

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	イネの持続的病害抵抗性の増強を目指したいもち病罹病性の分子機構の解明
研究機関・部局・職名	独立行政法人 農業生物資源研究所・遺伝子組換え研究センター・上級研究員
氏名	西澤 洋子

【研究目的】

いもち病はイネに最も深刻な被害をもたらす病気であり、抵抗性品種を作出してもすぐにそれに感染するいもち病菌が出現してしまうという問題がある。そのような中、いもち病菌が自らの感染効率を高める物質（感染補助因子）を作ること、また、イネには発病を促進してしまう遺伝子（罹病性遺伝子）があることがわかってきた。罹病性促進の原因はいもち病菌の感染戦略の標的となっている可能性がある。そこで本研究は、イネの耐病性を持続的に向上させるために、イネがなぜいもち病になってしまうのかを、いもち病菌の感染補助因子の作用と、イネがもつ罹病性遺伝子の作用の両サイドから分子レベルで解析し、改良すべきイネの病害抵抗性の脆弱部を遺伝子レベルで明らかにすることを目的とした。

本研究では、A（いもち病菌側の解析）、B（イネ側の解析）、C（解析手法の開発）の3つの中課題に分け、それぞれ、以下を目標に研究を進めた。

中課題A：感染補助因子（2'-デオキシウリジン；2-dU）の影響を受けるいもち病菌のエフェクター様遺伝子の機能解析を通して、いもち病菌が感染のために抑制するイネの免疫系を明らかにする。

中課題B：イネの罹病性遺伝子を過剰発現するイネにおける罹病性亢進の原因を明らかにし、耐病性イネ作出に向けて罹病性遺伝子の機能を改変する。

中課題C：イネといもち病菌の相互作用を可視化するための生細胞イメージング手法を確立し、感染に伴うイネ細胞内の変化や、イネといもち病菌の相互作用に關与するタンパク質の挙動等を時空間的に把握する。

【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

<p>【所見】</p>
<p>① 総合所見</p>
<p>本研究課題は、イネの抵抗性を増強する分子育種の新戦略構築にむけて、いもち病菌胞子懸濁液から見出した感染促進活性をもつ 2'-デオキシウリジン (2-dU) と、イネの転写因子で罹病性因子の可能性のある <i>OsWRKY76</i>、キチンエリシターにより誘導されるユビキチンリガーゼをコードする遺伝子 <i>EL5</i> を軸に、イネのいもち病抵抗性の脆弱部を明らかにすることを目的として、細胞イメージング法の開発、改良を含めて、3つのサブテーマを設けて展開されている。</p> <p>感染補助因子 2-dU に関する研究では、3種のいもち病菌のエフェクター様遺伝子 (<i>DRP1</i>, <i>DRP2</i>, <i>PWL2</i>) を出発材料として研究を展開し、<i>DRP1</i> についてイネいもち病菌の遺伝子破壊株を作製し、菌糸に侵入されたイネ細胞は褐変しやすくなり、<i>DRP1</i> 遺伝子の発現は付着器の成熟に伴って誘導されること、<i>DRP1</i> 遺伝子欠損によって一部の <i>PR</i> 遺伝子の他、ファイトアレキシン生合成経路やトリプトファン経路の酵素遺伝子群の発現誘導が顕著に亢進することや、<i>Drp1</i> は BIC (<u>Biotrophic Interfacial Complex</u>) 形成に関与することなど、いもち病感染において鍵となる因子であることを明らかにする優れた成果を上げた。<i>DRP1</i> により誘導される一連の生理現象は、いもち病感染防御技術開発の一つのターゲットとなり得ると期待される。</p> <p>一方、イネ側の因子である <i>OsWRKY76</i> に関する研究では、W-box 配列に結合するファイトアレキシン生合成遺伝子群の発現抑制因子であること明らかにするとともに、<i>OsWRKY76</i> 過剰発現株では、菌接種後のジテルペノイド系とフラボノイド系双方のファイトアレキシン合成誘導が抑制される一方、耐冷性が上昇するという興味ある結果を得ている。</p> <p><i>EL5</i> については、過剰発現体など多様な形質転換体を作製し、サイトカニン合成遺伝子や応答遺伝子、多数の窒素応答遺伝子の発現が恒常的に上昇していることをはじめ、情報を集積したものの、いもち病罹病性との関連が明瞭でないことから、他の課題に集中して、優れた成果を上げた。本研究課題の目的に照らして、この判断は適切であったと言える。</p> <p>本研究で得られた成果を基盤に、今後の展開として掲げている発展的課題に精力的に取り組み、学術的にも、病害防除の応用技術開発においても一層貢献されることを期待したい。</p>

<p>② 目的の達成状況</p>
<p>・所期の目的が <input checked="" type="checkbox"/> 全て達成された ・ <input type="checkbox"/> 一部達成された ・ <input type="checkbox"/> 達成されなかった)</p>
<p>本研究課題においては、以下の3つの中課題を設定して研究を展開し、いずれにおいてもその目標を達成していると評価できる。</p> <p>中課題 A (感染補助因子 (2'-デオキシウリジン; 2-dU) の影響を受けるいもち病菌のエフェクター様遺伝子の機能解析を通して、いもち病菌が感染のために抑制するイネの免疫系を明らかにする) においては、2-dU の感染促進性はイネ葉への感染に必</p>

須のエフェクター遺伝子 *DRP1* の発現亢進に因ること、*Drp1* はイネ細胞内に移行してイネのファイトアレキシン生合成遺伝子群の発現誘導を遅延する作用をもつことなどを明らかにし、所期の目標を達成している。

中課題 B (イネの罹病性遺伝子を過剰発現するイネにおける罹病性亢進の原因を明らかにし、耐病性イネ作出に向けて罹病性遺伝子の機能を改変する) においては、イネの転写因子 *WRKY76* がファイトアレキシン生合成遺伝子群の発現抑制因子であるために、その過剰発現イネではファイトアレキシン量が十分でなく、抵抗性が極度に低下することを示し、イネのいもち病抵抗性の脆弱部の一つはいもち病菌によるファイトアレキシン生合成遺伝子群の発現抑制であることを明らかにした。また、ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子や *PR* 遺伝子群を標的とする新規の転写促進因子を同定し、それを用いていもち病抵抗性が向上するイネを作出したことにより、所期の目標を達成している。

中課題 C (イネといもち病菌の相互作用を可視化するための生細胞イメージング手法を確立し、感染に伴うイネ細胞内の変化や、イネといもち病菌の相互作用に関与するタンパク質の挙動等を時空間的に把握する) においては、高速共焦点レーザー顕微鏡システム(横河電機共焦点ユニットと Andor 高感度 CCD カメラを装着した Leica 蛍光顕微鏡)を整備し、各種観察、撮影条件を検討した。微分干渉像と 2 色の蛍光像を同時に取得する場合、スライドガラス上の葉鞘組織切片上でいもち病菌の付着器形成直後(付着器の成熟前)から多細胞伸展期に至るまでを 20~30 分間隔で多点タイムラプス撮影することに成功し、所期の目標を達成している。

③ 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)

中課題 A : 2-dU 応答性エフェクター様遺伝子の機能解明

(i) *DRP1* 遺伝子破壊株(*drp1*)の機能: SuperSAGE 法によって同定された、イネ細胞内侵入後に初めて発現が検出され、且つ、2-dU 存在下で発現量が増加する 3 種のいもち病菌のエフェクター様遺伝子(*DRP1*, *DRP2*, *PWL2*)を出発材料とした。*DRP1* についてイネいもち病菌の遺伝子破壊株を作製し、その病原性を葉身への噴霧接種法、滴下接種法、および葉鞘接種法によって評価した結果、菌糸に侵入されたイネ細胞は褐変しやすくなり、特に葉身において病原性がほぼ消失することが明らかになった。*DRP2* 遺伝子破壊株については顕著な病原性の低下が認められなかった。*PWL2* については異なる染色体上に 2 コピー存在し、イネ科のシナガレスズメガヤに対する非病原力遺伝子であるという報告が既にあるため、破壊株作製の代わりに遺伝子発現様式やタンパク質局在性観察のための各種組換えいもち病菌株を作製し、中課題 C で使用した。

(ii) 遺伝子発現パターン: *prom::GFP* を導入したいもち病菌のイネ接種後の蛍光

観察から、上記3種のエフェクター様遺伝子は孢子や栄養菌糸では発現せず、成熟付着器と侵入菌糸で発現が誘導されることが確認された。さらに、中課題Cで開発した連続観察法によって、*DRP1* 遺伝子の発現は付着器の成熟に伴って誘導され、その後、第1細胞侵入後に発現が弱まるが、隣接細胞に伸展する際に再び誘導されることが明らかになった。親和性関係のイネに接種した時よりも非親和性関係のイネに接種した時の方が強く発現が誘導されることや、化学固定したイネ組織上に作らせた付着器や侵入菌糸では発現が誘導されなかったことから、*DRP1* 遺伝子の発現はイネの免疫反応によって誘導されることが示唆された。

(iii) Drp1 タンパク質の局在性：*DRP1p::DRP1:mCherry*を導入することで *drp1* の病原性が回復することを確認後、Drp1:mCherry の局在を共焦点顕微鏡により観察した。その結果、BIC (Biotrophic Interfacial Complex ; 侵入菌糸から突起する詳細不明な構造体) に Drp1 の蓄積が認められた。また、BIC 以外に細胞質でも検出され、核移行シグナルを付加した *DRP1p::DRP1: mCherry:NLS* 導入菌を接種した場合は、BIC に加えイネの核にも蛍光が認められたことから、Drp1 はイネ細胞内に移行することが明らかになった。さらに、分泌シグナル配列を除去すると Drp1 はいもち病菌内に蓄積し、その場合、病原性も発揮されなかった。

(iv) *DRP1* 遺伝子の分布: Drp1 タンパク質は N 末端に分泌シグナル配列がある他は機能領域を予測することができない。また、*DRP1* 遺伝子配列はゲノムデータベースの中ではイネいもち病菌にしかヒットしない。そこで *Magnaporthe* 属に分類される菌株を取り寄せ、*DRP1* 遺伝子断片をプローブにしてゲノミックサザン分析を行った。その結果、イネいもち病菌を含む *Magnaporthe oryzae* からはバンドが検出されたが、遠縁のいもち病菌 *Magnaporthe grisea* では検出されなかった。また、非病原力エフェクターとは異なり、イネいもち病菌株間でバンドパターンの多型は認められなかった。

●以上の結果から、*Magnaporthe oryzae* に特異的に存在する Drp1 は菌糸がイネ細胞を通過する度に分泌されて BIC 形成に関わり、イネのファイトアレキシン生合成経路の酵素遺伝子群の発現誘導を抑制する作用をもつことが示された。したがって、2-d U はこうした病原性の鍵となるエフェクター遺伝子の発現を亢進することで感染を促進するものと考えられた。

中課題 B-1 : OsWRKY76 の機能解明

(i) OsWRKY76 の遺伝子発現様式および分子機能解析：本遺伝子の発現は健常苗ではほとんど認められないが、いもち病菌接種 2 日目～5 日後や、SA 経路に作用するといわれる病害抵抗性誘導剤 BTH 処理 1 時間後に強く誘導されることがわかった。また、傷害や低温処理、ABA 処理でも誘導された。OsWRKY76 タンパク質は核に局在し、W-box 配列に結合する転写抑制因子であることを明らかにした。

(ii) *OsWRKY76* 過剰発現イネ (WRKY76ox) の表現型: WRKY76ox では付着器に対する侵入抵抗性よりも侵入菌糸への伸展抵抗性が著しく低下し、接種 5 日後の菌体は元品種イネと比較して 100～1000 倍にも増えることが明らかになった。特に、止まり型病斑がほとんど現れず、褐変を伴わない伸展型病斑の形成が顕著だった。一方、(i) の結果から本遺伝子が非生物的ストレスにも関与することが示唆されたため、WRKY76ox の耐冷性、耐乾燥性、耐塩性を調査した結果、耐冷性が上昇することが明らかになった。次に、*OsWRKY76* の過剰発現がいもち病菌接種後や低温 (4℃) 処理後

の遺伝子発現に及ぼす影響をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、元品種で親和性菌接種後に発現が誘導される346 遺伝子のうち、WRKY76ox では87 遺伝子の誘導率が有意に低下していた。それら

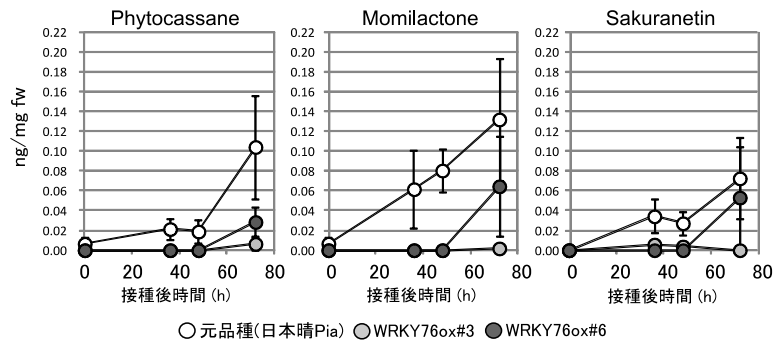


図4. いもち病菌接種後のファイトアレキシン蓄積量。

の中には、転写因子遺伝子の他、多くの防御関連遺伝子 (PR等)やファイトアレキシン生合成経路の一連の酵素遺伝子が含まれていた。一方、低温処理による発現変動の全体像はいもち病菌接種後のものとは対照的であり、*OsWRKY76* 過剰発現の影響を受ける遺伝子群の発現レベルは元品種よりも高かった。ファイトアレキシンを定量した結果 (東大・岡田先生との共同研究)、WRKY76ox では菌接種後のジテルペノイド系とフラボノイド系双方のファイトアレキシン合成誘導が抑制されることが明らかになった (図4)。

(iii) *OsWRKY76* 遺伝子破壊イネ (W76ko) の作製と解析: *OsWRKY76* の免疫抑制機能を低下させるために RNAi 法による遺伝子発現抑制体の作製を数回試みたが、BTH 処理による発現誘導が50%以上抑制される系統は得られなかった。そこで、アグロバクテリウムを介した相同組換えによるジーンターゲティング法を用いて W76ko を作製した (生物研・小沢博士との共同研究)。W76ko では BTH 処理後の *OsWRKY76* 遺伝子発現誘導が全く認められないことを確認後、W76ko の病害抵抗性 (いもち病、白葉枯病) や耐冷性を評価したが、元品種と同等であり、当遺伝子機能の重複が予想された。

(iv) いもち病抵抗性イネの作出: そこで、*OsWRKY76* の免疫抑制効果を相殺するために、*OsWRKY76* の標的候補である転写因子遺伝子の改変を試みた。WRKYox において接種後の発現誘導が抑制されていた遺伝子群のうち、それまでほとんど解析されていなかった5種の転写因子遺伝子について酵母ならびにイネ培養細胞を用いたレポーターアッセイを行った結果、いずれも転写活性化能をもつことが明らかになった。これら5つの遺伝子について過剰発現イネおよび CRES-T 法によるキメラリプレッサー系統 (生物研・市川博士、産総研・高木博士との共同研究) のいもち病抵抗性を解析した結果、*OsNAC111* 遺伝子を恒常的に発現させることで、ファイトアレキシン合成酵素遺伝子 (*CPS4*) や多くの PR 遺伝子を含む防御関連遺伝子群の発現が接種前から上昇し、いもち病抵抗性が向上することが明らかになった。また、*OsNAC111* が感染初期の褐変物質の蓄積を正に制御することも明らかになった。

●以上の結果は、*OsWRKY76* の過剰発現による罹病性の亢進は、いもち病菌感染時の防御関連遺伝子群の発現誘導と、それによるファイトアレキシンなどの防御物質産生が低下することが主因であることを示しており、中課題 A の結果と考え併せ、早期のファイトアレキシン蓄積がいもち病菌感染成立の実質的なバリアの一つであることが強く示唆された。

中課題 B-2 : EL5 の機能解明

(i) *EL5* 遺伝子の発現はいもち病菌接種後 3 日目に誘導され、その後 5 日目まで高いレベルで維持された。*EL5* のプロモーター::*GFP* 導入イネや *EL5p*::*GUS* 導入イネの解析から、*EL5* 遺伝子はいもち病斑内で発現が誘導されることが明らかになった。また、サイトカイニンやジャスモン酸処理の他、窒素処理や傷害、低温などのストレスによっても誘導されたが、*OsWRKY76* とは異なり、BTH や ABA 処理では変動しなかった。

(ii) ユビキチンリガーゼ (E3) 活性が完全に欠失した変異 *EL5* 遺伝子を過剰発現させたイネでは根形成が全く起こらないために解析できない。そこで E3 活性を中程度に低下させた変異 *EL5* 遺伝子過剰発現イネ (mEL5ox) を利用して、表現型が明瞭な根形成を指標に *EL5* の機能を解析した。その結果、mEL5ox は外性窒素のない条件下では根を形成することができ、外性窒素応答の一つとされるサイトカイニン合成量の上昇が窒素フリー条件下でも観察され (理研・神谷博士、軸丸博士との共同研究)、地上部の老化が大幅に遅延することが明らかになった。また、マイクロアレイ解析の結果からも、mEL5ox ではサイトカイニン合成遺伝子や応答遺伝子、多数の窒素応答遺伝子の発現が恒常的に上昇しており、外性窒素がない条件下でも窒素シグナル経路が活性化していることが強く示唆された。その他、SA、ジャスモン酸含量が高く、多数の *PR* 遺伝子の発現が恒常的に上昇しており、mEL5ox でいもち病抵抗性が向上した原因と考えられた。非形質転換イネとの詳細な比較解析の結果、イネには“硝酸態窒素-サイトカイニン-活性酸素-細胞死”経路が存在し、それを *EL5* が負に制御することで高濃度の窒素存在下でも根形成が進行することが明らかになった。

●以上の結果から、*EL5* は *OsWRKY76* とは異なり、窒素-サイトカイニン-活性酸素経路に対し抑制的に作用することで、いもち病を含む複数の菌類病発症に関与する可能性が考えられた。そこで、RNAi による *EL5* 遺伝子発現抑制イネや、根形成が影響されないよう変異 *EL5* 遺伝子を自身のプロモーターを用いて誘導的に発現させるイネを作出したが、顕著な病害抵抗性の向上が認められなかったため、以後、中課題 B は前述の B-1 課題を重点的に実施した。

中課題 C : イネ-いもち病菌相互作用の可視化技術の確立と利用

(i) 侵入過程のリアルタイム観察系の改良：本研究開始時に既に 40 時間以上の連続蛍光観察を成功させていたが、蛍光強度の高い材料の観察に限られることや、レーザー照射による細胞のダメージや動きの速いオルガネラの観察ができないなどの問題があった。そこで高速共焦点レーザー顕微鏡システム (横河電機共焦点ユニットと Andor 高感度 CCD カメラを装着した Leica 蛍光顕微鏡) を整備し、各種観察、撮影条件を検討した。すなわち、葉鞘切片調製法、接種濃度、保湿法、封入体の選択、レーザー照射条件、対物レンズの種類、画像取得・処理法等の諸条件を最適化した結果、微分干渉像と 2 色の蛍光像を同時に取得する場合、スライドガラス上の葉鞘組織切片上でいもち病菌の付着器形成直後 (付着器の成熟前) から多細胞伸展期に至るまでを 20~30 分間隔で多点タイムラプス撮影することに成功した。

(ii) 本法を利用して、いもち病菌侵入過程のリアルタイム蛍光イメージングを行った結果、付着器の成熟に伴って *DRP1* 遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった (前述)。また、細胞質や液胞膜を GFP で標識したイネを用いて、親和性菌感染

時のイネ細胞内構造の経時変化を観察し、付着器直下と BIC 周辺に細胞質に富む領域が生じる様子や、菌糸の伸長に伴って BIC の位置が菌糸先端から側部に变化する様子を動的に捉えることに成功した。また、菌の伸展に伴って液胞が収縮していくこと (図 7)、さらに、侵入第一細胞では菌糸が液胞膜に囲まれている時間が次細胞以降でよりも長いことが明らかになった。

(iii) そこで次に、イネの細胞質や膜系の変化を高倍率の対物レンズを用いて高解像度で定点観察した。その結果、付着器から伸び始めた初期侵入菌糸や次細胞に侵入したばかりの菌糸は小胞体の網目構造で覆われるが、BIC が菌糸側部に变化した後、その BIC 付随細胞から伸びた侵入菌糸周辺には小胞体由来の GFP 蛍光が認められなくなることがわかった。一方、液胞膜は菌糸が分岐した後も菌糸の形に沿って観察され (図 8)、その後、菌糸が液胞内に侵入する頃に収縮し始め、次細胞に伸展する頃に崩壊することを明らかにした。次に、イネの液胞崩壊と溶菌の関係を解析し、非親和性組み合わせでは菌の侵入後まもなく液胞が崩壊すること、また、親和性組み合わせにおいても液胞の崩壊と溶菌が相関することを明らかにした。さらに、アポプラストに局在するエフェクター *Bas4:mCherry* を発現するいもち病菌を用いて 侵入菌糸包囲膜 (EIHM) 構造の保持を可視化し、EIHM と液胞膜の動態を観察した結果、EIHM の崩壊が液胞の収縮や崩壊よりも後に起こることが明らかになった。この結果は、EIHM で囲われている間はたとえイネの液胞内から溶菌酵素などが流出しても菌の生長が保たれることを示唆し、いもち病菌が EIHM を保持するメカニズムを持つ可能性が考えられた。

(iv) イネ細胞膜と EIHM の関係：初期の侵入菌糸はイネの細胞膜を貫通するのではなく陥入させ、細胞膜由来の EIHM 内を伸展することが報告されている。そこで、細胞膜に局在するキチン受容体 (OsCERK1) や EL5 のいもち病菌接種後の局在性を、それらの GFP 融合タンパク質をイメージングすることで解析した。その結果、いずれも侵入初期の EIHM では観察されたが、BIC 付随細胞から伸長した侵入菌糸の EIHM には認められなかったことから、細胞膜と EIHM の構成タンパク質はかなり異なることが予想された。また、キチンエリシター認識は主に侵入初期に限られることが示唆された。

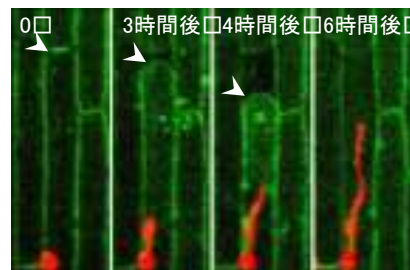


図7. 菌侵入に伴う液胞の収縮と崩壊。
赤：いもち病菌、緑：液胞膜、
矢頭：液胞の先端

(v) BIC の高解像度蛍光観察：BIC と EIHM や細胞質、液胞膜との構造的関係を明らかにするために、いもち病菌接種後の BIC 周辺を詳細に観察した。その結果、Drp1、Drp2 および Pw12 の局在性から捉えた BIC の形状は小胞様構造の集合体であることが明らかになった。また EIHM は BIC を形成する個々の小胞様構造体の周りに集積し、それをイネの細胞質が覆い、その外側に液胞膜が取り囲むように存在する様子が観察された。一方、前述したように病原性が著しく低下する *drp1* を接種した場合は、これらのエフェクターは侵入

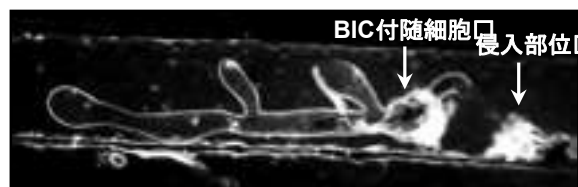


図8. 菌糸侵入細胞におけるイネ液胞膜の可視化。
液胞膜をGFPで標識したイネ葉鞘細胞のいもち
病菌接種42時間後のGFP蛍光像。

菌糸周辺に広く分布し、イネ細胞質の偏在も認められなかった。これらの結果から、細胞内移行型エフェクターは侵入初期の菌糸から分泌された後、菌糸先端で BIC を形成し、それを取り囲む EIHM 上に局在する取り込み機構によってイネ細胞質に移行する可能性が考えられ、侵入初期の正しい BIC 形成がいもち病菌の感染成立に重要であることが明らかになった。

●以上のように、イネといもち病菌の相互作用を可視化するための生細胞イメージング手法を確立し、感染に伴う遺伝子発現変動やイネ細胞内の構造変化、また、エフェクタータンパク質の局在性などに関する新知見を得た。

先進性・優位性

- (i) ファイトアレキシン合成酵素遺伝子群全体の発現が一つの転写因子 (*O_sWRKY76*) で負に制御されることが示されたのは初めてである。また、ファイトアレキシンの役割は不明瞭であったが、本研究によって免疫機構における重要性が植物 (抵抗性) と病原菌 (病原性) 双方の解析から示された。
- (ii) 病原菌の感染過程を動的に捉えた例はほとんどない。本研究で開発した 40 時間以上にわたって宿主と病原菌双方の細胞内の様子を蛍光観察する方法を用いることでいもち病菌の遺伝子発現やイネ細胞内構造が菌糸の伸展に伴ってダイナミックに変化することを明らかにできた。これらは組織から RNA を抽出して解析する従来の方法や、定時点観察では見いだせなかった事象である。

特記事項

近年、植物病原菌のエフェクターに関する研究は急速に進んでいるが、病原性に大きく寄与するエフェクターの報告例は非常に少ない。いもち病菌ゲノムには 200 個以上のエフェクター様遺伝子が存在するが、イネ細胞内に移行するエフェクターのうち、Drp1 ほど病原性に大きく関与するものは他に知られていないことから、Drp1 は広範囲の病原性因子に影響するいもち病菌の鍵エフェクターであると言える。したがって、今後、Drp1 の発現や分泌の制御機構の研究によって防除効果の高い新技術の開発を目指すことが可能である。

当初の目的の他に得られた特記すべき成果

- (i) ジーンターゲティング法を適用してイネのキチンエリシター受容体 CEBiP ならびに *O_sCERK1* の遺伝子破壊システムを作出した結果、*O_sCERK1* 欠損イネではキチンエリシター応答性が完全に消失することや、*O_sCERK1* が細菌の MAMPs であるペプチドグリカンに対する細胞応答にも関与することを明らかにできた。さらに、菌根菌共生にも不可欠であることが共同研究によって明らかになった (投稿中)。
- (ii) 自家蛍光が観察上の障害となるイネの感染細胞において、微弱な GFP 蛍光シグナルを分光して特定する手法を確立した。これにより、侵入菌糸の細胞壁キチンの露出性が感染過程で変化することを明らかにし、その成果は植物病理学会論文賞を受賞した。

本研究課題でこれまでに得られた成果が真に当該分野の研究におけるブレークスルーたり得るものになるかは、現時点では未知数であり、今後の研究の進展に負うところが大きい。現時点では、ブレークスルーと言える成果が得られたとまでは言えない。

④ 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)

下記に掲げるように、関連する研究分野への波及効果が見込まれる。

- (i) BIC 形成に関与する遺伝子が初めて同定されたことで、現在、ほとんど未知である BIC の機能解明に役立つ。また、機能解明を通して、新規防御技術の開発への発展も期待できる。
- (ii) Drp1 は既に報告されている類似のエフェクターと比較しても病原性への寄与率が極めて高い。従って、Drp1 の機能抑制による新規の防除技術の開発が期待できる。
- (iii) 中課題 C で開発された各種組換えイネといもち病菌株や接種・観察法は、イネ-いもち病菌相互作用のさらなる解析において有用なツールとなる。また、本観察技術は植物が抱える自家蛍光の問題を低減する方法を含み、いもち病だけでなく、その他の植物-微生物間相互作用の研究にも役立つ。
- (iv) 任意の遺伝子を破壊することは相同組換え率の低い高等植物ではまだ困難である。本研究で作出された遺伝子破壊イネ系統は、SA シグナル経路の解析 (OsWRKY76 破壊イネ) やキチンを介した微生物認識機構の解析 (CEBiP, OsCERK1 破壊イネ) に非常に有用であり、既に 5 件の共同研究がスタートしている他、論文発表後は海外からの分譲依頼もあり、前述のように貴重な成果が出始めている。

社会的・経済的な問題の解決への波及効果としては、Drp1 の機能解析から明らかになってきたいもち病菌の感染戦略に関する知見が得られたことにより、効果の高い防除剤の開発や耐病性イネ品種育成の技術開発の新しい展開が期待できる。また、OsWRKY76 は罹病性遺伝子であると同時に耐冷性遺伝子であることがわかり、生物ストレス耐性と環境ストレス耐性の両立に向けた技術開発に発展する可能性がある。これらは防除コストの大幅な削減とともに、省力的で環境低負荷型の農業につながるものであり、グリーンイノベーションへの貢献も見込まれる。

⑤ 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)

研究計画の中で提案されていた *EL5* に関する課題については、その機能の複雑さを明らかにする一方、本課題の中で重点を *OsWRKY76* の機能解明において展開したこと、指摘事項に対しても真摯に対応しており、目的達成に向けた研究マネジメント、研究実施体制は適切であった。

成果の公表については、下記に示す通り、適切に行われたと評価できる。また、所属機関を通じた研究内容の公表、国民との科学・技術の対話もおおむね適切に行われた。

学術論文：合計 15 件 (掲載済み査読有 10 件、掲載済み査読無 2 件、未掲載 3 件)

会議発表：合計 30 件（専門家向け 29 件、一般向け 1 件）

図書： 合計 1 件

知的財産権：0 件

国民との科学・技術対話：合計 5 件（所属機関の広報室を中心とした研究支援部署で構成する「アウトリーチ環境整備チーム」により、「研究者と国民との対話」に向けた活動がサポートされた）

その他：その他、所属研究所の HP に研究課題の内容をわかりやすく図示したページをリンクさせた。

<http://www.nias.affrc.go.jp/researchactivities/24nisizawa/>
(idem) /researchactivities /24nisizawa/leader