



イネ科植物の耐病性メカニズムとその応用



東京農業大学生物応用化学科

須恵 雅之

イネ科植物の耐病性メカニズムとその応用



- ・ **コムギにおける耐病性化合物：生合成と遺伝子**
- ・ **コムギおよびオオムギの耐病性化合物を発現するイネの作出を目指して**



植物の病害に対する抵抗性

分類その1

物理的抵抗性

細胞壁の強化など

化学的抵抗性

有毒な化合物の蓄積など

分類その2

静的抵抗性

元々備わっている抵抗性

動的抵抗性

感染などに応じて誘導される抵抗性

化学的抵抗性について

動的抵抗性

過敏感反応、ファイトアレキシン・PRタンパク質の誘導

病原菌-宿主間に比較的高い特異性

静的抵抗性

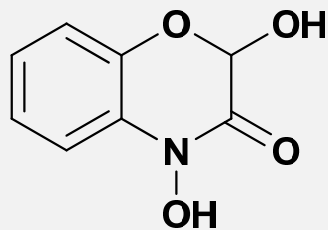
ファイトアンティシピンの蓄積

弱いが比較的広い抵抗性

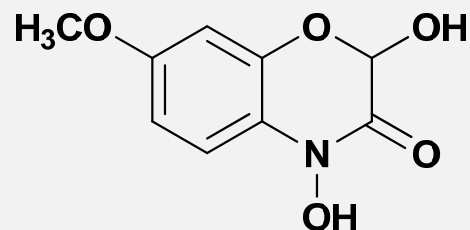
コムギ(*Triticum aestivum*)における化学的抵抗性

代表的な耐病性化合物

Benzoxazinones



2,4-Dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA)

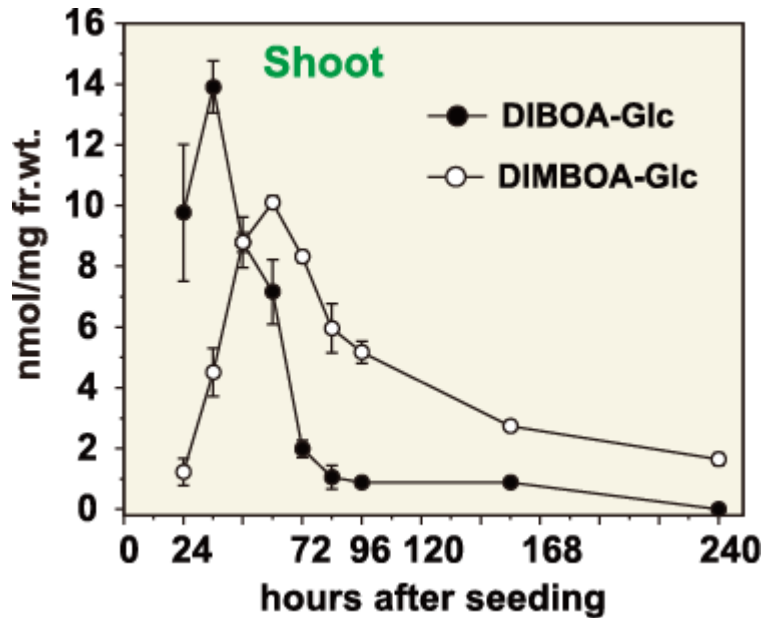


7-Methoxy-DIBOA (DIMBOA)

Biological activity:

- Resistance to **European corn borer (maize), aphid (wheat, maize), etc.**
- Resistance to various fungi such as ***Puccinia graminis*, *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum*, etc.**
- Allelopathic effects
- Detoxification of herbicides such as **atrazine** and **simazine**

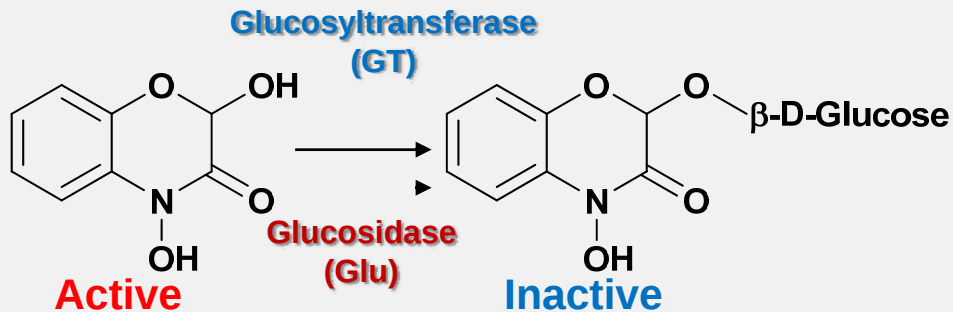
Bx発現量の経時変化



播種後1~3日後に、非常に高濃度
(新鮮重の1%弱)で発現

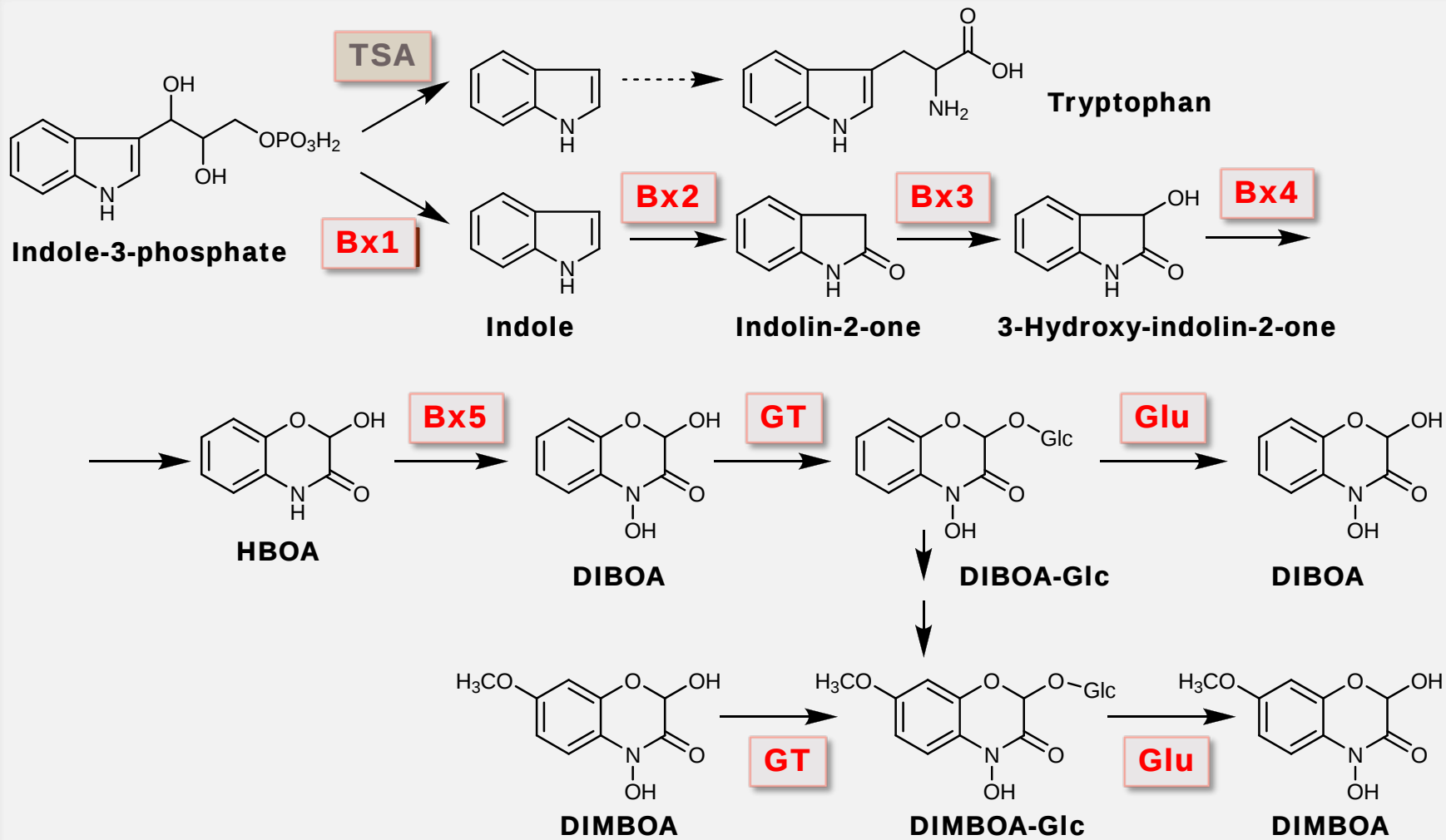


体内の濃度は成長とともに減少



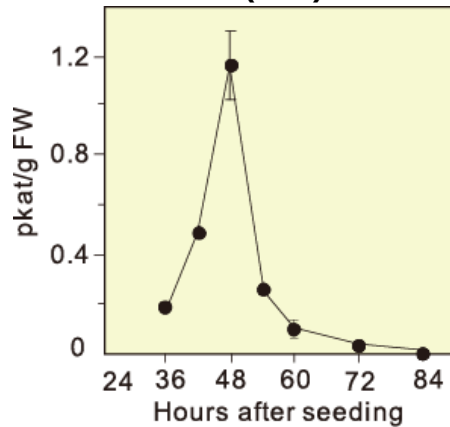
Bxは通常の細胞内では不活性な
グルコース配糖体として液胞内に
保存されている

Bxの生合成経路

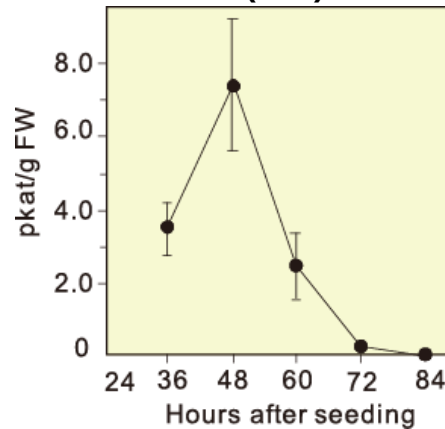


生合成、代謝酵素活性の変化

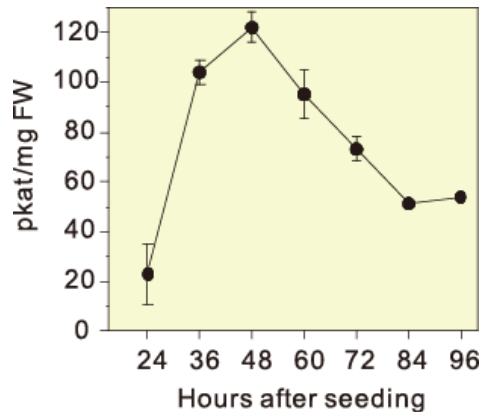
Indole hydroxylase
(Bx2)



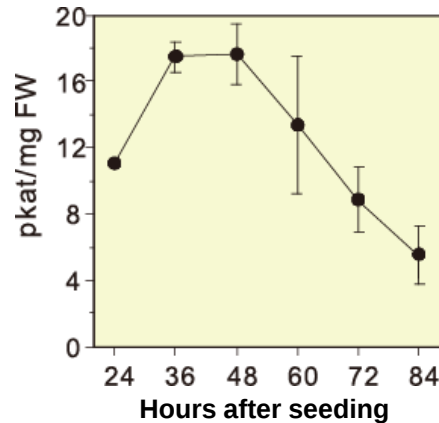
HBOA hydroxylase
(Bx5)



Glucosidase



Glucosyltransferase



Microsomal and cytosol fractions were prepared from wheat shoots. The products were measured using HPLC (Glu and GT) or LC-MS (Bx2 and Bx5).

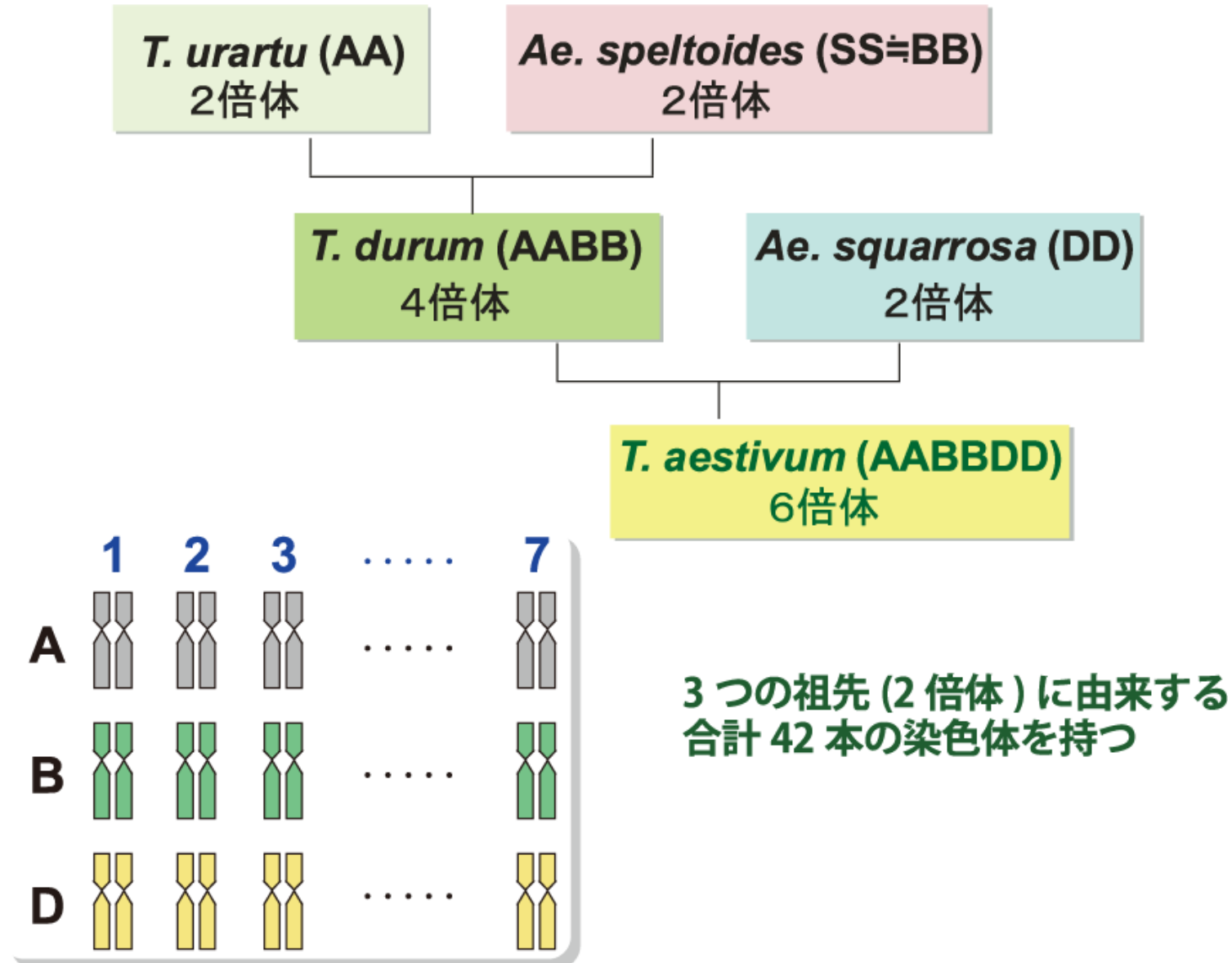
いずれの酵素活性も36-48時間に最も高く、成長とともに減少してゆく。

植物のゲノムサイズ

<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ)	1.4 x 10 ⁸	(2n=10)
<i>Oryza sativa</i> (イネ)	4.3 x 10 ⁸	(2n=24)
<i>Zea mays</i> (トウモロコシ)	30 x 10 ⁸	(2n=20)
<i>Triticum aestivum</i> (コムギ)	160 x 10 ⁸	(2n=6x=42)
<i>Hordeum vulgare</i> (オオムギ)	50 x 10 ⁸	(2n=14)
<i>Secale cereale</i> (ライムギ)	50 x 10 ⁸	(2n=14)

コムギは6倍体植物であり、ゲノムサイズも大きい

パンコムギ(*T. aestivum*)のゲノム



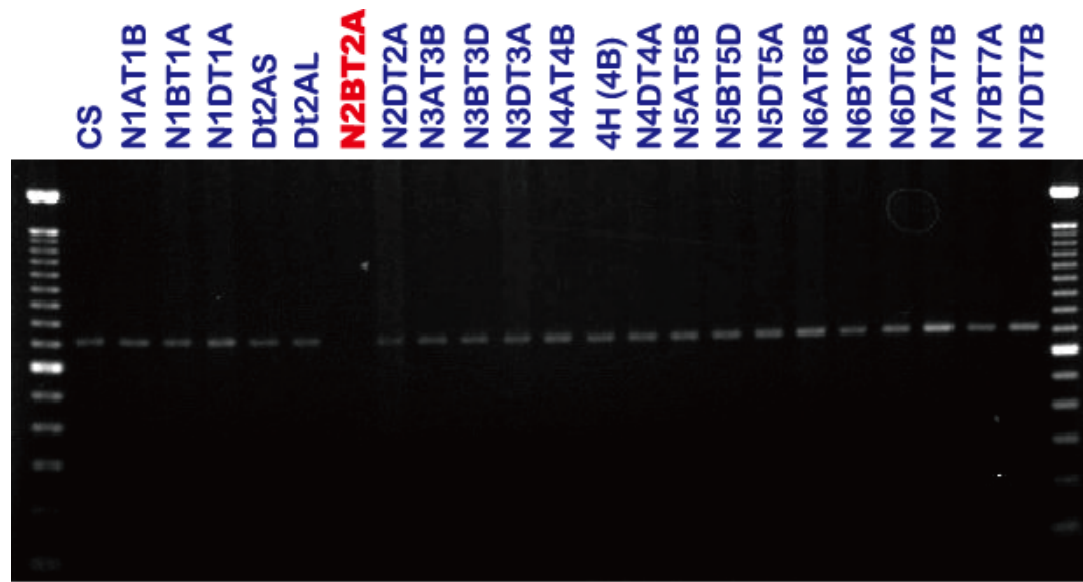
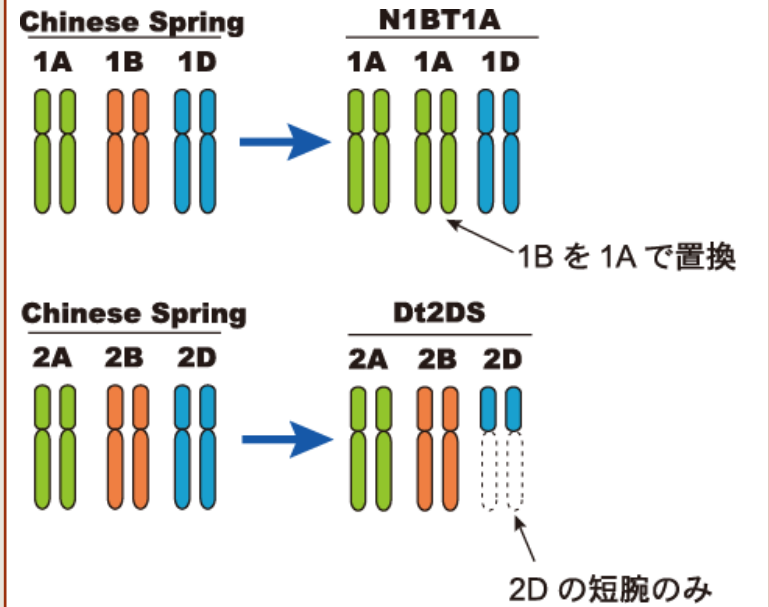
Bx関連遺伝子の座乗染色体

PCRおよびcDNAライブラリーのスクリーニング

各遺伝子とも複数の遺伝子の単離

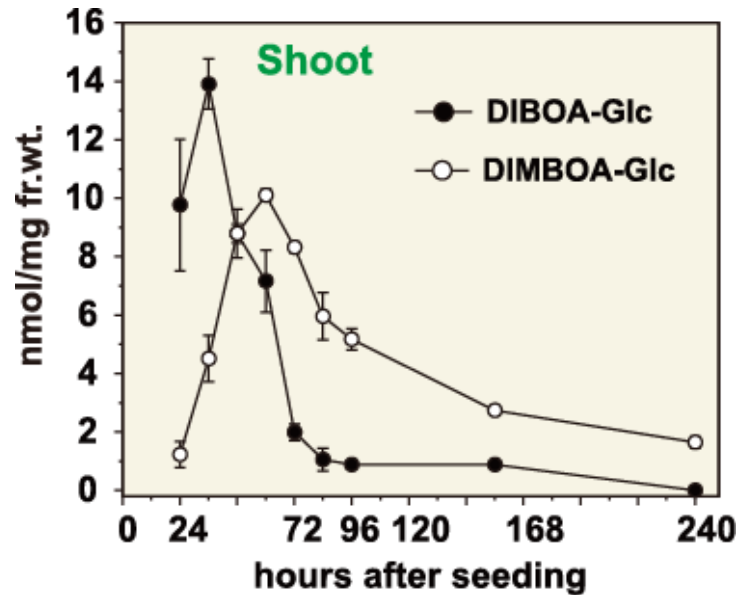
コムギ染色体置換系統よりゲノムDNAの調製

各遺伝子特異的プライマーを用いてPCR

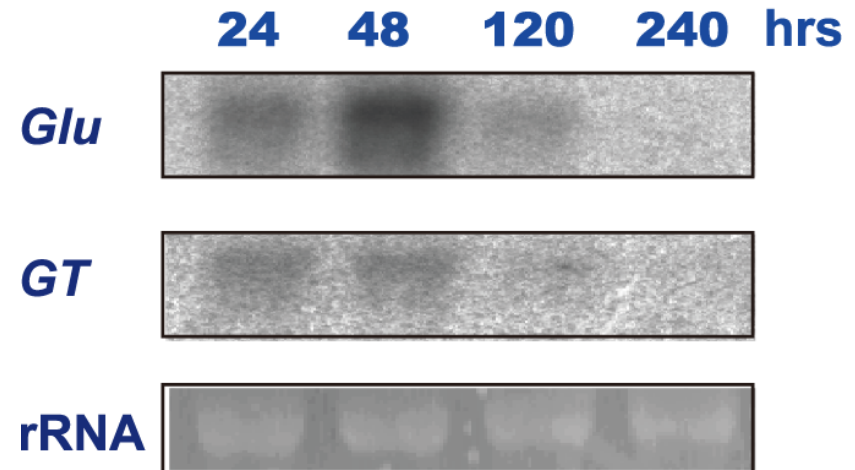


2B染色体に座乗

Bxの経時変化



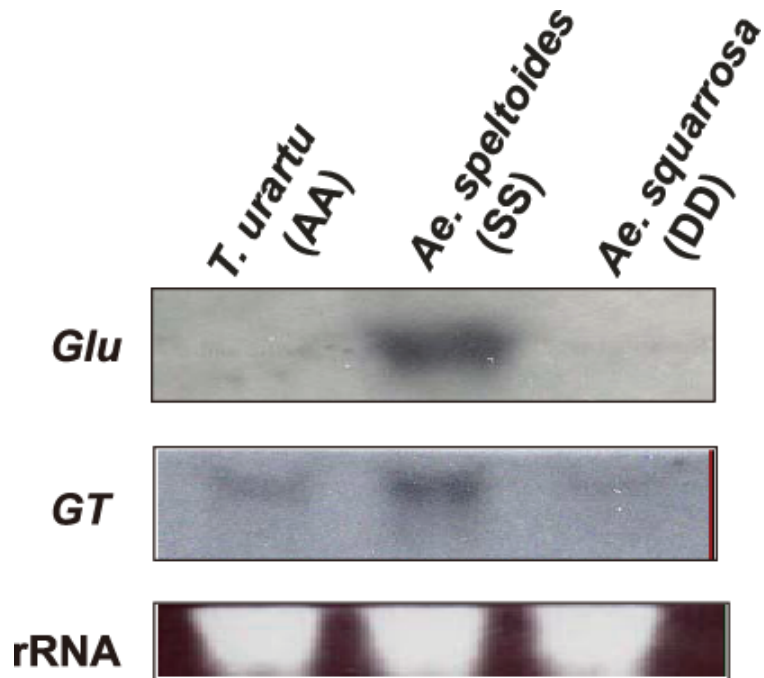
Northern hybridization



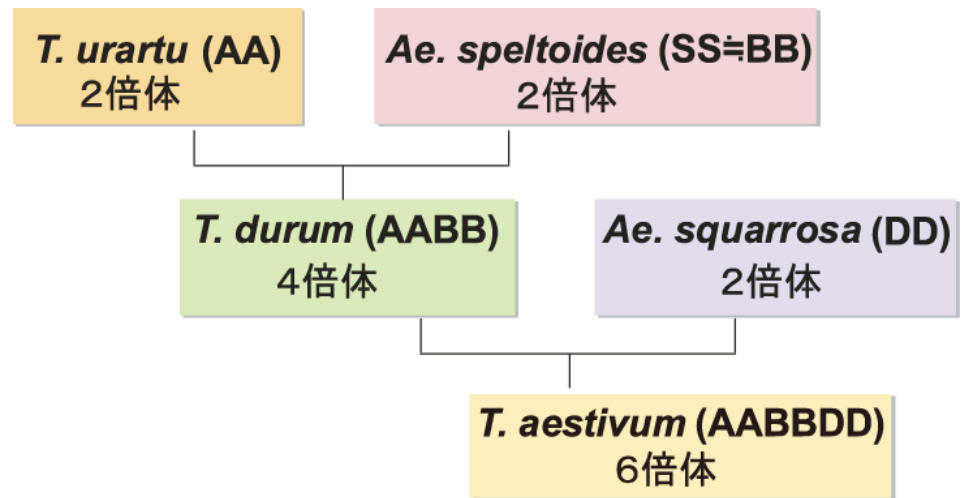
同祖遺伝子間で発現量に差はあるのか？

2倍体コムギにおける *Glu*, *GT* の発現量

Northern blot analysis



Total RNA was isolated from **48-hour old wheat**.



祖先種（2倍体）においても、**Bゲノム**を持つコムギで多く遺伝子が発現している。

まとめ

◆パンコムギ(*T. aestivum*)におけるBx関連遺伝子の座乗染色体を決定した。

◆これらの遺伝子は、コムギの幼小期に多く発現している。また、Bゲノムに座乗している遺伝子が最も多く発現している。このパターンは2倍体コムギでも同様である。

今後の予定

◆コムギのゲノムライブラリーを作成し、各同祖遺伝子の発現調節領域の取得、解析

コムギおよびオオムギの耐病性化合物を発現するイネの作出を目指して

これまでの形質転換イネ

ストレスに強い植物をめざして

殺虫性タンパク質、thaumatin-like protein、
stilben synthase、キチナーゼ、ディフェンシン
防御反応の誘導

栄養価の高い植物、アレルギー低減植物を目指して



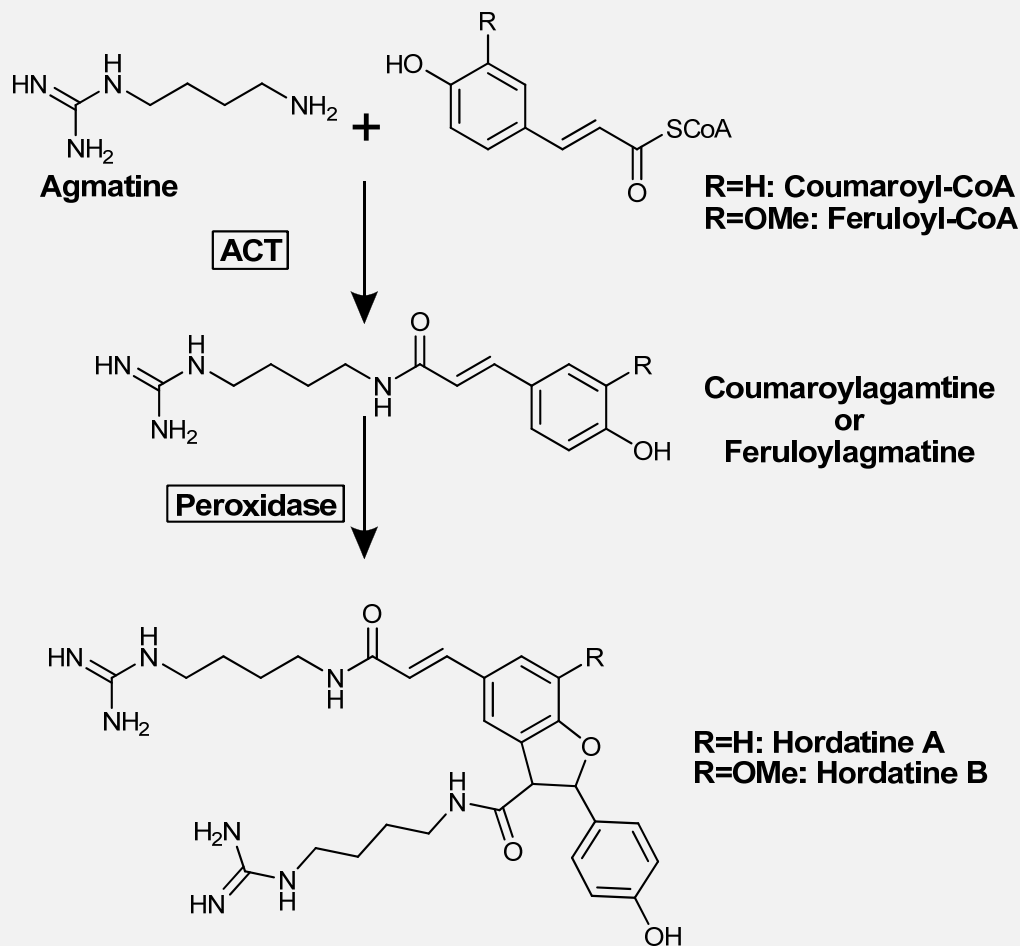
**コムギおよびオオムギの耐病性化合物を発現する
イネの作出を目指して**

**コムギのBx遺伝子、オオムギのホルダチン
遺伝子をイネに導入**



**イネにおけるBx、ホルダチンの発現、
病害抵抗性の評価**

ホルダチンの生合成経路



オオムギの幼小期に多く発現する
二次代謝産物

抗菌活性

Erysiphe graminis

Botrytis allii

Fusarium solani

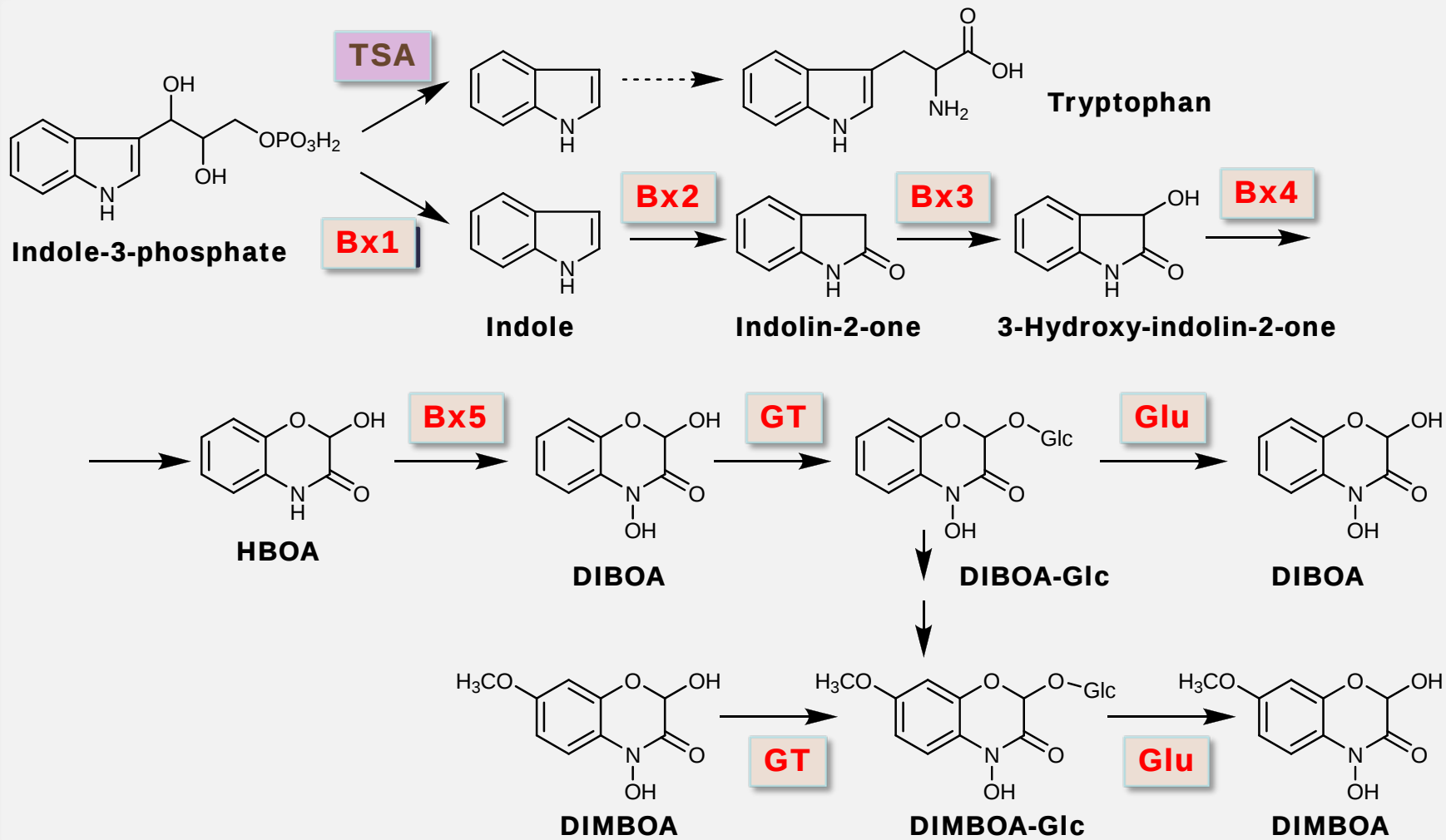
Glomerella cingulata

Monilinia fructicola など

ホルダチンやクマロイルアグマチン
は菌の感染により発現量が上昇する

イネにACT遺伝子を導入

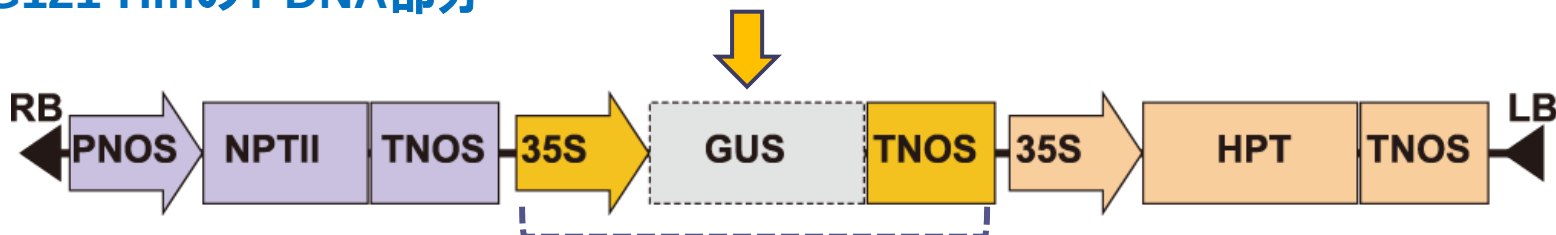
Bxの生合成経路



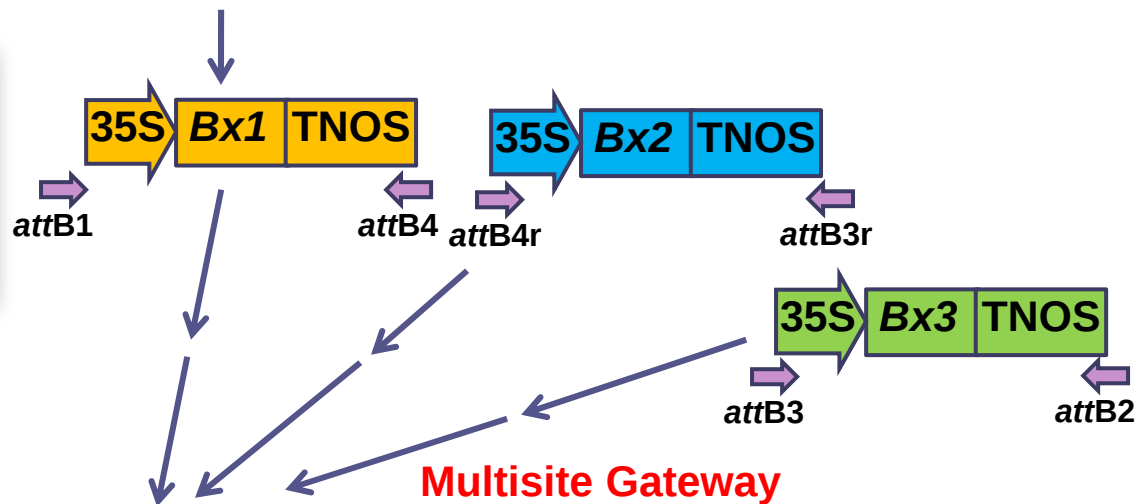
各遺伝子、**Bx2~Bx5**、**Bx2~GT**、**Bx1~GT**を導入

pIG121-HmのT-DNA部分

各遺伝子

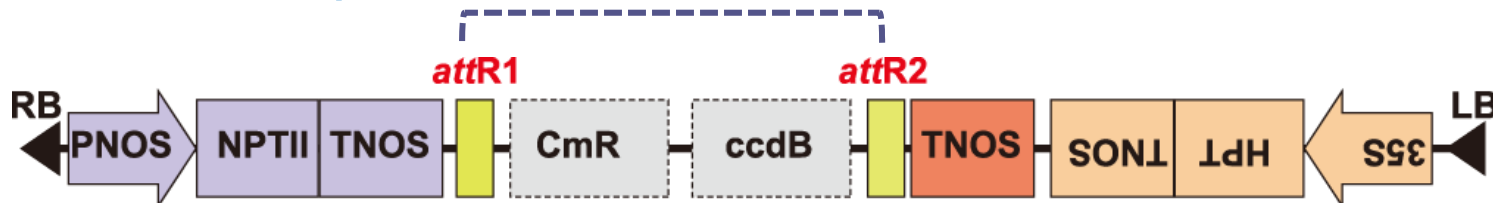


PNOS : nopaline synthase promoter
 NPTII : neomycin phosphotransferase
 TNOS : nopaline synthase terminator
 35S : cauliflower mosaic virus 35S promoter
 GUS : β -glucuronidase
 HPT : hygromycin phosphotransferase



Multisite Gateway

pGWB1のT-DNA部分



まとめ

- ◆アグロバクテリウムを用いたイネ形質転換用バイナリベクターを作成
- ◆現在、*Bx*遺伝子を1つ導入した形質転換植物を栽培中

今後の予定

- ◆作成した形質転換植物における酵素活性の評価
- ◆全遺伝子を導入した形質転換体を作成。病害抵抗性の評価。