

## 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13日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570057

研究課題名（和文）イネの防御応答におけるサイトカイニンのシグナル伝達機能の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of cytokinin signaling pathway in defense response of rice

研究代表者

姜 昌杰 (JIANG CHANG-JIE)

独立行政法人農業生物資源研究所・耐病性作物研究開発ユニット・上級研究員

研究者番号：80370659

**研究成果の概要（和文）：**植物の防御応答において、植物ホルモンは必須なシグナル伝達機能を担っている。本研究では、イネ幼苗において、 $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenine (iP), iP riboside (iPR) and iPR 5' -phosphates (iPRP)などのサイトカイニン(CK)分子種がイモチ病菌の感染に反応して蓄積することを見いだした。さらに、CKはサリチル酸(SA)シグナル経路に相乗的に作用し、PR遺伝子の発現誘導に関与することを明らかにした。また、イモチ病菌の菌糸、胞子および培養液から各分子種のCKが検出され、イモチ病菌自身によるCKの生合成能が認められた。本研究の結果により、イモチ病菌は自身の増殖戦略として感染部位におけるCKレベルを高めるが、一方、宿主植物(イネ)はそれを感染シグナルとして認識し、防御反応の誘導に利用している可能性が示唆された。

**研究成果の概要（英文）：**Hormone crosstalk is pivotal in plant-pathogen interactions. In this study, we found that blast infection to rice seedlings lead to massive accumulation of  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenine (iP), iP riboside (iPR) and iPR 5' -phosphates (iPRP) in leaf blades. Consistent with this, cytokinin (CK) signaling was activated around the infection sites as shown by histochemical staining for  $\beta$ -glucuronidase activity driven by a CK-responsive *OsRR6* promoter. A diverse CK species were also detected in the hyphae (mycelium), conidia and culture filtrates of blast fungus, indicating that *M. oryzae* is capable of production, as well as hyphal secretion of CKs. Co-treatment of leaf blades with CK and salicylic acid (SA), but not with either one alone, markedly induced pathogenesis-related genes *OsPR1b* and *PBZ1* (probenazole-induced protein 1). These effects were diminished by RNAi-knockdown of *OsNPR1* or *WRKY45*, the key regulators of SA signaling pathway in rice, indicating that the effects of CKs depend on these two regulators. Taken together, our data imply a coevolutionary rice-*M. oryzae* interaction, wherein *M. oryzae* probably elevates rice CK levels for its own benefits such as nutrient translocation. Rice plants, on the other hand, sense it as an infection signal and activate defense reactions through the synergistic action with SA.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：防御応答、サイトカイニン、サリチル酸

### 1. 研究開始当初の背景

植物-病原菌の相互作用において、CK は主に病原菌の増殖に寄与していることが報告されている。例えば、サビ病菌やうどん粉病菌等の糸状菌に感染した植物の葉においては、感染部位に CK レベルが高い緑色のスポット(green island)が形成され、周辺組織との CK レベルの勾配により、周辺組織から green island に栄養分が移動し病原菌に供給されることが知られている。しかしながら、植物の防御応答における CK の機能についてはほとんど不明であった。

### 2. 研究の目的

植物の防御応答において、植物ホルモンは必須なシグナル伝達機能を担っている。各ホルモンはそれぞれ特定のシグナル伝達を媒介するが、異なるシグナル伝達間の相互作用は病害抵抗性の形成において重要な意味をもつ。本研究では、イネ-イモチ病菌の相互作用における CK シグナル伝達の役割を、SA シグナル伝達との相互作用を中心に、分子レベルで解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)イネ幼苗(日本晴)にイモチ病菌を接種し、各 CK 分子種のレベルを経時的に測定する。また、イモチ病菌の菌糸、胞子および菌糸の培養液についても同様な測定を行う。  
 (2)CK 応答性遺伝子 OsRR6 のプロモーターにレポーター遺伝子 GUS を連結して導入した形質転換イネ(OsRR6::GUS)にイモチ病菌を接種し、

CK シグナル経路の活性化を GUS 染色法により観察する。

(3)イネの葉片に様々なホルモン処理を行い、CK 代謝および防御関連遺伝子の発現を解析する。

(4)CK 分解酵素(CKX2)を薬剤(DEX)誘導的に発現する形質転換イネ(*GVG::CKX2*)を作製し、CK シグナル伝達のイモチ病抵抗性への関与を検証する。

### 4. 研究成果

(1)イネ幼苗にイモチ病菌を接種すると、isopentenyl adenine (iP)、iP riboside (iPR) および iPR 5'-phosphates (iPRP)のレベルが顕著に上昇した(Fig.1)。特に、イネにおける主要なCK

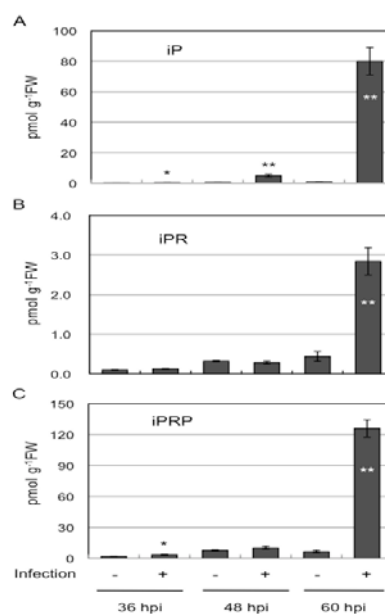


Fig. 1: Accumulation of CKs in *M. oryzae*-infected rice.

分子種であるiPにおいては100倍以上のレベル上昇が観察された(Fig.1)。他のCK分子種には顕著な変化は認められなかった。また、イモチ病菌感染後2~3日の*OsRR6-P::GUS*イネにおいて、感染部位の周辺でGUS活性が検出された。これらの結果は、CKシグナル伝達経路はいもち病感染に応答し、活性化することを示している。

また、オーキシシン(IAA)や一部のジベレリン分子種のレベル上昇も観察され、イネ-イモチ病菌の相互作用における複雑なホルモンクロストーク機構が示唆された。

(2)CKの生合成における律速酵素(IPT1-8)およびCK分解酵素(CKX1-11)の遺伝子に顕著な発現の変化は見られなかった。一方、イモチ病菌の菌糸、胞子および培養液から各分子種のCKが検出され、イモチ病菌自身によるCKの生合成能が認められた。但し、イモチ病菌の産生するCKレベルはいもち病感染葉のそれと比べて、50~100倍低いことから、上記CKの蓄積は主にイネIPT酵素の翻訳後修飾等によるde novo活性化機構によるものと考えられる。

(3)イネの葉片にSAおよびCKをそれぞれ単独で処理してもPR遺伝子の発現は誘導されないが、両者を共処理するとこれらPR遺伝子が顕著に発現誘導された(Fig.2)。このことから、CKはSAシグナル経路に相乗的に作用することにより防御反応の活性化に関与していると考えられる。

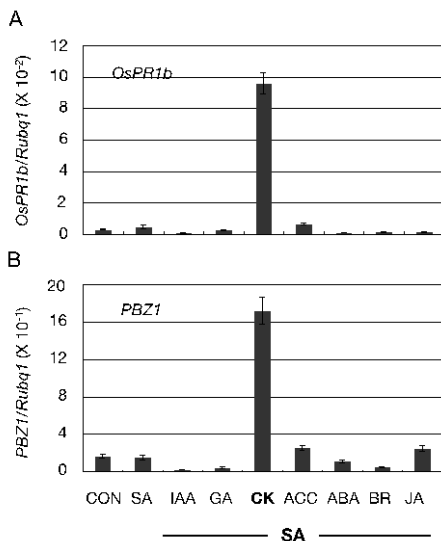


Fig. 2: CKs act synergistically with SA to activate defense gene expression.

(4)SA経路のキー因子である*WRKY45*および*OsNPR1*をRNAi法により発現抑制した形質転換

体イネ(*WRKY45-kd*, *OsNPR1-kd*)において、SAおよびサイトカイニン(CK)の共処理によるPR遺伝子の発現誘導は低減した。一方、*WRKY45*高発現形質転換体イネ(*WRKY45-ox*)においては、CK単独の処理によるPR遺伝子の発現誘導が観察された。これらの結果から、CKはSA経路において*WRKY45*/*OsNPR1* またはその下流に作用すると考えられる。

(5)GVG::*CKX2*イネは全ての系統において*CKX2*のleakyな発現が見られ、CK処理に対する*OsRR6*遺伝子の発現応答性が低下したことから、CKレベルが恒常的に低下していると推察された。イモチ病検定の結果、対照の非形質転換イネと比べ、顕著ないもち病抵抗性の変化は認められなかった。

以上の結果から、イモチ病菌は自身の増殖戦略として感染部位におけるCKレベルを高めるが、一方、宿主植物(イネ)はそれを感染シグナルとして認識し、防御反応の誘導に利用している可能性が示唆された。

## 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2件)

Jiang CJ, Shimono M, Sugano S, Kojima M, Liu X, Inoue H, Sakakibara H and Tatatsujii H (2013) Cytokinins act synergistically with salicylic acid to activate defense gene expression in rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26: 287-296.

Sugano S, Sugimoto T, Takatsujii T and Jiang CJ (2012) Induction of resistance to *Phytophthora sojae* in soyabean (*Glycine max*) by salicylic acid and ethylene. *Plant Pathol.* (DOI: 10.1111/ppa.12011)

[学会発表] (計1件)

Jiang CJ, Shimono M, Sugano S, Kojima M, Liu X, Inoue H, Sakakibara H, Takatsujii H (2011) Cytokinins act synergistically with salicylic acid

to activate defense gene expression in rice *9th International Symposium of Rice Functional Genomics* (Taipei).

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

姜 昌杰 (JIANG CHANG-JIE)

独立行政法人 農業生物資源研究所・耐病性  
作物研究開発ユニット

研究者番号：80370659

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：