

令和元年6月7日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17802

研究課題名(和文) 気孔の開閉をめぐる植物-病原菌共進化の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Pathogen pressure and evolutionary trade-off in the regulation of plant stomatal aperture

研究代表者

峯 彰(Mine, Akira)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：80793819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：気孔は光合成に必要なガス交換を担う植物の生育に必須の器官であると同時に、病原菌の侵入経路でもある。植物は病原菌を認識して気孔を閉じる免疫機構を持つが、病原菌の中には気孔を再開口させるものが存在する。病原菌が気孔を開く仕組みに関しては、未解明の部分が多く残されていた。本研究において、トマト斑葉細菌病菌が産生する植物毒素コロナチンが、植物の遺伝子を利用して気孔を開くことを突き止めた。この知見をもとに、ゲノム編集技術を用いて、コロナチン標的遺伝子をコロナチンに利用されないように改変することに成功した。さらに、コロナチン標的遺伝子は本来明け方の速やかな気孔開口と光合成の開始に必要なであることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原菌による農作物の減収は、現代農業が抱える最重要課題の一つであり、より効果的・効率的な病害防除技術の開発が求められている。病原細菌は、自然開口部である気孔から植物体内に侵入し病気を引き起こす。本研究において、トマト斑葉細菌病菌が気孔を開くために利用する植物の遺伝子を突き止めた。さらに、ゲノム編集技術を用いて、この遺伝子をトマト斑葉細菌病菌に利用されない形へと改変することに成功した。本成果は、病原細菌の気孔侵入を阻止する新たな病害防除技術の開発へ向けた基盤になると考えている。

研究成果の概要(英文)：Stomata are microscopic pores surrounded by a pair of guard cells and control gas exchange required for photosynthesis. As natural openings, stomata serve as a gate for microbial entry into nutrient-rich leaf interior space called the apoplast. Plants actively close stomata to restrict microbial entry. However, some pathogens reopen closed stomata to gain access into the apoplast and cause disease. Our understanding of how pathogens induce stomatal opening was fragmented. In this research project, we found that the phytotoxin coronatine produced by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* exploits a plant gene to induce stomatal opening. Based on this new finding, we employed genome editing technologies to modify the coronatine target gene so that it will be no longer exploited by coronatine. We also found that the coronatine target gene is required for plants to rapidly open stomata to facilitate photosynthesis in the morning.

研究分野：植物病理学

キーワード：気孔 コロナチン ジャスモン酸 病原細菌 共進化

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

## 1. 研究開始当初の背景

気孔は2つの孔辺細胞に囲まれた自然開口部であり、呼吸、蒸散および光合成に必要なガス交換を担う器官である。それ故に、気孔開閉の調節は植物の生育において中心的な役割を担う。シロイヌナズナの場合、光に応答した気孔開口が速くなると生育が促進されることが分かっている (Wang *et al.*, 2014, PNAS)。一方、気孔は微生物が植物体内へ侵入するための主な経路にもなっている。植物は微生物に特有の分子を認識して気孔を閉じる免疫機構を持つが、病原菌の中には、この免疫機構を乗り越えるものが存在する。*Pseudomonas syringae* は、世界で最も重要な植物病原細菌のひとつとして知られる (Manfield *et al.*, 2012, Mol Plant Pathol)。この細菌が産生する植物毒素コロナチンは、植物ホルモンの一種であるジャスモン酸 (JA) の構造類似体であり、JA シグナリングを活性化することで気孔を開けることが知られていた (Melloto *et al.*, 2006, Cell)。しかしながら、コロナチンによる JA シグナリングの活性化が気孔開口を誘導する仕組みの全容解明には至っていなかった。気孔の開口が *P. syringae* による病原性発現の最初のステップであることを考えると、その分子機構の解明は *P. syringae* の効率的な防除技術の開発への基盤情報にもなる。さらに、コロナチンが気孔開口に利用するシグナル伝達経路の全容が明らかになれば、このシグナル伝達経路の植物における本来の役割を調べることも可能になると考えた。また、研究代表者の予備的な研究から、シロイヌナズナはコロナチンによる気孔開口に感受性を示すのに対して、いくつかの近縁種では非感受性を示すことを発見していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) コロナチンによる気孔開口を担うシグナル伝達経路の全容解明、(2) シロイヌナズナ近縁種が示すコロナチン非感受性の分子機構の解明、および、(3) コロナチンが転用するシグナル伝達経路の植物における本来の役割の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) コロナチンによる気孔開口を担うシグナル伝達経路の全容解明

*P. syringae* を接種したシロイヌナズナにおける遺伝子発現解析から、コロナチンによる気孔開口に関与する可能性があるシロイヌナズナの遺伝子を絞り込んだ。これらの遺伝子を欠損したシロイヌナズナ変異体において、*P. syringae* あるいはコロナチンによる気孔開口の有無を調べた。シロイヌナズナ変異体を用いた遺伝子発現解析や DNA-タンパク質結合解析 (クロマチン免疫沈降) などの分子遺伝学的手法を用いて、コロナチンによる気孔開口に必要なことが明らかになった遺伝子の機能を詳細に調べた。また、部位特異的 DNA 切断酵素 (TALEN と Cpf1) 利用したゲノム編集により、コロナチンが気孔開口に利用していることが明らかになった遺伝子のプロモーター配列を、コロナチンに利用されないように改変することを試みた。

### (2) シロイヌナズナ近縁種が示すコロナチン非感受性の分子機構の解明

コロナチンが利用する遺伝子のプロモーター領域を抽出し、シロイヌナズナとその近縁種の間で比較解析を行った。塩基配列の違いだけでなく、塩基の修飾 (DNA のメチル化) の違いを調べるため、bisulfite sequencing を行った。また、シロイヌナズナ近縁種由来のプロモーターの制御下でコロナチンが利用する遺伝子を発現するシロイヌナズナを作成し、その気孔のコロナチンあるいは *P. syringae* に対する応答性を調べた。

### (3) コロナチンが転用するシグナル伝達経路の植物における本来の役割の解明

JA シグナリングの活性が朝方に高くなること (Shin *et al.*, 2012, Plant Cell) に着目し、植物培養器にライトが点灯する前から点灯後数時間にかけて、コロナチンによる気孔開口に必要な遺伝子を欠損したシロイヌナズナおよびシロイヌナズナ近縁種の気孔開度を調べた。同様の実験条件で光合成活性を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) コロナチンによる気孔開口を担うシグナル伝達経路の全容解明

シロイヌナズナ変異体を用いた解析から、コロナチンが気孔開口を誘導するのに必要な遺伝子 (コロナチン標的遺伝子) と、その発現を制御する転写因子を同定した。クロマチン免疫沈降法により、この転写因子が、コロナチン標的遺伝子のプロモーター上の特定の配列に結合することを示した。コロナチンによる気孔開口に対する感受性を人為的に取り除く試みとして、コロナチン標的遺伝子のプロモーターに存在するこの転写因子の結合部位の改変を試みた。定期的な高温処理など様々な工夫を凝らすことで、TALEN による変異導入個体を得たが、残念ながら次世代への変異の遺伝が確認できなかった。一方、Cpf1 を用いた場合、標的配列への導入変異が遺伝する個体を得られた。

### (2) シロイヌナズナ近縁種が示すコロナチン非感受性の分子機構の解明

シロイヌナズナとその近縁種のコロナチン標的遺伝子のプロモーター配列は比較的良く保存されていたことから、配列ではなくエピジェネティック修飾の差異がコロナチンに対する応答性の違いを生み出しているのではないかと考えた。コロナチン標的遺伝子のプロモーター上の DNA メチル化の違いを bisulfite sequencing 法で調べたところ、応答性の違いを説明できる差は

見つからなかった。一方、コロナチン標的遺伝子のプロモーター置換実験から、シロイヌナズナとその近縁種におけるわずかな DNA 配列の違いが、コロナチンに対する応答性を説明する可能性が示唆された。

### (3) コロナチンが転用するシグナル伝達経路の植物における本来の役割の解明

シロイヌナズナにおいて、コロナチンが転用するシグナル伝達経路は本来、明け方の速やかな気孔開口に必要であることを見出した。さらに、この明け方の速やかな気孔開口は、光合成の促進に必要であることも明らかにした。興味深いことに、コロナチンによる気孔開口に対して感受性を示すシロイヌナズナ近縁種は、明け方の速やかな気孔開口を示したのに対して、抵抗性を示す近縁種は、明け方の気孔開口に遅延を示すことが分かった。また、コロナチン非感受性を示すシロイヌナズナ近縁種は、*P. sryingae* による気孔からの感染を抑えられることを明らかにした。おそらく、コロナチンが転用するシグナル伝達経路は、光合成を促進する明け方の速やかな気孔開口に必要であるが故に、病原体に利用されているにも関わらず、シロイヌナズナを含むいくつかの植物種で依然として機能しているのであろう。一方で、いくつかのシロイヌナズナ近縁種は、*P. sryingae* に対する抵抗性へと繋がるコロナチン非感受性を獲得したが、明け方の速やかな気孔開口を誘導することができなくなったと考えられる。すなわち、コロナチンによる気孔開口に対する非感受性の獲得と明け方の速やかな気孔開口の間で進化的なトレードオフが起こっていることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計6件)

1. Berens ML, Wolinska KW, Spaepen S, Ziegler J, Nobori T, Nair A, Krueger V, Winkelmueller TM, Wang Y, Mine A, Becker D, Garrido-Oter R, Schulze-Lefert P, Tsuda K. Balancing trade-offs between biotic and abiotic stress responses through leaf age-dependent variation in stress hormone cross-talk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(6) 2364-2373 (2019) doi: 10.1073/pnas.1817233116 査読有
2. 峯彰. 植物と病原体のせめぎ合いの分子ネットワーク. 植物感染生理談話会論文集 53 57-67 (2018) ISSN 1345-8086 査読無
3. Mine A, Seyfferth C, Kracher B, Berens ML, Becker D and Tsuda K. The Defense Phytohormone Signaling Network Enables Rapid, High-amplitude Transcriptional Reprogramming During Effector-Triggered Immunity. *The Plant Cell*. 30(6) 1199-1219 (2018) doi: 10.1105/tpc.17.00970 査読有
4. Nobori T, Mine A, Tsuda K. Molecular networks in plant-pathogen holobiont. *FEBS Lett*. 592(12) 1937-1953 (2018) doi: 10.1002/1873-3468.13071. 査読有
5. Jacob F, Kracher B, Mine A, Seyfferth C, Blanvillain-Baufumé S, Parker JE, Tsuda K, Schulze-Lefert P, Maekawa T. A dominant-interfering *camta3* mutation compromises primary transcriptional outputs mediated by both cell surface and intracellular immune receptors in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*. 217(4) 1667-1680 (2018) doi: 10.1111/nph.14943. 査読有
6. Mine A, Berens ML, Nobori T, Anver S, Fukumoto K, Winkelmueller TM, Takeda A, Becker D, Tsuda K. Pathogen exploitation of an abscisic acid- and jasmonate-inducible MAPK phosphatase and its interception by *Arabidopsis* immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(28) 7456-7461 (2017) doi: 10.1073/pnas.1702613114. 査読有

### [学会発表](計7件)

1. 峯彰, 松本歩, 下川心平, 竹田篤史. 生物発光によるグラム陰性細菌の増殖定量を可能にする汎用性プラスミドベクター. 平成 31 年度日本植物病理学会大会. 2019 年
2. 峯彰. ネットワーキングから生み出される植物免疫ホルモンの多様な機能. 京大植物病理特別セミナー. 2018 年
3. 峯彰. 植物と病原体のせめぎ合いの分子ネットワーク. 平成 30 年度植物感染生理談話会. 2018 年
4. Akira Mine, Kaori Fukumoto, Ryohei Thomas Nakano, Kenichi Tsuda. Pathogen pressure and evolutionary trade-off in the regulation of plant stomatal aperture. 第 59 回日本植物生理学会年会. 2018 年.

5. Matthias L. Berens, Akira Mine, Kenichi Tsuda. Balancing trade-offs between biotic and abiotic stresses through leaf age-dependent variation in stress hormone crosstalk. 第59回日本植物生理学会年会. 2018年.
6. 峯彰, 福元 華織, 中野亮平, 津田賢一. 気孔開閉の制御に対する病原体の選択圧と進化的トレードオフ. 平成30年度日本植物病理学会大会. 2018年
7. 峯彰. 植物-病原体相互作用のシステム生物学. 滋賀植物病理懇話会. 2018年

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/7000020465/>