

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14468

研究課題名（和文）植物の免疫応答機構は病原細菌由来アブシジン酸によって抑制されるのか？

研究課題名（英文）Is plant immunity inhibited by abscisic acid produced from a phyto bacterium?

研究代表者

藤原 和樹 (Fujiwara, Kazuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・主任研究員

研究者番号：40725008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：カンキツグリーニング病を引き起こす *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Ca. L. asiaticus) と植物免疫応答機構との相互作用において、C. L. asiaticus はアブシジン酸 (ABA) を利用し、植物ホルモンバランスを変化させることで、宿主での感染を成立させてい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

植物では、環境ストレスにตอบสนองするアブシジン酸 (ABA) と病原体への防御応答に関わるサリチル酸 (SA) との間で拮抗的なクロストークが知られているものの、宿主植物に侵入した Ca. L. asiaticus は、植物が合成する ABA を増殖誘導因子として利用し、植物ホルモンバランスを変化させることで感染を成立させることが明らかになった。さらに、病原細菌における ABA を介した増殖制御機構の一端を解明したことで、細菌では未だ明らかになっていない ABA 応答機構を介した特異的なシグナル伝達経路の解明に向けた研究基盤を構築できた。

研究成果の概要（英文）：The interaction between *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Ca. L. asiaticus), which causes citrus greening disease, and the plant immune response mechanism suggests that C. L. asiaticus uses abscisic acid to alter the plant hormone balance, enabling its infection in the host.

研究分野：植物病理学

キーワード：カンキツグリーニング病 植物ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) *Candidatus Liberibacter asiaticus* (以下、*Ca. L. asiaticus* と省略) は、カンキツ樹の師部に局在する難培養性の病原細菌であり、カンキツグリーンング病を引き起こす。*Ca. L. asiaticus* には他の細菌と異なるアブシジン酸 (ABA) 合成経路が存在し、さらに外因性の ABA に応答して増殖の誘導が認められる。植物では、環境ストレスに応答する ABA と病原体への防御応答に関わるサリチル酸 (SA) との間で拮抗的なクロストークが知られていることから、宿主植物に侵入した *Ca. L. asiaticus* は、植物由来及び自身が合成する ABA を増殖誘導因子として利用するだけでなく、SA シグナル伝達経路による免疫応答を抑制し、感染を成立させているのではと考えられた (図 1)。

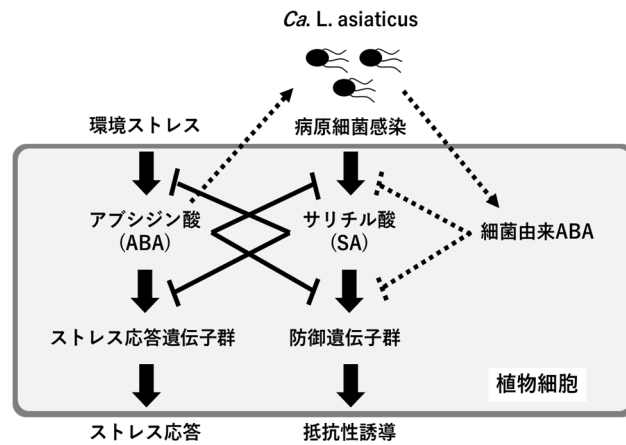


図 1. ABA SA 間のクロストーク (実線) と *Ca. L. asiaticus* 感染戦略 (点線) の仮説。

2. 研究の目的

本研究では、植物の免疫応答機構との相互作用における細菌由来 ABA の新たなシグナル伝達機能を明らかにする。細菌由来 ABA がシグナル伝達物質として機能し、植物の免疫応答を抑制する場合、植物 細菌間の相互作用における植物ホルモンの新たな機能的役割を解明することが可能となる。

3. 研究の方法

(1) *Ca. L. asiaticus* 由来 ABA の同定

Ca. L. asiaticus 感染カンキツ樹の葉サンプルおよび培養サンプルから溶媒により ABA を粗抽出する。濃縮乾固と精製溶媒への混和を繰り返した後に、固相抽出カラムにより精製する。精製したサンプルを LC/MS/MS システムを用いて解析し、*Ca. L. asiaticus* 由来 ABA の構造的特徴を明らかにする。健全植物由来 ABA との比較解析により *Ca. L. asiaticus* 由来 ABA を同定する。

(2) *Ca. L. asiaticus* の増殖に関わる植物の ABA SA シグナル伝達経路の解析

これまでにトマトのモデル実験植物であるマイクロトム (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) を利用した *Ca. L. asiaticus* の人工接種法を確立している。そこで、ABA 関連遺伝子 (ABA1 等) と SA 関連遺伝子 (PR1, NPR1 等) 変異株、コントロールとして野性株を用いて接種試験を行い、病原細菌と ABA SA 間相互作用に関わるシグナル伝達経路を明らかにする。*Ca. L. asiaticus* の検定は、接種 2 ヶ月後の展開葉から total DNA を抽出し、病原細菌の菌密度をリアルタイム PCR により定量解析する。

(3) *Ca. L. asiaticus* の ABA シグナル応答機構の解析

Ca. L. asiaticus は外因性の ABA に応答して増殖が誘導されることが明らかとなっている。そこで、*Ca. L. asiaticus* の ABA シグナル応答に関与する遺伝子群を特定するために、ABA を培養液に処理し、*in vitro* にて 2 週間培養する。培養液から total RNA を抽出し、主要な植物ホルモン応答関連遺伝子群について発現解析を行う。また、市販されている安定同位体で標識された ABA (ABA-d6) を添加した培養液で *Ca. L. asiaticus* を培養し、培養後の菌体および培養液中に残存する安定同位体標識 ABA を質量分析することで、ABA の菌体内への移行性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *Ca. L. asiaticus* の ABA 利用能および産生能の解明を行った。グリーンング病感染カンキツにおいて、*Ca. L. asiaticus* の増殖およびグリーンング病の発病に伴い、植物体中の ABA 量が低減し、さらに培養試験においても同様の現象が認められた。一方で、*Ca. L. asiaticus* 由来 ABA の産生は認められなかった。また、*in vitro* において、ABA 濃度の増加により *Ca. L. asiaticus* の増殖抑制が認められた。

(2) マイクロトムの植物ホルモン変異株に *Ca. L. asiaticus* を人工接種したところ、ABA 関連変異株において *Ca. L. asiaticus* の増殖が抑制された。一方で、SA 関連変異株において、*Ca. L. asiaticus* の増殖促進が認められた。

(3) *Ca. L. asiaticus* の ABA の細胞内移行性の解析および *Ca. L. asiaticus* の ABA 応答機構の

解析を行った。まず、安定同位体標識 ABA を培養源に *Ca. L. asiaticus* を培養し、培養上清および培養菌体を用いて ABA を質量分析したところ、培養上清の ABA は著しく低減し、一方で培養菌体からの ABA の検出は認められなかった。次に、*Ca. L. asiaticus* の ABA 応答性を調べるために、膜輸送関連遺伝子に着目し網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、ABA 処理にตอบสนองして著しく発現量が変化する膜輸送関連遺伝子の存在を明らかにした。よって、*Ca. L. asiaticus* は ABA にตอบสนองすることで自身の増殖を制御していることが示唆された。

以上の結果、*Ca. L. asiaticus* は、植物由来 ABA を積極的に利用することで、植物ホルモンバランスを変化させ、植物への感染を成立させていることが示唆された。一方で、*Ca. L. asiaticus* が ABA と SA 間クロストークに及ぼす影響については、病原体による ABA の低減により SA の恒常的な増加が考えられる。SA の恒常的な増加は、植物における免疫応答機構の異常であり、生育阻害を引き起こす原因となる。すなわち、*Ca. L. asiaticus* の感染により免疫応答機構は正常に機能していないことが考えられる。よって、*Ca. L. asiaticus* には免疫応答機構を回避または制御できる何らかの手段を保有している可能性が示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Fujiwara Kazuki, Iwanami Toru, Fujikawa Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Alterations of Candidatus Liberibacter asiaticus-Associated Microbiota Decrease Survival of <i>C. L. asiaticus</i> in in vitro Assays	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 3089
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2018.03089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 藤原和樹、藤川貴史	4. 巻 57
2. 論文標題 ミカンが黄色く熟さない?! 遺伝子を大幅に欠落した篩管に潜む奇妙な細菌	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 522-524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuki Fujiwara and Takashi Fujikawa
2. 発表標題 A citrus huanglongbing-associated microbiota has the capacity to metabolize sugars in the sieve elements
3. 学会等名 MPMI2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 リベリバクター属細菌の増殖制御剤およびその制御法	発明者 藤原和樹、藤川貴史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-031181	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----