

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 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：2011～2013

課題番号：23580142

研究課題名(和文) イネの新規耐病性遺伝子BSR1による広範な病害抵抗性機構の解析

研究課題名(英文) Analyses of the mechanism of broad-spectrum disease resistance by BSR1 in rice

研究代表者

森 昌樹 (Masaki, Mori)

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：50192779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：イネの病害抵抗性遺伝子BSR1は、高発現することで広範囲の病原菌に対する抵抗性を付与することができるリン酸化酵素遺伝子である。マイクロアレイ解析及び遺伝学的な解析の結果、BSR1による病害抵抗性には病害抵抗性ホルモンであるサリチル酸はほとんど関与していないことが明らかになった。つぎにBSR1の機能喪失イネの解析から、BSR1がイネの本来有する病害抵抗性に寄与していることが確認された。さらに、BSR1の高発現により、イネでは白葉枯病、いもち病の2大病害に加え、他2種類の病害に対しても抵抗性を付与できることが示された。双子葉作物のトマトにおいても斑葉細菌病に抵抗性になることが示された。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of BSR1, a novel kinase gene, confers broad-spectrum disease resistance against bacterial and fungal pathogens in rice. Microarray and genetic analyses uncovered that the resistance is largely independent of the salicylic acid pathway. Loss-of-function analyses showed that BSR1 is involved in innate immunity of rice. Overexpression of BSR1 conferred resistance against two more diseases in addition to leaf blight and blast in rice. Further, overexpression of BSR1 conferred resistance to bacterial speck in dicot tomato.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：病害抵抗性 イネ

1. 研究開始当初の背景

植物の病害を克服するには、農薬により防除する方法もあるが、コストや農薬噴霧の手間等を考えると、植物自身の持つ抵抗性機構を強化した耐病性作物を開発することが望まれる。イネの病害ではいもち病、白葉枯れ病は日本における2大病害であり、これらの病原菌に対する耐病性品種が求められている。更に今後需要の増加が見込まれる飼料イネやバイオマス作物などでは、特定の病気だけでなく、より広範囲の種類の病害に有効な遺伝子が求められている。

近年イネの完全長 cDNA 13,000 種類を網羅的に過剰発現させた約 2 万系統の形質転換シロイヌナズナ系統 (イネ FOX ナズナ系統) が、理化学研究所植物科学研究センター、農業生物資源研究所、岡山県生物科学総合研究所 (現 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所) の共同研究により作製された。我々は新規の耐病性遺伝子を単離する目的で、イネ FOX ナズナ系統にトマト斑葉細菌病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) を接種し、ほとんどの系統が菌の感染により死滅する中で生き残る抵抗性系統を選抜した。その中で更に、病原糸状菌のアブラナ科野菜類炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*) にも抵抗性になる系統を選抜しその原因遺伝子を特定した。こうして選抜された 11 個の遺伝子を順次イネで過剰発現すると、その中の 1 つの遺伝子が細菌病の白葉枯病および糸状菌病のいもち病両方に強い抵抗性を示した。いもち病抵抗性の程度は、既存の極強いいもち病抵抗性品種「戦しよう」以上の非常に強いレベルであった。このように、2 種の植物種において 4 種類の病原菌に抵抗性を示したことから、本遺伝子を *BSR1* (*Broad-spectrum resistance 1*) と命名した。*BSR1* はその遺伝子配列から、新規のレセプター様細胞内リン酸化酵素 (Receptor-like cytoplasmic kinase, RLCK) をコードしていると予測された。

植物における病原菌由来物質 (PAMPs) を認識する受容体 (Pattern Recognition Receptor, PRR) としてシロイヌナズナでは FLS2 や EFR が知られているが、これらの PRR は PAMPs を受容すると BAK1 と結合し PRR, BAK1 共にリン酸化され RLCK である BIK1 をリン酸化し、シグナルを細胞内に伝達することが最近明らかにされた。しかしながら BIK1 から核にどのようにシグナルを伝達するかについてはまだ明らかにされていない。

BSR1 は BIK1 とアミノ酸配列上の類似性を有する RLCK なので、イネで BIK1 と同様に PRR からのシグナルを細胞内に伝達している可能性が考えられた。また *BSR1* 過剰発現イネは白葉枯病およびいもち病にも強い抵抗性を示したことから、我々は *BSR1* はイネの複数の PRR からのシグナルによりリン

酸化され、そのシグナルを細胞内に伝達し、その結果抵抗性応答を引き起こしているのではないかと予想した。しかしながら抵抗性機構の実際については研究開始当初は全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

イネの *BSR1* 遺伝子は、過剰発現することで広範囲の病原菌に対する抵抗性 (シロイヌナズナとイネ両方で細菌病および糸状菌病にそれぞれ抵抗性) を付与することができる新規のリン酸化酵素遺伝子である。またシロイヌナズナの BIK1 との構造的類似性から、*BSR1* は耐病性シグナル伝達初期に機能している可能性が考えられる。本研究では *BSR1* による病害抵抗性について分子生物学的・遺伝的・植物病理学的手法を用いて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *BSR1* 下流の遺伝子解析

BSR1 過剰発現 (*BSR1-OX*) イネの抵抗性機構についての情報を得るために、*BSR1-OX* イネと WT にいもち病菌を感染させ、感染後経時的に植物体より RNA を調製し、44K マイクロアレイ解析により発現レベルに差のある遺伝子を網羅的に探索する。解析結果をもとに、*BSR1* による耐病性機構の活性化が、サリチル酸 (SA) 経路、ジャスモン酸経路、エチレン経路等の既知の経路を介しているのか予測する。SA 経路が予測された場合は、SA 含量の低下した *nahG* イネと交配することにより、SA の関与の有無を明らかにする。

また *BSR1* 誘導性の代表的な遺伝子をイネに導入・過剰発現し、*BSR1* 同様の抵抗性が得られるかどうか調べる。

(2) 機能喪失型変異イネを用いた *BSR1* のイネにおける本来の機能の解析

RNAi 法を用いてノックダウンイネを作製する。*BSR1* の発現レベルは葉で高くないので、いもち病菌を感染数日後に上昇する *BSR1* の発現レベルを比較することにより、ノックダウンされている形質転換イネを選抜する。得られたノックダウンイネでいもち病抵抗性、白葉枯病抵抗性が低下するかどうか調べる。

また本来の下流遺伝子を明らかにするために、マイクロアレイ解析で見出された、過剰発現イネで発現の上昇しているシグナル関連遺伝子について、ノックダウンイネで逆に低下するかどうかリアルタイム PCR により解析する。

さらに TOS17 変異イネ系統群の PCR スクリーニングにより *BSR1* のノックアウトイネを探索する。

(3) *BSR1* 相互作用タンパク質の単離・同定

BSR1 タンパク質を HPB_X HA-PreScission

site-Biotinyl domain) タグを付けてイネ植物体で発現させる。HPB タグはビオチン化ドメインを持っているので、BSR1-HPB 融合タンパク質は植物内でビオチン化され、streptavidin ビーズに結合させることができる。BSR1-HPB を高発現する形質転換イネ、及びコントロールとして GUS-HPB を高発現する形質転換イネを作製し T1 種子を得る。T1 イネで病害抵抗性が認められる場合は、streptavidin ビーズを用いて BSR1 相互作用タンパク質を単離・同定する。

一方で酵母の two-hybrid 法を用いて既知のイネの PRR との相互作用を調べる。two-hybrid 法による解析については明治大学の渋谷直人教授、賀来華江准教授の協力により行う。

(4) BSR1 による抵抗性の植物病理学的解析

BSR1 による抵抗性がどこまで広範か調べるために、過剰発現イネを用いて細菌病である柄枯細菌病、糸状菌病であるごま葉枯病、ウイルス病である縞葉枯病ウイルス (RSV) 病に対して抵抗性検定を行う。RSV については (独) 農業・食品産業技術総合研究機構の笹谷孝英博士の協力により保毒ヒメトピウンカを用いて接種する。さらに双子葉作物のトマトにおいても、BSR1-OX マイクロトムが斑葉細菌 (*P. syringae* pv *tomato* DC3000) 病に抵抗性になるかどうか調べる。

病原菌は宿主植物への寄生性の程度から、絶対寄生菌 (biotroph)、殺生菌 (necrotroph)、その中間である条件的腐生菌 (hemibiotroph) に分類される。これまで BSR1 による抵抗性が明らかになっていた菌のうち、トマト斑葉細菌病菌、アブラナ科野菜類炭疽病菌、いもち病菌についてはすべて条件的腐生菌に分類される。一方で農業的には殺生菌も重要であり、灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) 等は双子葉作物で甚大な被害をもたらす糸状菌である。よって BSR1-OX シロイヌナズナを用いて灰色カビ病に対する抵抗性検定を実施する。

4. 研究成果

(1) BSR1 下流の遺伝子解析

BSR1 の下流遺伝子を同定するために、BSR1-OX イネと WT イネで発現レベルに差のある遺伝子をマイクロアレイ解析により比較した。いもち病菌非感染時でも BSR1-OX イネと WT の発現パターンに顕著な違いが見いだされた。BSR1-OX イネでは WRKY45 遺伝子を含む BTH (SA アナログ) 誘導性遺伝子の 4 割以上が発現増大していることが示された。SA 下流の主要な転写因子遺伝子 WRKY45 の発現レベルをリアルタイム PCR で確認すると、BSR1-OX イネで 10 倍程度に増大していた。また、BSR1-OX イネで発現増大している遺伝子の半分以上はいもち病感染により発現が

誘導される遺伝子であった。以上より BSR1-OX イネにおける抵抗性が、WRKY45 を含む SA 経路を介していることが予想された。BSR1 と WRKY45 や SA 経路との上下関係を調べるために、BSR1-OX イネと、SA 含量の低下した nahG イネを交配し交配種子を得、WRKY45 と OsNPR1 の発現を調べた。すると両遺伝子共に WT に比べ BSR1-OX では発現が上昇し、BSR1-OX/NahG 植物では NahG と同程度まで発現が低下していたので、BSR1-OX における両遺伝子の高発現は内在性 SA に依存していることが示された。いもち病抵抗性検定を行ったところ、BSR1-OX/NahG では BSR1-OX よりやや弱いものの、WT に比べ有意に強い抵抗性を示した。よって、BSR1-OX における抵抗性の増大には内在 SA 経路はあまり寄与してなく、むしろそれ以外の経路が主に関与することが示唆された。

マイクロアレイにより同定した BSR1 の下流候補遺伝子の 5 種について過剰発現イネを作製し、いもち病抵抗性検定を行ったところ、2 種について抵抗性の傾向が認められた。これらの遺伝子については今後さらに詳細な解析を行う予定である。

(2) 機能喪失型変異イネを用いた BSR1 のイネにおける本来の機能の解析

BSR1 遺伝子の 3' -UTR 配列をノックダウンベクター pANDA に連結し、ノックダウンイネを作製した。発現レベルはいもち病感染 3 日目で WT と比較するとノックダウンイネで 1/2 ~ 1/3 に低下していた。ノックダウンイネではいもち病抵抗性及び白葉枯病抵抗性が低下していたため、BSR1 はイネの本来の抵抗性に寄与していることが示された。

またマイクロアレイ解析で見出された、BSR1 過剰発現イネで発現の上昇するシグナル関連遺伝子の 2 つについてノックダウンイネで発現レベルの低下が認められた。これらの遺伝子は BSR1 の本来の下流遺伝子である可能性があるため、今後過剰発現イネを作製し抵抗性検定を行う予定である。

さらに TOS17 ミュータントパネルの PCR 検索により、BSR1 のエキソンに TOS17 が挿入しているノックアウト系統を 1 系統取得した。

(3) BSR1 相互作用タンパク質の単離・同定

BSR1-HPB を高発現する形質転換イネ、及びコントロールとして GUS-HPB を高発現する形質転換イネを作製し T1 種子を得た。Western プロットにより BSR1-HPB を高発現していることを確認し、稔性が低いながらも種子を得たが、発現が最高レベルのものは不稔であった。また高発現しているイネで病害抵抗性検定を実施したが、顕著な抵抗性は認められなかったため、この

実験は中断した。

一方で酵母の two-hybrid 法を用いて、既知のイネの PRR である OsCERK1 (キチンエリシターの受容体キナーゼ) Xa21(白葉枯病抵抗性遺伝子がコードする受容体キナーゼ) OsFLS2(フラジェリンの受容体キナーゼ) の細胞内ドメインと BSR1 との相互作用を調べたが、相互作用は認められなかった。

(4) BSR1 による抵抗性の植物病理学的解析

BSR1-OX イネは籾枯細菌病、ごま葉枯病に対しては顕著な抵抗性を示した。RSV 抵抗性検定についても、WT よりやや抵抗性の傾向が認められた。また、BSR1-OX マイクロトムの斑葉細菌病抵抗性検定を行ったところ抵抗性を示した。さらに BSR1-OX シロイヌナズナで殺生菌の灰色カビ病に対して抵抗性検定を行ったところ、予備的なデータではあるが抵抗性が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Higuchi-Takeuchi M, Mori M, Matsui M (2013) High-throughput analysis of rice genes by means of the heterologous full-length cDNA overexpressor (FOX)-hunting system The International Journal of Developmental Biology 57(6/7/8):517-523 (査読有) Doi: 10.1387/ijdb.130176mm

前田哲, 森昌樹 (2012) 広範な植物病原菌に対する抵抗性遺伝子 - イネから BSR1 遺伝子を FOX ハンティングにより発見 - 化学と生物 50(9):627-628 (査読有)

Dubouzet J.G, Maeda S, Sugano S, Ohtake M, Hayashi N, Ichikawa T, Kondou Y, Kuroda H, Horii Y, Matsui M, Oda K, Hirochika H, Takatsuji H, Mori M (2011) Screening for resistance against Pseudomonas syringae in rice-FOX Arabidopsis lines identified a putative receptor-like cytoplasmic kinase gene that confers resistance to major bacterial and fungal pathogens in Arabidopsis and rice Plant Biotechnology Journal 9(4):466-485 (査読有) DOI: 10.1111/j.1467-7652.2010.00568.x

〔学会発表〕(計 12 件)

Mori M, Maeda S, Sugano S, Naoki Y, Hayashi N, Goto S, Jiang C-J, Oda K, Hirochika H, Takatsuji H Broad-spectrum disease resistance by overexpression of rice BSR1 and its application to crop improvement 11th International Symposium on Rice Functional Genomics 2013.11.20-23, New delhi (招待講演)

前田哲, 林長生, 森昌樹 イネの複合病

害抵抗性遺伝子 BSR1 による非常に広範な病害に対する抵抗性の付与 日本育種学会 124 回講演会 2013.10.12-13, 鹿児島

Maeda S, Sugano S, Dubouzet J.G, Yokotani N, Jiang C.J, Oda K, Matsui M, Hirochika H, Takatsuji H, Mori M A cytoplasmic kinase gene provides resistance against major bacterial and fungal pathogens in Arabidopsis and rice 10th International Congress of Plant Pathology 2013.8.25-30, Beijing (招待講演)

前田哲, 菅野正治, 中込マリコ, 宮尾安藝雄, 姜昌杰, 西澤洋子, 高辻博志, 森昌樹 イネの複合病害抵抗性遺伝子 BSR1 による抵抗性にはサリチル酸非依存性の経路が主に関与する 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013.3.21-23, 岡山

前田哲, 菅野正治, 中込マリコ, 宮尾安藝雄, 姜昌杰, 高辻博志, 森昌樹 イネの複合病害抵抗性遺伝子 BSR1 とサリチル酸シグナルとの関連解析 日本育種学会 122 回講演会 2012.9.14-15, 京都

Maeda S, Sugano S, Nakagome M, Miyao A, Jiang C-J, Takatsuji H, Mori M Broad-spectrum disease resistance by BSR1 shares transcriptional components with BTH-inducible resistance in rice XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions 2012.7.29-8.2 京都

前田哲, 菅野正治, 高辻博志, 森昌樹 広範な病害に対する抵抗性遺伝子 BSR1 による抵抗性機構のマイクロアレイ解析 第 53 回日本植物生理学会年会 2012.3.16-18, 京都

Maeda S, Dubouzet J.G, Sugano S, Ichikawa T, Kondou Y, Yokotani N, Oda K, Matsui M, Hirochika H, Takatsuji H, Mori M Identification of BSR1 gene that confers resistance to rice blight and blast by fox hunting 9th International Symposium of Rice Functional Genomics 2011.11.7-6, Taipei (招待講演)

前田哲, 横谷尚起, 菅野正治, 小田賢司, 松井南, 廣近洋彦, 高辻博志, 森昌樹 (2011) 複合病害抵抗性遺伝子 BSR1 による単子葉および双子葉作物への病害抵抗性の付与 日本育種学会 120 回講演会 2011.9.23-24, 福井

〔図書〕(計 1 件)

Higuchi M, Kondou Y, Mori M, Ichikawa T, Matsui M (2012) Characterization of rice genes using a heterologous full-length cDNA expression system Transgenic Plants: Methods and Protocols 3(8):75-90 (Springer)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 4 件)

名称：リゾクトニア菌抵抗性遺伝子
発明者：森昌樹、前田哲、横谷尚起、小田賢司、近藤陽一、松井南
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2014/052684
出願年月日：H26.2.5
国内外の別： 国外

名称：リゾクトニア菌抵抗性遺伝子
発明者：森昌樹、前田哲、横谷尚起、小田賢司、近藤陽一、松井南
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-020066
出願年月日：H25.2.5
国内外の別： 国内

〔その他〕

報道関連情報（計 1 件）
日経バイオテク 2011.9.26 日号 p.17-18 で
学会発表 の内容について紹介される。

アウトリーチ活動（計 2 件）

森昌樹 “万が一”の発見！～病気に強く、
環境にやさしい作物をつくる～平成24年度
農業生物資源研究所一般公開サイエンスカ
フェ 2012.4.21、つくば

森昌樹 広範な植物病原菌に対する抵抗
性遺伝子～分子育種への利用～第10回バイ
オテクノロジー国際会議，バイオアカデミ
ックフォーラム 2011.6.29、東京

6. 研究組織

研究代表者

森 昌樹 (MORI, Masaki)

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：50192779