

# オーキシン集積を制御する白葉枯病圃場抵抗性遺伝子 *OsSAUR51*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業研究センター <sup>あお</sup>青 <sup>き</sup>木 <sup>ひで</sup>秀 <sup>ゆき</sup>之

## はじめに

白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae*) は日本西南暖地および東南アジアでのイネの主要病原菌である。白葉枯病抵抗性には真性抵抗性と圃場抵抗性がある。真性抵抗性は単一の抵抗性遺伝子による特定の菌系への強い抵抗性であり、抵抗性を持たない菌系に対しては親和性となる。他方、圃場抵抗性は複数の菌系に対して感染はするが幅広い抵抗性を持ち、新しい菌系の出現による抵抗性の無効化が生じにくい。筆者らはいまだわかっていない白葉枯病圃場抵抗性のメカニズムを解明することが作物防疫上重要であると考え、既存品種および突然変異系統から圃場抵抗性遺伝子の単離に取り組んでいる(青木ら, 2006; Aoki et al., 2016; 青木・斎藤, 2016)。本研究では圃場抵抗性遺伝子 *OsSAUR51* が白葉枯病抵抗性を誘発することと、病原菌に対するオーキシンを介した圃場抵抗性機構に関して論議したい (Aoki et al., 2016 a)。

## I 白葉枯病抵抗性遺伝子 *OsSAUR51* の同定

筆者らはイネの白葉枯病抵抗性遺伝子を探索するために、レトロトランスポゾン *Tos17* が挿入された‘日本晴’由来の突然変異系統群 (Miyao et al., 2007) に白葉枯病菌 (race IIIA) を剪葉接種し、白葉枯病抵抗性が低下した突然変異個体 (XC20) を選抜した (青木ら, 2006)。原品種‘日本晴’およびXC20に5菌系 (race IA, II, IIIA, IV, V) の白葉枯病菌を接種すると、XC20はいずれの菌系に対しても白葉枯病抵抗性が低下していたことから、*Tos17* によって圃場抵抗性にかかわる遺伝子の機能が失われたと考えられる。

XC20からゲノムDNAを単離し、白葉枯病圃場抵抗性にかかわる *Tos17* の隣接配列をInverse PCRによって調査すると、第9染色体の *Tos17* 挿入部位9 bp下流にイネSAUR (small auxin-up RNA) ファミリーの *OsSAUR51* (432 bp) が存在した。SAURは *Aux/IAA* (auxin/indole

acetic acid), *GH3* (Gretchen Hagen 3) とともにオーキシン早期反応遺伝子と定義されている (HAGEN and GUILFOYLE, 2002)。

‘日本晴’ゲノムには58個の *OsSAUR* ファミリーが存在するが (JAIN et al., 2006), アミノ酸配列で相同性を比較すると *OsSAUR51* (144aa) は‘日本晴’のほかの *OsSAUR* とは相同性が低く、*OsSAUR40* (78%), *OsSAUR42* (66%) だけが60%以上の相同性があった。*OsSAUR51* 以外に病原菌の感染によって誘導されるSAURにはコショウ *upa5* (MAROIS et al., 2002) があるが、*OsSAUR51* との相同性は36%しかなく特異的なドメインも存在しなかったことから、SAURは病原菌の感染を直接の発現シグナルとしていないと推測された。

## II 白葉枯病菌接種およびオーキシン処理による *OsSAUR51* の発現

筆者らはRT-PCRによって白葉枯病菌感染およびオーキシン処理 (10  $\mu$ M IAA) 後の *OsSAUR51* mRNA の発現を調査した (図-1)。*OsSAUR51* mRNA の発現を調査した (図-1)。*OsSAUR51* mRNA の発現が観察された。しかしXC20では *OsSAUR51* mRNA の発現はほとんど観察されなかったことから、開始コドン直前に挿入されていた *Tos17* が *OsSAUR51* の発現を妨げていると考えられた。これまでの研究から、病原菌が感染すると病原菌自身のオーキシ

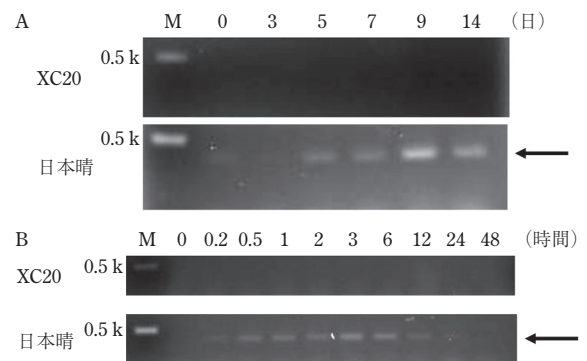


図-1 白葉枯病菌の接種 (A) およびオーキシン処理 (10  $\mu$ M IAA) (B) による *OsSAUR51* mRNA の発現  
M: マーカー, 矢印: *OsSAUR51* mRNA.

The Rice *OsSAUR51* Gene Functions in the Auxin-related Field Resistance against Bacterial Blight Disease. By Hideyuki Aoki

(キーワード: イネ, 白葉枯病, 圃場抵抗性, オーキシン, オーキシン早期反応遺伝子, SAUR)

ン合成や植物のオーキシン合成系の活性化等によって植物内にオーキシンが集積することがわかっている (O'DONNELL et al., 2003 ; FU et al., 2011 ; TANAKA et al., 2011)。 *OsSAUR51* mRNA は白葉枯病菌接種時よりもオーキシン処理によって早期に誘導されたことから、白葉枯病菌接種によるオーキシンの集積をシグナルとして発現したと推察される。

### III *OsSAUR51* 再導入による機能解析

*OsSAUR51* の機能を解明するために、'日本晴' 由来 *OsSAUR51* 突然変異体の XC20 にプロモーター領域を含む *OsSAUR51* を再導入した組換え体 (*OsSAUR51*-1, -2) を作出した。白葉枯病菌接種 7 日後の XC20 で観察されなかった *OsSAUR51* mRNA の発現が、*OsSAUR51* 再導入組換え体では再び観察された。さらに組換え体 (T<sub>1</sub>) の白葉枯病抵抗性およびオーキシン量を調査した (図-2)。接種 3 週間後の病斑長を測定した結果、*OsSAUR51* 再導入組換え体である *OsSAUR51*-1 (平均病斑長: 2.42 cm) および *OsSAUR51*-2 (3.76 cm) は XC20 (7.10 cm) よりも白葉枯病抵抗性が回復し、原品種'日本晴' (2.92 cm) 並みの強さになった。白葉枯病菌接種 3 週間後には'日本晴' のオーキシン量は約 2.7 倍 (0.78 から 2.07 nmol/gFW) に増加した。接種 3 週間後の XC20 のオーキシン量 (平均 IAA 量: 3.23 nmol/gFW) は'日本晴' (2.07 nmol/gFW) の約 1.6 倍に増加し、*OsSAUR51* 再導入組換え体 (それぞれ 2.02, 2.20 nmol/gFW) では再び'日本晴' 並みに低下した。この結果から、XC20 内の *OsSAUR51*

mRNA 発現の抑制が白葉枯病抵抗性の低下および白葉枯病菌感染後のオーキシンの集積につながったことが示唆された。

### IV *OsSAUR51* 高発現による機能解析

*OsSAUR51* の機能をさらに調査するために、CaMV35S 改変型高発現プロモーター RexPhi (MITSUHASHI et al., 1996) に連結した *OsSAUR51* をイネ'どんとこい'に導入し、*OsSAUR51* 高発現型組換え体 (RexPhi::*OsSAUR51*-1, -2, -3) を作出した。原品種'どんとこい'では白葉枯病菌接種前に *OsSAUR51* mRNA は発現していなかったが、*OsSAUR51* 高発現型組換え体では *OsSAUR51* mRNA の発現が観察された。さらに組換え体 (T<sub>1</sub>) の白葉枯病抵抗性およびオーキシン量を調査した (図-3)。白葉枯病菌接種 3 週間後の病斑長を測定した結果、*OsSAUR51* 高発現型組換え体 (平均病斑長: それぞれ 3.04, 3.64, 4.30 cm) は'どんとこい' (8.62 cm) よりも白葉枯病抵抗性が向上した。*OsSAUR51* 高発現型組換え体の外観は'どんとこい' とほとんど差がなく、白葉枯病菌接種前のオーキシン量も *OsSAUR51* 高発現型組換え体 (平均 IAA 量: 1.30, 1.26, 0.78 nmol/gFW) と'どんとこい' (1.73 nmol/gFW) ではほとんど変わらなかった。'どんとこい'では白葉枯病菌接種 3 週間後にはオーキシン量は約 1.8 倍 (1.73 から 3.10 nmol/gFW) に増加したが、*OsSAUR51* 高発現型組換え体では'どんとこい'に比べてオーキシンは集積されなかった (それぞれ 1.30, 1.26, 0.78 から 1.27, 1.57, 2.55 nmol/gFW)。この結果から、*OsSAUR51* は

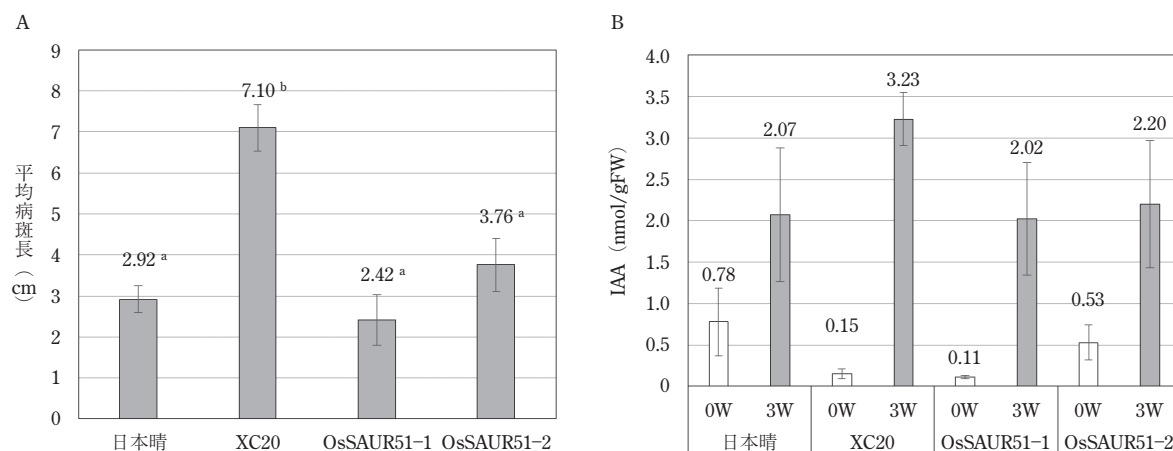


図-2 '日本晴' 由来 *OsSAUR51* 突然変異体 (XC20) および XC20 への *OsSAUR51* 再導入組換え体 (*OsSAUR51*-1, 2) の白葉枯病抵抗性およびオーキシンの集積

原品種'日本晴' (WT), '日本晴' 由来 *OsSAUR51* 突然変異体 (XC20), XC20 に *OsSAUR51* を再導入した組換え体 (T<sub>1</sub> 世代, *OsSAUR51*-1, 2) に白葉枯病菌 (race IIIA) を接種し, 3 週間後の 5 葉の病斑長の平均値 ± 標準誤差 (A), および接種前 (0W), 接種 3 週間後 (3W) のオーキシン量 ± 標準誤差 (B)。a と b は 1% レベルで有意差がある。

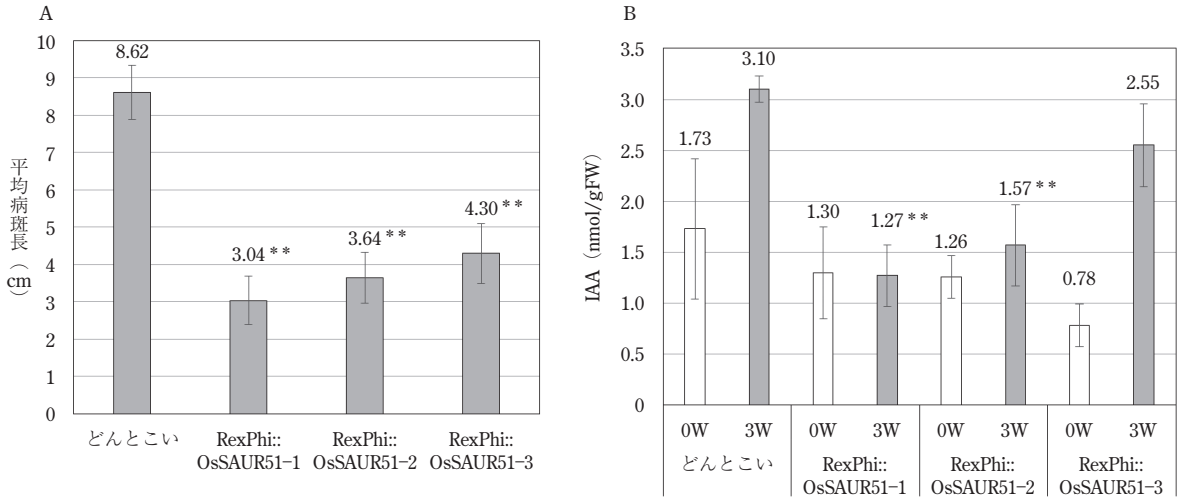


図-3 *OsSAUR51* の高発現型組換え体の白葉枯病抵抗性およびオーキシンの集積  
 原品種‘どんとこい’および *OsSAUR51* 高発現型組換え体 (T<sub>1</sub> 世代, RexPhi::*OsSAUR51*-1, 2, 3) に白葉枯病菌 (race IIIA) を接種し, 3週間後の5葉の病斑長の平均値±標準誤差 (A), および接種前 (0W), 接種3週間後 (3W) のオーキシニン量±標準誤差 (B). \*\*は‘どんとこい’と1%レベルで有意差がある.

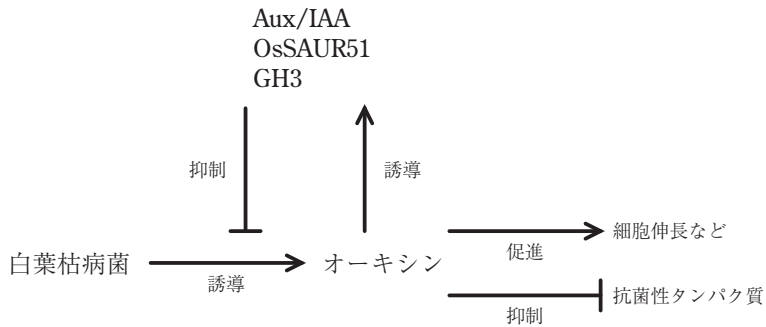


図-4 オーキシンを介した圃場抵抗性機構の推測図  
 白葉枯病菌などの病原菌は感染後に植物内にオーキシニンを集積させることで病害抵抗性を低下させようと試みる。これに対して, 植物はオーキシニン早期反応遺伝子を誘導し, オーキシニンの集積を低下させることで病原菌感染の進行を抑制し, 植物を防御していると考えられる.

平常時のオーキシニン量には影響を与えないが, 白葉枯病菌感染時にオーキシニンの集積を抑制することで白葉枯病抵抗性を向上させることが示唆された。

おわりに

オーキシニン is 多くの遺伝子の発現に影響を与え, 細胞の拡張, 分裂, 分化等様々な効果を及ぼす。最近の研究によりオーキシニンは植物と病原菌の相互作用に重要な役割をもたらすことがわかった。植物に病原菌が感染するとオーキシニンが集積し, さらにオーキシニンの集積によって抗菌性を持つ PR タンパク質のキチネースおよびβ-グルカネースの発現が抑制された (SHINSHI et al., 1987 ;

JOUANNEAU et al., 1991)。これらの研究から, 病原菌は感染によって植物内にオーキシニンの集積をもたらし, 植物の病害抵抗性を低下させて感染を進行させる戦略を持つことが考えられる (図-4)。

近年, 何人かの研究者がオーキシニン早期応答遺伝子をイネで高発現させ, オーキシニン合成および病害抵抗性への関係を調査している。*OsSAUR51* のファミリー遺伝子である *OsSAUR39* を高発現させたイネはオーキシニン集積量の低下, オーキシニン生合成および輸送遺伝子の発現の抑制が観察された (KANT et al., 2009)。また, *GH3-8* および *OsGH3.1* を高発現させたイネはいもち病, 白葉枯病に対する抵抗性が向上した (DING et al., 2008 ;

DOMINGO et al., 2009)。本研究の結果およびこれらの知見から、植物は病原菌によるオーキシン集積に対抗して *OsSAUR51* を含むオーキシン早期応答遺伝子を発現させ、植物内のオーキシン量を低下させることで病原菌感染の進行を抑制する防御反応を行っていると考えられる(図-4)。

**謝辞** 本研究では京都大学農学研究科の大西敦子氏、宮下正弘氏、宮川恒氏によってオーキシン量の測定が行われた。農研機構・中央農業研究センターの山元剛氏、矢頭治氏、次世代作物開発研究センターの斎藤浩二氏には白葉枯病菌の接種および論文執筆の指導を受けた。また本研究は農林水産省「アグリ・ゲノム研究の総合的な推進委託事業 MP-2139」の支援を受けた。ここに謝意を表す。

## 引用文献

- 1) AOKI, H. et al. (2016): JARQ 50: 219 ~ 227.
- 2) 青木秀之・斎藤浩二 (2016): 育種学研究 18: 112 ~ 123.
- 3) ————ら (2006): 北陸作物学会報 41: 24 ~ 28.
- 4) DING, X. et al. (2008): Plant Cell 20: 228 ~ 240.
- 5) DOMINGO, C. et al. (2009): Mol. Plant-Microbe Interact. 22: 201 ~ 210.
- 6) FU, J. et al. (2011): Plant Physiol. 155: 589 ~ 602.
- 7) HAGEN, G. and T. GUILFOYLE (2002): Plant Mol. Biol. 49: 373 ~ 385.
- 8) JAIN, M. et al. (2006): Genomics 88: 360 ~ 371.
- 9) JOUANNEAU, J. P. et al. (1991): Plant Physiol. 96: 459 ~ 466.
- 10) KANT, S. et al. (2009): ibid. 151: 691 ~ 701.
- 11) MAROIS, E. et al. (2002): Plant-Microbe Interact. 15: 637 ~ 646.
- 12) MITSUHASHI, I. et al. (1996): Plant Cell Physiol. 37: 49 ~ 59.
- 13) MIYAO, A. et al. (2007): Plant Mol. Biol. 63: 625 ~ 635.
- 14) O'DONNELL, P. J. et al. (2003): Plant J. 33: 245 ~ 257.
- 15) SHINSHI, H. et al. (1987): Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 89 ~ 93.
- 16) TANAKA, E. et al. (2011): J. Phytopathol. 159: 522 ~ 530.

(新しく登録された農薬 6 ページからの続き)

●クロラントラニリプロール・ジノテフラン・トルプロカルブ粒剤

23840: サンフェスタ箱粒剤 (宇都宮化成) 16/10/19

クロラントラニリプロール: 0.75%

ジノテフラン: 6.0%

トルプロカルブ: 4.0%

稲 (箱育苗): ウンカ類, ツマグロヨコバイ, イネドロオウムシ, イネミズゾウムシ, コブノメイガ, ニカメイチュウ, イネツトムシ, フタオビコヤガ, いもち病, もみ枯細菌病: 移植 3 日前 ~ 移植当日

〔殺菌剤〕

●テブコナゾール・マンゼブ水和剤

23836: グットクル水和剤 (ホクサン) 16/10/19

テブコナゾール: 10.0%

マンゼブ: 66.5%

てんさい: 褐斑病, 葉腐病: 収穫 21 日前まで

〔除草剤〕

●アシュラム・MCPP 液剤

23826: クサピース液剤 (保土ヶ谷アグロテック) 16/10/5

23827: シバキープエース液剤 (レインボー薬品) 16/10/5

アシュラム: 10.0%

MCPP: 20.0%

日本芝 (こうらいしば): 一年生雑草, 多年生広葉雑草

樹木等: 一年生及び多年生広葉雑草, 一年生及び多年生イネ科雑草, スギナ

●ヘキサジノン・MCPP 粒剤

23828: ラーチ HX 粒剤 (保土ヶ谷アグロテック) 16/10/5

23829: こっば HX 粒剤 (レインボー薬品) 16/10/5

ヘキサジノン: 0.50%

MCPP: 1.0%

樹木等: 一年生雑草, 多年生広葉雑草, スギナ

●ターバシル・テトラピオン・テブチウロン粒剤

23830: メガレンジャー粒剤 (保土ヶ谷化学) 16/10/5

ターバシル: 2.5%

テトラピオン: 4.0%

テブチウロン: 2.5%

樹木等: 一年生雑草, 多年生雑草

●カフェンストロール・シクロスルフアムロン・ダイムロン・ベンゾピシクロン粒剤

23831: レオンジャンボパワー (住商アグロインターナショナル) 16/10/5

カフェンストロール: 10.5%

シクロスルフアムロン: 2.25%

ダイムロン: 22.5%

ベンゾピシクロン: 10.0%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ, ウリカワ, ミズガヤツリ, クログワイ, オモダカ, ヒルムシロ, セリ, アオミドロ・藻類による表層は分離  
直播水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ, ヒルムシロ, セリ

●プロマシル水和剤

23832: 丸和ハイパー X (丸和バイオケミカル) 16/10/5

プロマシル: 80.0%

温州みかん: 一年生雑草, 多年生雑草

樹木等: 一年生雑草, 多年生雑草

●テフリルトリオン・ピラクロニル・モリネート粒剤

23835: イッソウ 1 キロ粒剤 (協友アグリ) 16/10/19

テフリルトリオン: 3.0%

ピラクロニル: 2.0%

モリネート: 24.0%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ, ウリカワ, ミズガヤツリ, ヒルムシロ

●プロモブチド・ペントキサゾン粒剤

23837: イネショット 1 キロ粒剤 (科研製薬) 16/10/19

プロモブチド: 9.0%

ペントキサゾン: 2.0%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ, ミズガヤツリ, クログワイ