

令和 2 年 9 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19210

研究課題名(和文) 食害昆虫に由来する植物免疫誘導物質の同定と免疫機構の解明

研究課題名(英文) Identification of HAMPs from a chewing insect and its roles in plant immunity

研究代表者

吉岡 博文 (Yoshioka, Hirofumi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30240245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ニジュウヤホシテントウ由来のHAMP (herbivore-associated molecular pattern)を精製し、その構造を決定することを第一の目的とする。テントウの吐き戻し液成分の中にROS生産を誘導する物質が存在することを見出した。大量のニジュウヤホシテントウの吐き戻し液から、各種カラムを用いてROS誘導活性画分を精製・収集した。精製した活性成分をLC-MS/MS解析した結果、分子量1,000以下の化合物であり、この精製画分でベンサミアナタバコ葉を処理すると、ROS生産およびMAPK活性を一過的に誘導することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

咀嚼昆虫が抵抗性誘導物質を生産する例が報告され、HAMPs (herbivore-associated molecular patterns) と呼ばれるようになってきた。しかし、咀嚼昆虫に対する植物免疫機能の実態は依然としてよくわかっていない。テントウの吐き戻し液成分の中にペルオキシダーゼを活性化する物質が存在することを見出した。本研究課題では、ニジュウヤホシテントウ由来のHAMPを精製し、その構造を決定することを第一の目的とする。本研究の成果によって、咀嚼昆虫と植物間における新たなシグナルネットワークの発掘を可能にする先駆的モデルを提示するとともに、病害虫抵抗性付与の戦略を構築する。

研究成果の概要(英文)：In this research project, the primary purpose of this study is to purify HAMP (herbivore-associated molecular pattern) from oral secession from *Henosepilachna vigintioctopunctata* and to determine its structure. We found that there is a substance that induces ROS production in the oral secession of the ladybird. The ROS-inducing active fraction was purified and collected from a large amount of the oral secession using various columns. As a result of LC-MS / MS analysis of the produced active ingredient, it was found that the compound had a molecular weight of 1,000 or less, and that treatment of *Nicotiana benthamiana* leaves with this fraction transiently induced ROS production and MAPK activity.

研究分野：植物免疫学

キーワード：植物免疫 虫害抵抗性 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

咀嚼昆虫が抵抗性誘導物質を生産する例が報告され、HAMPs (herbivore-associated molecular patterns) と呼ばれるようになってきた(図1)。しかし、咀嚼昆虫に対する植物免疫機能の実態は依然としてよくわかっていない。この大きな理由として、HAMPs の同定例が少ない上に、植物の遺伝子操作の煩雑さが主な原因であると考えられる。

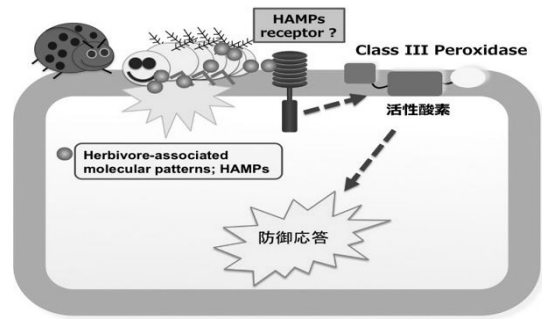


図1. 害虫に対する免疫応答

本研究は、担当学生による実験上のミスに端を発している。ニジュウヤホシテントウを抵抗性であるベンサミアナ葉に放飼した後、DAB (3,3'-diaminobenzidine) 染色をして活性酸素種 (ROS) の生成を観察する予定であった。しかし、手違いで放飼する前に葉に水を注入してから DAB 染色したところ、ROS 蓄積を示す褐色が摂食痕周辺に広がっていた(図2右)。この手違いから、担当学生はテントウの吐き戻し液成分の中に細胞壁のペルオキシダーゼを活性化する HAMP 様物質を発見したのである。ベンサミアナの遺伝子は、ウイルスベクターを用いて容易にサイレンシングすることが可能であり、一方、ニジュウヤホシテントウの遺伝子は、2本鎖 RNA を摂食させることで効率よくサイレンシングすることが可能であることから、テントウ-ベンサミアナのシステムは病害虫-植物間相互作用研究の格好のモデル系であると考えられる。これらの背景を基に、本研究では報告例が極めて少ない HAMP の精製・構造決定に挑むことを計画した。

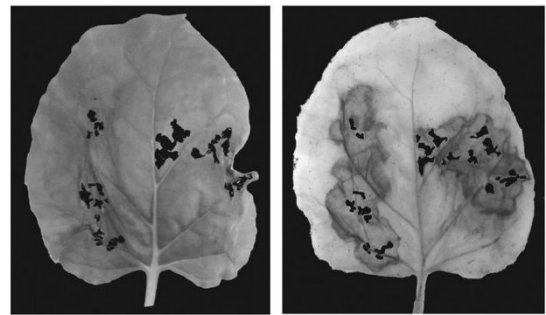


図2. DAB による ROS の染色

## 2. 研究の目的

咀嚼昆虫に対する植物免疫機能の実態は依然としてよくわかっていない。ニジュウヤホシテントウによって加害されたベンサミアナ葉では、細胞壁のペルオキシダーゼに依存した ROS が生成され、抵抗性が誘導される。さらに、テントウの吐き戻し液成分の中にペルオキシダーゼを活性化する物質が存在することを見出した。本研究課題では、ニジュウヤホシテントウ由来の HAMP を精製し、その構造を決定することを第一の目的とする。本研究の成果によって、咀嚼昆虫と植物間における新たなシグナルネットワークの発掘を可能にする先駆的モデルを提示するとともに、病害虫抵抗性付与の戦略を構築する。

## 3. 研究の方法

ニジュウヤホシテントウは、摂食する過程で HAMP を分泌する。この分泌液画分で処理すると、DAB 染色による ROS 誘導が確認された。この ROS 蓄積は、細胞壁ペルオキシダーゼ阻害剤である SHAM (Salicylhydroxamic acid) によってほぼ完全に阻害された(図3)。粗抽出液に含まれる HAMP の精製を進めるため、粗抽出液にエタノールを加え、遠心分離して上清液を回収

し、水に溶解した後に酢酸エチルを重層して水相画分を得た。ブタノール可溶画分を用いてアッセイした結果、ベンサミアナ葉において ROS 生成活性が認められた (図 3)。

この粗精製物を大量のニジュウヤホシテントウの吐き戻し液から集め、粗抽出液にエタノールを加え、遠心分離して上清液を回収し、水に溶解した後に酢酸エチルを重層して水相画分を得た (図 4)。

ブタノール可溶画分を用いてアッセイした結果、ベンサミアナ葉において ROS 生成活性が認められた。この活性画分をさらに各種カラムを用いて ROS 誘導活性画分を精製・収集し、構造決定に供試した。

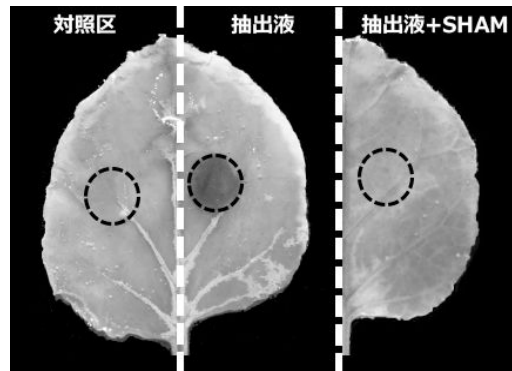


図 3 . SHAM による ROS の阻害  
テントウの吐き戻し液処理によって誘導される ROS 生産は、細胞壁ペルオキシダーゼ阻害剤である SHAM によって阻害された。

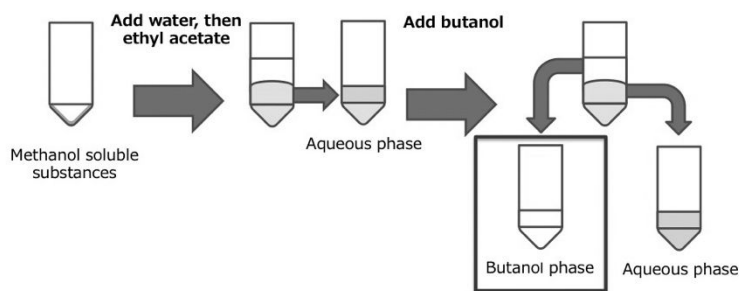


図 4 . HAMP 粗精製のフローチャート

#### 4 . 研究成果

ニジュウヤホシテントウによって加害されたベンサミアナ葉では、細胞壁のペルオキシダーゼに依存した ROS が生成され、抵抗性が誘導される。さらに、テントウの吐き戻し液成分の中にペルオキシダーゼを活性化する物質が存在することを見出した。本研究課題では、ニジュウヤホシテントウ由来の HAMP を精製し、その構造を決定することを第一の目的とした。粗抽出液に含まれる HAMP の精製を進めるため、粗抽出液にエタノールを加え、遠心分離して上清液を回収し、水に溶解した後に酢酸エチルを重層して水相画分を得た。ブタノール可溶画分を用いてアッセイした結果、ベンサミアナ葉において ROS 生成活性が認められた。この粗精製物を大量のニジュウヤホシテントウの吐き戻し液から集め、各種カラムを用いて ROS 誘導活性画分を精製・収集した。精製した活性成分を LC-MS/MS 解析した結果、分子量 1,000 以下の化合物であった。

SIPK および WIPK は MEK2 によってリン酸化される MAPK で、さまざまな防御応答の制御に関与することが知られている。また、SIPK は転写因子である WRKY8 をリン酸化し、ROS バーストやファイトアレキシン生合成に関与する遺伝子の発現制御など、病害抵抗性において重要な反応を制御していることが知られている。さらに、ニジュウヤホシテントウの食害抵抗性に MEK2-SIPK/WIPK が関与すること、SIPK/WIPK のリン酸化が食害時に誘導されることが明らかになっている。抗リン酸化 MAPK 抗体を用いてウエスタン解析を行い、HAMP が SIPK/WIPK を活性化するのかを調べた。部分精製した HAMP 溶液、および MAPK を一過的に活性化することで知られる細菌のべん毛タンパク質である flg22 を 1  $\mu$ M に調整し、これらの水溶液をベンサミアナ葉に注入した。注入後、経時的にサンプリングし、タンパク質を抽出して SIPK/WIPK のリン酸化を調べた。その結果、HAMP 処理 30 分後に一過的で強い SIPK のリン酸化が検出された (図 5)。

これらの結果より、ニジュウヤホシテントウの HAMP によって強い免疫応答が誘導される事が明らかになった。

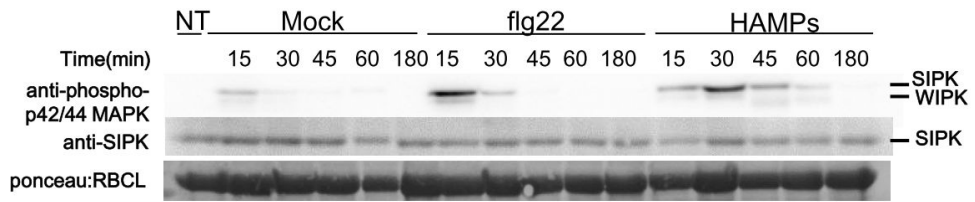


図5 . HAMP による MAPK の活性化

テントウの HAMP、細菌の flg22 または水 (Mock) でベンサミアナ葉を処理し、抗 p42/44 抗体で SIPK/WIPK のリン酸化を検出した。NT は未処理葉からのサンプルを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Yoshioka, M., Adachi, I., Sato, Y., Doke, N., Kondo, T. and Yoshioka, H.	4. 巻 20
2. 論文標題 RNAi of the sesquiterpene cyclase gene for phytoalexin production impairs pre and post invasive resistance to potato blight pathogens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 907-922.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mpp.12802	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 鳴坂義弘・鳴坂真理・吉岡博文・吉岡美樹・谷口伸治・石川美友紀・紀岡雄三・野口勝憲	4. 巻 73
2. 論文標題 植物を元気にして病気を防ぐ 植物活力剤によるイチゴの病害抑制技術	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 植物防疫	6. 最初と最後の頁 684-688.
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 無
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 Kobayashi, Y., Fukuzawa, N., Hyodo, A., Kim, H., Mashiyama, S., Ogihara, T., Yoshioka, H., Matsuura, H., Masuta, C., Matsumura, T. and Takeshita, M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of salicylic acid glucosyltransferase in balancing growth and defence for optimum plant fitness.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 429-442.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1111/mpp.12906	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14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshioka, H., Adachi, H., Ishihama, N., Belhaj, K., Takano, Y., Kamoun, S., Sato, M. and Yoshioka, M.
2. 発表標題 WRKYs phosphorylated by MAPK regulate chloroplast-mediated ROS burst in plant immunity
3. 学会等名 International Congress of Plant Pathology (ICPP) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshioka, H
2. 発表標題 Plant immunity mediated by MAPK-WRKY phosphorylation pathway
3. 学会等名 2018 International Symposium on Agricultural Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川尊也・安達広明・吉岡美樹・杉浦大輔・吉岡博文
2. 発表標題 植物免疫応答における光合成活性抑制は葉緑体のROS生産を誘導する
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川尊也・安達広明・吉岡美樹・杉浦大輔・吉岡博文
2. 発表標題 細胞死に連動する植物免疫応答では葉緑体の ROS 生産が誘導される
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田啓一朗・高橋来人・千賀紀尚・安達広明・石濱伸明・吉岡美樹・近藤竜彦・吉岡博文
2. 発表標題 ニジュウヤホシテントウの食害による MAPK 活性の時空間的動態
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本溪太・小川尊也・稲田太一・安達広明・吉岡美樹・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 ROS免疫シグナルを介在するROSセンサータンパク質のプロテオーム解析
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川尊也・岡本溪太・稲田太一・安達広明・吉岡美樹・杉浦大輔・吉岡博文
2. 発表標題 植物免疫応答における葉緑体のROSシグナルは葉緑体の核への凝集に関連する
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡美樹・安達広明・石濱伸明・鳴坂真理・鳴坂義弘・高野義孝・吉岡博文
2. 発表標題 シロイヌナズナMAPKセンサー植物を用いた免疫MAPKの時空間的活性動態
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田啓一朗・高橋来人・千賀紀尚・安達広明・石濱伸明・吉岡美樹・近藤竜彦・吉岡博文
2. 発表標題 咀嚼昆虫の食害に対するMAPKの時空間的活性動態における薬理学的研究
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川尊也・岡本溪太・稲田太一・安達広明・吉岡美樹・杉浦大輔・森 仁志・三宅親弘・吉岡博文
2. 発表標題 植物免疫における葉緑体ROSバーストは、フェレドキシンに還元力が蓄積することで誘導される
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉岡美樹・山口公志・吉村智美・野元美佳・多田安臣・山内卓樹・石井陽大・中園幹生・川崎 努・吉岡博文
2. 発表標題 イネのRBOHIを介したROS生成に おけるRLCK185とCDPKによる相 加的効果
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本溪太・小川尊也・稲田太一・安達広明・吉岡美樹・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 植物免疫シグナルを介在するROS センサータンパク質は抵抗性を正に制御する
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中達己・安達広明・吉岡美樹・荒川花子・別役重之・多田安臣・ 鳴坂真理・鳴坂義弘・吉岡博文
2. 発表標題 サリチル酸とジャスモン酸シグナルの活性化および拮抗作用を可視化するバイオセンサーの構築
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 岩田啓一朗・高橋来人・千賀紀尚・安達広明・石濱伸明・關 光・村中俊哉・吉岡美樹・近藤竜彦・吉岡博文
2. 発表標題 ニジュウヤホシテントウの経口成分に由来するソラニン・チャコニンは植物の免疫反応を誘導する
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 植物免疫ホルモンであるサリチル酸およびジャスモン酸のシグナル伝達および拮抗作用の可視化システム	発明者 吉岡博文、安達広明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-021831	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

植物免疫学研究室 <a href="https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/%7ebio4283/index.html">https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/%7ebio4283/index.html</a>
---

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
研究分担者	近藤 竜彦  (Kondo Tatsuhiko)  (30362289)	名古屋大学・生命農学研究科・講師    (13901)	