

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05597

研究課題名(和文) CEP ペプチドを介した植物免疫の新制御機構

研究課題名(英文) New regulatory mechanism on plant immunity via CEP peptide

研究代表者

豊田 和弘 (Toyoda, Kazuhiro)

岡山大学・環境生命自然科学学域・教授

研究者番号：50294442

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)：植物は自身の免疫を負に調節する因子(内生サブプレッサー)を備えている。これまでに、シロイヌナズナからの精製を進め、その1つが CEP5 ペプチドであることを明らかにした。実際、化学合成した CEP5 ペプチドで処理した植物体では MAMP 誘導性の ROS 生成やカロース生成は抑制され、本来感染しない不適応型菌による感染が成立する。本研究課題では、シロイヌナズナの CEP ペプチドのうち、グループ (CEP1-12) およびグループ (CEP13-15) から CEP1、3、5、グループ から CEP14 を合成し、これらの免疫や成長に対する作用の冗長性と特異性について示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

傷害や感染時に植物体内で生成される内生エリシターについての研究例は多数あるが、植物免疫を抑制する内生サブプレッサーの作用機構を明らかにしようとする研究は世界的にも少ない。このような状況の中、CEP5 ペプチドが、植物の免疫と成長を調節しうることから、それらのトレードオフを調節する有力な鍵分子であると考えられた。この研究の延長上には植物の「成長」と「防御」の人為的制御もあり、その仕組みを利用した作物生産が現実となれば食料生産に大きなインパクトを与え、波及効果は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：Plants constitutively possess certain factors that negatively regulate their own immunity. These are called as endogenous suppressors (ESs). Our attempt to purify the ES from Arabidopsis Col-0 revealed CEP5 peptide as one of potential ESs. Actually, in Arabidopsis plants pretreated with synthesized CEP5 peptide, MAMP-induced ROS and callose production were severely suppressed, allowing non-adapted bacteria to cause disease symptom. In this research, we synthesized CEP1, 3 and 5 from group I (CEP1-12) and CEP14 from group II (CEP13-15) of Arabidopsis CEP peptides and demonstrated the redundancy and specificity of their role in regulating immunity and growth.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物免疫 内生サブプレッサー CEP ペプチド 免疫抑制 シロイヌナズナ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「内生サプレッサー」については、健全なエンドウ葉から免疫抑制作用をもつ物質として初めて分離されて以来、その構造は長い間不明であった。2020年、シロイヌナズナ由来の物質の精製と構造解析に成功し、その1つが意外にも、名古屋大学・松林教授らが発見した全身的窒素獲得応答に関連する CEP ペプチドであることが分かった。本研究課題ではこれを受け、CEP ペプチドが介する植物免疫の調節機構の全容とその生物学的・病理学的意義についての実証を目指した。

2. 研究の目的

植物感染時における免疫調節の役割について明確にできれば、CEP ペプチドの新しい機能に留まらず、これを介した「成長」と「防御」のトレードオフという表裏一体の現象にも迫ることができる。内生サプレッサーは発見当初、植物にとって不利(不要)なものであり、その意義について否定的な見方が多かった。しかし、その正体が窒素獲得を介在するシグナル因子としての役割を兼ね備えていることが確かとなった今、「成長」と「防御」という相反する事象への CEP ペプチドの関与は想像に難くない。研究分野をリードし、世界に打って出る研究を展開していくために研究基盤をさらに強化することを目的とした。

3. 研究の方法

化学合成した CEP ペプチドで処理した植物体の不適応型菌に対する感受性誘導や MAMP 応答性の PTI 応答(ROS 生成、カロース生成など)の成否について調べた。一方で、全身的窒素獲得応答への関与については、各ペプチドで処理した幼苗における根の伸長停止を指標としてそれらの作用の有無を評価した。

また、CEP ペプチドの免疫応答における役割を明らかにする目的で、マト斑葉細菌病菌の強病原性株(DC3000)、タイプIII分泌装置欠損株(*AhrcC*)、非親和性菌として *AvrRpm1* 発現株ならびに不適応型病原菌としてタバコ野火病菌を接種したシロイヌナズナ植物体から全 RNA を抽出し、すべての CEP 遺伝子の挙動について qPCR で定量した。

4. 研究成果

(1) CEP ペプチドのアミノ酸配列に基づく系統解析

本研究で注目している CEP 遺伝子は、シロイヌナズナでは 15 種からなるファミリーを形成しており、すべての遺伝子から 23 種の成熟型 CEP ペプチドが生成される。アミノ酸配列による系統解析によれば、個々のペプチド配列に保存性が認められるが、グループI(CEP1~12)およびII(CEP13~15)のクレードに分類されることが分かった。

(2) CEP ペプチドの免疫ならびに全身的窒素獲得応答に対する作用

前記の系統解析の結果、シロイヌナズナの CEP ペプチドは 2 つクレードに分類されるが、アミノ酸配列が部分的に保存されていることから、個々のペプチドの機能には冗長性があるものと推測された。そこで、内生サプレッサーとして同定した CEP5 ペプチド以外にグループIから CEP1 と CEP3、グループIIから CEP14 を化学合成し、それらで処理した植物体の不適応型菌に対する感受性誘導や MAMP 応答性の PTI 応答(ROS 生成、カロース生成など)の成否について調べた。その結果、CEP ペプチドによる免疫抑制作用はグループ内(またはグループ間)で冗長性があることが示された。一方、これらの全身的窒素獲得応答への関与については、CEP ペ

ペプチドによる根の伸長停止を指標として調べたところ、グループIのペプチドには CEP1 に依存した作用が認められたが、CEP14 ペプチドにはないことが明らかとなった。以上から、全身の窒素獲得応答に關与する CEP ペプチドはグループIに限られており、CEP ペプチドの一部(グループ II)の機能は分化していることが示唆された。

(3) CEP 遺伝子の病原菌接種ならびに分子パターン処理に対する応答

シロイヌナズナ Col-0 に対して、トマト斑葉細菌病菌の病原性株(DC3000)、タイプIII分泌装置欠損株(*ΔhrcC*)、非親和性菌として *AvrRpm1* 発現株ならびに不適応型病原菌としてタバコ野火病菌を接種した植物体でのすべての CEP 遺伝子の挙動について qPCR で定量し、ヒートマップおよびクラスター解析を実施した。その結果、強い免疫応答を伴う病原菌の接種に反応してほぼすべての CEP 遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなった。すなわち、CEP 遺伝子は PTI や ETI に伴って誘導されること、さらに親和性の組み合わせでも拡大抵抗性の発現に伴って一部の CEP 遺伝子が誘導されることが分かった。事実、CEP 遺伝子は病原細菌由来の *flg22* の処理に反応して発現が増加することを確認している。以上から、CEP 遺伝子の発現に伴って生成する一群の CEP ペプチドは「過剰な免疫応答を未然に調節し、成長と防御の最適化を図る」という考え(仮説)を強く支持している。

(4) CEP 遺伝子の植物ホルモンによる制御

病原菌感染時における CEP 遺伝子の応答への植物ホルモンの關与について調べる目的で、シロイヌナズナ Col-0 ならびに *npr1-2* 変異体をサリチル酸で処理した。その結果、病原菌応答性の CEP 遺伝子の多くはサリチル酸の処理によって誘導され、その応答は *npr1-2* 変異体では部分的またはほぼ完全に抑制された。この結果は、CEP 遺伝子がサリチル酸による調節を受けていることを意味している。

(5) CEP 遺伝子の非生物学的ストレスに対する応答

CEP ペプチドの窒素飢餓(非生物学的ストレス)下での全 CEP 遺伝子(CEP1-15)の応答について解析した結果、窒素飢餓に反応してグループIの CEP 遺伝子が同調して誘導されたのに対して、グループIIの遺伝子に大きな変化は認められなかった。この結果は、病原菌応答時にはグループIIを含むほぼすべての遺伝子が活性化されたのとは対照的であった。グループIのペプチドの全身の窒素獲得応答(N 源獲得)への關与を考慮すると、病原菌感染時における CEP ペプチドの役割としては単に防御応答の収束(緩和)に留まらず、免疫応答に伴う N 源の消費を補償して防御応答収束後の成長プロセスへの円滑なシフトを可能にしているものと考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toyoda, K., Fitrianti, A.N., Itoh, C., Hasegawa, H., Matsui, H., Noutoshi, Y., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T.	4. 巻 125
2. 論文標題 CEP peptide, a family of conserved, secreted small peptides acts as an endogenous suppressor in Arabidopsis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological and Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 102019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pmpp.2023.102019	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 該当する

1. 著者名 豊田和弘, 白石友紀	4. 巻 55(9)
2. 論文標題 CEP ペプチドを介した植物免疫の制御機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 78-82
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 Fitrianti, A.N., Mai, T.M., Monden, H., Shiba, N., Matsui, H., Noutoshi, Y., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T., Toyoda, K.	4. 巻 88
2. 論文標題 CEP peptide induces susceptibility of Arabidopsis thaliana to non-adapted pathogens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 287-292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-022-01077-2	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 該当する

1. 著者名 豊田和弘・Aprilia Nur Fitrianti・Mai Thanh Luan・川崎達弘・門田日陽里・椎葉紀香・伊藤千晶・長谷川晴香・白石友紀	4. 巻 55
2. 論文標題 植物免疫を調節する病原体サプレッサーと内生サプレッサー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物病害研究のフロントライン - 病原体との熱き闘い - (竹下 稔・菅野善明・草場基章編)	6. 最初と最後の頁 49-59
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 該当する

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 長谷川晴香, 伊藤千晶, 澤田健太郎, 石田壮太, 松井英譲, 能年義輝, 一瀬勇規, 白石友紀, 豊田和弘
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける CEP ペプチドの成長と免疫に対する作用
3. 学会等名 平成 5 年度日本植物病理学会関西西部会
4. 発表年 2023年 ~ 2024年

1. 発表者名 石田壮太, 伊藤千晶, 長谷川晴香, 澤田健太郎, 松井英譲, 能年義輝, 一瀬勇規, 白石友紀, 豊田和弘
2. 発表標題 CEP14 ペプチドによるシロイヌナズナの免疫応答の制御
3. 学会等名 平成 5 年度日本植物病理学会関西西部会
4. 発表年 2023年 ~ 2024年

1. 発表者名 長谷川晴香, 石田壮太, 伊藤千晶, 松井英譲, 能年義輝, 一瀬勇規, 白石友紀, 豊田和弘
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける CEP ペプチドの成長と免疫に対する作用 (2) CEP 遺伝子群の生物学的および非生物学的ストレスに対する応答
3. 学会等名 平成 6 年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年 ~ 2024年

1. 発表者名 Toyoda, K.
2. 発表標題 CEP peptides, a family of conserved, secreted small peptides act as endogenous suppressors in Arabidopsis
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Itoh, C., Hasegawa, H., Fitrianti, A.N., Matsui, H., Noutoshi, Y., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T., Toyoda, K.
2. 発表標題 CEP peptides, a family of conserved, secreted peptides that negatively modulate Arabidopsis immunity I. Potential role during PTI and ETI
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hasegawa, H., Itoh, C., Fitrianti, A.N., Matsui, H., Noutoshi, Y., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T., Toyoda, K.
2. 発表標題 CEP peptides, a family of conserved, secreted peptides that negatively modulate Arabidopsis immunity II. CEP peptide attenuates SA-mediated immunity
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤千晶, 長谷川晴香, Aprilia Nur Fitrianti, 松井英謙, 山本幹博, 能年義輝, 一瀬勇規, 白石友紀, 豊田和弘
2. 発表標題 保存され分泌されるペプチドのファミリーである CEP ペプチドはシロイヌナズナの免疫を負に調節する(3) CEP ペプチドは PTI および ETI を抑制する
3. 学会等名 植物微生物研究会第31回研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川晴香, 伊藤千晶, Aprilia Nur Fitrianti, 松井英謙, 山本幹博, 能年義輝, 一瀬勇規, 白石友紀, 豊田和弘
2. 発表標題 保存され分泌されるペプチドのファミリーである CEP ペプチドはシロイヌナズナの免疫を負に調節する(4) CEP ペプチドはサリチル酸を介した免疫を抑制する
3. 学会等名 植物微生物研究会第31回研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤千晶, 長谷川晴香, Aprilia Nur Fitrianti, 松井英謙, 山本幹博, 能年義輝, 一瀬勇規, 白石友紀, 豊田和弘
2. 発表標題 病原体感染およびサリチル酸に応答したシロイヌナズナにおける CEP 遺伝子の誘導
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

1. 発表者名 豊田和弘
2. 発表標題 植物免疫を調節する病原体サプレッサーと内生サプレッサー
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会第53回植物感染生理談話会(招待講演)
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 伊藤千晶・小原七海・佐藤穂高・市成光広・山田 晶・櫻本和生・白石 慎・山本 隆・松井英謙・能年義輝・山本幹博・一瀬勇規・白石友紀・豊田和弘
2. 発表標題 メトミノストロピンの抵抗性誘導作用に関する研究 9. シロイヌナズナにおける PTI および SAR 関連遺伝子の発現に対する影響
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会第53回植物感染生理談話会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 木元菜々子・高須瑞穂・Aprilia Nur Fitrianti・松井英謙・能年義輝・山本幹博・一瀬勇規・白石友紀・豊田和弘
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける MAMP 誘導性 ROS バーストにおけるペルオキシダーゼの寄与
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会第53回植物感染生理談話会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 伊藤千晶・小原七海・佐藤穂高・市成光広・山田 晶・櫻本和生・白石 慎・山本 隆・松井英讓・能年義輝・山本幹博・一瀬勇規・白石友紀・豊田和弘
2. 発表標題 メトミノストロピンの抵抗性誘導作用に関する研究 8. シロイヌナズナにおける ROS パースト, MAP キナーゼならびに防御関連遺伝子の発現に対する影響
3. 学会等名 植物微生物研究会第30回研究交流会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 木元菜々子・高須瑞穂・Aprilia Nur Fitrianti・松井英讓・能年義輝・山本幹博・一瀬勇規・白石友紀・豊田和弘
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける MAMP 誘導性 ROS パーストの分子機構
3. 学会等名 植物微生物研究会第30回研究交流会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Aprilia Nur Fitrianti, Chiaki Itoh, Haruka Hasegawa, Hidenori Matsui, Yoshiteru Noutoshi, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose, Tomonori Shiraishi, Kazuhiro Toyoda
2. 発表標題 CEP5 peptide negatively modulates defense responses in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 植物微生物研究会第30回研究交流会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Aprilia Nur Fitrianti, Chiaki Itoh, Haruka Hasegawa, Hidenori Matsui, Yoshiteru Noutoshi, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose, Tomonori Shiraishi, Kazuhiro Toyoda
2. 発表標題 CEP peptide suppresses innate immunity and promotes disease development in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 伊藤千晶・小原七海・佐藤穂高・市成光広・山田 晶・櫻本和生・白石 慎・山本 隆・松井英讓・能年義輝・山本幹博・一瀬勇規・白石友紀・豊田和弘
2. 発表標題 メトミノストロピンの抵抗性誘導作用に関する研究 7. シロイヌナズナにおける PTI および SAR 関連遺伝子の発現に対する影響
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 木元菜々子・高須瑞穂・Aprilia Nur Fitrianti・松井英讓・能年義輝・山本幹博・一瀬勇規・白石友紀・豊田和弘
2. 発表標題 シロイヌナズナの MAMP 誘導性免疫における細胞壁ペルオキシダーゼと NADPH オキシダーゼの関与
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Aprilia Nur Fitrianti・伊藤千晶・長谷川晴香・松井英讓・能年義輝・山本幹博・一瀬勇規・白石友紀・豊田和弘
2. 発表標題 非親和性および不適応型病原細菌を接種したシロイヌナズナ葉における CEP 遺伝子の応答
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年～2022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
---------------------------	-----------------------	----

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