOL と KSLX-bar のサブタイプが存在し、AA ゲノム種に広く分布していることが見出された。KSLX-NOL と KSLX-bar を有する系統からはオリザラクトンは検出されなかったことから、これらの遺伝子は別のジテルペノイド系ファイトアレキシンの生合成に関与していることが推定された。また、KSLX, KSL8, および KSL9 の系統解析から、KSLX-OL は KSL8 および KSL9 と共通の祖先から遺伝子重複、機能分化、遺伝子融合を経て生成されたことが示された (図 7)。KSLX-OL と KSL8 が AA ゲノムの生物種に広く分布していることは、両遺伝子が種分化を越えて長期的に共存していることを示しており、両遺伝子が平衡選択により保持されてきたことが示唆された。

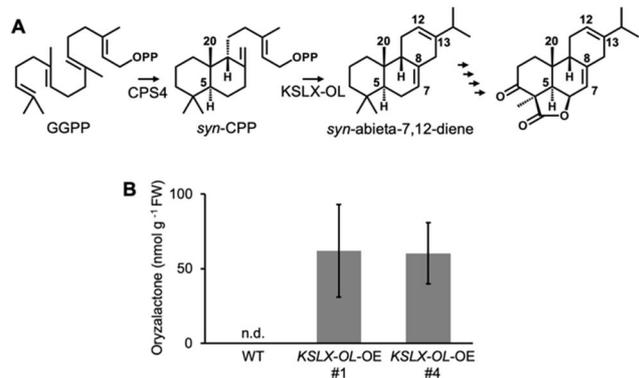


図 6 オリザラクトンの生合成経路 (A) と KSLX-OL を過剰発現させたイネにおけるオリザラクトンの蓄積

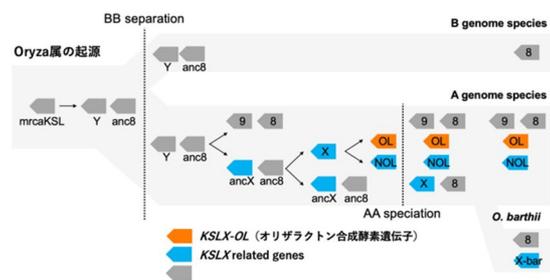


図 7 イネの進化過程における KSLX 遺伝子の出現と多様化

### (4) イネが蓄積するフラボノイドに関するナチュラルバリエーション

イネの品種日本晴 (ジャポニカ亜種) とカサラス (インディカ亜種) において、蓄積するファイトアレキシンを比較すると、カサラスはそのほとんどを蓄積しなかった。このことからカサラスは、ファイトアレキシンによらない別の方法で身を守っていると考えられた。先行研究から、日本晴に存在せず、カサラス特異的に蓄積する抗菌性物質 (ファイトアンティシピン) の存在が明らかにされた。さらにこの物質を単離すると thevetiaflavone-8-C-glucoside (TFG) であった。そこで、TFG の蓄積量に品種間差 (ナチュラルバリエーション) をもたらす要因を明らか



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 0件）

1. 著者名 Kariya Keisuke, Mori Haruka, Ueno Makoto, Yoshikawa Takanori, Teraishi Masayoshi, Yabuta Yukinori, Ueno Kotomi, Ishihara Atsushi	4. 巻 118
2. 論文標題 Identification and evolution of a diterpenoid phytoalexin oryzalactone biosynthetic gene in the genus <i>Oryza</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 358 ~ 372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.16608	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 Kariya Keisuke, Fujita Aiko, Ueno Makoto, Yoshikawa Takanori, Teraishi Masayoshi, Taniguchi Yoshimasa, Ueno Kotomi, Ishihara Atsushi	4. 巻 211
2. 論文標題 Natural variation of diterpenoid phytoalexins in rice: Aromatic diterpenoid phytoalexins in specific cultivars	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 113708 ~ 113708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2023.113708	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 Keisuke Kariya, Naoki Ube, Makoto Ueno, Masayoshi Teraishi, Yutaka Okumoto, Naoki Mori, Kotomi Ueno, Atsushi Ishihara	4. 巻 180
2. 論文標題 Natural variation of diterpenoid phytoalexins in cultivated and wild rice species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 112518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2020.112518	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 假谷佳祐、吉川貴徳、寺石政義、上野琴巳、石原亨
2. 発表標題 イネにおけるファイトアレキシン生合成遺伝子の進化
3. 学会等名 日本進化学会第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 假谷佳祐、吉川貴徳、寺石政義、上野琴巳、石原亨
2. 発表標題 イネのファイトアレキシン生合成遺伝子の進化
3. 学会等名 植物化学調節学会大57回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 假谷佳祐、吉川貴徳、寺石政義、上野琴巳、石原亨
2. 発表標題 イネにおけるファイトアレキシン合成に関与するジテルペン生合成遺伝子の進化
3. 学会等名 日本農薬学会第48回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 假谷佳祐、藤田愛子、吉川貴徳、寺石政義、上野琴巳、石原亨
2. 発表標題 イネの品種特異的ファイトアレキシン
3. 学会等名 日本農薬学会第47回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉田亮直、村田晃一、假谷佳祐、吉川貴徳、寺石正義、上野琴巳、石原亨
2. 発表標題 イネのインディカ亜種に特有のファイトアンティシピン
3. 学会等名 日本農芸化学会大会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 假谷佳祐, 宇部尚樹, 上野琴巳, 寺石政義, 奥本裕, 森直樹, 石原亨
2. 発表標題 イネにおけるテルペノイド型ファイトアレキシン蓄積に関するナチュラルバリエーション
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度中四国支部大会 (第57回講演会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原 亨
2. 発表標題 イネ科植物における二次代謝が関与した防御機構の解明
3. 学会等名 日本農薬学会第46回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 假谷佳祐, 吉川貴徳, 寺石政義, 上野琴巳, 石原亨
2. 発表標題 イネのファイトアレキシンであるアピエトリジン類の生合成遺伝子の探索
3. 学会等名 日本農薬学会49回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 假谷佳祐, 吉川貴徳, 寺石政義, 上野琴巳, 石原亨
2. 発表標題 イネのジテルペノイドファイトアレキシンであるアピエトリジン類の生合成遺伝子の探索
3. 学会等名 植物化学調節学会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 假谷佳祐、影井了、石原亨
2. 発表標題 マススペクトルを活用したイネの二次代謝における多様性の解明
3. 学会等名 第71回質量分析総合討論会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究分担者	手林 慎一 (Tebayashi Shin'ichi) (70325405)	高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・教授  (16401)	
研究分担者	寺石 政義 (Teraishi Masayoshi) (80378819)	京都大学・農学研究科・准教授  (14301)	

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