

令和元年6月6日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07395

研究課題名(和文) 病虫害応答に関与する新規葉緑体機能の探索

研究課題名(英文) Search for novel chloroplast function involved in disease and insect response

研究代表者

本橋 令子 (Motohashi, Reiko)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：90332296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体を持つ新規機能を調べることを目的として、病害応答と虫害応答に関与する葉緑体タンパク質を探索した。まず、植物の防御応答メカニズムであるPTIを引き起こす、細菌の鞭毛を構成するフラジェリンのN末端に保存されている22個のアミノ酸(flq22)を用いて、感受性株として葉緑体タンパク質遺伝子破壊株2系統、非感受性株を1系統が得られた。また、ハモグリバエの加害の程度を指標に葉緑体タンパク質遺伝子破壊株をスクリーニングした結果、斑入り変異体の食害は野生型より多く、老化に関与する葉緑体タンパク質の遺伝子破壊株は、食害が少ない傾向が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉緑体は病原菌の感染による免疫応答に関わるCa²⁺シグナル伝達やROS(reactive oxygen species)を発生する場としての機能を持ち、病害応答において病原菌の侵入を認識するシグナルを受けることで免疫応答を誘導することがわかり始めているが、具体的な他の因子については報告が極めて少ない。本研究では、フラジェリンタンパク質を用いて葉緑体タンパク質をコードする遺伝子破壊株から病害応答に関与する葉緑体タンパク質を効率よく単離することが可能である事を示した。又、同様に、ハモグリバエの加害の程度を指標に虫害応答に関与する葉緑体タンパク質を探索することも可能である事を示した。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate new functions of chloroplasts, we searched for chloroplast proteins involved in disease and insect responses. The 22 amino acids (flq22) conserved at the N-terminus of the flagellin that is a component of bacterial flagella. flq22 peptides cause PTL (pattern-triggered immunity / PAMP-triggered immunity), which is the defense response mechanism of plants. Two flq22 sensitive tagged lines and one insensitive tagged line were obtained from chloroplast protein encoded gene-disrupted lines using flq22. Moreover, the chloroplast protein encoded gene-disrupted lines were screened based on the feeding damage of the leafminer fly. As a result, the feeding damage of the variegated mutant was greater than that of the wild type, and senescence mutants had less feeding damage.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：葉緑体タンパク質 病害応答 虫害応答 シロイヌナズナ 遺伝子破壊株

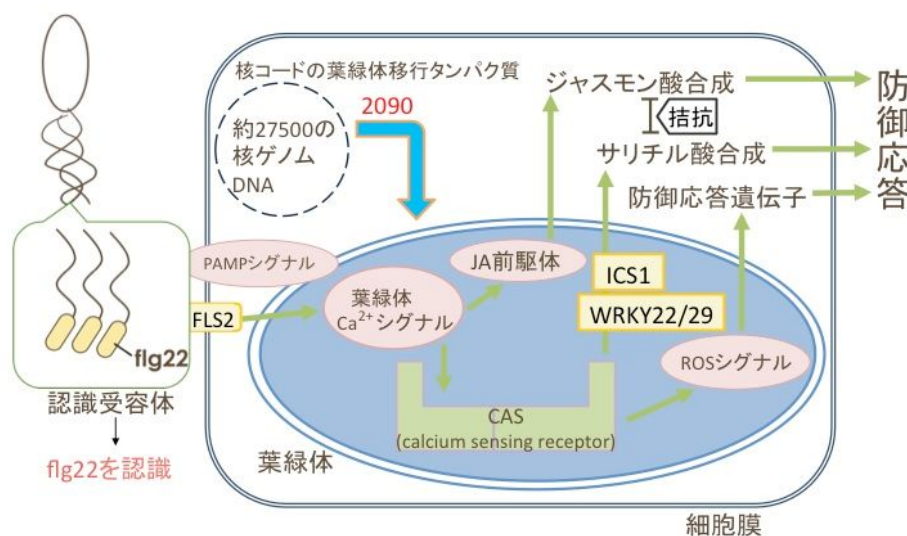
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

葉緑体と病害応答が関係していることは30年ほど前から知られ、免疫反応の中心的な役割を担っているのは葉緑体で産生されるROS(reactive oxygen species)だと言われていた。しかし、実際に葉緑体が直接病害応答に関与しているという報告は極めて少ない。

我々は葉緑体の発達や分化のメカニズムを解明するために、シロイヌナズナの葉緑体タンパク質遺伝子破壊株を栽培している時に、色素の薄い変異体が病虫害に弱いことを多く目にしてきた (Satou et al., 2014, Motohashi et al., 2012, 2007, 2001, Tanaka et al., 2010, Myouga et al., 2010, 2008)。また、クロモプラスト分化の研究材料であるトマトにおいても、通常の赤トマト、クロロフィルが成熟しても残っている黒トマト、カロテノイド色素も含まない白トマトを同時期に同じ温室にて栽培した場合、常に白トマトがハモグリバエやうどんこ病などの病虫害被害が最も大きいという経験を持っていた。

また、2012年に野村らにより、植物の病害応答の最初の段階であるPAMP (pathogen-associated molecular pattern) シグナルが葉緑体に伝達されCa²⁺シグナルを生じること、このCa²⁺シグナルの発生にはCASと呼ばれる葉緑体チラコイド膜タンパク質が関与し、一重項酸素などのROSシグナルを誘導して防御応答遺伝子群の発現を誘導していることが報告された (Nomura et al., 2012)。さらに、CASは防御応答の中心的シグナル分子であるサリチル酸 (SA) の生合成を制御する可能性が示唆されている (Nomura et al., 2012)。SA生合成は葉緑体内で行われるが、出発物質であるコリスミ酸をイソコリスミ酸に変換するICS1 (Isochorismate synthase 1) しか見つかっておらず、どのようにPAMPシグナルが葉緑体に伝達され、どのように葉緑体がSAの生合成経路を制御しているのか全くわかっていない。また、病害応答における葉緑体の機能として、種々の病原菌の侵入シグナルを受容するとジャスモン酸 (JA) 合成やSA合成、ROSの発生などをシグナルとして細胞内に出力し、多元的または複合的に免疫反応を誘導することがわかりつつある (Stael et al., 2015) (図1)。さらに、葉緑体のストロミュールが免疫応答により誘導され、ダイナミックに核と結合することが観察され、SAやH₂O₂のようなPro-PCD (Program Cell Death) シグナルもストロミュールを誘導することがわかった (Caplan et al., 2015)。これらの報告により、葉緑体と病害応答は密接な関係があると確信を得ていた。



虫害応答に関しては、最近北海道大学の田中らによってクロロフィルの代謝成分が虫害に対する抵抗性に強く寄与することが報告された (Hu et al., 2015)。このことは、葉緑体特異的な化合物が虫

図1. 植物の免疫システムについて

植物の免疫システムには、パターン誘導型免疫 (病原体分子パターンの認識で防御応答) とエフェクター誘導型免疫 (抵抗性(R)タンパク質で制御する防御応答) がある

害応答に関与していることを示している。さらに時を同じくして、クロロフィルの分解産物がある種の害虫に対する誘引性を保持しており、害虫の行動に大きな影響を及ぼしている可能性を発見した（安部ら未発表データ）。これは、田中らの結果と相反するが、やはり葉緑体由来の化合物が虫害応答において生理的な役割を持つことを示している。

2. 研究の目的

本研究では、葉緑体機能と病虫害応答の関係を明らかにすることを目的としている。葉緑体はエネルギー・ホルモン生産の場、酸化還元ホメオスタシス、プラスチドシグナルなどの役割を持つ。近年それらに加え、病原菌感染の免疫応答に関わる Ca^{2+} シグナル伝達や活性酸素種（ROS）発生の際として中心的な機能を持つことがわかってきた。また、クロロフィルの代謝産物が虫害抵抗性を示すこともわかってきた。そこで我々は、核ゲノムコードの葉緑体タンパク質の遺伝子破壊株から病虫害抵抗性に变化を示す系統をスクリーニングし、新規病虫害抵抗性因子を探索し、新しい葉緑体の病虫害応答システムを理解するための研究を行った。

3. 研究の方法

シロイヌナズナの葉緑体には、3500以上のタンパク質が存在していることが示されているが、機能が完全に解明されていないものも多く残されている。我々は葉緑体への局在が予測された2090の核ゲノムコードの葉緑体タンパク質の遺伝子破壊株をバイオリソースセンターより集め、約2000ラインの葉緑体タンパク質の遺伝子破壊株を整備した（Myouga et al., 2010）。これらのなかには、表現型が野生型と変わらず、また、一次配列情報からの機能類推もできないタンパク質が含まれる。本研究では、このバイオリソースを利用する。リソース自体はオープンになっており、誰にでも利用可能であるが、作成時のノウハウの蓄積があることから、栽培や維持等でアドバンテージを持って利用することが出来る。

このリソースを用いて、すでに葉緑体タンパク質遺伝子破壊系統（ホモ系統）をPTI (pattern-triggered immunity) 誘導物質であるフラジェリンタンパク質 flg22 を用いてスクリーニングを開始した。解析の当初は検定基準の設定に苦慮したが、以下の条件で培養することにより有意差を見出す手法を確立した。まず、葉緑体タンパク質遺伝子破壊系統と野生株を同条件（MS培地）で5日間培養後、1 μ M flg22 を各シャーレに2 ml 添加し、2週間後に植物体の生育を観察する。葉緑体タンパク質遺伝子破壊系統と野生型を2 ml SDW（滅菌蒸留水）処理した植物体と

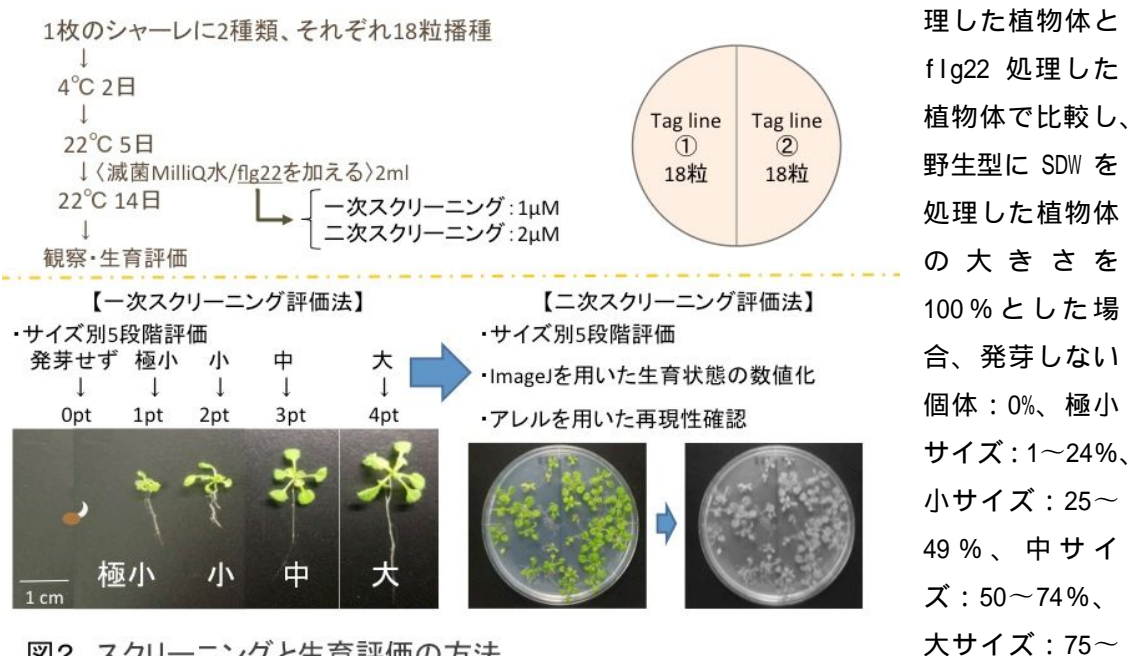


図2. スクリーニングと生育評価の方法

100%と5段階に分類する。この手法によって単離した解析候補株を、さらに2 μMもしくは4 μMのflg22処理により2次スクリーニングし、野生株と明らかに異なる株を単離した(図2)。

ハモグリバエやアザミウマは農薬抵抗性を高度に発達させた難防除害虫であり、世界的に深刻な問題となっている。安部らは、これまでにモデル植物を用いたこれらの虫害抵抗性に関する植物防御機構の解析から、JAが制御する植物防御がこれらの虫害抵抗性において中心的な役割を果たしていることを明らかにしてきた(Abe et al., 2011, 2012, 2013)。同時に、植物防御機構そのものが害虫の寄主特異性に深く関わっていることを世界に先駆けて報告した(Abe et al., 2013)。興味深いことに、上記の害虫種による加害を受けた植物体において増大する植物二次代謝成分には、葉緑体の代謝に関わる成分が含まれており、詳細な解析から、そのような成分を感受することで、ハモグリバエなどが誘引されることをこれまでに見いだしている(安部ら未発表データ)。

そこで、3週間栽培した葉緑体タンパク質の遺伝子破壊株と野生株をアクリルケースに入れ、ハモグリバエを処理し、その誘引性、産卵や食害の受けやすさを指標にしたスクリーニングを行った。各種アルビノ、パールグリーン変異体、老化に関係する変異体を材料として用いた。

4. 研究成果

フラジェリンのN末端にある22個のアミノ酸配列(flg22)を用いて、葉緑体タンパク質の遺伝子破壊株1284ラインのスクリーニングを行った。2次スクリーニングによって表現型の再現性が得られたラインは16ラインであった。表現型の再現性が得られた16のタグライン(葉緑体タンパク質の遺伝子破壊株)のアレルを探索し、アレルでの表現型の再現性の確認を行った結果、確認できたものは3ラインであった。3ラインの遺伝子発現をRT-PCRを用いて調べた結果、いずれも転写産物は検出されず、完全な遺伝子破壊株であった。flg22の感受性株としてDs.190とDs.210、非感受性株としてDs.73が得られた(図3と4)。

flg22感受性株として、Ds.190、Ds.210、非感受性株として、Ds.73の詳細な解析を試みた。発現解析の結果、flg22処理による病害関連遺伝子の発現が1時間程度で誘導されることが明らかになった。*FLS2*(flg22のレセプター)、*WRKY22/29*(シグナル伝達因子)、*ICS1*(サレチル酸合成)

【Ds.73: 非感受性株】 Pectin lyase-like superfamily protein

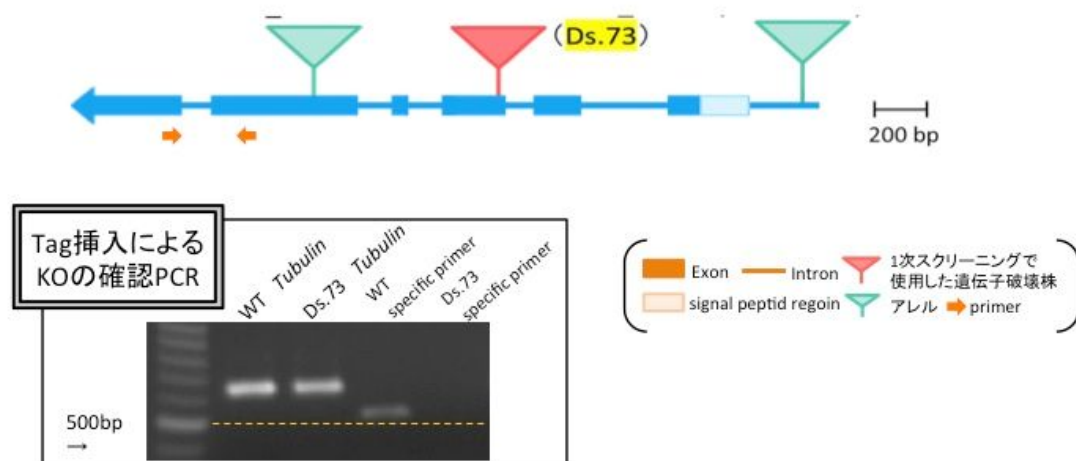
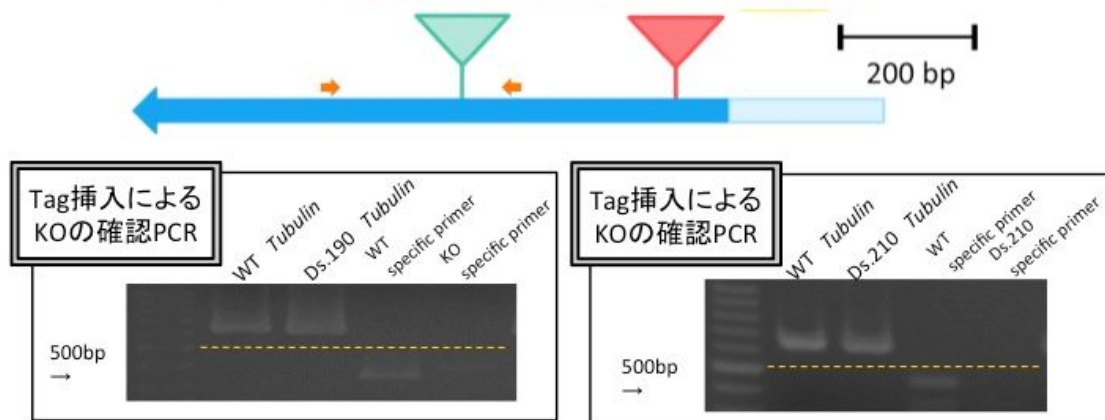


図3. Flg22のスクリーニングで得られたFlg22非感受性株の葉緑体タンパク質遺伝子

【Ds.190: 感受性株】 **LIGHT SENSITIVE HYPOCOTYLS 7**



【Ds.210: 感受性株】 **FMN-linked oxidoreductases superfamily protein**

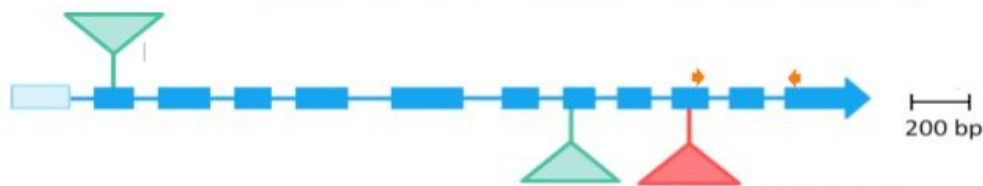


図4. Flg22のスクリーニングで得られたFlg22感受性株の葉緑体タンパク質遺伝子

LTP4 (防御応答)の発現を調べたが、このうち特に*FLS2*の発現量には野生株と非感受性株(Ds.73)で明らかな違いが見られた。これはDs.73の原因タンパク質がPectinlyase-like superfamily proteinであり、細胞壁又は細胞膜の構造に何らかの影響が生じ、細胞膜に存在するレセプターである*FLS2*の発現に影響が生じたと推察される。また、DAB染色の結果は、非感受性株であるDs.73では、ミリQ水処理区では野生型と同程度の染色、flg22処理区では野生株より染色は薄く、flg22処理時に活性酸素の発生量が少ないことから病害応答が弱い事が解った。一方、感受性株であるDs.190とDs.210では、ミリQ水処理区では野生型より染色は濃く、flg22処理区野生株と同程度であり、植物体中の活性酸素がもともと多いため病害に感受性が強いと考えられた。さらに、GFP蛍光による細胞内局在観察では、3つの原因タンパク質が葉緑体に局在することが解った。

葉緑体タンパク質と虫害応答の解明のために、4週間栽培したシロイヌナズナのロゼット葉を5X5mmの穴をあけたる紙で覆い、産卵場所を限定し、ハモグリバエ雌成虫を1匹放飼し、24時間自由に食害させ、野生型とハモグリバエの加害の程度比較した。老化に關与する*SAG2*, *SAG12*, *SEN1*, *SEN2*の遺伝子破壊株、虫に食われたような模様に見える斑入り変異体や黄緑変異体、*stay green* 変異体を調査した結果、*SAG12*, *SEN2*の遺伝子破壊株が特にハモグリバエの加害が少なく、*SAG2*と*SEN1*も加害が少なかった。*stay green* 変異体の加害は野生型と変わらず、斑入り変異体は野生型に比べて加害が多かった。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：安部 洋

ローマ字氏名：Hiroshi Abe

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。