

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

-平成25年 6月21日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380066

研究課題名（和文）イネの基礎的病害抵抗性を制御する鍵転写因子の機能の解明

研究課題名（英文） Functional analysis of key transcription factors regulating basic disease resistance in rice

研究代表者

山根 久和 (YAMANE HISAKAZU)

帝京大学・理工学部・教授

研究者番号：80090520

研究成果の概要（和文）：

植物は病原菌の感染に対して様々な抵抗性反応を示す。本研究では、イネをモデル植物として用い、代表的な抵抗性反応である、抗菌性タンパク質の生産とファイトアレキシンと総称される抗菌性二次代謝産物の生産において、それぞれ重要な機能を果たしている転写因子である OsWRKY53 と OsTGAP1 について、それらの標的遺伝子を同定するとともに、活性化機構を追究し、植物における病害抵抗性発現機構を理解するための重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

Plants respond to pathogen infection a variety of defense reactions. In this study, we investigated functional analysis of the key transcription factors OsWRKY53 and OsTGAP1 that are, respectively, involved in expression of antimicrobial proteins and production of phytoalexins in rice. According to chromatin immunoprecipitation-sequencing, the binding sites of OsWRKY53 and OsTGAP1 were identified comprehensively. Key information on activation mechanisms and interacting factors of these two transcription factors were also obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2013年度	0	0	0
2014年度	0	0	0
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物生産化学・生物有機化学

 キーワード：イネ、植物免疫、WRKY型転写因子、bZIP型転写因子、シグナル伝達、  
 ファイトアレキシン、基礎的病害抵抗性、エリシター

## 1. 研究開始当初の背景

植物の病害抵抗性には、病原菌特有の分子パターン（MAMPsあるいはPAMPsと総称される）であるキチンオリゴ糖、フラジェリン、リポ多糖などのエリシターにより誘

導される基礎的抵抗性と病原体由来の非病原性遺伝子産物（AVRタンパク質）と植物由来の抵抗性遺伝子産物（Rタンパク質）との相互作用により誘導される特異的抵抗性が存在する。病原菌感染時に通常誘導さ

れる基礎的抵抗性は、一般には、親和性病原菌の侵入を阻止できるほど強力なものではないが、基礎的抵抗性を人為的に増強することにより病害抵抗性の付与は可能である。実際、Rタンパク質依存の特異的抵抗性は、基礎的抵抗性を特異的な機構で顕著に増強することにより誘導される場合がある。オオムギのうどん粉病に対するRタンパク質MLAは、うどん粉病菌由来のAVRタンパク質と相互作用することにより、基礎的抵抗性を負に制御するWRKY型転写因子の機能を抑制し、結果として基礎的抵抗性を病原菌感染特異的に増強しオオムギにうどん粉病抵抗性を付与している。したがって、基礎的抵抗性発現に至る情報伝達機構の解明は、植物の病害抵抗性発現機構を総合的に理解するためにきわめて重要である。我々は、これまで、キチンオリゴ糖などのエリシターのシグナル伝達系中流・下流の解明を目的として、イネにおける代表的な基礎的抵抗性反応であるPRタンパク質と総称される抗菌性タンパク質やファイトアレキシンと総称される抗菌性二次代謝産物の生産に至る情報伝達に関する転写因子の同定・機能解析を行ってきた。本研究では、我々が解析対象としてきたエリシター応答性転写因子のうち、イネの病害抵抗性において特に重要な機能を果たしていると考えられるOsWRKY53とOsTGAP1の2種について、下流標的遺伝子の網羅的同定や当該転写因子自体の発現・作用機構の解明を行い、OsWRKY53(抗菌性タンパク質の生産に関与する分子スイッチの一つ)とOsTGAP1(ファイトアレキシン生産を制御するマスター転写因子)を介した病害抵抗性発現機構の総合的理解を目指す。

## 2. 研究の目的

PRタンパク質の生産は、すでに述べたように代表的な基礎的抵抗性反応の一つで、現在実用化されている病害抵抗性誘導剤は、PRタンパク質を誘導することが示唆されている。OsWRKY53は、キチンエリシター処理により早期に誘導される転写活性化因子で、主にPRタンパク質の発現に関与すると考えられ、過剰発現によりイネにいもち病菌抵抗性を付与することから、イネの病害抵抗性を制御する重要な分子スイッチの一つと考えられる。そこで、本研究では、クロマチン免疫沈降(ChIP)と次世代型高速シーケンサーを組み合わせたChIP-sequenceにより、OsWRKY53の標的遺伝子を網羅的に同定するとともに、*OsWRKY53* 遺伝子自体の転写発現制御機構の解明、OsWRKY53の翻訳後修飾の解析、OsWRKY53と相互作用する因子の同定・機能解析等を行い、OsWRKY53による標的遺伝子の発現誘導機構の解明、OsWRKY53を中心とした遺伝子ネットワークの解明を行う。また、本研究を行う過程で見出した、イネの病害抵抗性を負に制御する転写因子であるOsWRKY28についても詳細な特徴付けや過剰発現体の表現型の解析を行い、当該転写因子の機能解明を試みた。

一方、病原菌感染により誘導される抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシンの生産も、代表的な基礎的抵抗性反応の一つである。最近、農業生物資源研究所のOhashiらと申請者らとの共同研究により、親和性、非親和性イネいもち病菌がともにファイトアレキシンを分解・無毒化する能力を持っているが、非親和性菌が侵入した場合には親和性菌が侵入した場合より早期にファイトアレキシン生産が誘導されること、イネにファイトアレキシンを前もって処理しておくことにより親和性菌に対する病害抵抗性を付与できることが明らかにな

った。以上の事実は、ファイトアレキシンのレベルがイネの病害抵抗性の重要な制御要因の一つであることを強く示唆している。我々は、イネのゲノム情報を活用して、イネのジテルペン型ファイトアレキシンであるモミラクトン類やファイトカサン類の生合成経路の解明研究も行っており、その全容を遺伝子レベルで明らかにしつつあるが、最近、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成最上流のメチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路の酵素遺伝子群から下流の P450 酵素・デヒドロゲナーゼ遺伝子に至るまでの生合成酵素遺伝子全体の発現制御に関与し、転写活性化能を有する bZIP 型のマスター転写因子 OsTGAP1 を同定することに成功した。OsTGAP1 遺伝子のノックアウト株培養細胞では、ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現抑制が確認され、過剰発現株培養細胞では生合成遺伝子の発現はエリシター未処理では微弱であるもののキチンエリシター処理した場合は劇的な発現の増強が見られた。実際、エリシター処理した過剰発現株においてはモミラクトン類やファイトカサン類の集積量は顕著に増大し、コントロールの培養細胞にエリシター処理した場合の 5~10 倍にも達することが示されている。また、OsTGAP1 はファイトアレキシン生合成遺伝子だけでなく、プロテアーゼインヒビター、ホスホリパーゼ D などの防御関連遺伝子の発現制御にも関与していることが示唆されている。そこで、本研究の二つ目の課題として、OsTGAP1 を中心とした遺伝子ネットワークの解明に向けて、ChIP-sequence による OsTGAP1 の標的遺伝子の網羅的な同定、OsTGAP1 の翻訳後修飾の解析、OsTGAP1 と相互作用する因子の同定・機能解析等を試みることにした。また、ファイトアレキ

シン生合成制御機構や生合成遺伝子の機能解析に関連した研究テーマで、Iowa 州立大学グループ、南京農業大学グループ、東京理科大学グループと共同研究を行った。

### 3. 研究の方法

解析対象としている 2 種の転写因子 (OsWRKY53, OsTGAP1) を恒常的に発現するイネ形質転換体培養細胞を作製する。それら形質転換体細胞から調製したクロマチン画分を材料とし、それぞれの転写因子を特異的に認識する抗体を用いて行ったクロマチン免疫沈降 (ChIP) と次世代型高速シーケンサーを組み合わせた ChIP-sequence、および当該形質転換体培養細胞におけるキチンエリシター応答性遺伝子のマイクロアレイ解析の結果を考え合わせるにより、両転写因子の標的遺伝子を網羅的に同定した。また、両転写因子の翻訳後修飾の解析、両転写因子と相互作用するタンパク質遺伝子の酵母 two-hybrid 法等による探索も併せて行い、両転写因子による標的遺伝子の発現誘導機構、両転写因子それぞれを中心とする遺伝子ネットワークの解明を試みた。イネのファイトアレキシンの定性・定量分析は、LC-MS/MS システムを用いて行った。

### 4. 研究成果

OsWRKY53 の標的遺伝子を網羅的に同定するため、HAエピトープ付加型 OsWRKY53 恒常的発現株イネ培養細胞からクロマチン画分を調製し、抗HA抗体を用いたChIPを行った。こうして得られた ChIP DNA の塩基配列を次世代型高速シーケンサーを用いて網羅的に解析し、多数の標的遺伝子を同定した。これらの標的遺伝子には複数の転写因子遺伝子を含む防御関連遺伝子が高い割合で含まれており、OsWRKY53 を起点とする、防御応答に関するシ

グナルカスケードが機能していることが示唆された。また、OsWRKY53はキチンエリシターにより活性化されるMAPKカスケード (OsMKK4-OsMPK3/6)によりリン酸化されることが示された。そこで、OsWRKY53のN末端側に存在する6カ所の予想リン酸化サイトを全てアスパラギン酸残基に置換した、擬似リン酸化体のOsWRKY53 (OsWRKY53Asp)を発現するコンストラクトを作製し、イネ培養細胞を用いたレポーター・ジーンアッセイで転写活性化能を検定したところ、擬似リン酸化により転写活性化能が増強されることが強く示唆された。また、OsWRKY53標的候補遺伝子のうちでWRKY型転写因子やキチナーゼ等をコードする病害抵抗性への関与の可能性が高い7遺伝子について、プロモーターへのOsWRKY53の結合能の有無をゲルシフトアッセイにより調べたところ、全ての遺伝子について結合が認められた。さらに、OsWRKY53、及びOsWRKY53Aspと相互作用するタンパク質を酵母two-hybrid法等により探索したところ、VQ domain-containing proteinファミリーの一種をコードする遺伝子 (*OsVQ*) がOsWRKY53およびOsWRKY53Aspの相互作用因子候補として得られた。OsVQとOsWRKY53およびOsWRKY53Aspの相互作用については、ゲルシフトアッセイにおいてOsVQタンパク質を共存させることで、両タンパク質の結合により見られるスーパーシフトが認められた。現在、組み換えタンパク質を用いたpull-down assayによっても解析を進めている。*OsWRKY53Asp*を過剰発現させたイネ (AspOX) では、対照区と比較した際のイネいもち病菌に対する抵抗性の上昇が通常型*OsWRKY53*の過剰発現株 (OX) よりも顕著に見られることも示された。

イネの防御応答を負に制御する転写因子であるOsWRKY28についても機能解析を行った。OsWRKY28過剰発現体イネではいもち病菌に抵

抗性が低下し、それを裏付けるように病原菌感染後の防御遺伝子の発現も低下していた。OsWRKY28が病原菌感染後早期に誘導されること、また防御応答は植物にとって負荷が大きい生理反応であることを考え併せると、OsWRKY28などの負の制御因子は、植物の防御応答が過度の負荷にならないように調整する機能を果たしている可能性が考えられる。

一方、イネのジテルペン型ファイトアレキシンの生合成酵素遺伝子群の発現を制御するマスター転写因子OsTGAP1についても、OsTGAP1過剰発現体の作製を行うとともに、OsTGAP1を特異的に認識する抗体を作製し、それらを用いて、ChIP-sequenceによる標的遺伝子の網羅的同定を試み、イネゲノム中において約2700箇所のOsTGAP1の結合位置を同定することに成功した。主要なジテルペン型ファイトアレキシンであるモミラクトンやファイトカサンの生合成遺伝子はそれぞれ4番染色体、2番染色体上でクラスターを形成していることが示されているが、興味深いことに、これらのクラスター内の生合成酵素遺伝子については一部の上流域にのみ弱い結合が見られただけで、遺伝子間領域およびクラスター領域の両端に強い結合が見出された。このようなクラスター領域の外側や遺伝子間領域における結合が、クラスター内の遺伝子の転写制御において重要な意味を持っている可能性があり、更なる追究が必要と考えられる。

我々はOsTGAP1が関与する転写制御機構について、知見を得るためOsTGAP1の相互作用タンパク質の酵母two-hybridシステムによるスクリーニングを行い、ヒストン修飾やクロマチンリモデリングに関与することが予想されるENT-domainを有するタンパク質を同定した。この事実はクラスター領域の外側や遺伝子間領域に結合したOsTGAP1を足掛かりにENT-domainタンパク質がクラスター領

域に結合し、この領域のヒストン修飾の変化やクロマチンリモデリングを引き起こし、その結果クラスター全体の転写が活性化されるような機構が存在している可能性を示しているのかもしれない。

一方、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子については、MEP経路の初発段階を触媒するデオキシキシルロースリン酸合成酵素をコードする*OsDXS3*のみについて、転写開始点付近に明確なOsTGAP1の結合が見出された。そこで、*OsDXS3*に注目し、その転写制御機構を詳細に解析することにした。*OsDXS3*の転写開始点付近に存在する結合領域には、OsTGAP1の予想結合配列であるTGACG-motif (TGACGT)が2つ近接して存在していた。まず、ゲルシフトアッセイにより、OsTGAP1はこれら2つのTGACG-motifを認識し、結合していることが示された。さらにレポーター・ジーンアッセイにより、これらの2つのTGACG-motifがエリシター未処理時のプロモーター活性に関与していることが明らかになった。

以上に加えて、Iowa州立大学グループ、とは、イネのファイトカサン生合成遺伝子クラスターに存在するシトクロムP450酵素遺伝子の機能解析、南京農業大学グループとは、イネのシトクロムP450酵素遺伝子*CYP71Z2*の機能解析、および微生物由来のタンパク質エリシターのファイトアレキシン誘導作用、東京理科大学グループとは、イネのファイトアレキシン生産の制御におけるカルシウムイオンチャンネルの機能について共同研究を行った。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Yamane H. Biosynthesis of phytoalexins and

its regulatory mechanisms in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (査読あり) in press (2013). DOI (10.1271)

② 宮本皓司、岡田憲典、植物が獲得した防御応答物質の生合成遺伝子クラスター イネにおけるファイトアレキシン生産の制御機構、*化学と生物*、(査読あり) 51(5): 310-317 (2013).

③ Li W, Shao M, Zhong W, Yang J, Zhang L, Okada K, Yamane H, Qian G, and Liu F.

*Oscyp71Z2* involves diterpenoid phytoalexin biosynthesis that contributes to bacterial blight resistance in rice. *Plant Sci.*, (査読あり) 207: 98-107 (2013). DOI (10.1016)

④ Chujo T, Miyamoto K, Shimogawa T, Shimizu T, Otake Y, Yokotani N, Nishizawa Y, Shibuya N, Nojiri H, Yamane H, Minami E, Okada K. OsWRKY28, a PAMP-responsive transrepressor, negatively regulates innate immune responses in rice against rice blast fungus. *Plant Mol. Biol.*, (査読あり) 82: 23-37 (2013). DOI (10.1007)

⑤ Li W, Shao M, Zhong W, Yang J, Okada K, Yamane H, Zhang L, Wang G, Wang D, Xiao S, Chang S, Qian G, and Liu F. Ectopic expression of Hrf1 enhances bacterial resistance via regulation of diterpene phytoalexins, silicon and reactive oxygen species burst in rice. *PLoS One*, (査読あり) 7(9): e43914 (2012). DOI (10.1371)

⑥ Hamada H, Kurusu K, Okuma E, Nokajima H, Kiyoduka M, Koyano T, Sugiyama Y, Okada K, Koga J, Saji H, Miyao A, Hirochika H, Yamane H, Murata Y and Kuchitsu K. Regulation of a proteinaceous elicitor-induced Ca<sup>2+</sup> influx and production of phytoalexins by a putative voltage-gated cation channel, OsTPC1, in cultured rice cells. *J. Biol. Chem.*, (査読あり) 287: 9931-9939 (2012). DOI (10.1074)

⑦ Wang Q, Hillwig ML, Okada K, Yamazaki K, Wu Y, Swaminathan S, Yamane H, and Peters RJ. Characterization of CYP76M5-8 indicates metabolic plasticity within a plant biosynthetic gene cluster. *J. Biol. Chem.*, (査読あり) 287: 6159-6168 (2012). DOI (10.1074)

[学会発表] (計 21 件)

① 岡田憲典他 2 名、植物における抗菌性イソプレノイドの生理と生産制御機構、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013. 3. 24-27、東北大学 (仙台)

② 小川哲史他 9 名、イネの病害抵抗性を制御する転写因子 OsWRKY53 の標的遺伝子の同定、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013. 3. 24-27、東北大学 (仙台)

③ 宮本皓司他 8 名、イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産に関与する MEP 経路遺伝子 *OsDX3* の転写制御機構の解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013. 3. 24-27、東北大

学 (仙台)

- ④宮本皓司他 8 名、イネの bZIP 型転写因子 OsTGAP1 による MEP 経路遺伝子 *OsDXS3* の転写制御機構の解析、第 54 回日本植物生理学会年会、2013.3.21-23、岡山大学 (岡山)
- ⑤小川哲史他 9 名、イネの病害抵抗性を制御する転写因子 *OsWRKY53* の相互作用因子の探索と機能解析、植物化学調節学会第 47 回大会、2012.10.27・28、山形大学農学部 (鶴岡)
- ⑥宮本皓司他 8 名、イネにおけるエリシター応答性 bZIP 型転写因子 *OsTGAP1* による MEP 経路遺伝子 *OsDXS3* の転写制御機構の解析、植物化学調節学会第 47 回大会、2012.10.27・28、山形大学農学部 (鶴岡)
- ⑦宮本皓司他 7 名、イネの bZIP 型転写因子 *OsTGAP1* を介したジテルペン型ファイトアレキシン生産制御機構、第 22 回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会、2012.9.29、新潟大学 (新潟)
- ⑧山崎浩平他 12 名、イネのファイトアレキシン生合成酵素遺伝子クラスターに存在する P450 遺伝子の機能解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012.3.22-25、京都女子大学 (京都)
- ⑨小川哲史他 9 名、イネの病害抵抗性を制御する転写因子 *OsWRKY53* の機能発現機構の解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012.3.22-25、京都女子大学 (京都)
- ⑩宮本皓司他 3 名、イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子クラスターの発現制御へのヒストン修飾の関与、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012.3.22-25、京都女子大学 (京都)
- ⑪宮本皓司他 10 名、ChIP-seq 解析によるイネのジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御する bZIP 型転写因子 *OsTGAP1* の標的遺伝子の同定、第 53 回日本植物生理学会年会、2012.3.22-25、2012.3.22-25 京都産業大学 (京都)
- ⑫清水崇史他 10 名、イネの病害抵抗性発現に関与する転写因子 *OsWRKY53* の標的遺伝子の探索、第 53 回日本植物生理学会年会、2012.3.22-25、2012.3.22-25 京都産業大学 (京都)
- ⑬Okada K 他 1 名、Induction of diterpenoid phytoalexin production in rice bycoordinated transcriptional control of biosynthetic pathway genes. 東京大学生物生産工学研究センター国際シンポジウム「植物バイオテクノロジーの将来展望」2011.11.15、東京大学 (東京)
- ⑭宮本皓司他 10 名、イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御する bZIP 型転写因子 *OSTGAP1* の機能解析、植物化学調節学会第 46 回大会、2011.11.01-02、宇都宮大学 (宇都宮)
- ⑮山根久和、イネの病害応答に関わるシグナ

ル伝達機構、蕨田セミナー「化学物質による植物のストレス耐性の制御」2011.7.14、東京大学 (東京)

- ⑯Miyamoto K 他 8 名、The bZIP transcription factor, *OsTGAP1*, is a master transcription factor regulating the inductive production of diterpenoid phytoalexins in rice. TERPNET2011, 10th International Meeting, 2011.5.22-26, Kalmar, Sweden
- ⑰山根久和 3 名、ジャスモン酸とファイトアレキシンの生合成、日本農芸化学会大会 2011 年度大会、2011 年 3 月 28 日、京都女子大学 (京都)
- ⑱増田優花他 10 名、イネの病害抵抗性に関与する転写因子 *OsWRKY53* の翻訳後修飾機構の解明、日本農芸化学会大会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学 (京都)
- ⑲宮本皓司他 8 名、イネの bZIP 型転写因子 *OsTGAP1* の標的遺伝子の探索、日本農芸化学会大会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学 (京都)
- ⑳増田優花他 8 名、イネの病害抵抗性を制御する転写因子 *OsWRKY53* の活性化機構の解析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 21-22 日、東北大学 (仙台)
- ㉑宮本皓司他 8 名、イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御する bZIP 型転写因子 *OsTGAP1* の過剰発現株を用いたトランスクリプトーム解析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 21-22 日、東北大学 (仙台)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山根 久和 (YAMANE HISAKAZU)  
帝京大学・理工学部・教授  
研究者番号：80090520

### (2) 研究分担者

岡田 憲典 (OKADA KAZUNORI)  
東京大学・生物生産工学研究センター・助教  
研究者番号：20312241