

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580057

研究課題名（和文） 青枯病菌の感染を制御する植物生体膜リン脂質代謝機構を解明する

研究課題名（英文）

Analysis of phospholipid turnovers in plant membrane systems that regulates infection of bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum*

研究代表者

木場 章範 (KIBA AKINORI)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授

研究者番号：50343314

研究成果の概要（和文）：青枯病は土壌伝染性の難防除・細菌性病害である。病原性・非病原性青枯病菌を接種した *Nicotiana* 植物より、リン脂質代謝に関わると推定される *Sec14P* タンパク質とフォスファチジン酸フォスファターゼ（PAP）を見出した。*SEC14P* はリン脂質代謝の制御を介して植物免疫の活性化を導くことがわかった。一方、PAP はシグナルリン脂質の分解を介して青枯病に対する抵抗性を負に制御していることを示した。

研究成果の概要（英文）：*Ralstonia solanacearum* causes bacterial wilt in several economically important solanaceous. We isolated *Sec14P* and phosphatidic acid phosphatase (PAP), which are candidate genes related to plant immune response. From our results, *Sec14P* activate plant immune responses by the regulation of phospholipid turnover. In contrast, PAP negatively regulates plant defense responses by degradation of signaling phospholipids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：リン脂質、フォスファチジン酸、植物免疫

## 1. 研究開始当初の背景

青枯病は *Ralstonia solanacearum* によって引き起こされる土壌伝染性の難防除・細菌

性病害である。申請者は *Nicotiana* 植物をモデルに青枯病発病の成否に関わる植物の分子応答機構について解析を進めている。病原

性・非病原性青枯病菌を接種した *Nicotiana* 植物より青枯病菌感染応答性遺伝子の遺伝子発現プロファイルと機能解析を進める過程で、リン脂質代謝に関わると推定される酵母のフォスファチジルイノシトール輸送タンパクである Sec14P タンパク質のホモログとフォスファチジン酸フォスファターゼ (PAP) を見出した。このことから、“イノシトールリン脂質を中心とした、リン脂質のターンオーバーが青枯病菌の感染→発病の制御に重要な役割をもつ”と判断できる。

## 2. 研究の目的

本研究では Sec14P、PAP の植物免疫応答における役割を中心に解析を進めた。さらに、上記 2 タンパク質に加え、リン脂質代謝に関連するフォスホオリパーゼ C (PLC)、およびフォスホオリパーゼ D (PLD)、ジアシルグリセロールキナーゼ (DAGK) に着目し、青枯病菌の感染制御、青枯病発病制御におけるリン脂質代謝の役割について解析を進めた。

## 3. 研究の方法

リン脂質代謝酵素の植物免疫における役割の解明

*Nicotiana benthamiana* とジャガイモ X ウイルベクターを用いた、遺伝子の一過的ノックダウン系を用いて、リン脂質代謝酵素遺伝子抑制形質転換植物を作成する。本研究ではフォスファチジルイノシトール輸送タンパクである Sec14P タンパク質とフォスファチジン酸フォスファターゼ (PAP) に関する遺伝子のノックダウン植物を作成し解析に用いる。遺伝子のノックダウン植物および対照植物に青枯病菌を接種し、病原体の増殖、発病、防御関連遺伝子の発現を解析する。さらに、青枯病菌以外にも *N. benthamiana* に病原性を示すタバコ野火病菌、タバコ黄かさ細菌病菌を接種し、病原体の増殖推移と発病を調査する。

### リン脂質代謝酵素遺伝子の機能解析

Sec14P および PAP のタンパク質機能は温度感受性変異酵母を用いた機能相補実験により行う。高温 (37°C) で致死の Sec14P 変異株 ( $\Delta$  Sec14P<sup>TS</sup>)<sup>2)</sup> および PAP 変異株 ( $\Delta$ lpp $\Delta$ dpp1 $\Delta$ pah1)<sup>3)</sup> に恒常発現プロモーター制御下で *N. benthamiana* 由来の Sec14P および PAP を形質転換する。高温条件下での生育能の回復を指標に Sec14P および PAP のタンパク質機能を証明する。さらに、小麦胚芽の *in vitro* 翻訳システムを用いてタンパク質の合成、および精製を行う。合成したタンパク質を用いて、Sec14P については *in vitro* のフォスファチジルイノシトール、フォスファチジルコリンを基質としたリン脂質輸送活性を測定する。PAP については PA を基質とし、脱リン酸化の結果生成されるジアシル

グリセロールを定量することにより、*in vitro* の PAP 活性を評価する。これに加えて、PAP については遺伝子ノックダウン植物よりタンパク質を抽出し、粗抽出タンパク質画分における PAP 活性を測定する。

## 4. 研究成果

*N. benthamiana* 由来の SEC14P は *in vitro* でフォスファチジルイノシトール、フォスファチジルコリンの輸送能を有すること、および酵母の温度感受性 sec14 変異株の高温における生育を相補した。そのことから、典型的な Sec14P の特徴を持つことが示された。また、Sec14 ノックダウン植物では免疫応答の低下が認められた。その過程で、PLC、PLD 等のリン脂質代謝酵素活性の低下が観察された。以上の結果から Sec14P は生体膜のリン脂質代謝酵素である PLC や PLD の活性を調製することによって、免疫応答に関わるシグナルリン脂質の生産を調製 (活性化) した結果、植物免疫の活性化を導くことがわかった。

一方、PAP タンパク質は *in vitro* でフォスファチジン酸を脱リン酸化する能力があることを明らかにした。また、酵母の温度感受性 PAP 変異株の高温における生育を相補した。このことから、PAP 活性を持つことが示された。さらに、PAP を抑制した植物では PAP 活性の低下とともに、フォスファチジン酸の蓄積が観察された。本 PAP ノックダウン植物では免疫応答が活性化し、青枯病、野火病等の広範囲の植物病原細菌に対して強い抵抗性を示した。これらの結果から、PA の生産が植物免疫の ON・OFF に重要であることが明らかになった。

現在は PA 合成に関連すると推定される DGK 遺伝子の単離を進めており、21 種の DGK 様遺伝子の単離に成功している。さらに、DGK 遺伝子のノックダウン系も確立することが出来た。今後は PA 合成 DGK 遺伝子の植物免疫制御における役割について解明を進める。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Kiba A, Nakatsuka T, Yamamura S, Nishihara M. Lipid transfer protein homolog from gentian has an antimicrobial property and confirms resistance to *Botrytis cinerea* in transgenic tobacco. *Plant Biotechnology*, in press, 2012 (査読有)

- ② Komori D, Nishihara M, Takahashi A, Gupta M, Yoshioka H, Mizumoto H, Ohnishi K, Hikichi Y, Kiba A. Isolation and characterization of an asparagine-rich protein that regulates hypersensitive cell death-mediated resistance in *Nicotiana* plants. *Plant Biotechnology*, in press, 2012 (査読有)
- ③ Maimbo M, Ohnishi K, Hikichi Y, Yoshioka H, Kiba A. (2010) S glycoprotein-like protein regulates defense responses in *Nicotiana* plants against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology*, 152, 2023-2035. (査読有)
- ④ Kiba A, Lee KY, Ohnishi K, Park P, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S, Hikichi Y. (2009) Induction of reactive oxygen generation and functional changes in mitochondria and their involvement in the development of bacterial rot in lettuce caused by *Pseudomonas cichorii*. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 74: 45-54. (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

1. 中野真人, 西原昌宏, 大西浩平, 曳地康史, 木場章範: ホスファチジン酸は植物免疫応答を制御する, 日本植物病理学会平成 24 年度大会, 福岡国際会議場, 3 月 28-30 日, 2012
2. Masahito Nakano, Masahiro Nishihara, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, and Akinori Kiba: Regulatory mechanisms of plant immunity by phosphatidic acid phosphatase, 2nd Korea-Japan Joint Symposium. Fukuoka, 3 月 27 日, 2012
3. 中野真人, 西原昌宏, 大西浩平, 曳地康史, 木場章範: 青枯病菌抵抗性におけるホスファチジン酸の関与. 日本植物生理学会第 53 回年会, 京都産業大学, 3 月 16-18 日, 2012
4. Kiba A, Nakano M, Yoshioka H, Ohnishi K, Hikichi Y: Sec14 phospholipids transfer protein regulates phospholipid turnover during plant immune responses. The 4th Asian Symposium on Plant Lipids. 2011, 12.2-4. The University of Hong Kong.
5. Nakano M, Nishihara M, Ohnishi K, Hikichi Y, Kiba A: Phosphatidic acid phosphatase acts as a molecular switch in the plant immune system. The 4th Asian Symposium on Plant Lipids. 2011, 12.2-4. The University of Hong Kong,
6. 中野真人, 西原昌宏, 大西浩平, 曳地康史, 木場章範: ホスファチジン酸ホスファターゼはタバコ植物における防御応答の制御に関与する. 植物微生物研究会第 21 回研究交流会, 岡山大学, 9 月 20-22 日, 2011
7. 木場章範, 中野真人, 大西浩平, 吉岡博文, 曳地康史: Sec14P を介したリン脂質代謝制御と植物免疫応答. 第 24 回植物脂質シンポジウム, 東京大学, 9 月 19-20 日, 2011
8. 中野真人, 西原昌宏, 大西浩平, 曳地康史, 木場章範: 病害抵抗性と感受性における植物リン脂質シグナルの役割~ホスファチジン酸脱リン酸化酵素について (2) ~, 第 24 回植物脂質シンポジウム, 東京大学, 9 月 19-20 日, 2011
9. 中野真人, 大西浩平, 曳地康史, 木場章範: ウイルス誘導遺伝子サイレンシング法を用いた耐病性植物の作出と解析. 第 29

- 回日本植物細胞分子生物学会大会, 福岡市, 9月6-8日, 2011 3-26. 福岡国際会議場
10. 中野真人、大西浩平、曳地康史、木場章範：ウイルス誘導ジーンサイレンシング法を用いた耐病性植物の作出と解析. 第29回日本植物細胞分子生物学会大会 2011. 9. 6-8 九州大学箱崎キャンパス
11. 中野真人、西原昌宏、大西浩平、曳地康史、木場章範：ホスファチジン酸ホスファターゼはタバコ植物における防御応答の制御に関与する  
植物微生物研究会第21回研究交流会 2011. 9. 20-22 岡山大学津島キャンパス
12. 中野真人、大西浩平、曳地康史、木場章範：病害抵抗性と感受性のスイッチングに関わるNbPAPの機能解析. 平成23年度日本植物病理学会大会 2011. 3. 27-29 東京農工大
13. 中野真人、大西浩平、曳地康史、木場章範：ホスファチジン酸脱リン酸化酵素は植物免疫を負に制御する. 第52回日本植物生理学会年会 2011. 3. 20-22 東北大学川内キャンパス
14. 中野真人、大西浩平、曳地康史、木場章範：ホスファチジン酸分解酵素であるNbPAPは病害感受性誘導因子である. 平成22年度日本植物病理学会大会, 京都国際会議場, 4月19日, 2010
15. Akinori Kiba: A *sec14P* phospholipids transfer protein regulates plant immunity in *Nicotiana* plants in response to phytopathogenic bacteria. 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, 宮崎市, 9月20-24日, 2010
16. 中野真人、大西浩平、曳地康史、木場章範：NbPAPは*Nicotiana*植物の病害感受性遺伝子である. 日本植物生理学会第51回年会, 熊本大学, 3月18-21日, 2010
17. 木場章範、大西浩平、吉岡博文、曳地康史：リン脂質代謝系は*Nicotiana*植物の防御応答の制御に関与する. 日本植物生理学会第51回年会, 熊本大学, 3月18-21日, 2010
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
木場 章範 (KIBA AKINORI)  
高知大学・教育研究部総合科学系・准教授  
研究者番号：50343314
- (2) 研究分担者  
曳地 康史 (HIKICHI YASUFUMI)  
高知大学・教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号：70291507
- 大西 浩平 (OHNISHI KOUHEI)  
高知大学・教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号：50211800