

(別紙様式第3号)

## 学 位 論 文 要 旨

氏名: 今岡敦子

題目: イネ科植物の光依存的抵抗性発現における光合成経路の役割に関する研究

Studies on Role of Photosynthesis in Light-dependent Resistance in Poaceae Species

近年、病原菌が感染無しに病原菌誘導の過敏感細胞死と同様の病徴を自然発生的に誘導する突然変異体がトウモロコシ、オオムギ、イネおよびシロイヌナズナで報告された。これらの変異株は、疑似病斑形成変異株 (Lesion mimic mutant) と呼ばれ、小さな褐点状の壊死を誘導する開始型 (Initiation type) と感受性の病斑と同様の大型の壊死斑を形成する進行型 (propagation type) に分類されている。さらに、開始型変異株は病原体に対して強い抵抗性を示すことが報告されていることから、現在これらの変異株は、植物の病害抵抗性の分子生物学的解明のためのモデル植物として注目されている。

イネ品種関口朝日はイネ品種朝日の突然変異体として発見された。この変異イネは進行型疑似病斑形成変異株で、いもち病菌やごま葉枯病菌などの斑点性病害に対して橙黄色、大型不整形の関口病斑と呼ばれる疑似病斑を形成し、その病斑形成には *spl1* 遺伝子が関与することが知られている。また、この病斑形成は光依存的な反応であり、親和性イネいもち病菌を接種した後、可視光照射下に保つと関口病斑を形成する。一方、暗黒下および紫外線照射下に保った場合は従来のいもち病斑や褐点状の壊死病斑が多数形成される。関口病斑内において侵入菌糸の進展は非常に貧弱で病斑上に胞子の形成も認められないことから、関口病斑はイネの光依存的な抵抗性発現の表れであると考えられている。関口病斑は褐点病斑と比べて大型で肉眼でも容易に検出可能であることから、野生型イネでは解明できなかった抵抗性、特に局所的あるいは全身的抵抗性が、関口病斑の形成機構を解明することにより明確になると考えられる。

本研究では、疑似病斑形成変異イネを用いて、これまでに明らかとなっているイネのいもち病菌に対する光依存的抵抗性発現における葉緑体の役割の解析を行った。さらに、野生型品種のイネ及びオオムギを用いて同様の解析を行い、以下の結果を得た。

### 1. 疑似病斑形成変異イネのイネいもち病菌感染による光依存的関口病斑形成における葉緑体の役割

Linuron、1,10-Phenanthroline 及び Poly-l-lysine の 3 種類の光合成阻害剤がイネいもち病菌感染による関口病斑の形成に及ぼす影響を調査した。その結果、これらの光合成阻害剤を処理することによって光依存的な関口病斑の形成及びトリプタミンの蓄積が著しい抑制を受けた。さらにトリプタミン関連酵素である *TDC* の遺伝子発現、*MAO* 活性および DNA の断片化の有無について調査したところ光合成阻害剤処理葉では光照射下においても抑制され、カタラーゼ活性の低下も認められなかった。以上のことから、関口病斑の形成及びトリプタミンの蓄積には葉緑体における光合成が関連していることが示唆された。

3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU)を用いてさらに詳細な調査を行ったところ、DCMU 前処理によって *TDC* 遺伝子発現、*MAO* 活性、過酸化水素生成および DNA 断片化が抑制された。カタラーゼ活性はいもち病菌感染時に光照射下において著しく低下するが、

DCMU 前処理イネ葉ではそのような活性の低下は認められなかった。興味深いことに DCMU 処理葉ではトリプタミンの前駆体であるトリプトファンの蓄積も抑制した。さらに、DCMU 処理葉における関口病斑形成及びトリプタミン蓄積の抑制は、トリプタミンの前駆体であるトリプトファンの存在下では誘導されなかった。以上の結果はいもち病菌感染時の本変異イネにおける葉緑体の機能としてカタラーゼ活性の抑制およびトリプトファンの供給があげられることを示唆した。

## 2. 疑似病斑形成変異イネのイネいもち病菌に感染による光依存的関口病斑形成におけるトリプトファン合成経路の役割

いもち病菌接種葉におけるトリプトファン合成酵素関連遺伝子(5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ (*EPSP*)、アントラニル酸シンターゼ (*ANT*)、トリプトファンシンターゼ  $\beta$  (*TSB*) の発現を調査したところ、いずれの遺伝子も光照射下ではいもち病菌感染により高い発現が認められた。特に *TSB* においては発現が顕著だった。さらにトリプトファンの蓄積量についても調査を行ったところ、蓄積量は菌接種後光依存的に増加していた。これらのことから、関口病斑形成が光依存的である一因としてトリプタミンの前駆体であるトリプトファンの供給が光依存的であることが考えられた。

本変異イネへ芳香族アミノ酸生合成阻害剤である *N*-(phosphonomethyl) glycine (Glyphosate) を前処理すると、光依的な関口病斑形成およびトリプタミン蓄積が抑制された。このようなグリホセートによる阻害効果は同時にトリプトファンを処理することで消失し再び関口病斑形成およびトリプタミン蓄積が認められたが、フェニルアラニン存在下ではグリホセートの抑制効果は維持された。さらに、グリホセート処理葉においては、光依的なカタラーゼ活性の低下は認められず、高い活性を維持したままであり、過酸化水素生成および DNA 断片化についても抑制された。以上の結果は本変異イネにおけるイネいもち病菌に対する光依的な抵抗性発現の誘導においてトリプトファン経路とトリプタミン経路が同調的に調節され、両経路が非常に強い相関関係を示すことを示唆した。

## 3. 野生型イネおよびオオムギのイネいもち病菌に対する光依的な抵抗性発現における葉緑体の役割

野生型イネ (品種; 朝日) およびイネ科植物であるオオムギにおいても、いもち病菌接種後光依的に褐点形成が認められたが、光合成阻害剤処理によって、光依的な褐点形成は抑制され、いもち病斑へと転換した。また、蒸留水処理、いもち病菌接種葉においては褐点形成の誘導が可能な濃度のトリプタミンの蓄積が認められた。しかしながら、DCMU 前処理葉においてはトリプタミン蓄積は抑制された。またトリプタミン経路関連酵素である TDC 遺伝子の発現、MAO 活性の増加およびカタラーゼ活性の著しい低下も DCMU 前処理、菌接種イネ葉では認められなかった。さらに、病害抵抗性に関連しているといわれる PAL の活性についても経時的な調査を行ったところ、蒸留水前処理、いもち病菌接種イネ葉では菌接種後 PAL 活性が増加し、その後も高い活性を維持していた。一方 DCMU 前処理後いもち病菌を接種したイネ葉ではそのような活性の増加は認められず、無接種葉と同程度に抑制された。以上の結果は、野生型イネおよびオオムギにおける光依的な抵抗性へトリプタミン経路およびフェニルプロパノイド経路の 2 つの経路が関与しており、さらにそれら両経路の活性化には葉緑体、特に光合成が重要な役割を果たしていることを示唆した。

以上の結果より、1) 関口病斑形成変異イネでの光依的な抵抗性の発現における葉緑体の役割としてカタラーゼ活性の低下およびトリプトファンの供給に関与していること、2) 野生型イネ、オオムギにおける光依的な抵抗性発現には、トリプタミン経路とフェニルプロパノイド経路が関与しており、両経路に依存した抵抗性の発現において光合成が重要な役割を果たしていることが示唆された。