

**最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書**

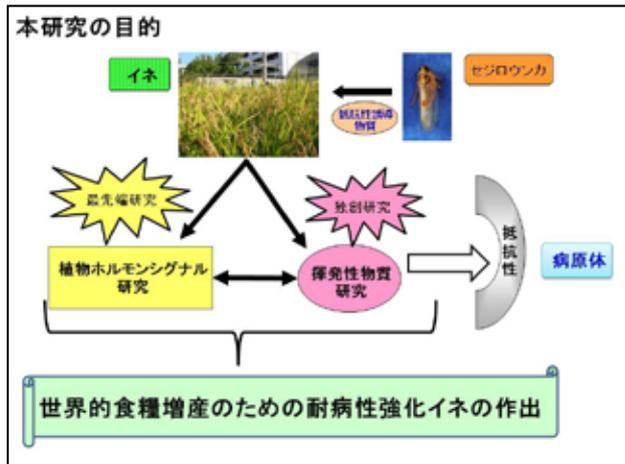
研究課題名	植物・微生物・昆虫三者間相互反応解析によるイネ新規抵抗性機構の解明
研究機関・部局・職名	香川大学・農学部・准教授
氏名	五味 剣二

**【研究目的】**

本研究では間接的三者間相互作用時に引き起こされるイネの防御反応を詳細に解析することによって、これまでの「植物 病原体相互作用」研究では明らかにできなかった新規のイネ病虫害抵抗性機構を明らかにし、最終目標として耐病性を強化したイネの作出を目的としている（下図）。研究期間中に以下の2項目の研究課題について焦点を絞って推進する。

**（１）新規イネ病虫害抵抗性機構の解明**

これまで、揮発性テルペン物質がイネ病害抵抗性に関与する可能性が示されていた。そこで、揮発性物質のテルペン系物質がどのように病虫害抵抗性に関与するのか分子レベルで解明し、それらを蓄積するような遺伝子組換えイネを作出し、耐病性を強化したイネの作出を試みる。最終的には植物揮発性物質の合成制御から病虫害抵抗性における役割までの全容を明らかとする。



また、植物揮発性物質以外の新規病害抵抗性機構の探索を行い、これまで明らかにされなかった抵抗性機構を発掘する。さらに、本病害抵抗性を誘導するセジロウカ側の要因を分子レベルで検討することを目的とした。

**（２）イネにおけるジャスモン酸シグナル伝達機構**

植物ホルモンの一つであるジャスモン酸は、植物病虫害抵抗性において非常に重要な役割を持ったホルモンであることが双子葉植物の研究より明らかとなっている。しかしながらイネを含む単子葉植物におけるジャスモン酸シグナル伝達機構は未解明の部分が多い。そこで本研究では、セジロウカ加害による間接誘導抵抗性機構におけるジャスモン酸シグナルの役割を解明する第一歩として、イネのジャスモン酸シグナル伝達機構を詳細に解析し、どのような因子の制御を受けて病虫害抵抗性関連遺伝子群の発現が誘導されるのかを解明する。

【総合評価】	
	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】
<p><b>総合所見</b></p> <p>本研究課題は、研究計画書の中で「世界の重要作物であるイネにおける三者系相互作用の分子レベルの解明で非常に重要な研究課題」と謳っているように、植物・微生物・昆虫相互反応解析を通して、イネにおける既知の機構とは異なることが期待される抵抗性誘導の機構を明らかにしようとする極めて斬新な取り組みとして評価され、採択された課題である。中間評価時にも、当初の目標に立ち返り、その目標を達成する研究を推進する方策を改めて検討されることを期待したいとの指摘が行われたが、セジロウンカでは誘導され白葉枯れ病に対する抵抗性がトビイロウンカの加害ではほとんど誘導されないことなど、昆虫側との特色あるかかわりについての解析は全く進められておらず、植物・微生物・昆虫三者間相互反応解析を進めようという試みはなされなかったと言える。昆虫サイドを含めた取り組みが最後まで軽視されたことは、極めて残念である。</p> <p>一方、セジロウンカ加害により、リナロールが誘導されること、その生合成がジャスモン酸制御下にあること、リナロールは、それ自体では白葉枯れ病菌に対し殺菌活性を示さず、その生合成遺伝子を過剰発現させて蓄積させた形質転換イネでは、白葉枯れ病に抵抗性を示す一方、生育は正常であるという重要な発見を果たすなどの成果を上げている。ジャスモン酸は、植物に処理すると抵抗性遺伝子を誘導する一方では、生育阻害を引き起こすのに対し、リナロールは抵抗性遺伝子の誘導にかかわる一方、植物の生育にかかわる生理現象を阻害しないという発見は、植物への病害抵抗性付与に新たな展開の可能性を示している。また、イネにおけるジャスモン酸応答性病害抵抗性遺伝子と、サリチル酸応答性病害抵抗性遺伝子が50%以上も重複していることから、イネでは他の植物とは異なり、ジャスモン酸とサリチル酸に共通した病害抵抗性誘導システムを持つことを示唆し、その共有システムを common defense system として提唱するなどの優れた成果を得ている。</p> <p>しかしながら、課題担当者自身が述べているように、遺伝子発現のプロファイルはセジロウンカ加害時の特有の現象ではないと思われる。吸汁時の障害により誘導されたジャスモン酸による可能性が高いと考えられる。本研究で得られた成果の大部分は、ジャスモン酸のイネにおけるシグナル伝達、応答性遺伝子の解析と機能の解明の延長線上の成果に留まっており、新しい切り口を拓いたとは言い難い。</p> <p>「最先端・次世代研究開発支援」という応募型の大型プロジェクトにおいて、提案のコアともいえる課題を差し置いて他の課題に重点的に取り組むことが許されるのは、そのことにより、極めて重要な成果が得られる場合に限られよう。本研究課題の取り組みがそれに相当するとはいい難い。</p>



## 研究の成果

- ・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が (ある ・ ない)
- ・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が (創出された ・ 創出されなかった)
- ・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

### 1) 新規イネ病害抵抗性機構の解明

#### 研究小テーマ 揮発性物質によるイネ新規病害抵抗性機構の解明

研究計画当初、セジロウンカ加害によって揮発性モノテルペンである linalool が特異的に蓄積していることが明らかとなっていたが、その機能の詳細は全く明らかとなっていなかった。本研究により、linalool は、イネ病原体に対して抗菌活性を有していないが、曝露処理をするとイネ白葉枯病抵抗性を強く引き起こすシグナル活性があることが明らかとなった。そこで、linalool 合成酵素遺伝子を過剰発現させ、linalool を蓄積させた組換えイネを作成したところ、白葉枯病に対する抵抗性が強化された (図1)。さらに、この組換え体では恒常的に抵抗性関連遺伝子が発現していることも明らかとなった (図2)。興味深いことに、通常、耐病性応答や、ストレス応答シグナルが常時動いている植物体は、総じて、生育不全(矮性形質等)を起こすことが知られているが、この組換え体は健全体と同様の生育を見せ、種子もまったく問題なく収穫できる。この為、linalool 合成酵素遺伝子過剰発現体は、健全体と変わらない生育を見せ、かつ、病気に強いという、理想の形質を持った植物体であると言える。これらの事から、本プログラムの最終目標である、三者間相互作用解析から見出された揮発性物質を利用した病害抵抗性強化イネの作出にも成功した。また、linalool の生合成を制御している因子がジャスモン酸であることも突き止め、計画当初想定していた、揮発性物質とジャスモン酸シグナルの関連性を証明できた。以上のことから、三者間相互作用解析から見出された植物揮発性物質である linalool が、抗菌性物質としてではなく、シグナル物質としてイネ病害抵抗性機構に深く関与することを証明できた。Linalool 自体は様々な植物種で存在する揮発性物質だが、抵抗性関連遺伝子の発現を誘導させる活性など、イネにおける病理学的役割を詳細に解析した研究例は全くなく、全て新たな知見といえる。

次に、セジロウンカ加害によって有為に蓄積していた別の揮発性セスキテルペンである  $\beta$ -elemene についても解析を進めた。 $\beta$ -Elemene 合成酵素遺伝子を単離同定し、



図1. リナロール合成酵素遺伝子過剰発現イネに見られる白葉枯病抵抗性  
WT: 野生型; Line13, 14, 33: リナロール合成酵素遺伝子過剰発現イネ. 白葉枯病接種後2週間の病徴写真

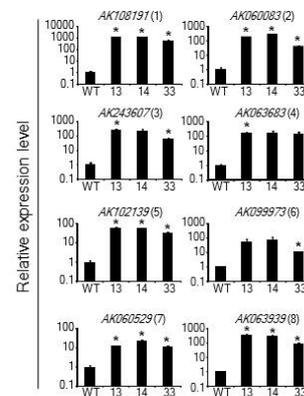


図2. リナロール合成酵素遺伝子過剰発現イネに見られる抵抗性関連遺伝子の恒常的発現

WT: 野生型; Line13, 14, 33: リナロール合成酵素遺伝子過剰発現イネ. 調べた遺伝子(AK番号)は全て抵抗性関連遺伝子.

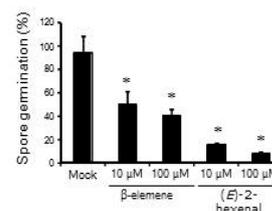


図3.  $\beta$ -elemene のいもち病菌に対する抗菌活性

その遺伝子の発現や  $\beta$ -elemene 合成がジャスモン酸シグナル制御下におかれていることが明らかとなった。興味深いことに、 $\beta$ -elemene は linalool のような抵抗性誘導活性は見られなかったが、カビ病菌であるいもち病菌に対する抗菌性があることが認められた(図3)。さらに、この抗菌活性は白葉枯病菌に対しては見られなかった。 $\beta$ -Elemene 合成酵素を過剰発現させた組換えイネの作出を試みたが、全て枯死してしまい、イネにとってもその過剰な蓄積は害であることが明らかとなった。本研究により、linalool には抗菌活性はなく抵抗性誘導活性があり、 $\beta$ -elemene には抵抗性誘導活性はなく抗菌性があるということが明らかとなり、イネ病害抵抗性機構において、揮発性物質がそれぞれの特徴を持ち、様々な場面で重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

また、セジロウンカ加害によって誘導される抵抗性は、カビ病(いもち病)、細菌病(白葉枯病)を問わない非選択的抵抗性であるが、本研究から得られた知見はそれに矛盾しない結果となり、両病害抵抗性において揮発性物質が非常に重要であることを示唆するものとなった。

さらに、本研究を通じて、ジャスモン酸シグナル依存的で、イネ病害抵抗性機構に関与すると思われる新たな揮発性物質を5個(2,4-heptadienal,  $\beta$ -cyclocitral,  $\beta$ -caryophyllene, methyl salicylate,  $\beta$ -ionone)同定した(図4)。現在まで、2,4-heptadienal はいもち病菌と白葉枯病菌両方に強い抗菌性を持つことが明らかとなっている。しかしながら、2,4-heptadienal には、linalool に見られるような抵抗性関連遺伝子発現の顕著な誘導活性はなかった。さらに、2,4-heptadienal はイネ植物体自体にも発芽抑制や細胞死を引き起こし、強い毒性を示すことが明らかとなった。 $\beta$ -Cyclocitral, methyl salicylate,  $\beta$ -ionone に関しては、ジャスモン酸と他の植物ホルモンであるサリチル酸やアブシジン酸との病害抵抗時におけるクロストークを証明できる可能性がある揮発性物質であった。ジャスモン酸とサリチル酸やアブシジン酸の病害抵抗時における単純な「現象」としてのクロストークは、イネを含め多くの植物種によって知られているが、どのような「メカニズム」で起こっているのかはいまだ未解明な部分が多い。えに、そのクロストークに揮発性物質が関与しているという研究例はないと思われることから、本研究が世界に先駆けた研究例になる可能性があり、その成果によっては、linalool に続く、イネの新規病害抵抗性機構の発見に発展する可能性がある。さらに、これら揮発性物質の植物ホルモン間クロストークへの関与を証明できれば、本研究分野のみならず、植物ホルモン研究に非常に高いインパクトを与えるものと考えている。これらは、三者間研究によって見出された揮発性物質に着目して研究を行ってきた本研究でしか見出せない成果であると思われる。

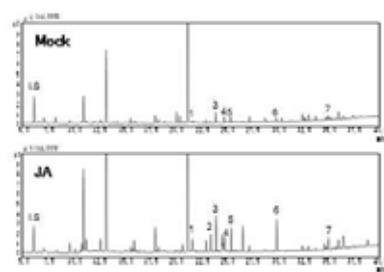


図4. ジャスモン酸(JA)処理後に有意に蓄積する揮発性物質のGCプロファイル  
1:2,4-heptadienal, 2:linalool, 3: $\beta$ -cyclocitral, 4:  $\beta$ -elemene, 5:  $\beta$ -caryophyllene, 6:  $\beta$ -ionone.

**研究小テーマ 植物揮発性物質以外の新規病害抵抗性機構の探索**

これまで、多くの植物種において、ジャスモン酸シグナルと、サリチル酸シグナルは拮抗的な相互作用をすることが知られていたが、イネにおいてはその拮抗作用は明確にされていなかった。本研究によって、イネにおいて、ジャスモン酸応答性遺伝子とサリチル酸応答性遺伝子が50%以上も重複していることが明らかとなり、イネにおいては拮抗作用が明確

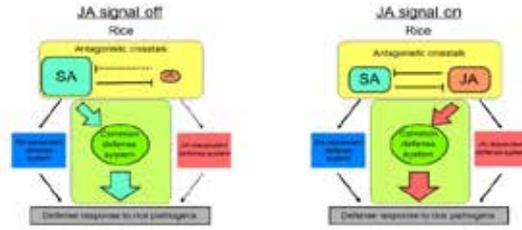


図5. イネにおけるジャスモン酸とサリチル酸によって誘導される新規病害抵抗性機構のモデル図

ではなく、むしろ、同じ病害抵抗性システムを“共有”していることを網羅的な遺伝子発現解析から見出し、イネ独自の新規病害抵抗性メカニズムを初めて明らかにしてモデル化し、その共有システムを common defense system として提唱した(図5)。このモデルは多くの研究者に指示されて、我々が提唱し論文発表した直後に本モデルが権威ある review(Trend in Plant Science, 18, 555-565, 2013) において同じ名称で採用されたことから、本研究成果が世界のイネ研究の発展に大きく貢献したと言える。

**(2) ジャスモン酸シグナル伝達機構に関する研究**

申請者が先に同定した、セジロウカ加害時に特異的に誘導される 349 個の遺伝子と、本研究で明らかにされたジャスモン酸誘導性遺伝子群を照らし合わせたところ、解析可能な 331 個について、約 60%の遺伝子がジャスモン酸処理によって誘導されることが明らかとなった。さらに、抵抗性関連遺伝子だけを見ても、約 72%もの遺伝子がジャスモン酸によって誘導されることが明らかとなり、セジロウカ加害時に引き起こされる誘導抵抗性機構の大部分がジャスモン酸シグナルによって制御されている可能性が強く示された(図6)。また、ジャスモン酸処理によって、白葉枯病抵抗性が誘導されることも確認し(図7)、セジロウカ加害におけるジャスモン酸シグナル伝達機構の重要性を明らかにした。また、ジャスモン酸シグナルを制御する因子として OsJAZ8 を同定した。その基本的性状の解析を行い、ジャスモン酸シグナルがオフの時に、そのシグナルを負の状態に維持するための因子であることを明らかにし、ジャスモン酸シグナル起動時に分解されることによってイネ病害抵抗性に関与している因子であることが明らかとなった。さらに、OsJAZ8 の C 末端領域を欠失したタンパク質 (OsJAZ8ΔC) を過剰発現させて作出したジャスモン酸非感受性イネを用いて、ジャスモン酸応答性遺伝子を網羅的に解析したところ、多くの遺伝子が OsJAZ8 タンパク質の制御下にあることが明らかとなった。これまで、

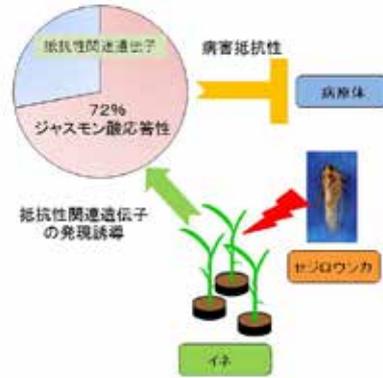


図6. セジロウカ加害によって誘導される抵抗性関連遺伝子のジャスモン酸依存率

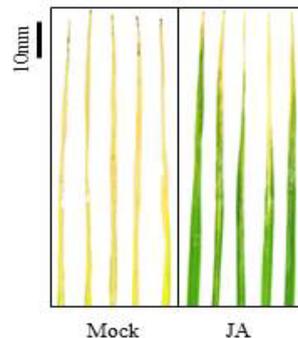


図7. ジャスモン酸処理によって誘導される白葉枯病抵抗性  
JA:ジャスモン酸処理. 白葉枯病菌接種後2週間の病徴写真

イネ白葉枯病抵抗性機構において、ジャスモン酸シグナルが正の制御をするのか、負の制御をするのか、はっきりとしていなかったが、本研究によって、ジャスモン酸が正の制御因子である可能性が極めて高いことが証明された。これは海外の研究グループによっても再現性が証明され、ジャスモン酸のイネ白葉枯病抵抗性時における役割は「正の制御因子」であることで決着したと思われる。このことから、本研究成果がこの研究分野の発展に非常に大きな貢献をしたと断言できる。

また、セジロウカ加害時とジャスモン酸処理時両方で誘導される転写因子を解析したところ、オーキシシンシグナルを負に制御することによってイネの成長を抑制する機能があることが明らかとなり、セジロウカ加害時におけるイネの生育の遅延には本転写因子が関与している可能性が示された。通常、ジャスモン酸シグナルを抑制した植物体は雄性不稔の表現型を示すことがほとんどで、十分量の種子(植物体)の確保が困難であったが、*OsJAZ8AC* 過剰発現イネは、雄性不稔ではなく、種子の確保が容易にできることから、今後のイネジャスモン酸シグナル伝達機構解析時のモデル材料になるとと思われる。

また、*OsJAZ8AC* 過剰発現イネを用いて、先に明らかにした linalool と  $\beta$ -elemene の生合成における *OsJAZ8* の関与を検証したところ、*OsJAZ8AC* 過剰発現イネではジャスモン酸による各合成酵素遺伝子の発現誘導は見られなかった。これらのことから、揮発性物質合成には JAZ タンパク質を介したジャスモン酸シグナルが重要であることが明らかとなった。さらに、メタボローム解析により、揮発性物質を含む、ジャスモン酸誘導性物質が100個以上存在することも明らかとなった。以上の成果により、本プログラムの目標である、植物揮発性物質とジャスモン酸シグナルのクロストークを証明することができた。さらに、*OsJAZ8* と直接相互作用する転写因子を同定し、その遺伝子を過剰発現させた耐病性強化イネの作出に成功した(図8)。また、*OsJAZ8* 複合体構成因子である *OsNINJA1* と結合する制御因子を複数単離しており、イネの新規ジャスモン酸シグナル伝達機構における詳細を解明する足掛かりを得ている。その中には、シロイヌナズナ等でも解明されていない、新規ジャスモン酸シグナル伝達機構の一端を解明できる可能性がある非常に重要な因子も含まれている。この因子のジャスモン酸シグナルへの関与を証明できれば、本研究分野のみならず、植物ホルモン研究に非常に高いインパクトを与えるものと考えている。白葉枯病菌が感染したイネでは、ジャスモン酸応答性抵抗性関連遺伝子の発現が誘導されないことから、白葉枯病菌が積極的にジャスモン酸シグナルを負に制御している可能性が示された。

以上のことから、当初の研究計画以上に問題なく研究が推進され、セジロウカによって誘導される抵抗性機構の大部分を制御していると思われるジャスモン酸シグナル伝達機構が、揮発性物質の制御も行っていることや、揮発性物質自身も、セジロウカ加害時の特有の現象ではなく、イネの本質的な病害抵抗性に深く関与することを証明できた。

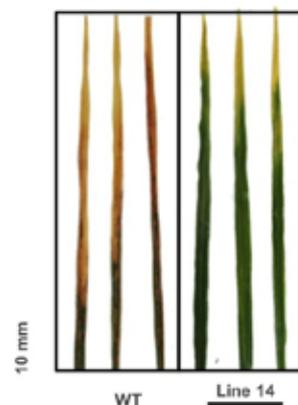


図8. ジャスモン酸応答性転写因子過剰発現イネに見られる白葉枯病抵抗性 WT:野生型; Line14; 転写因子過剰発現イネ

### 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が  
( 見込まれる ・ 見込まれない )

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が  
( 見込まれる ・ 見込まれない )

植物揮発性物質が病害防除に有効であることを学会等で積極的に発表することによって、主に農薬会社の研究者に関心を持ってもらうなど、多くの人に認知されるようになり、植物病理学分野での新たな研究領域の構築が出来つつあると思われる。また、植物揮発性物質に関する研究は Plant Science **カテゴリーでトップ10に入る雑誌(Plant Cell Environment IF: 5.906)に掲載され、世界的に本研究の重要性が認められた。**さらに、提唱した新規抵抗性システム(common defense system)は多くの研究者から支持を得ることができたと思われ、本モデルは権威ある review(Trend in Plant Science, 18, 555-565, 2013) において同じ名称で採用された。これに関する論文は **2013年に発表して以来、既に1000回以上のページアクセスがあり、高い関心を得ている。**また、ジャスモン酸シグナル研究においては、イネ病害抵抗性における JAZ タンパク質の重要性を世界で初めて示すことによって、存在感をアピールでき、**2012年に論文発表して以来、既に3本の review** (Mol. Plant Vol.6, 675-685,2013;Plant Cell Rep. Vol.32, 815-827,2013; Trend in Plant Science. Vol.18, 555-565, 2013)に引用されており、当該研究分野の研究者間では既に非常に高い評価を受けていることから、当該研究分野の発展に大きく貢献していると言える。また、国内外の研究者から共同研究の依頼もあり、本研究の世界的な発展が見込まれる。

一部の低分子アルデヒドやイソプレノイドなどの揮発性物質が病害抵抗性を増進させることは周知のことであるが、実際にリナロール合成遺伝子過剰発現個体を作成し、それが細菌病であるイネ白葉枯病に対して抵抗性であることを示すことができたことは、優れた成果であり、関連研究分野への波及効果が期待できる。研究のさらなる進展によっては、農業的な課題(イネの病害)の解決に繋がる期待、具体的な社会貢献を成しうる期待はある。しかし、これまでも病害抵抗性に関わる遺伝子の過剰発現などによる同様の試みは、具体的な成果に結び付いていないケースが多い。我が国における遺伝子組み換え作物の栽培実験が厳しく制限されていることもあるが、実際の栽培条件で有意な効果が認められていない場合も多いとされる。社会的、経済的な課題解決への波及効果については、今後の研究の展開と結果を待つ必要がある。

### 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが ( 行われた ・ 行われなかった )

この研究課題が採択された段階で、昆虫側の抵抗性誘導因子を分子レベルで検討するという部分と新規のイネ病虫害抵抗性機構の解明に、これまでにない新規性と期待があった。また、研究開始時及び進捗状況確認においても、昆虫側からの研究を含めて進めることの重要性が指摘されていたにも関わらず、昆虫側研究の担当者を獲得できなかったために、昆虫側からの研究への取り組みが当初から最後までなされなかったことは、申請時の研究計画、マネジメントに大きな問題があったと言わざるを得な

い。

一方、取り組んだ課題については、注目度の高い優れた成果を上げていることを評価したい。

助成金の活用については、昆虫側研究担当者の雇用・研究展開に活用されなかった点を指摘せざるを得ないが、取り組んだ研究課題へ重点的に活用されており、おおむね適切であったと言える。

研究成果の公表は下記のとおりである。

学術論文としての発表は、注目度の高い雑誌への発表があるものの、不十分である。会議発表、国民との科学・技術対話については、所属機関との連携により適切に進めている。

雑誌論文： 合計 5 件（すべて査読あり）

会議発表： 合計 29 件（専門家向け 28 件、一般向け 1 件）

新聞雑誌等： 新聞 1 件、 雑誌 1 件

図書： 0 件

知的財産権の出願： 0 件

国民との科学・技術対話： 合計 11 件