

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06055

研究課題名(和文)植物免疫はクロロシス発症モデル植物におけるクロロシスと細胞死に関与するか

研究課題名(英文) Does plant immunity have roles in chlorosis and cell death in chlorosis development model plants?

研究代表者

小林 括平 (Kobayashi, Kappei)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：40244587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物病害では、モザイクなどの退緑・黄化(クロロシス)を伴う病徴を示す成熟葉が健全葉に比べて早期に老化・枯死する現象が認められる。以前の研究で、クロロシス発症に先立ち、植物免疫に関連する遺伝子の発現が活性化することが分かった。そこで本研究では、植物免疫の活性化が病徴発現の進行と増悪に重要な役割を果たすという仮説のもと、網羅的な遺伝子発現解析を実施した結果、細胞死を含む植物免疫関連遺伝子、免疫関連ホルモンであるサリチル酸経路の活性化や活性酸素種の生産がクロロシス発症過程で誘導されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルス感染症の治療に免疫抑制効果のあるステロイドが用いられたことを例にとるまでもなく、ヒトなど動物の感染症ではその発症に宿主免疫が密接に関連している。本研究では、植物免疫が病原体の排除という本来の役割に加え、病害発症という負の働きもあることを示した。これによって、より持続的な農業生産に役立つ新たな品種の開発に向けて新たな戦略が加わるとともに、風邪薬のような対症療法的な農薬を開発する道も拓かれた。

研究成果の概要(英文)：It is frequently observed that diseased plant leaves which show chlorotic symptoms such as virally induced mosaic, senesce more rapidly than healthy plant leaves. Our previous study suggested that chlorosis development accompanies the activation of plant immunity. Here we tested a hypothesis that plant immunity would have a role in plant disease symptom development. Our comprehensive gene expression study revealed the activation of plant immunity-related gene including those having roles in cell death induction, activation of defense hormone salicylic acid pathways, the production of reactive oxygen species during chlorosis development.

研究分野：分子植物ウイルス学

キーワード：遺伝子組換え植物 細胞死 植物ウイルス 植物免疫 退緑黄化 病徴

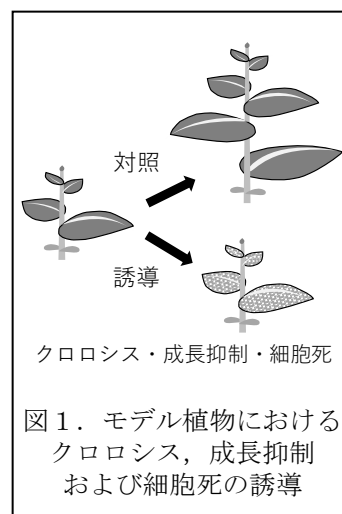
### 1. 研究開始当初の背景

本研究代表者はかつてピーマンのウイルス抵抗性遺伝子に関する研究に取り組んでいたが、研究対象の抵抗性遺伝子については、すでに多数の抵抗性打破変異ウイルス系統が発生していた。現場病理研究者から「抵抗性品種では、抵抗性打破変異ウイルスが出現すると全身壊死が生じて著しい減収となるため、腕の良い生産者はあえて感受性品種を利用して収量を確保している」と伺い、抵抗性遺伝子研究の有用性に疑念を抱くに至った。そこで、植物病害発症機構を解明すれば、その成果に基づいて耐病性（病害トレランス）作物の開発が可能になると考え、病害発症機構の解析に取り組んできた。

植物病害の発症機構のうち、ウイルスによる全身壊死の発症については、ウイルス抵抗性遺伝子様の遺伝子の関与や、抵抗性応答の活性化が重要な役割を果たすこと、すなわち、植物免疫の関与が明らかにされてきた。一方、クロロシスについては、ウイルスに対する RNA サイレンシングによって、宿主植物の葉緑体タンパク質遺伝子の発現が抑制されるメカニズムが知られていた[1-2]。しかし、一方でウイルスタンパク質の単一アミノ酸の置換によってクロロシスの程度が変化することも報告されており、植物免疫と同様に病原体タンパク質の認識に基づくクロロシス発症のメカニズムの存在も示唆されていた[3]。

### 2. 研究の目的

本研究代表者らは、植物病害発症機構を研究するにあたり、発症を肉眼や葉色の変化で検出できるようになる以前に起こる分子生物学的変化を解析する目的で、人工的かつ全身的に植物病害において最も広く認められる病徴である退緑・黄化（クロロシス）を誘導可能な遺伝子組み換えモデル植物（タバコ）を作出した[4-7]。誘導薬剤（デキサメサゾン；以下、Dex）によって、病原因子であるウイルス遺伝子やウイルスの病原性標的である葉緑体タンパク質遺伝子の発現を抑制する RNA の発現を誘導して、クロロシスを発症させることのできる実験系（図 1）である。それらを用いてクロロシス発症に先立って代表的な植物免疫関連遺伝子の発現が活性化すること[4-7]を明らかにし、植物免疫が植物病害発症に重要な役割を果たす可能性を想起した。そこで本研究では、植物病害、特にクロロシスの発症に関与するか否かを明らかにすることを目的とした。



### 3. 研究の方法

(1) 網羅的遺伝子発現解析：クロロシス発症の過程でどのような植物免疫関連遺伝子の発現が活性化しているかを明らかにする目的で、RNA シークエンス（RNA-seq）による網羅的遺伝子発現解析を行った。クロロシス発症モデル植物に誘導薬剤または対照溶液を処理し、24 時間後（実験 1）あるいは、1, 3, 6, 12, および 24 時間後（実験 2）に RNA を抽出した。委託解析によって次世代シーケンサーによる全ポリ A-RNA の塩基配列を決定し、広く用いられている解析プログラムである Salmon と DESeq2 を用いて処理区と対照区の間で発現量の異なる遺伝子（DEG）を特定し、ジーンオンロジー解析によって DEG の機能を推定した。

(2) 活性酸素種の生産および細胞死の検出：クロロシス発症過程にある植物の葉において、誘導薬剤処理 24 時間後に、ジアミノベンジジンの酸化反応によって、植物免疫の活性化に呼応して生産される過酸化水素を検出した。また、7 日後にトリパンプルー染色法によって、細胞死を検出した。

(3) 植物免疫抑制遺伝子を発現する遺伝子組換え植物の作出：植物免疫に関わる植物ホルモンとして知られるサリチル酸（SA）に着目し、細菌由来の SA 分解酵素遺伝子（nahG）を常時発現する遺伝子組換えタバコを定法により作出した。キュウリモザイクウイルス（CMV）の病原因子で、RNA サイレンシングと SA を介したウイルス増殖抑制を阻害することで知られる 2b タンパク質（C2b）遺伝子を Dex とは異なる誘導薬剤（エストラジオール、以下、Est）によって発現させることのできる遺伝子組換えタバコも作出した。

(4) 植物免疫制御に関わる転写因子の解析：SA を介する植物免疫応答において、その制御に重要な役割を果たすことが報告されている SARD1 および CBP60g に着目し、タバコを含む種々の植物における相同遺伝子を検索した。見出された遺伝子の関係性については、系統解析プログラムである MEGA X を用いて系統樹を推定して評価した。タバコに見出された 6 個の遺伝子について、3-4 カ所の標的配列を設定し、CRISPR/Cas9 系を用いて標的配列間の欠失による遺伝子破壊を試みた。遺伝子破壊は、PCR 法によって検出した。また、それら相同遺伝子を Est 依存的に過剰発現するタバコを作出した。導入遺伝子の植物免疫における役割を明らかにする目的で、トマトモ

ザイクウイルス (ToMV) を接種し、接種葉におけるウイルスの拡がり免疫組織化学検出によって評価した。

#### 4. 研究成果

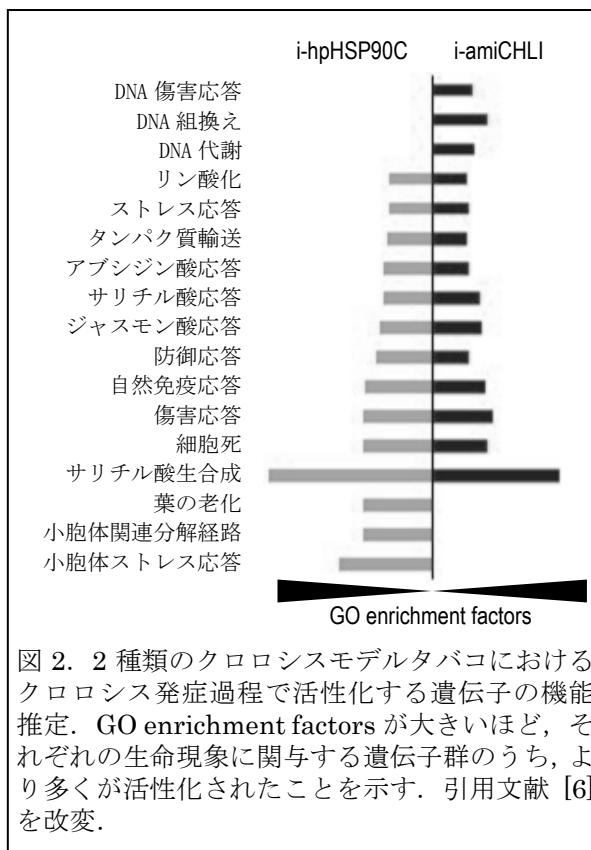
(1) クロロシス発症過程における植物免疫の活性化：2種類のクロロシス発症モデル植物において、網羅的遺伝子発現解析を行い、両者において SA 経路の活性化を伴う免疫応答が活性化していたことを明らかにした[8, 9] (図 2)。モモ潜在モザイクウイルスの病原性標的である葉緑体分子シャペロン、HSP90C の発現を抑制された場合は、免疫応答に加えて小胞体ストレス関連遺伝子群が、CMV の黄化サテライト (Y-sat) の標的である CHLI が発現抑制された場合は、DNA 傷害に関連する遺伝子群が、それぞれ特異的に発現誘導されていた。このことは、クロロシスの引き金となる現象によって、影響を受ける生命活動が異なること、および免疫応答の活性化は異なる引き金によって生じるクロロシスに共通して起こることを示している。解析に用いた2種類のクロロシス発症モデル植物では、免疫応答の指標である活性酸素種の生産、および細胞死が実際に起こっていることが示された。これらのことは、クロロシスの発症および重症化に植物免疫の活性化が関与することを示唆するものである。

(2) 植物免疫抑制遺伝子を発現する遺伝子組換え植物の作出：上述の結果から、クロロシスの発症に SA 経路の活性化を伴う免疫応答が関与することが示唆された。そこで、後述する SA 経路の活性化を抑制する遺伝子を発現する遺伝子組換えタバコを作出し、クロロシスモデルタバコと交配した。今後、それらを用いて SA 経路がクロロシスの発症に果たす役割を解析する。

①細菌由来の SA 分解酵素遺伝子 (nahG) 発現タバコ：nahG を常時発現する遺伝子組換えタバコを作出し、RT-PCR 法によって発現量の多い系統について、後代における選抜薬剤に対する抵抗性を評価したところ、5 系統において単一の導入遺伝子を持つことが示された。これらを2種類のクロロシスモデルタバコ、およびウイルス抵抗性遺伝子を持つタバコと交配し、nahG およびクロロシス誘導遺伝子または抵抗性遺伝子の両方をホモに持つ集団を作出した。今後、それらの植物を用いてクロロシスの発症における SA の役割を明らかにできると期待される。

②CMV 2b (C2b) タンパク質遺伝子発現タバコ：CHLI が発現抑制されたタバコでは、上述のように細胞死が誘導された。しかし、Y-sat を持つ CMV が感染したタバコでは、本研究で持っているクロロシス発症モデルよりも鮮やかな黄色の症状を呈する。この違いが、SA 依存性植物免疫が CMV 感染植物において抑制されているために生じたとする仮説を検証する目的で、C2b を Est 依存的に発現するタバコを作出した。その際、C2b の RNA サイレncing 抑制能によって、CHLI の発現抑制が阻害される可能性を考慮し、C2b による RNA サイレncing 抑制に必須であることが示されている核移行シグナル配列を変異または欠失させた変異体 C2b を発現するものも併せて作出した。C2b 導入タバコを CHLI 発現抑制タバコと交配し、その雑種第一代の種子を Dex および/または Est を含む培地に播種し、クロロシスの発症を検討した。その結果、Dex のみを含む培地ではクロロシスを発症したが、いずれの薬剤も含まない培地、Est のみを含む培地、および Dex と Est の両方を含む培地では、クロロシスの発症は認められなかった。このことは、C2b が SA 依存性植物免疫の抑制を介してクロロシスの発症を抑制したことを示唆している。これら知見については、さらなる確認が必要であるが、今後、SA 依存性植物免疫とクロロシスの発症の関連を明らかにする研究において、C2b 発現タバコは有用な材料となると期待される。

(3) 植物免疫制御に関わる転写因子の遺伝子破壊：(1) の発現解析において、顕著な発現亢進の認められた遺伝子の一つに、SA 依存性植物免疫の制御に重要な役割を果たす転写因子として知られる SARD1 があつた。シロイヌナズナでは、CBP60g が SARD1 と重複した役割を果たすことが報告されており[10]、上述の発現解析においても CBP60g の発現亢進も認められた。そこで、タバコを含む種々の植物種において、これら転写因子遺伝子の相同遺伝子を検索した。その結果、



シロイヌナズナやイネ, トウモロコシは, SARD1 遺伝子を 1 コピーずつしか保有していなかったが, タバコを含むトマトやジャガイモなどのナス科植物, ダイズおよびブドウは, 複数の SARD1 遺伝子を持つことが明らかとなった (図 3). このことは, SARD1 遺伝子が被子植物の多様化の過程で多様な進化をしてきたことを示唆する. さらにタバコは異質 4 倍体であるため, 4 種類の SARD1 遺伝子を持つことが判明し, それぞれ SARD1A(S), SARD1A(T), SARD1B(S), および SARD1B(T), と名付けた. CBP60g については, タバコで 2 個, その他の植物では 1 個の遺伝子を持っていたが, 類似遺伝子である CBP60a との分岐は, SARD1 の多様化よりも後であった可能性が示唆される. 4 倍体であるタバコは, CBP60g(S) と CBP60g(T) の 2 個の遺伝子を持っていた.

タバコにおいて SARD1 および CBP60g 遺伝子が植物免疫およびクロロシス発症に果たす役割を明らかにする目的で, CRISPR/Cas9 系を用いた遺伝子破壊を試みた. その結果, SARD1B(S) と SARD1B(T) の両方が破壊されたキメラ植物は得られたが, SARD1A と CBP60g では, (T) 型の遺伝子破壊株のみが得られている. 今後, SARD1A, SARD1B および CBP60g の (S) 型および (T) 型の両方が破壊されたアレルをホモに持つ系統を作成する. また, SARD1 の 4 遺伝子, あるいは CBP60g の 2 遺伝子について, 発現抑制された遺伝子組換えタバコの作出も進めている.

一方, SARD1 および CBP60g 遺伝子を Est 依存的に発現するタバコは, ToMV 抵抗性遺伝子を持つタバコを親株として作出した. Est 処理後の SARD1A(S) 発現量の多かった系統では, Est 処理個体において, 無処理個体よりもウイルス抵抗性が増強されていたことが示唆された. 以上のことからタバコにおいても SARD1 および CBP60g 遺伝子が植物免疫において重要な役割を果たすことが示唆された. 本研究で得られた遺伝子組換えタバコは, 今後, 植物免疫がクロロシス発症に果たす役割を明らかにする研究において, 有用な材料となるであろう.

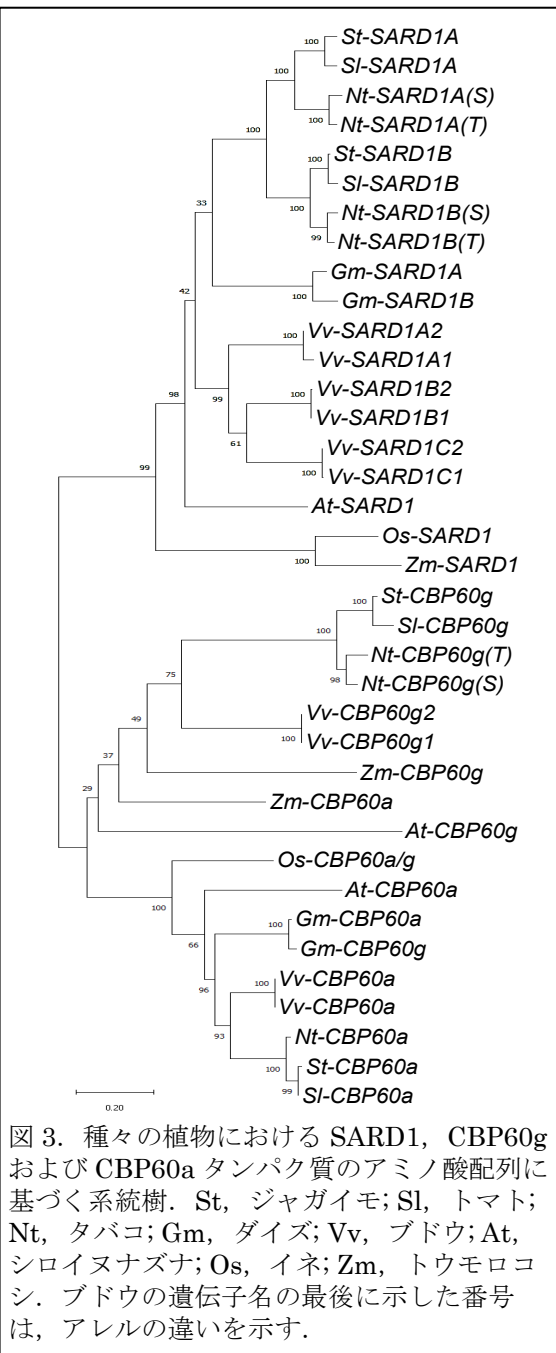


図 3. 種々の植物における SARD1, CBP60g および CBP60a タンパク質のアミノ酸配列に基づく系統樹. St, ジャガイモ; SI, トマト; Nt, タバコ; Gm, ダイズ; Vv, ブドウ; At, シロイヌナズナ; Os, イネ; Zm, トウモロコシ. ブドウの遺伝子名の最後に示した番号は, アレルの違いを示す.

<引用文献>

1. Shimura H et al. (2011) PLoS Pathog 7: e1002021.
2. Smith NA et al. (2011) PLoS Pathog 7: e1002022.
3. Mochizuki T & Ohki ST. (2011) Arch Virol 156: 881-886.
4. Waliullah S et al. (2014) Physiol Mol Plant Pathol 88: 43-51.
5. Waliullah S et al. (2015) J Gen Plant Pathol 81: 261-270.
6. Bhor SA et al. (2017) VirusDisease 28 (1): 69-80.
7. Bhor SA et al. (2017) VirusDisease 28 (1): 81-92.
8. Islam S et al. (2020) Int J Mol Sci 21: 4202 (本研究の成果).
9. Islam S et al. (2020) Int J Mol Sci 21: 7044 (本研究の成果).
10. Sun T. et al. (2015) Nat Commun 6: 10159.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shaikhul Islam, Sachin Ashok Bhor, Keisuke Tanaka, Hikaru Sakamoto, Takashi Yaeno, Hidetaka Kaya and Kappei Kobayashi	4. 巻 21
2. 論文標題 Impaired Expression of Chloroplast HSP90C Chaperone Activates Plant Defense Responses with a Possible Link to a Disease-Symptom-Like Phenotype	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21124202	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 Shaikhul Islam, Sachin Ashok Bhor, Keisuke Tanaka, Hikaru Sakamoto, Takashi Yaeno, Hidetaka Kaya and Kappei Kobayashi	4. 巻 21
2. 論文標題 Transcriptome Analysis Shows Activation of Stress and Defense Responses by Silencing of Chlorophyll Biosynthetic Enzyme CHL1 in Transgenic Tobacco	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21197044	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Islam S, Tanaka K, Sakamoto H, Yaeno T, Kobayashi K
2. 発表標題 Two Different Pathways Activate Plant Immune-like Responses that lead to chlorosis development in Transgenic Tobacco Models
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 Unung OO, Mori I, Goda H, Fujita Y, Kaya H, Kobayashi K
2. 発表標題 Rapid activation of salicylic acid and systemic acquired resistance pathways by induced knock-down of HSP90C
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会関西部会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kobayashi K, Nishiguchi M (Eds.)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 292
3. 書名 Antiviral Resistance in Plants	

〔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
研究 分担者	賀屋 秀隆  (Kaya Hidetaka)  (80398825)	愛媛大学・農学研究科・准教授    (16301)	

	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 協力者	イスラム シャイクル  (Islam Shaikhul)		博士課程修了生
研究 協力者	ウヌン オコン オディオ  (Unung Okon Odiong)		博士課程在学学生
研究 協力者	合田 光  (Goda Hikaru)		学部卒業生
研究 協力者	藤田 結衣  (Fujita Yui)		学部卒業生

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
---------	---------