

令和元年6月21日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04888

研究課題名(和文)植物のセンチュウ抵抗性に果たす葉緑体関連物質の役割解明と新規シグナル物質の探索

研究課題名(英文) Role of chlorophyll related compounds in root-knot nematode resistance in plants and exploration of new signal compounds

研究代表者

瀬尾 茂美 (SE0, Shigemi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主席研究員

研究者番号：80414910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：作物の収量低下等をもたらす植物寄生性線虫に対する防除技術の開発に資するべく、サツマイモネコブセンチュウ(以下、センチュウと略記)に対して抵抗性を誘導する物質として見出した、フィトール(クロロフィルの構成成分)のシグナル伝達機構の解析を行い、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析等からフィトールによるセンチュウ抵抗性においてはエチレンが重要な役割を演じることが明らかとなった。また、先行研究で見出した別のセンチュウ抵抗性誘導物質であるスクラレオールで起こるクロロシスの誘導に関わる物質の探索を行い、phytosterol類を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フィトールはクロロフィルの構成成分であるが、他の生理学的役割については全くと言ってよいほど知られていなかった。本研究では、フィトールがセンチュウ抵抗性を付与することを見出した。フィトールを用いたセンチュウ防除技術(抵抗性誘導剤等)の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Plant-parasitic nematodes parasitize roots and/or stems of a lot of host plants, resulting in damage or yield loss. Especially, the plant damage by root-knot nematode (RKN) is a very serious problem. RKN is one of the most devastating pathogenic nematodes. We found that phytol, a constituent of chlorophyll, induced resistance to RKN in tomato and Arabidopsis. Molecular genetic analyses revealed that ethylene is involved in phytol-induced RKN resistance. We also found that sclareol, another RKN resistance-inducing substance, caused chlorosis-like lesions in Arabidopsis and phytosterols are involved in inducing sclareol-induced chlorosis.

研究分野：植物保護

キーワード：植物寄生性線虫 抵抗性誘導 エチレン 葉緑体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原体や害虫の攻撃に対して植物はサリチル酸やジャスモン酸、エチレンなどの防御物質(主に低分子二次代謝産物)を生産することにより対処している。蓄積したこれら物質は pathogenesis-related (PR) 遺伝子などの病害虫抵抗性に関わる一連の遺伝子群の発現を誘導することから、植物の病害虫防御における化学シグナルとして働いていると考えられている(文献)。これら防御物質のうちでも病原体を直接殺すことなく病害虫抵抗性を誘導・活性化する物質は、耐性菌の出ない環境低負荷型病害虫防除剤の天然素材として注目されている。実際、そのような物質の生合成や代謝、シグナル伝達経路などを標的とする防除剤の開発が国内外において進められているが、これまで見出された標的候補の防御物質そのものの数が少ないこともあり、実用化に至った例は極めて少ないのが現状である。

土壌中には植物に感染・寄生し被害を与える様々な病原微生物が存在する。土壌微生物のうち植物寄生性ネコブセンチュウは、トマトやキュウリ、ニンジンなど広範囲の作物の根等に寄生し、収量減などの被害を起こすことから重要害虫の一つと数えられている。ネコブセンチュウを防除する手法として主に土壌消毒と抵抗性品種が用いられているが、土壌消毒は処理に手間がかかる上、用いる消毒剤の種類に応じて有用微生物にも影響を与えること、抵抗性品種は抵抗性を打破するセンチュウが出現してしまうことなどの問題が懸念されている。これら問題を解決するための手法の一つとして考えられるのが、センチュウ抵抗性を誘導する植物由来の防御物質の利用である。しかし、ネコブセンチュウに対する防御物質については、ジャスモン酸(文献)以外知られていなかった。

このような状況のなか、申請者らは植物が生産するジテルペンの1種であるスクラレオールがネコブセンチュウの植物根への侵入を抑制することにより抵抗性を誘導することを見出した。

これまでの解析から、スクラレオールは根でのエチレンの生合成及びシグナル伝達系の部分的な活性化を通じて防御反応を誘導することによりセンチュウに対して防除効果を発揮することが示された。スクラレオールによるセンチュウ抵抗性誘導のメカニズムを解明するための足掛かりとして、スクラレオールを外生処理したシロイヌナズナ根における代謝産物を分析したところ、スクラレオール処理特定に蓄積する物質の一つとしてフィトールを同定した。フィトールはクロロフィルの構成成分であることが知られているが、その他の生理学的役割については全くと言ってよいほど知られていない。シロイヌナズナ根にスクラレオールを処理した場合に、地上部(主に葉)で壊死様クロロシスが見られたが、このことは、スクラレオール処理に反応して葉でのクロロフィル分解を起こすシグナルが伝わることを示唆する。

2. 研究の目的

「研究開始当初の背景」に記述した通り、スクラレオール処理した植物根ではフィトールの蓄積が起こるとともに、葉でのクロロフィル分解が起こる。そこで本研究では、フィトールの上流・下流で機能する植物因子の同定・機能解析等を通じて作用機構を解明し、当該物質のセンチュウ抵抗性に果たす役割を解明するとともに、クロロフィル分解に関わる植物成分を探索することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

植物材料及びサツマイモネコブセンチュウ

トマト(*Solanum lycopersicum*)は桃太郎、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)は野生型として Col-0 を用いた。また、シロイヌナズナの各種植物ホルモン変異株として *npr1-1*(サリチル酸シグナル伝達), *coi1-1*(ジャスモン酸シグナル伝達), *abi1-1*(アブシジン酸シグナル伝達), *ein2-1*(エチレンシグナル伝達), *ein3-1*(エチレンシグナル伝達)を用いた(文献 ~)。トマトとシロイヌナズナの栽培条件は文献 に記載の方法に従った。

サツマイモネコブセンチュウ及び接種法は定法に従った(文献、)。

センチュウ抵抗性検定

センチュウ抵抗性は文献 及び に従って、根を酸性フクシンで染色し、染色されたセンチュウ数を計測することにより評価した。

リアルタイム PCR

植物組織からの RNA 抽出及びその後のリアルタイム PCR は定法(文献、)に従った。プライマーは文献 に記載の配列に従った。

植物ホルモン定量

植物ホルモンの定量は定法(文献、)に従った。

クロロフィル分解促進物質の精製

シクラレオール処理したシロイヌナズナをアセトン抽出し、抽出物をシリカゲルのオープンカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン-酢酸エチル-メタノール系でステップワイズ溶出した。溶出画分は生物検定に供試、活性を示した画分は逆相系 HPLC (アセトニトリル-水系) で精製した。

生物検定

各画分はシロイヌナズナの根を介して処理し、地上部で現れる壊死の誘導の有無やクロロフィル含量を指標とした。

構造解析

活性を示した精製物は、800 MHz ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR に供した。

4. 研究成果

1) フィトールのシグナル伝達機構

まずフィトールがセンチュウ抵抗性誘導活性を示すかを、トマトを用いて検証した。具体的には、異なる濃度のフィトールを予め処理したトマト根にセンチュウを接種し、根に侵入したセンチュウを酸性フクシン法を用いて計測することにより評価した。その結果、フィトールは 10 μM 以上の濃度でセンチュウ侵入数の低下を起こした (図 1)。

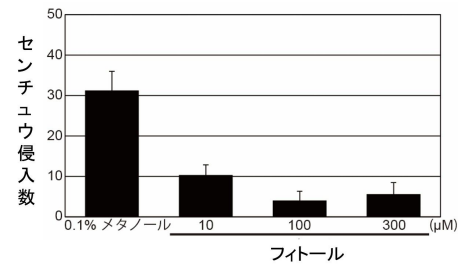


図 1. サツマイモネコブセンチュウのトマト根侵入に対するフィトールの効果

次いで、フィトールのシグナル伝達機構の解明に向けて、実験系をシロイヌナズナに移し、フィトール処理したシロイヌナズナ野生型 (Col-0) 根における各種植物ホルモンマーカ遺伝子の発現様相を調べた。調べたマーカ遺伝子は、*PR1* (サリチル酸応答性遺伝子)、*LOX2* (ジャスモン酸応答性遺伝子)、*chiB* (ジャスモン酸/エチレン応答性遺伝子)、*PDF1.2* (エチレン応答性遺伝子) を用いた。その結果、対照区 (0.1%メタノール) に比較してフィトール処理区では *LOX2*、*chiB*、*PDF1.2* の発現上昇が認められた (図 2)。

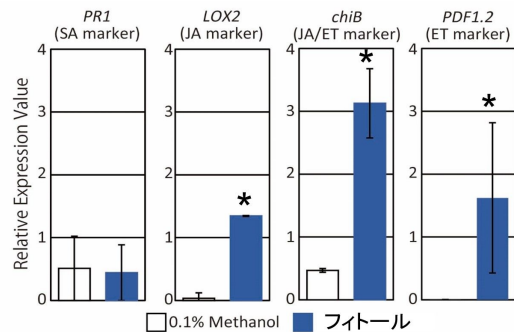


図 2. シロイヌナズナの防御関連遺伝子の発現に対するフィトールの効果
*は有意差 ($p < 0.05$) を示す。

フィトール処理したシロイヌナズナ野生型 (Col-0) 根 (処理後 48 時間) におけるサリチル酸、ジャスモン酸、エチレンの量を測定したところ、エチレン量の増加が認められた (図 3)。サリチル酸とジャスモン酸はフィトール処理による内生量の増加は認められなかった (data は省略)。

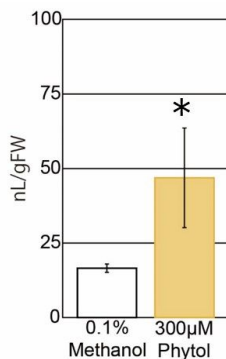


図 3. シロイヌナズナにおけるエチレン発生に対するフィトールの効果
*は有意差 ($p < 0.05$) を示す。

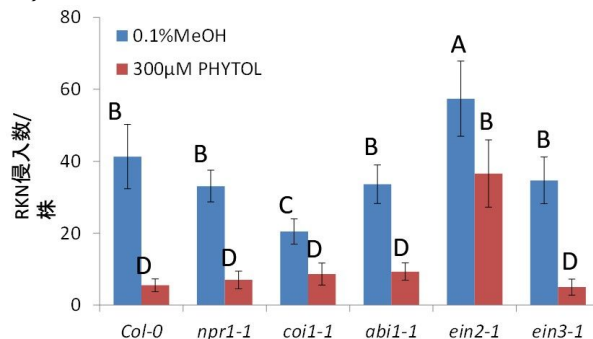


図 4. シロイヌナズナ防御関連変異株を用いたフィトールによるセンチュウ抵抗性の検証
異なるアルファベットは有意差があることを示す。

フィトールによるセンチュウ抵抗性に果たすエチレンの重要性をさらに明らかにするべく、エチレンシグナル伝達の変異株を用いて抵抗性検定を行った。エチレンシグナル伝達因子である EIN2 の機能喪失変異株 *ein2-1* では、野生型 (Col-0) に比較して、フィトールによるセンチュウ抵抗性が減衰していた (図 4)。興味深いことに、別のエチレンシグナル伝達因子である EIN3 の変異株 *ein3-1* では野生型並みのフィトールによるセンチュウ抵抗性が見られた。他植物ホルモンの変異株 (*npr1-1*, *coi1-1*, *abi1-1*) では *ein2-1* で見られた抵抗性の減衰は認められなかった (図 4)。

これらの結果は、フィトールによるセンチュウ抵抗性には EIN2 を介したエチレンシグナル伝達が重要な役割を演じていることを示唆する。EIN3 の関与については現時点では不明である。

2) クロロフィル分解促進シグナル物質の探索

スクラレオール処理したシロイヌナズナの地上部 (葉) では、図 5 に示す通りクロロシ様の症状が生じる。クロロシ様の症状を示した植物の地上部ではクロロフィル量の低下が認められた (図 6)。そこで、このクロロシ様の症状を引き起こす物質を明らかにするために、スクラレオール処理したシロイヌナズナクロロフィル分解やクロロシを指標に植物成分の精製を進めた。活性成分は単一の物質ではなく、複数の物質であり、構造解析の結果から、これらは stigmasterol 及び campesterol のいわゆる phytosterol であることが判明した。スクラレオールが如何にしてこれら phytosterol の蓄積を誘導するのかは今後明らかにすべき課題として残っている。



図 5 . スクラレオール処理したシロイヌナズナに見られるクロロシ様症状

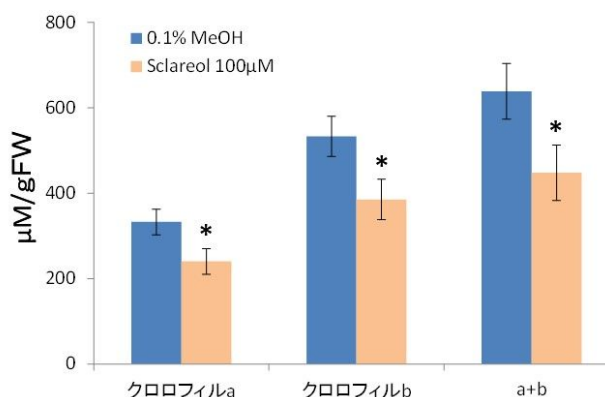


図 6 . スクラレオール処理したシロイヌナズナ葉におけるクロロフィル含量 *は有意差 (p<0.05) を示す。

< 引用文献 >

- Shah, J. Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology* (2009) 12: 459-464
- Fujimoto T., Tomitaka, Y., Abe, H., Tsuda, S., Tutai, K., and Mizukubo, T. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology* (2011) 168: 1084-1097
- Fujimoto, T., Mizukubo, T., Abe, H., and Seo, S. Sclareol induces plant resistance to root-knot nematode partially through ethylene-dependent enhancement of lignin accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (2015) 28: 398-407
- Seo, S., Gomi, K., Kaku, H., Abe, H., Seto, H., Nakaho, K., Nakatsu, S., Neya, M., Kobayashi, M., Ichinose, Y., Mitsuahara, I., and Ohashi, Y. Identification of natural diterpenes that inhibit bacterial wilt disease in tobacco, tomato and Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* (2012) 53: 1432-1444.
- Seo, S., Nakaho, K., Hong, Si, Won, Takahashi, H., and Mitsuahara, I. L-Histidine induces resistance in plants to the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* partially through the activation of ethylene signaling. *Plant and Cell Physiology* (2016) 57: 1932-1942
- Fujimoto, T. Mizukubo, H. Abe, S. Seo, Root-knot nematode penetration and sclareol nematicidal activity assays (2016) bio-protocol <http://www.bio-protocol.org/e1848>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fujimoto, T. Mizukubo, H. Abe, S. Seo, Root-knot nematode penetration and sclereol nematicidal activity assays (2016) bio-protocol <http://www.bio-protocol.org/e1848> (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

安部 洋、櫻井 民人、瀬尾 茂美、澤田 有司、平井 優美、大矢 武志、松浦 昌平、三富 正明、梅村 賢司、腰山 雅巳、津田 新哉、小林 正智、アザミウマ忌避剤の開発とアザミウマ忌避に関わる植物二次代謝物の探索、第 60 回日本植物生理学会、2019

安部 洋、下田 武志、瀬尾 茂美、澤田 有司、平井 優美、上原 拓也、霜田 政美、釘宮 聡一、櫻井 民人、津田 新哉、小林 正智、微笑害虫の行動と植物防御の解析、第 59 回日本植物生理学会、2018

安部 洋、小林 優大、瀬尾 茂美、釘宮 聡一、本橋 令子、下田 武志、小林 正智、植物由来の豆ハモグリバエ誘因成分の同定とその生態学的な意義に関する研究、第 58 回日本植物生理学会、2017

瀬尾 茂美、藤本 岳人、安部 洋、水久保 隆之、クロロフィルの構成成分であるフィトールは植物のサツマイモネコブセンチュウ抵抗性を誘導する、日本農薬学会第 42 回大会、2017

瀬尾 茂美、天然化合物からの化学的病害虫防除技術シーズの探索、平成 28 年度植物病理学会感染生理談話会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：センチュウ抵抗性誘導剤及びセンチュウ防除方法

発明者：水久保 隆之、藤本 岳人、瀬尾 茂美

権利者：農業・食品産業技術総合研究機構

種類：特許

番号：第 5668232 号

取得年：2018

国内外の別：日本

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：安部 洋

ローマ字氏名：ABE Hiroshi

研究協力者氏名：藤本 岳人

ローマ字氏名：FUJIMOTO Taketo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。