

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19212

研究課題名(和文)植物のPAMP誘導免疫システムにおける多様性の解明を目指す研究

研究課題名(英文)Studies on a diversity of PAMP-triggered immunity in plants

研究代表者

高野 義孝(Takano, Yoshitaka)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：80293918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物は病原菌特有の分子パターン(PAMPs)を認識し、PAMP誘導免疫を活性化する。PAMP誘導免疫メカニズムは共通性が高いと捉えられてきたが、最近の研究により、明確な多様性があることが示唆された。本研究では、この多様性の問題に迫るため、シロイヌナズナns11変異体を利用した。本変異体では二つのPAMP(flg22とnlp24)での反応の違いを壊死斑形成として可視化できる利点があり、そのサプレッサー変異体の同定、解析をおこなった。その結果、エチレン経路がflg22とnlp24が活性化するPAMP誘導免疫の相違に関わることを明らかにし、さらに本問題の解明に利用できる多数の変異体の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物における中格的免疫システムであるPAMP誘導免疫については、これまではPAMP認識後のシグナル経路や活性化する抗菌反応は共通であると捉えられてきたが、近年になり、その多様性が浮かび上がってきた。本研究では、本多様性の問題に迫るため、シロイヌナズナ変異体を利用した研究を実施し、その結果、植物ホルモンであるエチレン経路がPAMP誘導免疫の多様性の一因であることを明らかにし、さらに今後の研究推進に必要な多数のシロイヌナズナ変異体の同定に成功した。今後、PAMP誘導免疫の多様性の分子的背景を明らかにできれば、それぞれの病原体に特化した抵抗性誘導剤開発など、耐病性技術の向上に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Higher plants recognize PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) and then activate PAMP-triggered immunity called PTI. The PTI mechanism including signaling pathways and subsequent immune responses was believed to be common, however, the recent studies suggested that there is a clear diversity in each PTI mechanism. In this study, to focus on the diversity in PTI system, we utilized the ns11 mutants of *Arabidopsis thaliana*. Because the difference between flg22-triggered PTI and nlp24-triggered PTI is visualized by lesion development in the ns11 mutants, we identified and analyzed suppressor mutants of the ns11 mutants. As a result on the analyses of an identified mutant, we revealed that the ethylene pathway is involved in the diversity in the two PTI pathways. Also, we successfully identified many mutants useful for the future studies.

研究分野：植物病理学

キーワード：PAMP誘導免疫 相違性 nlp24 flg22 シロイヌナズナ ns11変異体 サプレッサー変異 ルシフェラゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高等植物は病原菌に特有の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) を認識することで、病原菌を感知し、それに対抗する生体防御反応を活性化させる。植物はまず (i) 細胞膜に存在するパターン認識受容体と総称される受容体によって、各 PAMP を認識し、それにより (ii) 活性酸素の生成、MAP キナーゼカスケードと呼ばれるシグナル伝達経路の活性化などが起き、(iii) 最終的には抗菌物質の生成を中心とした抗菌反応・抵抗反応が起こる。このような植物の抵抗性は、PAMP 誘導免疫 (PAMP-triggered immunity) と呼ばれる。PAMP 誘導免疫の研究は、シロイヌナズナを中心に進められ、特に細菌鞭毛の構成タンパク質であるフラジェリン内の 22 アミノ酸からなる PAMP である flg22 とその認識受容体 FLS2 の組み合わせによって活性化される PAMP 誘導免疫の研究が先端を走っていた。flg22 に加え、elf18 と呼ばれる細菌の翻訳伸長因子内のアミノ酸配列なども PAMP として認識されることが判明していた。そして、flg22、elf18 など異なる PAMP によって、上述の活性酸素生成、MAP キナーゼの活性化などが共通して誘起されることから、PAMP とその受容体の組み合わせは多数存在すると推定される一方、PAMP の認識以降の分子機構および免疫反応は共通性が高いと捉えられてきた。

しかし、最近の研究により、この考えに修正が必要である可能性が提示された。糸状菌と卵菌が共通して有する分泌タンパク質 NLP 内の 24 アミノ酸 (nlp24 と命名) が、シロイヌナズナにおいて PAMP として認識され、さらに nlp24 の処理によってエチレン合成が急激に誘導されることが近年になり報告された。このエチレン合成は flg22 ではほとんど誘導されない。さらに、代表者の研究グループは nlp24 が誘導する活性酸素生成は flg22 と比較して顕著に低いことを見出していた。このことは、これまでの考えとは異なり、同じシロイヌナズナの中でさえ、PAMP 誘導免疫のメカニズムには明確な多様性があることを強く示している。しかし、この PAMP 誘導免疫の多様性の背景は全く理解されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この高等植物における PAMP 誘導免疫の多様性の解明である。研究代表者のグループは、植物抵抗性研究の過程でシロイヌナズナの *NSL1* (*Necrotic Spotted Lesion 1*) と呼ばれる遺伝子の変異体が、野生型植物とは異なり、上述の PAMP である flg22 の処理によって自発的細胞死に基づく壊死斑形成が起きることを発表している (Fukunaga et al., 2017 Plant J. 89)。興味深いことに、最近になり上述の nlp24 ペプチドでは flg22 の 10 分の 1 の濃度でも *ns11* 変異体で壊死斑形成が起きることを発見した。このことは、PAMP 誘導免疫の多様性を改めて示すと同時に、*ns11* 変異体における自発的細胞死を nlp24 が flg22 よりも強く誘導することを示した。flg22 の経路は詳細に研究されている一方、新たに見つかった nlp24 の経路についてはほとんど知見がないのが現状である。この nlp24 が誘導する PAMP 誘導免疫の機構を解明し、flg22 が誘導する PAMP 誘導免疫の機構と比較し、PAMP 誘導免疫の多様性に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究においては、nlp24 が活性化させる PAMP 誘導免疫経路に機能する遺伝子の発見に挑戦するために、*ns11* 変異体を用いる。具体的には、nlp24 処理で壊死斑が形成されない *ns11* 変異体のサプレッサー変異体をスクリーニングする。EMS で変異処理した *ns11* 変異体種子から M1 植物を育て、その種子由来の M2 植物について、nlp24 処理をおこない、壊死斑形成が起きない、あるいは顕著にその形成が低下するサプレッサー変異体をスクリーニングする。同定した変異体について、*ns11* 変異体との交配 F2 集団の解析をおこなって単一遺伝子座の変異であることが判明した場合、原因遺伝子の単離を MutMap 法によりおこなう。また、得られた nlp24 で壊死斑が形成されない *ns11* サプレッサー変異体の中で、flg22 処理によっては壊死斑が依然として形成されるものに特に注目する。

4. 研究成果

(1) *ns11* 変異体に対するサプレッサー変異体のスクリーニング
nlp24 変異体に対して EMS 処理をおこない、その M2 植物 5,292 個体をスクリーニングし、その結果、220 の個体が一次スクリーニングを通過した。一次スクリーニングを通過した植物について、二次スクリーニングを実施した結果、24 の *ns11* サプレッサー変異体の同定に成功した。続いて、親株である *ns11* 変異体と当該変異体を交配した後の F2 植物における分離比を調査した結果、22 の *ns11* サプレッサー変異体において、その原因変異は単一の劣性変異であることが判明した。これらの変異体について、MutMap 解析による原因遺伝子の探索を実施した。

(2) MutMap 解析による *ns11* サプレッサー変異体の原因遺伝子の同定
原因遺伝子が単一の劣性変異であると推定される 22 のサプレッサー変異体に対して、MutMap 解析による原因遺伝子の探索を実施した。まず、flg22 ペプチド処理時よりも、nlp24 ペプチド処理時の壊死斑形成において、その抑制度がより大きい *ns11* サプレッサー変異体の原因遺伝子として、*EIN2* 遺伝子が同定された。*EIN2* 遺伝子はエチレン経路において重要な役割を果たしており、このことは、nlp24 が活性化させる PAMP 誘導免疫と *EIN2* が関わるエチレン経路の結びつきを示唆した。さらに *EIN2* は nlp24 依存的なトリプトファンを由来とする抗菌物質の生合成経

路の活性化に関与することを明らかにした。また、他の *ns11* サプレッサー変異体に対する MutMap 解析により、フェレドキシン依存的グルタミン酸合成酵素をコードする *GLU1* 遺伝子、ヌクレオポリンをコードすると推定される *SBB1* 遺伝子などをその原因遺伝子として同定した。*ns11 sbb1* 二重変異体については、トリプトファンを由来とする抗菌物質の蓄積を調査した結果、*ns11* 変異体と比較して、抗菌物質の蓄積が劇的に低下していることを明らかにした。また、最近になり高濃度の nlp24 処理によって野生型植物でも細胞死が誘導されることを見出し、さらに *SBB1* は本細胞死にも必要であることを明らかにした。

(3) nlp24 が活性化する PAMP 誘導免疫とエチレン経路のリンク

nlp24 が誘導する *ns11* 変異体の細胞死にエチレン経路の因子である EIN2 が関与することを発見し、このことは nlp24 が活性化する PAMP 誘導免疫とエチレン経路の密接なリンクを示した。この結果に基づき、nlp24 とエチレン経路の関係についてさらに調査し、その結果、flg22 と比較して nlp24 によって、*ERF1* 遺伝子 (エチレン経路のマーカー遺伝子の一つ) の発現がより強く誘導されることを見出し、この *ERF1* の発現を指標にした変異体スクリーニングをおこなった。具体的には *ERF1* プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結し導入した形質転換シロイヌナズナに由来する約 30,000 個体の変異集団に対して、ハイスループット型リアルタイム発光測定装置を用いたスクリーニングを実施した。その結果、nlp24 処理に対する発光値が減少しているにも関わらず flg22 処理に対して変化が見られない nlp24 免疫経路に特異的な欠損を有する変異体 8 個体、*ERF1* の発現パターンに異常が生じている変異体 8 個体、計 16 変異体の発見に成功した。上記の *ns11* サプレッサー変異体に加え、これらの変異体の更なる解析により、PAMP 誘導免疫の多様性の分子的背景に迫ることができると期待している。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Irieda H, Inoue Y, Mori M, Yamada K, Oshikawa Y, Saitoh H, Uemura A, Terauchi R, Kitakura S, Kosaka K, Singkaravanit-Ogawa S, and Takano Y.	4. 巻 116
2. 論文標題 Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	6. 最初と最後の頁 496-505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1807297116.	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 Pastorczyk M, Kosaka A, Pislewska-Bednarek M, Lopez G, Frerigmann H, Kulak K, Glawischnig E, Molina A, Takano Y, and Bednarek P.	4. 巻 225
2. 論文標題 The role of CYP71A12 monooxygenase in pathogen-triggered tryptophan metabolism and Arabidopsis immunity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 400-412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.16118.	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ayumi Kosaka, Mariola Pastorczyk, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, Pawel Bednarek, Yoshitaka Takano
2. 発表標題 Involvement of tryptophan-derived metabolites in the post-invasive resistance of Arabidopsis thaliana against multiple fungal pathogens with different infection strategies
3. 学会等名 International Congress of Plant Pathology 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂井遼太、畑 政輝、海道真典、三瀬和之、阿部 陽、寺内良平、高野義孝
2. 発表標題 不適応型炭疽病菌の接種によりシロイヌナズナnsI1変異体において誘導される細胞死に関する遺伝子の探索
3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林由佳、小内清、田中左恵子、加藤大明、海道真典、三瀬和之、寺内良平、高野義孝
2. 発表標題 シロイヌナズナによるウリ類炭疽病菌の認識とそれに伴う初期防御応答の分子機構研究
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 高野義孝
2. 発表標題 植物と炭疽病菌の間で繰り広げられる攻防戦
3. 学会等名 東京大学生物生産工学研究センターシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野恵梨佳、小内 清、加藤大明、海道真典、三瀬和之、寺内良平、高野義孝
2. 発表標題 nlp24 ペプチドが活性化するシロイヌナズナのPAMP誘導免疫経路の研究
3. 学会等名 第53回植物感染生理談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野恵梨佳、小内 清、加藤大明、海道真典、三瀬和之、寺内良平、高野義孝
2. 発表標題 シロイヌナズナのRLP23遺伝子は灰色かび病菌への抵抗性に関与している
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----