

学 位 論 文 要 旨

氏 名 ムトウク ジョシア ムセンビ

題 目 イネの紋枯病に対する抵抗性および感受性に関する分子生物学研究
(Molecular biology studies on resistance and susceptibility to sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani* (Kuhn) in rice)

人口増加に対応した食糧確保は、緊急に解決すべき課題である。我々の食料の大部分は、数少ない植物種に依存し、中でもイネ (*Oryza sativa* L) は「三大穀物」の一つで、世界人口の60%が主食としている。しかし、その生産において病害は収量を制限する大きな要因である。特に、イネ紋枯病はイネの収量及び品質に大きな損害を与える病気の一つである (Lee and Rush, 1983)。イネ紋枯病は *Rhizoctonia solani* (Kuhn) と呼ばれる糸状菌によって引き起こされ、世界の食物確保に大きな脅威となっている。

本研究は、Wasano *et al.* (1985) によって開発された *R. solani* 抵抗性系統及び感受性系統を用いてイネ紋枯病に対する抵抗性メカニズムを解明することを目的として実施した。調査は、*R. solani* を接種した抵抗性及び感受性系統の解糖系、ペントースリン酸回路、シキミサン経路、フェニルプロパノイド代謝とTCA回路の関連酵素のmRNA発現について行った。その結果、解糖系、ペントースリン酸回路、シキミサン経路、フェニルプロパノイド代謝及びTCA回路を活性化させる炭素の分配部分が、罹病後に変化した。しかし、還元的ペントースリン酸回路は活性化しなかった (Mutuku and Nose, 2010)。同時に、F-6-P、DHAP、GAP、3-PG、PEP、ピルビン酸、E-4-P及びATPが増加した。さらに、アルドラーゼ、TPI、GAPDH、PGK、エノラーゼ及びPKの酵素活性は、*R. solani* に罹病したイネで高かった。トランスケトラーゼ、PAL及びパーオキシダーゼの高い活性とH₂O₂の蓄積が認められ、*R. solani* に対するイネの病害抵抗性のメカニズムに関連していることが明らかになった (Mutuku and Nose, 2011a)。さらに、*R. solani* を接種したイネを用いた解糖系の *in vivo* での制御特性については、PFK、アルドラーゼ、TPI、GAPDH+PGK及びPKによる触媒反応が平衡状態より制御された状態にあることが観察された。

解糖系の制御部として重要な F6P と F-1-6P₂ の相互転換部において、*R. solani* 抵抗性系統で pyrophosphate-fructose-6-phosphate-phosphotransferase (PFP) と 6-phosphofructokinase (PFK) の活性が増加することが明らかになった。さらに、13種類の PFP/PFK アイソザイムの mRNA 発現について解析した結果、*Os01g09570* (PFK 1)、*Os01g53680* (PFK 3)、*Os04g39420* (PFK 4)、*Os06g05860* (PFK 5)、*Os08g25720* (PFP 2) 及び *Os06g13810* (PFP 5) というイネ紋枯病に特異的なアイソザイムが存在した。これらの結果は、(a) PFP と PFK に *R. solani* 罹病対応のアイソザイムが存在し、(b) 罹病に伴う PFP の活性化は、その α -及び β -サブユニットの両方が関係している (PFP2 及び PFP5) こと、(c) 無関係な α -サブユニットが存在することを示している (Mutuku and Nose, 2011b)。また、解糖系の活性化はリグニンを生成するフェニルプロパノイド代謝の活性化と関連していた。事実、*R. solani* 感受性系統と比較して抵抗性系統のイネで活発なリグニン蓄積が観察された。

以上の結果は、*R. solani* に罹病したイネがその抵抗性を高めるための解糖系制御の代謝工学的アプローチには、遺伝子発現によって直接制御される部分 (coarse controls) とタンパク合成後の生体内調整 (fine controls) の両方の制御が必要であることを示している。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	MUTUKU Josiah Musembi
題 目	Molecular biology studies on resistance and susceptibility to sheath blight disease caused by <i>Rhizoctonia solani</i> (Kuhn) in rice (イネの紋枯病に対する抵抗性および感受性に関する分子生物学研究)

There is no problem confronting humans more fundamental than feeding its expanding populations. The greater proportion of our food is derived from relatively few plant species chief among which are cereal crops. Rice (*Oryza sativa* L.) one of the 'big three' cereals, is the principal food for 60% of the worlds' people. However, rice is subject to diseases that place major biological constraints on its production. Of these, rice sheath blight is one of the most prevalent causing great damage to rice yield and quality worldwide (Lee and Rush, 1983). Sheath blight disease is caused by the fungus *Rhizoctonia solani* (Kuhn) and is a serious threat to food security worldwide because it is prevalent in all rice growing areas.

This study was undertaken to investigate resistance response mechanisms of rice to sheath blight disease using *R. solani* resistant and susceptible rice lines developed by Wasano *et al.* (1985). The study investigated mRNA expressions of metabolic enzymes in glycolytic, pentose phosphate, shikimate, phenylpropanoid and TCA pathways in *R. solani*-infected plants of both resistant and susceptible plants. The results showed that carbon resource distribution changed after infection leading to activation of these pathways (Mutuku and Nose, 2010). Further investigations revealed significant changes in the metabolite contents whereby F-6-P, DHAP, GAP, 3-PG, PEP, pyruvate, E-4-P and ATP as well as enzyme activities of aldolase, TPI, GAPDH, PGK, enolase and PK increased in *R. solani*-infected rice plants. The high activities of transketolase, PAL and peroxidase and accumulation of H₂O₂ were detected and associated with the mechanisms for disease resistance in *R. solani*-infected rice plants (Mutuku and Nose, 2011a). When *in vivo* regulation of the glycolysis in *R. solani*-infected rice plants was examined, reactions catalyzed by PFK, aldolase, TPI, GAPDH+PGK and PK were found to be far from equilibrium *in vivo*. When PFK was investigated further, it was revealed that the activities of both forms of PFK i.e., pyrophosphate-fructose-6-phosphate-phosphotransferase (PFK) and 6-phosphofructokinase (PFK) increased in *R. solani*-infected rice plants especially those of the resistant line. Furthermore, changes in the mRNA expression of the 13 PFP/PFK isozymes showed some were specific for sheath blight disease while some were not. The sheath blight disease-specific isozymes were *Os01g09570* (PFK 1), *Os01g53680* (PFK 3), *Os04g39420* (PFK 4), *Os06g05860* (PFK 5), *Os08g25720* (PFP 2) and *Os06g13810* (PFP 5). These observations provide evidence that (a) both PFP and PFK have isozymes that play an adaptive role after *R. solani* infection, (b) the adaptive activation of PFP in *R. solani*-infected rice plants is correlated with the paired expression of its α - and β -subunits as shown by PFP 2 and PFP 5, and (c) the expression of some α -subunits is not specific to *R. solani* infection (Mutuku and Nose, 2011b). The activation of the glycolytic pathway was linked to activation of phenylpropanoid pathway where lignin was generated. Indeed when lignification was examined, significantly higher and uniform deposition was detected in the *R. solani*-infected rice plants of the resistant line, compared to those of susceptible line. When taken together, the findings of these studies presented a case for using metabolic engineering as a strategy to modulate the glycolysis of *R. solani*-infected rice plants to enhance their resistance response. The studies argued that modulation of glycolysis in *R. solani*-infected rice plants requires different strategies of engineering that consider enzyme synthesis (coarse control), and protein structure and function (fine control). Where both coarse and fine controls are exerted, regulation through a combination of both coarse and fine metabolic controls can be done simultaneously.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	MUTUKU Josiah Musembi
審査委員	主査 佐賀 大学 教授 野瀬 昭博
	副査 佐賀 大学 准教授 穴井 豊昭
	副査 琉球 大学 教授 屋 宏典
	副査 鹿児島 大学 教授 佐々木 修
	副査 佐賀 大学 准教授 鄭 紹輝
審査協力者	
題 目	Molecular biology studies on resistance and susceptibility to sheath blight disease caused by <i>Rhizoctonia solani</i> (Kuhn) in rice (イネの紋枯病に対する抵抗性および感受性に関する分子生物学研究)
<p>西南暖地においてイモチ病と並ぶ重要病害であるイネ紋枯病は、糸状菌 <i>Rhizoctonia solani</i> (Kuhn) によって引起され、地球温暖化にともなう拡大が懸念されている。本研究は、Wasano <i>et al.</i> (1985) によって開発されたポリジーン由来の <i>R. solani</i> 抵抗性イネ系統 (32R) 及び感受性イネ系統 (29S) について、その抵抗性メカニズムを解明することを目的として実施したものである。</p> <p>特に、32Rの抵抗性の一因が、感染にともなう細胞壁へのリグニン蓄積によると考えられることから、リグニン合成に係るフェニルプロパノイド代謝系へのシキミ酸経路を介した解糖系からの炭素分配に着目し、その代謝変動を遺伝子発現・酵素活性・代謝中間体濃度の感染後の経時変化を解析している。さらに、代謝変動を、遺伝子発現を伴う Coarse control (粗調整) と翻訳後に細胞質内のタンパク質レベルで生じる Fine control (微調整) に類別し、後者を評価するために代謝中間体の濃度から質量作用比 (Mass Action Ratio; MAR) を求めている。得られた遺伝子発現レベルと細胞レベルでの制御特性から代謝工学的品種開発のアップ</p>	

ローチの仕方にも言及している。

まず、解糖系、ペントースリン酸回路、シキミ酸経路、フェニルプロパノイド代謝及びトリカルボン酸 (TCA) 回路における関連酵素の mRNA 発現について調査した。32R においては、罹病後に解糖系の 8 種類の酵素中 5 種類の酵素遺伝子の発現が増大し、シキミ酸経路、フェニルプロパノイド代謝及び TCA 回路の制御酵素遺伝子の発現も増大することを観察している。しかし、シキミ酸経路の初発物質である Erythrose 4-phosphate (E4P) 合成に関わる酸化的ペントースリン酸回路の関連酵素の発現は抑制され、罹病後の E4P 供給は主に解糖系よりもたらされ、解糖系の活性化が重要であることを明らかにしている。

次に、関連する酵素活性の変化について解析を加え、解糖系の Phospho-glucomutase (PGM)、6-phosphofructokinase (PFK)、Pyrophosphate-fructose-6-phosphate-phospho-transferase (PFP)、Triosephosphate isomerase (TPI)、Pyruvate kinase (PK) の活性化が mRNA 発現を伴って生じる Coarse control によること示している。さらに、解糖系の代謝中間体の含量が、Glucose 6-phosphate (G6P) 以外の 9 種類で増大し、罹病後に解糖系の全体的な活性化が生じていることを観察している。また、MAR と既知の平衡係数との比較から *in vivo* レベルでの Fine control が PFK、Aldolase、TPI、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase + Phospho-glycerate kinase (GAPDH+PGK)、Pyruvate kinase (PK) の部分で生じていることを明らかにしている。また、*R. solani* 感染に伴う細胞質型解糖系の発現を PFK と PFP 遺伝子のアイソザイム発現から分析し、細胞質型解糖系が抵抗性系統 32R で特異的に発現していることを明らかにしている。

さらに、*R. solani* 感染に伴うリグニン蓄積についてもリグニン合成に関与するパーオキシダーゼ発現の組織化学的な観察を含め形態学的観察により 32R と 29S に明らかな差があることを認めている。

以上の内容は、ポリジーン由来のイネ紋枯病の抵抗性発現における解糖系の活性化を遺伝子及び生化学レベルで明らかにし、メタボロームやトランスクリプトーム解析を利用した代謝工学的品種開発のアプローチに有益な知見を与える成果となっている。また、多犯性の病原である *R. solani* のイネ以外の抵抗性品種の開発モデル解析としても有益な知見となっている。以上のことから、博士 (農学) の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	MUTUKU Josiah Musembi
審査委員	主査 佐賀 大学 教授 野瀬 昭博
	副査 佐賀 大学 准教授 穴井 豊昭
	副査 琉球 大学 教授 屋 宏典
	副査 鹿児島 大学 教授 佐々木 修
	副査 佐賀 大学 准教授 鄭 紹輝
審査協力者	
実施年月日	平成 24 年 1 月 26 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査および副査は、平成24年1月26日(木)の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足ができる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに見識を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	MUTUKU Josiah Musembi
<p>質問 1 : PFK、PFK についてはアイソザイムについて分析がされているが、その他の酵素遺伝子についてアイソザイム分析はしていないのか？</p> <p>回答 1 : PFK、PFK 以外の酵素遺伝子については、共通領域を用いて mRNA の分析を行った。</p> <p>質問 2 : 発現量と活性に一致しない例があったが、アイソザイム分析をすると傾向が変わるのではないのか？</p> <p>回答 2 : 多数の酵素遺伝子を対象としたので今回はアイソザイムまで分析できなかったが、今後検討したい。</p> <p>質問 3 : mRNA expression ではなくて accumulation ではないのか？</p> <p>回答 3 : その通りで、修正したい。</p> <p>質問 4 : relative expression ということで、アクチンをコントロールにしていると思うが、未接種植物体のデータをコントロールとすると差が明確になるのではないのか？</p> <p>回答 4 : 検討したい。</p> <p>質問 5 : 調査期間が 4 日で終わっているが、その後はどういう経過をすると考えるのか？</p> <p>回答 5 : 多分、その後は mRNA 量は低下するものと予想している。</p> <p>質問 6 : アルドラーゼの MAR と K の関係が、その他の酵素と異なり MAR が大きくなっていたが、何故か？</p> <p>回答 6 : アルドラーゼに係わる F16BP、DHAP、GAP の部分は、E4P や PEP への炭素の分岐、あるいはスクロースへの分岐部になっているために、様々な反応に係わってこのような結果になったのではないかと考えているが、今後は、この部分について更に詳しく分析をする必要があると考えている。</p> <p>質問 7 : 紋枯病菌は、どのようにして植物体に侵入するのか？気孔等から侵入するのか？それとも細胞壁を溶かして侵入するのか？</p> <p>回答 7 : 後者であると考えている。理由としては、抵抗性の原因のひとつが、細胞壁でのリグニン蓄積であることから、リグニン蓄積によって菌から出されるセルラーゼによる細胞壁の分解をしにくくしていると考えている。</p> <p>質問 8 : 気孔から侵入することは考えられないのか？</p> <p>回答 8 : 感染部位が葉鞘であることから気孔からの侵入は少ないと考えている。</p> <p>質問 9 : 感染メカニズムとしてシグナリングについては、どのようかんがえるのか？</p> <p>回答 9 : 今後の研究課題と考えている。</p> <p>質問 10 : リグニン以外の抵抗性としてフェノール類の関与はないのか？</p> <p>回答 10 : フェノール類の関与を示した研究はすでに報告されている。PAL 活性が抵抗性系統で増大することから、フェノール類の関与は十分にあり得る。</p> <p>質問 11 : アフリカイネ graberrima にも紋枯病はあるのか？</p> <p>回答 11 : 重要な病気である。</p> <p>質問 12 : 陸稲と水稲での感染の仕方の違いはないのか？</p> <p>回答 12 : 同様である。</p>	