

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05647

研究課題名(和文) 酸化マグネシウムによって萎ちょう病感受性トマトに誘導される萎ちょう病抵抗性

研究課題名(英文) Fusarium wilt resistance induced by magnesium oxide in Fusarium wilt-susceptible tomato plants

研究代表者

伊藤 真一 (Ito, Shin-ichi)

山口大学・大学院創成科学研究科 ・教授

研究者番号：30243629

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)：萎ちょう病感受性トマトの根を酸化マグネシウム(MgO)で処理すると、強力な萎ちょう病抵抗性が誘導される。本研究では、MgOが誘導するトマト萎ちょう病抵抗性のメカニズム解明を目指した。研究の結果、MgO誘導萎ちょう病抵抗性には、ジャスモン酸シグナル伝達経路が必須であり、DAMP-triggered immunity(DTI)とPAMP-triggered immunity(PTI)の両方の関与が示唆された。また、トマトの根の細胞壁に蓄積するグリシンリッチタンパク質の関与が示唆された。抵抗性は果実収穫まで維持されたことから、MgOによる抵抗性誘導は萎ちょう病防除の実用技術として期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1. 学術的意義：本研究により以下のことが初めて明らかになった。萎ちょう病感受性トマトが萎ちょう病抵抗性になるメカニズム。萎ちょう病感受性トマトに萎ちょう病抵抗性を誘導する方法。MgO処理によるトマトの遺伝子発現パターン再構成と、病原菌感染に対する迅速応答。MgOによるトマトの複数の植物ホルモンシグナル伝達経路の活性化。
2. 社会的意義：本研究によって、安価で安全な天然素材であるMgOがトマト萎ちょう病の防除に利用できることが明らかになった。トマト萎ちょう病を含むFusarium萎ちょう病防除技術の確立は世界的な課題であることから、本研究成果の社会的意義はきわめて大きい。

研究成果の概要(英文)：Treatment of roots of Fusarium wilt-susceptible tomato plants with magnesium oxide (MgO) containing nanoparticles induces strong Fusarium wilt-resistance in the plants. The aim of this study was to elucidate the mechanism of the Fusarium wilt-resistance induced by MgO in tomato plants. The study suggested that the jasmonic acid signaling pathway is essential for the establishment of the MgO-induced resistance against Fusarium wilt in tomato. In addition, it was suggested that both DAMP-triggered immunity (DTI) and PAMP-triggered immunity (PTI) are involved in the resistance. Since the resistance was maintained until fruit harvest, MgO treatment of tomato seedlings is expected to be a practical technology for the control of Fusarium wilt of tomato.

研究分野：植物病理学

キーワード：Fusarium oxysporum トマト萎ちょう病 誘導抵抗性 植物免疫 酸化マグネシウム ナノ粒子 ジャスモン酸

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

非生物ストレス(物理・化学ストレス)は、植物に病害抵抗性を誘導することが知られている。しかしながら、その誘導メカニズムについては、イネやシロイヌナズナなど一部の植物を除いて、ほとんど明らかになっていない。著者は、トマト萎ちょう病感受性のトマトに仮焼酸化マグネシウム(MgO)懸濁液を灌注すると、トマト萎ちょう病菌(FOL)に対してきわめて強い抵抗性が誘導されることを見いだした。本実験系は、明瞭な結果と高い再現性を示すことから、非生物ストレスによるトマト萎ちょう病抵抗性誘導メカニズムの解析に適していると思われた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「MgOによってトマト萎ちょう病感受性品種に誘導される萎ちょう病抵抗性」がどのようなメカニズムによって成立するのかを解明することである。具体的には、MgO処理した萎ちょう病感受性トマトの苗にFOLを接種し、トマトおよびFOLの双方に生じる変化を、RNAシーケンシングおよび顕微鏡観察によって解析し、「萎ちょう病感受性トマトの感染防御システム」に関する知見を得る。また、「MgOによる萎ちょう病抵抗性誘導の実用化」につながる知見を得る。

3. 研究の方法

(1) トマト植物体内におけるFOLの動態: 植物体内におけるFOL細胞数をPCRによって定量する方法を確立し、この方法を用いてトマト植物体内におけるFOLの増殖を調べた。また、FOL再分離試験および顕微鏡による組織学的解析を行い、トマト植物体内におけるFOLの増殖をモニタリングした。

(2) 植物ホルモンの関与: サリチル酸、ジャスモン酸(JA)およびエチレンシグナル伝達経路のトマト突然変異体をMgOで処理した後、FOLを接種して萎ちょう病抵抗性誘導の有無を調べた。MgOによる萎ちょう病抵抗性誘導に関与していることが示唆されたJAシグナル伝達経路については、関連する遺伝子の定量的RT-PCR解析を行った。

(3) RNAシーケンシング: MgO処理1時間後にトマト根で発現しているmRNAのRNAシーケンシングを行った。また、MgO処理トマトおよび非処理トマト植物体にFOLを接種し、接種1時間後および3週間後のトマト根で発現しているmRNAのRNAシーケンシングを行った。発現が変動するトマト遺伝子群(DEG)を抽出した後、DEGのGO解析およびKEGG解析を行った。

(4) 抵抗性誘導のマーカー: MgO処理したトマト植物体にFOLを接種した際に迅速かつ顕著に発現が誘導されたトマト遺伝子を探索し、抵抗性誘導のマーカーとなる遺伝子を選抜した。それらのうちグリシンリッチタンパク質(GRR)遺伝子については、タンパク質の予想エピーペプチドを合成し、抗GRR抗体を作製した。抗GRR抗体を用いて免疫ブロッティングおよび免疫組織染色を行い、GRRの蓄積部位を調べた。

(5) 抵抗性誘導の実用化: MgOが誘導するトマト萎ちょう病抵抗性の持続時間、およびトマト品種間における誘導抵抗性の差異を調べた。また、トマト萎ちょう病抵抗性を誘導したトマトの果実から回収した種子を用いて次世代植物体を生育し、萎ちょう病抵抗性の世代間継承の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) MgO処理したトマト植物体内におけるトマト萎ちょう病菌(FOL)の動態

MgO 非処理区では接種 2 週間後（茎）から 3 週間後（根）の間に急激に FOL の数が増加したが、MgO 処理区では根、茎ともに FOL の数は接種 1 週間後の数と変わらなかった。トマトの根、胚軸、茎（地上部 10 cm）における FOL の動態を顕微鏡で観察した結果、MgO 非処理区では導管内に菌糸塊や組織の褐変が観察された。一方、MgO 処理区では導管内にごく少数の FOL 菌糸が見られたものの菌糸塊は見られず、組織の褐変も観察されなかった（図 1）。以上から、MgO 処理したトマト植物体では、FOL は根や胚軸に侵入しているが、増殖が抑制されているため病徴が表れないと考えられた。

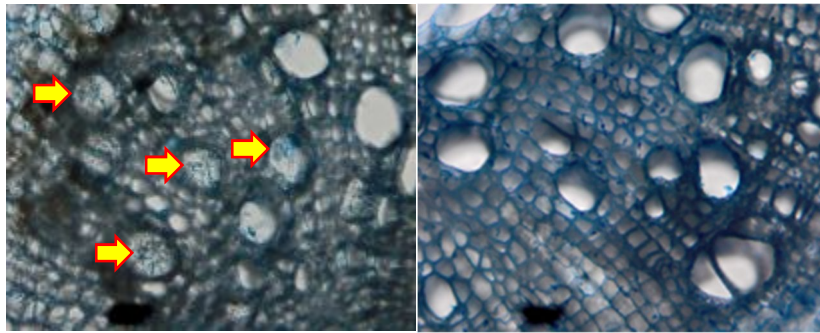


図 1 トマト植物体内におけるトマト萎ちょう病菌（FOL）の増殖

MgO 非処理（左）と MgO 処理（右）トマトの根の顕微鏡像（ラクトフェノールコットンブルー染色）。
MgO 非処理トマトでは、導管内に FOL 菌糸塊（矢印）が多数観察され、組織が褐変している。

（ 2 ）植物ホルモンシグナル伝達経路

植物ホルモンシグナル伝達経路の突然変異トマトを用いた実験の結果、JA シグナル伝達経路変異体では MgO による萎ちょう病抵抗性誘導が起こらなかったことから、MgO が誘導する萎ちょう病抵抗性においては JA シグナル伝達経路が必須であると考えられた。

JA シグナル伝達の主要制御因子である *MYC2* とおよびその下流遺伝子の定量 RT-PCR 解析の結果、MgO 処理したトマトでは、処理直後（30 分後）に *MYC2* の転写が顕著に誘導され、その後 *MYC2* の標的遺伝子およびその下流に位置する防御応答遺伝子の転写が誘導された。一方、MgO 処理 1 週間後に FOL を接種すると、*MYC2* およびその標的遺伝子よりも、下流の防御応答遺伝子のほうが先に誘導された。これらのことから、MgO 処理 1 週間後のトマト根では、JA シグナル伝達経路下流の防御応答遺伝子が迅速に転写できる状態（プライミングされた状態）になっていると考えられた。

（ 3 ）RNA シーケンス解析

1)FOL 接種 3 週間後の MgO 処理トマト根の RNA シーケンシングを行い、KEGG パスウェイ解析を行った結果、MgO 処理区のトマト苗の根では FOL の感染によって フェニルプロパノイド生合成経路、SA、JA、および ET シグナル伝達経路が活性化され、総合的な萎ちょう病抵抗性が確立されていることが示唆された。

2)MgO 処理 1 時間後のトマト根の RNA シーケンシングを行い、MgO 処理によって発現が変動する遺伝子群(DEG)を抽出した。DEG の GO 解析の結果、テルペノイド生合成および代謝、イソプレノイド生合成、モノオキシゲナーゼ活性など、傷害によって誘導される遺伝子の発現が有意に増大していた。

3)MgO 処理後 1 週間のトマト根に FOL を接種し、接種 1 時間後の発現遺伝子の RNA シーケンシングを行って DEG を抽出した。DEG の GO 解析を行った結果、ストレス応答、脂質異化、刺激応答などの遺伝子発現が有意に増大していた。

4) DEG の KEGG 解析を行った結果、MgO 処理したトマト根では、フェニルプロパノイド合成および植物・病原体相互作用パスウェイ遺伝子の発現が上昇していた。MgO 処理後 1 週間のトマト根に FOL を接種したトマトの KEGG 解析では、フラボノイドパスウェイ遺伝子の発現が上昇していた。

5) MgO 処理 1 時間後に誘導される遺伝子 (MgO 誘導遺伝子) には Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity (DTI) に関する遺伝子が多く含まれていた。一方、MgO 処理したトマトに FOL を接種すると、Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity (PTI) に関する遺伝子が顕著に発現していた。DTI と PTI は病害抵抗性応答において相乗的に作用することから、MgO によって誘導される強力な萎ちょう病抵抗性に、DTI と PTI の相乗作用が関与している可能性が推察された。

(4) 誘導抵抗性のマーカー

誘導抵抗性のマーカー遺伝子として選抜したグリシンリッチタンパク質 (GRP) 遺伝子の転写制御領域には、メチルジャスモン酸応答性のシス制御エレメントが存在していた。抗 GRP タンパク質抗体を用いた免疫プロットティングおよび免疫組織染色の結果、MgO で前処理したトマト植物体に FOL を接種すると、24 時間以内に GRP が根の表皮や皮層の細胞壁に蓄積することが明らかになった (図 2)。GRP の機能は不明であるが、MgO が誘導する萎ちょう病抵抗性において何らかの役割を果たしていることが示唆された。

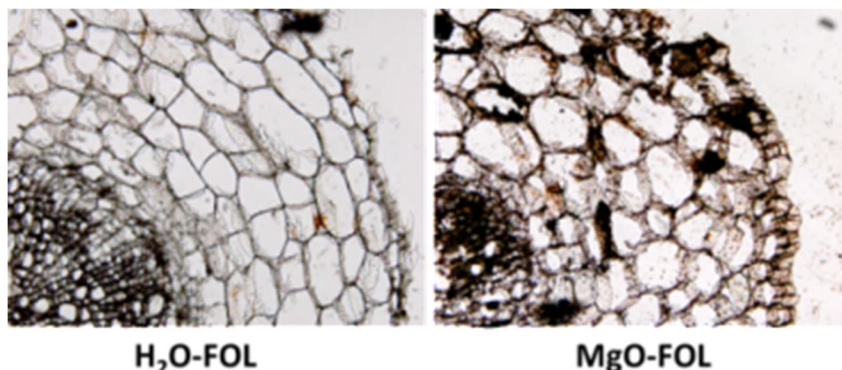


図 2 抗グリシンリッチタンパク質 (GRP) 抗体によるトマト根組織の免疫染色
MgO 処理したトマトに FOL を接種すると右 (右: MgO-FOL) 24 時間以内に根の細胞壁に GRP (茶色) が蓄積する。

(5) 抵抗性誘導の実用化

MgO が誘導するトマト萎ちょう病抵抗性は、生育期間 (FOL 接種後 133 日間) を通じて保持された。すなわち、トマト苗に 1% MgO 懸濁液を 1 回灌注するだけで萎ちょう病抵抗性が生育期間を通じて保持されることがわかった。

萎ちょう病感受性トマト (6 品種) に MgO 処理を行い、これに FOL を接種して萎ちょう病抵抗性の誘導の差異を調べた。その結果、いずれの品種にも萎ちょう病抵抗性が誘導されたが、抵抗性の程度は品種間で異なっていた。このことから、MgO の実用化においては、あらかじめ栽培するトマト品種の抵抗性誘導特性を把握しておくことが重要と思われる。

MgO 誘導萎ちょう病抵抗性の次世代への継承については、抵抗性のばらつきが大きく、結論を得るには至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ota M., Imada K., Sasaki K., Kajihara H., Sakai S., Ito S.	4. 巻 68
2. 論文標題 MgO-induced defence against bacterial wilt disease in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 323 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ppa.12939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujikawa Isamu, Takehara Yushi, Ota Makiko, Imada Kiyoshi, Sasaki Kazunori, Kajihara Hiroshi, Sakai Shoji, Jogaiah Sudisha, Ito Shin-ichi	4. 巻 325
2. 論文標題 Magnesium oxide induces immunity against Fusarium wilt by triggering the jasmonic acid signaling pathway in tomato	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology	6. 最初と最後の頁 100 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiotec.2020.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 S. Ito
2. 発表標題 Suppression of Fusarium wilt of tomato by magnesium oxide nanoparticles (MgO NP)
3. 学会等名 International Conference on Emerging Advancement in Science & Technology, New Delhi, India (5-6 September, 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤川勇・佐々木一紀・境昭二・伊藤真一
2. 発表標題 仮焼酸化マグネシウムが誘導するトマト萎凋病発病抑制の解析
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
タイ	Prince of Songkla University		