

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580067

研究課題名(和文) イネいもち病菌感染時に誘導される宿主ジベレリン不活性化経路の生理的意義

研究課題名(英文) Physiological role of rice gibberellin inactivation pathway induced by rice blast infection.

研究代表者

真籠 洋 (Magome, Hiroshi)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：70425643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ジベレリン(GA)は種子発芽、茎葉の伸張、花成、果実肥大と顕花植物の一生を通して生長を促進する作用を持つ植物ホルモンである。その一方、近年ジベレリンのシグナルが病害応答にも関与するという報告がある。本研究ではイネいもち病菌感染イネ葉における宿主ジベレリン不活性化酵素遺伝子の顕著な誘導と、それに伴う感染葉内の活性型ジベレリンの低下についてその生理的な意義を明らかにする目的で行われた。その結果、宿主ジベレリン不活性化酵素遺伝子の誘導はこれまで知られていなかったイネの病害応答の一つであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gibberellins (GAs) are a class of plant hormones that promote growth in various stages of plant lifecycle: seed germination, stem elongation, leaf expansion and flowering and fruit growth. Meanwhile, recent reports revealed that gibberellin signal is involved in disease response. In this study, to clarify the physiological role of upregulation of a rice gene, encoding a GA inactivation enzyme and decreased levels of bioactive GAs in rice blast infected leaves. Our results suggested that this phenomenon might be one of the defensive reactions in rice.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、植物病理学、

キーワード：ジベレリン いもち病菌

1. 研究開始当初の背景

植物宿主と病原菌の分子間相互作用は多くの研究者が注目し、近年その理解が著しく進展している。一方、植物は病傷害を受けるとサリチル酸、ジャスモン酸、エチレンなどの植物ホルモンが誘導され、その結果様々な防御反応が起こる。最近の研究で、一部の病原菌が宿主側のこれら植物ホルモンシグナルをかく乱し感染性を高めていること、一方宿主側がそのかく乱を抑えようとする、新たな病原菌と宿主とのせめぎ合いが明らかにされた。

ジベレリン(GA)は種子発芽、茎葉の伸張、花成、果実肥大と一生を通して重要な働きをする植物成長促進ホルモンである。ジベレリンはイネ馬鹿苗病菌(*Gibberella fujikuroi*)など数種の糸状菌が産生することが知られており、イネ馬鹿苗病の徒長症状はこのホルモンによる。ところが、それら糸状菌のジベレリン産生の生理的な意義は明らかになっていない。先述の他のホルモンの研究例になぞらえ、糸状菌が植物側のジベレリンシグナルをかく乱し、植物防御反応を抑えている可能性が指摘されているが、その検証はなされていない。

申請者はマイクロアレイデータの解析から、イネいもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)感染初期におけるイネジベレリン不活性化酵素遺伝子、GA2-oxidase3の顕著な発現誘導を見いだした。申請者の知る限り、糸状菌感染時の宿主ジベレリン生合成/代謝遺伝子の応答は知られておらず、またイネいもち病菌がジベレリン産生菌である報告もこれまでない。本研究は申請者が見いだした上記の現象の生理的意義の解明を目的とする。計画を進めていく上で以下の予備的な研究結果を得ている。

(1)リアルタイム定量PCRによりマイクロアレイデータで見られたGA2-oxidase3遺伝子のいもち病菌接種5日目葉(病斑形成期にあたる)における発現誘導が確かめられた。

(2)同いもち病菌接種5日目の感染葉における活性型ジベレリン(GA₁)量の低下と不活性型(GA₈:2位が水酸化されたGA₁)の増加が認められた。

以上の結果はマイクロアレイの結果を強く支持するものであり、ジベレリンが関与する未知のイネいもち病菌-宿主イネ相互作用が存在する可能性を示すものと考えている。

2. 研究の目的

本研究は、イネいもち病菌感染時に見られたジベレリン不活性化酵素遺伝子GA2-oxidase3誘導の生理的意義の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1)イネいもち病菌感染時の経時的、空間的的植物ホルモン分析

イネいもち病菌感染時の内生ジベレリンの量的変動を詳細に調べる。接種後初期(植物細胞への侵入から病斑形成まで)の経時的な変化を測定し、ジベレリンが病害応答の時系列上のどのステップに深く関係しているかを明らかにする。さらに地上部各部位の植物ホルモン分析を行い、感染個体内でのジベレリン減少の全体像を明らかにする。

(2)イネいもち病菌の内生植物ホルモン分析

「イネいもち病菌はジベレリンを産生するか」をLC/MS/MSを用いて高感度に調べる。最近イネいもち病菌ゲノム上にジベレリン生合成遺伝子と相同性の高い遺伝子クラスターが存在することが報告されている。申請者はジベレリン応答性であるGA2-oxidase3遺伝子は、いもち病菌が産生したジベレリンに応答した可能性を考えた。人工培養したイネいもち病菌を植物ホルモン分析し、この仮説を検証する。

(3)GA2-oxidase3ノックダウンイネの作製

GA2-oxidase3遺伝子の喪失が植物側の病害防御反応に与える影響を、野生型と比較する目的で、GA2-oxidase3ノックダウンイネを作製する。GA2-oxidase3遺伝子は、これまで機能喪失変異体が見つからない。そこで人工マイクロRNA法をもちいてGA2-oxidase3ノックダウン形質転換イネを作製する。

(4)イネいもち病菌感染時のジベレリン関連遺伝子の発現解析

イネいもち病菌感染時のジベレリン生合成および代謝の実態をより明らかにするためGA2-oxidase3遺伝子以外のジベレリン関連遺伝子の発現を調査する。

4. 研究成果

(1)接種後2日目-6日目のイネいもち病菌感染葉について主要ジベレリン13種の経時的量的変化をLC/MS/MSを用いて詳細に調べた。その結果、予備実験と同じく接種後5日目と6日目において活性型ジベレリン(GA₁)量の低下と不活性型(GA₈:2位が水酸化されたGA₁)の増加が認められた他に、活性型GA₁の前駆体GA₂₀の減少とその不活性型GA₂₀(GA₂₀の2位が水酸化型)の増加が認められた。GA2-oxidaseはイネに10種類見つかり、そのいくつかは基質特異性に違いが認められる。GA2-oxidase3酵素はGA₁の他にGA₂₀を基質にすることが報告されている(図1)

ことから、この酵素遺伝子の発現誘導が、今回観察された体内ジベレリン量の変化の主要な原因になっていることが考えられた。

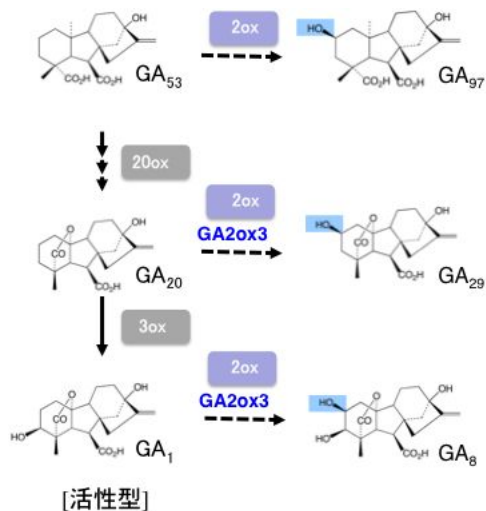


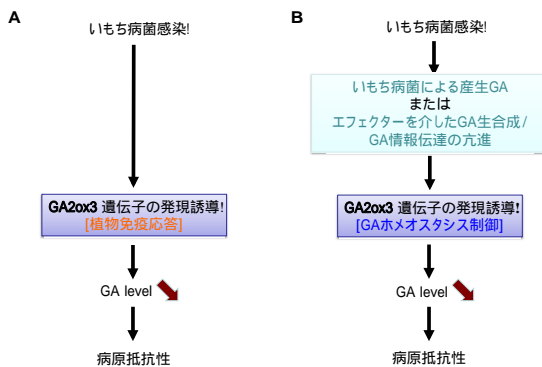
図 1

イネいもち病菌感染時の GA2-oxidase3 遺伝子の誘導と活性型ジベレリンの低下の時間的・空間的範囲を明らかにするため、いもち病菌感染個体地上部全体の、接種後 2 日目-5 日目のジベレリンの経日的量的変化を LC/MS/MS を用いて分析した。その結果 5 日目の感染個体地上部において活性型ジベレリン (GA₁) が減少し、不活性型ジベレリン (GA₈) の増加が認められた。この結果から、いもち病菌感染によるジベレリン内生量の低下は感染葉だけではなく、個体レベルで起こることが明らかになった。興味深いことに接種後 6 日目の shoot 長を測定した結果、いもち病菌感染イネは成長抑制を示していることが明らかになった。体内ジベレリンの減少がこの成長抑制に関与しているかは今後さらに調査する必要がある。

(2) 近年、植物ホルモンの一つであるアブシジン酸をいもち病菌が産生し、これが植物の抵抗性を抑制している可能性が指摘されている。アブシジン酸はジベレリンと拮抗的に作用することが知られることから、ジベレリン分析に用いた同質サンプルのアブシジン酸を LC/MS/MS を用いて定量分析した。その結果、いもち病菌感染によるアブシジン酸量の変動は見られなかった。

(3) イネいもち病菌がジベレリンを産生するか否かを明らかにするため、LC/MS/MS を用いて高感度に調べた。人工培養したイネいもち病菌の分生子や菌糸、その培養後の培地ろ液から活性型ジベレリン (GA₁, GA₃, GA₄) の検出を試みたが、いずれも検出されなかった。GA2-oxidase3 はジベレリン誘導性遺伝子として知られる。いもち病菌感染時に見られた

GA2-oxidase3 誘導の生理的な意義の仮説のひとつとして、いもち病菌が活性型ジベレリンを産生していることが考えられたが、本結果はその仮説(図 2 の仮説 B)を支持しないものである。最近他の研究グループにより人為的にジベレリン内生量が低下させたイネはいもち病菌感染に対して抵抗性を示すことが報告されている。これらのことから宿主ジベレリン不活性化酵素遺伝子の誘導はこれまで知られていなかったイネの病害応答の一つであることが示唆された(図 2 の仮説 A)。今後 GA2-oxidase3 遺伝子を誘導する感染シグナル経路の解明が課題である。



2つの仮説(AとB)

図 2

(4) 作製した GA2-oxidase3 遺伝子ノックダウンイネの形質転換イネの解析を行った。作製した独立 20 ラインのうち、6 ラインが不稔、10 ラインが低稔性を示した。GA2-oxidase3 遺伝子は通常においても高い発現を示すため、この生育異常が遺伝子の発現低下によることも考えられた。この生育異常のため、計画していた接種試験を期間内にすることが出来なかった。これとは別に表現型を調べるためフランス研究機関より入手した本遺伝子 T-DNA 挿入破壊株には実際には本遺伝子に T-DNA の挿入が認められなかった。

(5) イネいもち病菌ゲノム内にジベレリン産生菌であるイネ馬鹿苗病菌のジベレリン合成酵素遺伝子クラスターに類似の配列領域が存在することが報告されている。イネいもち病菌のジベレリン産生能力を検討するため、この領域の 2 つのジベレリン合成酵素様遺伝子の遺伝子破壊株の作製を試みた。しかし複数のプライマーおよび条件でこれら遺伝子の増幅を試みたが、各遺伝子を増幅することが出来なかった。本研究で用いたいもち菌北一株はゲノムプロジェクトの 70-15 株とは異なるため、系統によってゲノム配列に大きな違いがある可能性が考えられた。今後 70-15 株を用いて遺伝子破壊株を作製するとともに、本株感染時のイネ GA2oxidase-3 遺伝子発現を調べることを検討している。

(6) いもち病菌感染時の遺伝子変動の調査過程で、GA 2-oxidase3 遺伝子の他に、申請者らが最近明らかにしたジベレリン生合成酵素遺伝子である GA 13-oxidase 遺伝子の一つも感染特異的な誘導を示すことを見いだした。イネは強い活性型 GA₁、GA₄ と弱い活性型の GA₇ を主に合成する。GA13-oxidase は弱い活性型の GA₁ の生合成に必須な酵素である。すなわち GA13-oxidase は生合成酵素でありながら、ジベレリンの活性を弱める働きを持つ。従ってこの遺伝子の発現誘導と GA 2-oxidase3 遺伝子の誘導は細胞内の GA シグナルを下げる方向に働くため、感染時の協調したジベレリン生合成 / 不活性化制御である可能性も考えられ興味深い。

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)

[学会発表](計 3 件)

Magome, H., Nomura, T., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Ohnishi, T., Shinma, Y., Katsumata, T., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S.

CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice.

The international Plant Growth Substances Association 21th Conference

June 18 - June 22, 2013

Shanghai, China

真籠洋、藤枝俊介、花田篤志、大里修一、神谷勇治、山口信次郎

イネいもち病菌感染誘導性を示すジベレリン 2-酸化酵素遺伝子

植物化学調節学会

2012 年 10 月 27 日~2012 年 10 月 28 日

山形大学農学部

真籠洋、藤枝俊介、花田篤志、大里修一、神谷勇治、山口信次郎

いもち病菌感染イネのジベレリン分析

日本植物病理学会大会

2012 年 3 月 28 日

福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真籠 洋 (Magome Hiroshi)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：70425643