

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 宇治 雄也
Name

学位論文題目： イネ病害抵抗性誘導時に重要なジャスモン酸シグナル伝達機構の解明
Title of Dissertation

学位論文要約：
Dissertation Summary

【緒言】

世界の主要作物であるイネ(*Oryza sativa* L.)は、栽培技術や農薬等のレベルが飛躍的に向上している現在においても、アジアの稲作地域では、かび病と細菌病だけでも毎年の予想収穫量の 20~30% の被害がある。例えば、細菌病であるイネ白葉枯病は、イネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*)によって引き起される病害である。この病原菌は、葉の傷や葉縁にある水孔から侵入し、増粘性のあるキサントタンガムと呼ばれる多糖を分泌する。最終的にキサントタンガムが道管を詰まらせ、葉が黄白、灰白色になって枯死する。また、イネ白葉枯病は植物細菌病中で世界の重要度が 4 位で、イネ細菌病では第 1 位となっている。このイネ白葉枯病を引き起す *Xoo* は、宿主への感染戦略としてセルラーゼ(ClsA)及びリパーゼ/エステラーゼ(LipA)等の細胞壁分解酵素を分泌する。これら細胞壁分解酵素合成遺伝子を変異させた *Xoo* は病原性が低下することが報告されている。また、これら細胞壁分解酵素は、*Xoo* の病原性に重要なだけでなく、カロース蓄積やプログラム細胞死といったイネ抵抗性反応にも関与する。例えば、イネに LipA を処理すると植物ホルモンの一つであるジャスモン酸(JA)の生合成に関わる遺伝子の発現誘導や JA の活性型因子である Jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile)含量の増加が確認され、イネ白葉枯病に対する抵抗性が強化される。さらに近年、*Xoo* 抵抗性イネ品種の JA-Ile 含量は、感受性品種と比べて高いことが報告されている。また、近年、イネいもち病を引き起す *Magnaporthe oryzae* は、antibiotic biosynthesis monooxygenase (Abm)を分泌し、JA を 12OH-JA に変化することが報告されている。この 12OH-JA は、トマト(*Solanum lycopersicum*)やシロイヌナズナ、オオムギ(*Hordeum vulgare*)においてつの巻きつきや根の伸長阻害、種子発芽、遺伝子の発現変動などの JA 応答を不活化する働きが報告されている。さらに、Abm を欠損した *M. oryzae* を罹病性のイネに接種すると、12OH-JA への不活化能力が低下したことによる methyl jasmonate (MeJA)の高蓄積が起こることが明らかになっている。以上のことより、*M. oryzae* が JA シグナルを不活化することによる宿主への感染戦略をとっていることが示唆できる。さらに、近年、当研究室の先行研究を含めイネに JA を処理すると、*Xoo* や *M. oryzae* によって引き起こされるイネ白葉枯病やイネいもち病に対する抵抗性が強化されることが明らかとなった(Yamada et al., 2012)。また、イネへの JA 処理は、*OsPR1a*、*OsPR1b*、*OsPR2*、*OsPR5*、*OsPR10*等の多くの PR 遺伝子の発現が誘導され、さらには、抗菌物質であるジテルペン型ファイトアレキシンであるモミラクトン A 及びフラボノイド型ファイトアレキシンであるサクラネチンの蓄積を誘導することも明らかとなっている。これらの知見から、イネの病害抵抗性において JA 及び JA シグナルが極めて重要であることが示唆される。

双子葉類のモデル植物であるシロイヌナズナにおいては JA シグナルが担う植物病理学的役割が様々な分子学的実験を用いて解析され、その複雑なメカニズムの全貌が明らかとなりつつある。さらに、JA シグナルにおいて働く転写因子の重要性も数多く報告されてきた。単子葉のモデル植物であるイネにおいては近年、JA がイネ白葉枯病抵抗性を強化することが報告され、その抵抗性には OsJAZ タンパク質の一つである OsJAZ8 が中心的な役割を担っていることが明らかとなっている。またこれまでの報告によりイネの JA シグナルが関与する病害抵抗性機構において転写因子が重要な役割を担っているのは明確であるが、JA シグナル伝達機構で機能し、JAZ タンパク質により制御される転写因子は未解明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、OsJAZ タンパク質によって制御される二つの転写因子について詳細な解析をすすめている。一つ目に、AtMYC2 のホモログである OsMYC2 に着目した。AtMYC2 は上述した通り、様々なシグナル伝達機構で機能する転写因子であり、病害抵抗性においても重要であることが明らかとなっている。一方で、OsMYC2 がイネの

成長発達の側面において重要であることが報告されているが、OsMYC2 が制御するイネ病害抵抗性機構については未解明である。そこでイネ白葉枯病をモデルとし、JA 誘導性のイネ白葉枯病抵抗性において OsMYC2 がどのような機能を有しているかを解明していく。二つ目に、MYB 型転写因子である JMTF1 に着目した。本研究室で行われた JA 処理したイネのマイクロアレイ解析において明らかとなった JA 誘導性の転写因子群のうち、最も発現誘導が認められた転写因子である JMTF1 は、遺伝子発現レベルで OsJAZ8 の制御下にあることが明らかとなっているが、イネ白葉枯病抵抗性においては機能未知である。そこで、イネ白葉枯病抵抗性において JMTF1 がどのようなシグナルを制御し、寄与しているかを解明していく。

【材料及び方法】

■OsMYC2 が制御するイネ白葉枯病抵抗機構の解明

まず、OsJAZ8を含むイネのJAZタンパク質とOsMYC2との相互作用をY2H(yeast-two-hybrid)法を用いて解析した。次に、JA処理後のOsMYC2遺伝子の経時的な発現挙動を行った。さらに詳細に解析するため、OsMYC2を過剰発現させたイネを作出した。まず、この過剰発現イネを用いてJA感受性及びイネ白葉枯病に対する抵抗性を野生株(WT)と比較した。次に、マイクロアレイ解析等でOsMYC2過剰発現イネにおいて発現変動している遺伝子を見出した。さらに、それら遺伝子の内、OsMYC2が直接制御している遺伝子をChIP-qPCRを用いて同定した。

■OsMYC2が制御するイネ白葉枯病抵抗機構の解明

上記の解析により、OsMYC2がJAシグナルのポジティブレギュレーターであることが明らかとなった。また、JAが葉の老化現象を促進することが明らかとなり、OsMYC2も葉の老化作用に影響を与える可能性が考えられた。そこでまず、DIS(dark-induced senescence)アッセイを行い、OsMYC2過剰発現イネ及びJA非感受性の表現型を示すOsJAZ8ΔC過剰発現イネとWTの暗所誘導性の老化を比較した。次に、qRT-PCRを用いてOsMYC2過剰発現イネにおける老化関連遺伝子(SAG遺伝子)の発現挙動を調べた。さらに、ChIP-qPCRによってOsMYC2が直接制御するSAG遺伝子を同定した。

■JMTF1が制御するイネ白葉枯病抵抗機構の解明

まず、JMTF1のJA処理後の経時的な発現挙動を解析した。次に、さらに詳細に解析するため、JMTF1を過剰発現させたイネを作出した。まず、この過剰発現イネを用いてJA感受性及びイネ白葉枯病に対する抵抗性をWTと比較した。さらに、この過剰発現イネにおけるJA後期応答性のPR遺伝子の発現挙動解析を行った。その後、JMTF1応答性のOsPrx26遺伝子を過剰発現したイネを作出し、詳細な解析を進めた。また、JMTF1過剰発現イネのオーキシンに関する表現型に着目し、重力屈性等を解析した。また、JMTF1過剰発現イネにおいてオーキシン応答性遺伝子の発現挙動解析をおこなった。さらに、JMTF1応答性の遺伝子の内、JMTF1が直接制御している遺伝子をChIP-qPCRを用いて同定した。

【結果】

■OsMYC2 が制御するイネ白葉枯病抵抗機構の解明

OsMYC2 はイネに存在する 15 個の OsJAZ のうち、OsJAZ14 以外の全ての OsJAZ と結合し、その結合は JAZ-Interacting domain (JID)依存的事であることが明らかとなった。また、OsMYC2過剰発現イネは、JA に対して高感受性の表現型を示し、イネ白葉枯病に対する抵抗性が強化された。また、この過剰発現イネでは JA 早期応答性の抵抗性関連遺伝子及び OsJAZ10 の発現が顕著に誘導されていた。そこでそれら遺伝子のプロモーターを標的とした ChIP-qPCR を行った結果、OsMYC2 は特定の G-box-like モチーフを認識することが明らかとなった。次に、JID を欠損させた OsMYC2ΔJID 遺伝子を過剰発現したイネを作出した。この過剰発現イネは、OsMYC2 過剰発現イネで見られた防御関連遺伝子の発現誘導が見られなかった。さらに、OsMYC2 は JID 依存的に核局在性を示すことが明らかとなった。

■OsMYC2 が制御する老化作用の解明

OsMYC2 は上記の解析において、JA 処理条件下で葉の黄化現象を促進することが明らかとなった。そこで、DIS アッセイを行った結果、OsMYC2 過剰発現イネでは WT イネと比較して暗条件下でのクロロフィル分解が促進され、老化が促進することが明らかとなった。一方で、OsJAZ8 が恒常

的に蓄積する *OsJAZ8/AC* 過剰発現イネでは老化が遅延した。そこで *OsMYC2* 過剰発現体における老化関連遺伝子 (*SAG* 遺伝子) の発現挙動を調べたところ、いくつかの *SAG* 遺伝子の恒常的な発現誘導が認められた。さらに、ChIP アッセイによって、*OsSAG12* 遺伝子のプロモーターの G-box に *OsMYC2* が結合することが明らかとなった。

■JMTF1が制御するイネ白葉枯病抵抗機構の解明

JMTF1 は、JA 処理後 48 時間で最も高い転写レベルを示した。また、イネに存在する JAZ タンパク質と *JMTF1* は相互作用しなかった。*JMTF1* 過剰発現イネは、JA に対して高感受性の表現型を示し、イネ白葉枯病に対する抵抗性が強化された。さらに、この過剰発現イネでは JA 誘導性の *OsPrx26* 遺伝子の発現が恒常的に発現していた。そこでそれら遺伝子のプロモーターを標的とした ChIP-qPCR を行った結果、*JMTF1* は、*OsPrx26* プロモーター上の特定の MYB 認識モチーフに結合することが明らかとなった。また、*OsPrx26* を過剰発現イネはリグニン含量が増加し、イネ白葉枯病に対する抵抗性が強化された。さらに、 γ -terpinene 合成酵素遺伝子である *OsTPS24* の発現が *JMTF1* 過剰発現イネでは恒常的に発現し、 γ -terpinene の高蓄積が示された。また、*JMTF1* 過剰発現イネにおいては、重力屈性能の低下とともに、多くのオーキシン応答性遺伝子の発現が抑制されていた。一方で、オーキシンシグナルの負の制御因子である *OsIAA13* をコードする遺伝子に関しては、オーキシン非依存的な高い発現誘導が認められた。そこで、機能獲得型 *Osiaa13* 変異体を用いて解析を進めたところ、この変異体はイネ白葉枯病抵抗性が強化された。

【考察】

■OsMYC2 が制御するイネ白葉枯病抵抗機構の解明

本研究の解析より、*OsMYC2* は JA シグナルのポジティブレギュレーターとして機能し、イネ白葉枯病抵抗性を正に制御することが明らかとなった。*OsMYC2* 過剰発現イネにおいて発現誘導が認められた *OsMYC2* 応答性抵抗性関連遺伝子や *OsJAZ10* は JA 早期応答性の遺伝子であった。一方で、先の解析で同定された JA 誘導性 PR 遺伝子に関しては *OsMYC2* 過剰発現イネにおいての発現誘導されないことが明らかとなった。さらに、これら JA 誘導性 PR 遺伝子は、JA 処理後、*OsMYC2* 応答性防御関連遺伝子と比較して遅い時間で発現誘導のピークが見られた。これらのことから、JA 応答は遺伝子発現レベルで早期応答と後期応答に分けることができ、*OsMYC2* が JA 早期応答性防御関連遺伝子を制御している可能性が示された。

以上のことから、*OsMYC2* は JA 早期誘導性のイネ白葉枯病抵抗機構において重要な転写因子であることが明らかとなった。

■OsMYC2 が制御する老化作用の解明

本研究の解析により、*OsMYC2* が葉の老化作用に関与することが明らかとなった。また、*OsMYC2* 過剰発現イネにおいて、シロイヌナズナにおいて主要な *SAG* 遺伝子のホモログである *OsSAG12* の発現誘導が認められた。以前の解析により JA の活性体の受容体である *OsCOI1b* を変異させたイネ植物体は葉の老化作用が遅延することが報告されていることから、*OsCOI1b*-*OsJAZ*-*OsMYC2* 経路において *OsSAG12* 遺伝子が制御され暗所誘導性の老化作用を促進している可能性が示された。

以上のことから、*OsMYC2* は老化作用を正に制御する転写因子であることが明らかとなった。

■JMTF1が制御するイネ白葉枯病抵抗機構の解明

本解析により、*OsJAZ8* の制御するシグナル伝達機構で機能する *JMTF1* は JA シグナルの正の制御因子であることが明らかとなった。さらに、JA シグナルにおいては、*JMTF1* は *OsPrx26* 及び *OsTPS24* の発現を制御することにより物理的障壁であるリグニンの合成及びイネ白葉枯病菌に対して抗菌活性を有するモノテルペンである γ -terpinene の合成に関与し、イネ白葉枯病抵抗機構に寄与する可能性が示された。また、*JMTF1* は JA シグナルを正に制御する因子であると同時に、*OsIAA13* の発現誘導を制御することでオーキシンシグナルの負の制御因子としても機能することが明らかとなった。以上のことから、イネ白葉枯病抵抗性において、*JMTF1* は JA シグナルとオーキシンシグナルの分子スイッチとして機能している可能性が示された。