

平成 31 年 4 月 18 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07407

研究課題名(和文) ジャスモン酸シグナル下流因子JUL1の分子機能の解明

研究課題名(英文) Characterization of JUL1, the regulatory factor of jasmonate signaling

研究代表者

有村 源一郎 (Arimura, Gen-ichiro)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・教授

研究者番号：60505329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ジャスモン酸シグナルにおける抑制型制御因子JAV1と分子間相互作用するJAV1ユビキチンリガーゼ(JUL1)を同定した。植物内で一過的にJUL1およびJAV1を共発現させた結果、JUL1はJAV1と相互作用し、JAV1のユビキチン化分解を促した。JUL1過剰発現株および変異株ではJAV1の分解が促進もしくは抑制されることで、広食性害虫であるハスモンヨトウ幼虫に対する抵抗性が野生株と比べて促進もしくは抑制された。これらの個体の成長や生殖において異常は認められなかったことから、JUL1は防御応答に特化した制御因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ジャスモン酸を介した植物の食害応答メカニズムの理解が飛躍的に深まったと言える。中でも、JAV1・JUL1システムはジャスモン酸シグナル伝達系の第二ステージにおける制御因子として役割を担うことから、本研究におけるJUL1の同定は当該領域において革新的な成果となった。世界的な人口増加や環境問題による作物生産力の低下を考慮すると、これまで以上に多様な組換え植物等の利用が必要となる。JUL1制御因子の過剰発現株は、これらの問題を解決するためのバイオ産業資源として期待される。本研究は、そのための学術基盤を構築するシーズとなった。

研究成果の概要(英文)：Jasmonates regulate plant defense and development. In Arabidopsis, JAV1 is a repressor of jasmonate-mediated defense responses and is degraded through the ubiquitin-26S proteasome system after herbivory. We found that JAV1-ASSOCIATED UBIQUITIN LIGASE 1 (JUL1), a RING-type E3 ubiquitin ligase, interacted with JAV1. JUL1 interacted with JAV1 in the nucleus to ubiquitinate JAV1, leading to proteasomal degradation of JAV1. Gain or loss of function of JUL1 modulated the expression levels of the defensin gene PDF1.2 in leaves, conferring on the plants various defense properties against the generalist herbivore *S. litura*. Because neither the JUL1 mutant nor over-expression lines showed any obvious developmental defects, we concluded that the JAV1/JUL1 system functions as a specific coordinator of reprogramming of plant defense responses.

研究分野：分子生態学

キーワード：シロイヌナズナ ジャスモン酸 ユビキチンリガーゼ ハスモンヨトウ

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、食の安全や環境保全に対する関心が消費者の間で非常に高まっており、環境への負担を最小限に抑えながら高い生産性と高品質を維持する減農薬型作物生産体制の確立が求められている。有機的かつ高品質で、環境に優しい害虫防除技術の開発を推し進めるためには、これまで以上に植物の防御メカニズムを理解し、活用していくことが不可欠である。その中で注目されているのが、食害応答において中心的な役割を担う JA シグナル伝達系である。食害によって生じる物理的傷害は JA 生産を誘導し、JAZ リプレッサータンパク質をユビキチン分解する制御システムが知られている。JAV1 (jasmonate-associated VQ-motif gene 1) はこれらのシグナル伝達系のさらに下流で機能するリプレッサータンパク質であり、JAZ と同様に、転写因子などに結合することで JA 誘導性遺伝子の発現を抑制する (Hu et al. 2013)。JA シグナル伝達系が活性化されると、JAV1 はユビキチン分解され、防御遺伝子が活性化されるが、JAV1 は JAZ と異なり、植物の成長には影響を及ぼさないモデルが提唱されている。しかし、JAV1 のユビキチン分解に関わる E3 ユビキチンリガーゼは同定されていなかった。

### 2. 研究の目的

ジャスモン酸シグナル伝達系における分子制御システムを理解するため、シロイヌナズナ・E3 ユビキチンリガーゼライブラリー (210 遺伝子クローン) から無細胞タンパク質合成システムを用いてタンパク質合成し、JAV1 と分子間相互作用能の高いタンパク質 (at5g10650: JAV1-associated ubiquitin ligase 1 [JUL1]) を同定した。本研究課題では、JUL1 の JAV1 を基質ターゲットした活性および相互作用、シロイヌナズナ JUL1 変異株および過剰発現株の表現型、JUL1 遺伝子の発現制御機構を明らかにすることで、JAV1/JUL1 システムの植物の防御応答を中心とした分子機能を紐解くことを目的とした (Ali et al. 2019)。

### 3. 研究の方法

#### (1) JAV1 基質ターゲットとした JUL1 のユビキチン分解活性および相互作用

コムギ無細胞タンパク質合成システムを用いて合成した JUL1 タンパク質を用いて、JAV1 のユビキチン化アッセイを実施した。さらに、シロイヌナズナ葉細胞由来のプロトプラストを用いて bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析を施し、JAV1 と JUL1 の相互作用について評価した。また、プロトプラスト内で JAV1 と JUL1 を共発現させることで、JUL1 による JAV1 のユビキチン分解能を評価した。

#### (2) 過剰発現株および変異株の表現型解析

JAV1 および JUL1 の T-DNA 挿入変異株 (*jav1*, *jul1*)、CaMV 35S プロモーター制御下で恒常的に JUL1 を発現させた過剰発現株 (JUL1-OX1、JUL1-OX2) における防御遺伝子 (*PDF1.2*) 等の発現、ハスモンヨトウ幼虫に対する抵抗性、成長率、種子生産量を評価した。

#### (3) 遺伝子発現解析

シロイヌナズナ葉における遺伝子発現量はリアルタイム PCR 解析システムを用いて定量分析した。

### 4. 研究成果

#### (1) JAV1 基質ターゲットとした JUL1 のユビキチン分解活性および相互作用

無細胞タンパク質合成システムにより合成された JAV1 と JUL1 タンパク質を用いた免疫共沈降解析によって、JUL1 には JAV1 を特異的にユビキチン分解する活性があることが示唆された (Ali et al. 2019)。さらに、シロイヌナズナ葉細胞からプロトプラストを作成し BiFC 法によって JAV1 と JUL1 タンパク質の細胞内における相互作用を見出した (図 1)。この相互作用は、proteasome inhibitor である MG132 を投与した際に強く生じたことから、JUL1 は JAV1 と結合することで JAV1 のユビキチン分解を引き起こす可能性が示唆された。この仮説は、シロイヌナズナ野生株および JUL1 を過剰発現させた組換え株 (図 3 参照) からプロトプラストを作成し、一過的に JAV1 を過剰発現させた際、過剰発現株では MG132 を投与していない場合に野生株と比べ、JAV1 タンパク質量が低下した結果と合致した (図 2)。

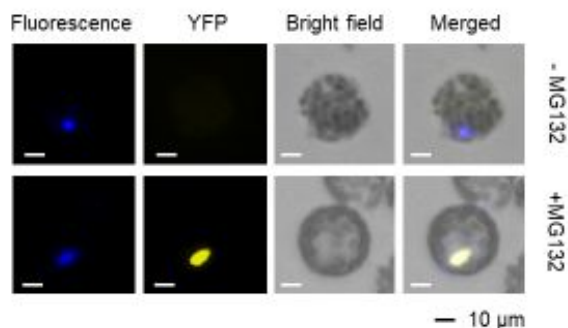


図 1 BiFC 法を用いた JAV1 と JUL1 タンパク質の相互作用解析

JUL1 の下流に YFP の N 末端と融合させたキメラ遺伝子と JAV1 の下流に YFP の C 末端と融合させたキメラ遺伝子をシロイヌナズナ野生株由来のプロトプラストに共発現させた。MG132 を投与したプロトプラスト (+MG132) と投与していないプロトプラスト (-MG132) を用いて解析した。

## (2) 過剰発現株および変異株の表現型

*jul1*、*jav1* 変異株および *JUL1* 過剰発現株は、非ストレス条件下で生育された場合、植物体の成長や種子生産量に欠損は認められなかった。また、ジャスモン酸メチルを処理した場合の根の成長抑制も野生株同様に引き起こされたことから、ジャスモン酸感受性に欠損もないものと考えられる(図 3A)。一方で、*JUL1* 過剰発現株と *JAV1* 変異体は防御遺伝子である *PDF1.2* の発現量が非ストレス下でも亢進されており、ハスモンヨトウ幼虫食害に対する抵抗性も向上していた。逆に、*jul1* 変異体はハスモンヨトウ幼虫食害に対する抵抗性は野生株と比べ、低下していた(図 3B,C)。

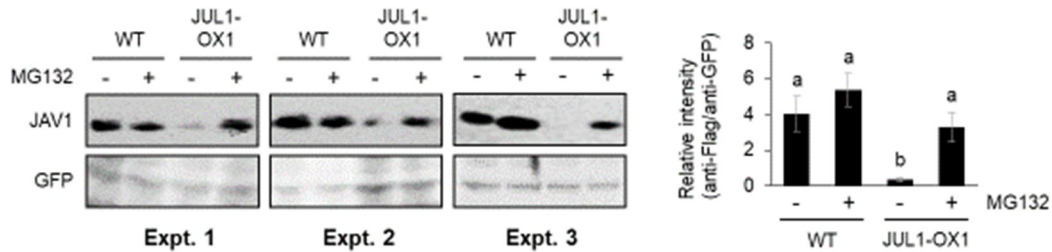


図2 JUL1 による JAV1 分解活性

シロイヌナズナ野生株 (WT) および *JUL1* 過剰発現株 (*JUL1*-OX1) 由来のプロトプラストに *JAV1* を一過的に発現させた際の *JAV1* タンパク質量を定量分析した。その際、MG132 を投与したプロトプラストと投与していないプロトプラスト (-MG132) を用いて解析した。実験は 3 回実施され、その平均値および標準誤差を右のグラフに示す。異なるアルファベットは有意に異なることを示す ( $P < 0.05$ , one-way ANOVA with post-hoc Tukey's HSD)

## (3) *JUL1* 遺伝子の発現制御

*JAV1* と *JUL1* 遺伝子は共に、ジャスモン酸メチルを施したシロイヌナズナ葉において発現応答を示した。ジャスモン酸非感受性株で *coil-1* では、ジャスモン酸メチルに対する発現応答は野生株と比べて弱かったことから、それぞれ制御抑制因子と促進因子である *JAV1* と *JUL1* の発現は共にジャスモン酸シグナルによって亢進されることで、ジャスモン酸シグナルの均衡を保つ役割を担うことが考察された。

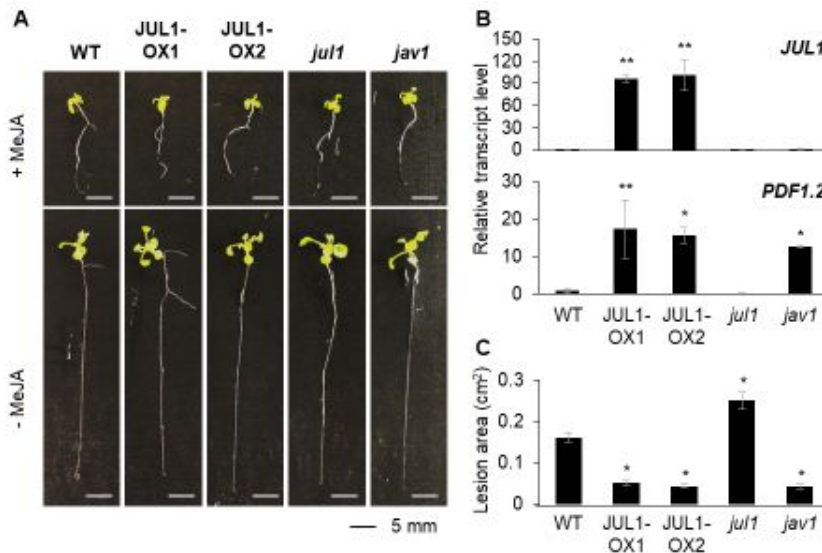


図3 過剰発現株および変異株の表現型

(A) シロイヌナズナ野生株 (WT) および *JUL1* 過剰発現株 (*JUL1*-OX1、*JUL1*-OX2)、*jul1*、*jav1* 変異株の実生にジャスモン酸メチル (MeJA) 処理を施し、2週間後の根の成長を観察した(-MeJA: MeJA 処理無; +MeJA: MeJA 処理有)。また、ロゼット葉における *JUL1* 遺伝子、*PDF1.2* 遺伝子の発現量 (B)、ハスモンヨトウ幼虫 (3 令) に曝された葉における被食量 (C) を評価した。\*\*,  $0.001 \leq P < 0.01$ ; \*,  $0.01 \leq P < 0.05$  (one-way ANOVA with Holm's sequential Bonferroni post-hoc test)

## < 引用文献 >

Hu P, Zhou W, Cheng Z, Fan M, Wang L, Xie D, *JAV1* controls jasmonate-regulated plant defense,

Molecular Cell、50 卷、2013、504-515

Ali M.R.M., Uemura T., Ramadan A., Adachi K., Nemoto K., Nozawa A., Hoshino R., Abe H., Sawasaki T., Arimura G., The ring-type E3 ubiquitin ligase JUL1 targets the VQ-motif protein JAV1 to coordinate jasmonate signaling、Plant Physiology、179 卷、2019、1273-1284

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 20 件)

Iida J., Desaki Y., Hata K., Uemura T., Yasuno A., Islam M., Maffei M.E., Ozawa R., Nakajima T., Galis I., Arimura G., Tetransins: new putative spider mite elicitors of host plant defense、New Phytologist、査読有、出版中

Rim H., Sekiguchi S., Ozawa R., Kainoh Y., Arimura G., Diurnal rhythm of volatile emissions from damaged *Brachypodium distachyon* affects the temporal preferences of tritrophic interactions. Journal of Plant Interactions、査読有、143 卷、2019、143-150

Sukegawa S., Arimura G., Two arrays of defense strategies of Brassicaceae plants that eavesdrop on mint volatiles、Journal of Plant Interactions、査読有、143 卷、2019、164-166

Ali M.R.M., Uemura T., Ramadan A., Adachi K., Nemoto K., Nozawa A., Hoshino R., Abe H., Sawasaki T., Arimura G., The ring-type E3 ubiquitin ligase JUL1 targets the VQ-motif protein JAV1 to coordinate jasmonate signaling、Plant Physiology、査読有、179 卷、2019、1273-1284

有村源一郎、ミントをコンパニオンプランツとして害虫防除に応用、Aroma Research、査読無、出版中

有村源一郎、上村卓矢、八代拓也、植物アロマ成分を用いた有機栽培システムの開発とヒト健康増進効果への応用、化学と生物、査読有、出版中

有村源一郎、植物の匂い物質を利用した病虫害防除技術、バイオサイエンスとインダストリー、査読無、出版中

Togashi K., Goto M., Rim H., Hattori S., Ozawa R., Arimura G., Mint companion plants attract the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*、Scientific Reports、査読有、9 卷、2019、1704

Hamachi A., Nishihara M., Saito S., Rim H., Takahashi H., Islam M., Uemura T., Ohnishi T., Ozawa R., Maffei M.E., Arimura G., Overexpression of geraniol synthase induces heat stress susceptibility in *Nicotiana tabacum*、Planta、査読有、249 卷、2019、235-249

有村源一郎 (2019) 植物の匂いが織りなす生き物の相互作用、青淵、査読無、4 卷、2019、12-14

有村源一郎、生態系コミュニケーションを介した植物の防御応答、アグリバイオ、査読無、3 卷、2019、360-364

有村源一郎、植物から放出される香りの機能と害虫防除への活用、Green Age、査読無、2 卷、2019、4-6

Sukegawa S., Shiojiri K., Higami T., Suzuki S., Arimura G., Pest management using mint volatiles to elicit resistance in soy: mechanism and application potential、Plant Journal、査読有、96 卷、2018、910-920

Nakayasu M., Shioya N., Shikata M., Thagun C., Abdelkareem A., Okabe Y., Ariizumi, T., Arimura G., Mizutani M., Ezura H., Hashimoto T., Shoji T., JRE4 is a master transcriptional regulator of defense-related steroidal glycoalkaloids in tomato、Plant Journal、査読有、94 卷、2018、975-990

Uemura T., Yashiro T., Oda R., Shioya N., Nakajima T., Hachisu M., Kobayashi S., Nishiyama C., Arimura G., Intestinal anti-inflammatory activity of perillaldehyde、Journal of Agricultural and Food Chemistry、査読有、66 卷、2018、3443-3448

上村卓矢、有村源一郎、シソの香り成分「ペリラルデヒド」の腸炎緩和機能、Aroma Research、査読無、19 卷、2018、221-222

Nemoto K., Ramadan A., Arimura G., Imai K., Tomii K., Shinozaki K., Sawasaki T., Tyrosine phosphorylation of the GARU E3 ubiquitin ligase promotes gibberellin signalling by preventing GID1 degradation、Nature Communications、査読有、8 卷、2017、1004

Ozawa R., Endo H., Iijima M., Sugimoto K., Takabayashi T., Gotoh T., Arimura G., Intraspecific variation among Tetranychid mites for ability to detoxify and to induce plant defenses、Scientific Reports、査読有、7 卷、2017、43200

Yazaki K., Arimura G., Ohnishi T., “Hidden” terpenoids in plants: their biosynthesis, localization and ecological roles、査読有、Plant and Cell Physiology、査読有、58 卷、2017、1615-1621

有村源一郎、林鎬俊、助川聖、植物の香り生態系ネットワーク、香料、査読無、272 卷、2016、37-43

### 〔学会発表〕(計 5 件)

有村源一郎、香氣成分を介した植物間コミュニケーション、理研シンポジウム「植物の代謝制御と化学生物学の新展開」、2018 年 12 月 20 日(横浜市)

有村源一郎、植物の食害応答と揮発性化合物を介した生物間相互作用、第 36 回日本植物細胞分子生物学会大会、2018 年 8 月 26-28 日(金沢市)

有村源一郎、植物のコミュニケーションは、他生物と会話するツールである、第 54 回植物化学シンポジウム、2017 年 11 月 10 日（東京）

有村源一郎、植物虫害応答の初期シグナル伝達機構、第 5 回植物二次代謝フロンティア研究会、2016 年 11 月 5-6 日（山口市）

Ali M.R.M., Ramadan A., Adachi K., Nemoto K., Sawasaki T., Arimura G., Isolation and characterization of Arabidopsis JUL1 E3 ubiquitin ligase interacting with JAV1 negative regulator in jasmonate signaling pathway、東京理科大学アグリ・バイオ公開シンポジウム、2016 年 7 月 28 日（東京）

〔図書〕(計 5 件)

有村源一郎、杉山暁史、基礎から学ぶ植物代謝生化学、15 章 生物間相互作用、水谷正治、土反伸和、杉山暁史(編) 羊土社、2018、261-269

有村源一郎、西原昌宏、植物のたくらみ — 香りと色の植物学、ペレ出版、2018、159

Arimura G., Pearse I., From the lab bench to the forest: ecology and defence mechanisms of volatile-mediated “talking trees”. In Advances in Botanical Research vol. 82. How Plants Communicate with their Biotic Environment, ed. Becard, G., Elsevier, 2017、3-17

Arimura G., Maffei M.E., Introduction to plant specialized metabolism. In Plant Specialized Metabolism: Genomics, Biochemistry, and Biological Functions, eds. Arimura G., Maffei M.E., CRC Press, 2016、1-7

Arimura G., Matsui K., Koeduka T., Holopainen J.K., Biosynthesis and regulation of plant volatiles, and their functional roles in ecosystem interactions and global environmental changes. I In Plant Specialized Metabolism: Genomics, Biochemistry, and Biological Functions, eds. Arimura G., Maffei M.E., CRC Press, 2016、185-237

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ペパーミントから放出される香気成分を活用したアブラナ科野菜の害虫防除技術

発明者：有村源一郎、助川聖、鈴木駿平、樋上智大

権利者：東京理科大学

種類：通常出願

番号：2017-214231

出願年：2017

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.rs.tus.ac.jp/garimura/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

該当無

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：澤先達也

ローマ字氏名：(SAWASAKI, tatsuya)

研究協力者氏名：根本圭一郎

ローマ字氏名：(Nemoto, keiichirou)

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。