

## 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25年5月8日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580051

研究課題名（和文）

植物細胞壁における異物認識・情報伝達・防御応答のダイナミズム

研究課題名（英文） DYNAMISM OF PERCEPTION OF PATHOGEN SIGNALS, SIGNALING AND REGULATION OF DEFENSES IN PLANT CELL WALLS

研究代表者

豊田 和弘 (TOYODA KAZUHIRO)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：50294442

研究成果の概要（和文）：植物に固有の細胞壁が病原体による感染を未然に防ぐ物理的な障壁となることは周知の事実であるが、外界からの生物学的あるいは化学的な情報を受信（認識）し、それらを正確に伝達して細胞あるいは組織全体の防御機構を成立させる動的な小器官であることが最近の申請者らの研究によって明らかとなってきた。本研究は、細胞の外側で行われる高次の情報処理システムの分子基盤について、病理学の視点からメスを入れ、細胞（組織）の統御と恒常性の維持を図る植物細胞壁の新たな機能に迫るものである。

研究成果の概要（英文）：Plant cell wall is well known to act as physical barriers against invading pathogens. However, our recent studies have suggested that plant cell wall likely employs the perception of pathogen signals, signaling and regulation of cell wall-based defense. In this study, we focus on an undiscovered role(s) of the plant cell wall in plant-pathogen interactions, to unravel the complicated system to sustain or control the plant immunity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生産環境農学、植物保護科学

キーワード：植物細胞壁、認識、情報伝達、防御応答

### 1. 研究開始当初の背景

ほとんどの植物は大地に根を張り、その場所で様々な環境ストレスに適応して生活環を全うする。病原体による感染が生存を脅かす要因の1つであることは言うまでもないが、長い間、植物の細胞壁が感染を未然に防ぐ単なる物理的な障壁であると考えられてきた。この様な状況の中、植物細胞壁が外界からの生

物的あるいは化学的な情報を積極的に受信（認識）し、それらを正確に伝達して細胞あるいは組織全体の防御機構を成立させる動的な小器官であることが申請者らの最近の研究によって次第に明らかとなってきた。本研究は、細胞の外側で行われる高次の情報処理システムの分子基盤について、病理学の視点か

らメスを入れ、細胞（組織）の統御と恒常性の維持を図る植物細胞壁の新たな機能に迫るものである。つまり、外環境に常に曝されながらも、種と多様性を維持してきた植物の卓越した環境適応能力を保障する植物細胞壁の新たな役割について、最新の解析技術で紐解くものである。

## 2. 研究の目的

本研究の最大の特徴は、植物細胞壁に存在するエクト型 ATPase（アピラーゼ）を分子標的とする病原糸状菌由来のサプレッサー（抵抗性抑制因子）の作用機序の解析を通して、細胞壁が独自に備える異物認識機構とその回避の仕組みについて明らかにする点にある。申請者らはすでに、細胞壁に存在するエクト型 ATPase の近傍には複数の免疫機構に関連したタンパク質が存在し、これらと協調して細胞壁での防御応答を成立させていることを示してきた。逆に言えば、ATPase の機能低下（活性抑制）が免疫不全を引き起こし、結果として病原体による感染を許すという考えである。本研究では、この細胞壁 ATPase を免疫応答の「マスター酵素」と位置付け、これを起点とするタンパク間相互作用、細胞壁で生成する抗感染物質、さらには細胞内部への情報発信の動態について解析し、免疫反応の成立・不成立を司る細胞壁情報分子の相互作用について明らかにすることを目指している。

## 3. 研究の方法

マメ科のモデル植物である *Medicago truncatula*（タルウマゴヤシ）ならびにエンドウの芽生えを材料として、細胞壁に局在するエクト型 ATPase（アピラーゼ）が複数のタンパク質と複合体（450~700 kDa）を形成していることを明らかにしてきた。本複合体は、分離した細胞壁画分から 1 M 塩化ナトリウムで可溶化され、1 構成分子であるペルオキシ

ダーゼ ( $O_2^-$  生成酵素) やジアミノキシダーゼ ( $H_2O_2$  生成酵素) は、病原菌由来のエリシターやサプレッサーの処理で活性が調節される。さらに、これらの活性は ATPase の特異的阻害剤（バナジン酸や NGXT191）の処理によって同調して抑制されたことから、構成分子の活性が ATPase からの調節を受けているものと推測された。本研究では、細胞壁での病原体認識と免疫応答を調節する「マスター酵素」としての ATPase の役割について一層明確にするとともに、これを起点とする情報伝達機構について解析する。

## 4. 研究成果

エンドウの細胞壁タンパク質を調製し、Blue-Native 電気泳動で解析した結果、エクト型 ATPase は  $H_2O_2$  生成酵素の 1 つであるジアミノキシダーゼと共精製され、この活性が ATPase と同調して調節されることが明らかとなった。一方、エンドウ褐紋病菌由来のサプレッサーならびに ATPase 阻害剤を用いた解析から、ATPase の活性阻害とジャスモン酸を介した情報伝達系の亢進は深く関連すること、さらに、ジャスモン酸合成に関与する遺伝子を発現抑制したエンドウでは、本菌に対する感受性（罹病性）が著しく低下することなどが明らかとなった。これらの結果より、サプレッサーは宿主の細胞壁 ATPase を標的とし、この活性抑制がジャスモン酸合成を促進し、生成するジャスモン酸を介してサリチル酸に依存した防御機構を一時的に阻害することで自身の感染を有利にしているものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）

- 1) Toyoda, K., Kawanishi, Y., Kawamoto, Y., Kurihara, C., Yamagishi, N., Tamura, A., Yoshikawa, N., Inagaki, Y., Ichinose,

- Y. and Shiraishi, T., Suppression of *lipoxygenase (LOX)*-, *allene oxide synthase (AOS)*-, *allene oxide cyclase (AOC)* and *12-oxo-phytodienoic acid reductase (OPR)*-mRNA in pea reduces the sensitivity to a phytotoxin coronatine and disease development by *Mycosphaerella pinodes*. *Journal of General Plant Pathology* 2013, 79 (印刷中). 査読有
- 2) Amano, M., Toyoda, K., Kiba, A., Inagaki, Y., Ichinose, Y., and Shiraishi, T., Plant cell walls as suppliers of potassium and sodium ions for induced resistance in pea (*Pisum sativum* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *Journal of General Plant Pathology* 2013, 79: 12-17. 査読有
- 3) Toyoda, K., Ikeda, S., Morikawa, J., Hirose, M., Maeda, A., Suzuki, T., Inagaki, Y., Ichinose, Y., and Shiraishi, T., The *Medicago truncatula*-*Mycosphaerella pinodes* interaction: A new pathosystem for dissecting fungal-suppressor-mediated disease susceptibility in plants. *Journal of General Plant Pathology* 2013, 79: 1-11. 査読有
- 4) Toyoda, K., Yasunaga, E., Niwa, M., Ohwatari, Y., Nakashima, A., Inagaki, Y., Ichinose, Y., Shiraishi, T., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by copper amine oxidase, a component of the ecto-apyrase (ATPase)-containing protein complex(es) in the pea cell wall, is regulated by an elicitor and a suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Journal of General Plant Pathology* 2013, 78: 311-315. 査読有
- 5) Meguro, A., Toyoda, K., Ogiyama, H., Hasegawa, S., Nishimura, T., Kunoh, H., and Shiraishi, T., Genes expressed in tissue-cultured seedlings of mountain laurel (*Kalmia latifolia* L.) with colonizing *Streptomyces padanus* AOK30. *Journal of General Plant Pathology* 2013, 78: 303-310. 査読有
- [学会発表] (計32件)
- 1) 茶谷真菜美・大河摩祐・田中佳織・稲垣善茂・一瀬勇規・豊田和弘・白石友紀、ササゲにおけるペルオキシダーゼ依存性細胞外オキシダティブースト反応の分子機構、平成25年度日本植物病理学会大会、2013. 3. 27-29、岐阜大学
- 2) 飯尾賢太郎・鎌田智絵・渡辺智和・泉実・稲垣善茂・一瀬勇規・豊田和弘・白石友紀、エンドウの感染阻害物質 dihydromaleimide の抵抗性誘導効果、平成25年度日本植物病理学会大会、2013. 3. 27-29、岐阜大学
- 3) 田中佳織・豊田和弘・茶谷真菜美・住井紀子・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、ペルオキシダーゼ依存性細胞外オキシダティブースト反応は、ササゲやエンドウにおける非宿主抵抗性に関与する、平成25年度日本植物病理学会大会、2013. 3. 27-29、岐阜大学
- 4) 田中佳織・豊田和弘・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、細胞外 ATP によるオキシダティブースト反応の制御、平成24年度日本植物病理学会関西部会、2012. 9. 27-28、鳥取市
- 5) 豊田和弘・石井寛子・山岸紀子・吉川信行・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、エンドウにおけるサリチル酸を介した防御

- 応答は褐紋病菌に対する侵入抵抗性に関与している、平成24年度日本植物病理学会関西西部会、2012.9.27-28、鳥取市
- 6) 飯尾賢太郎・鎌田智絵・渡辺智和・泉実・稲垣善茂・一瀬勇規・豊田和弘・白石友紀、エンドウの感染阻害物質 dihydromaleimide の局部および全身抵抗性における役割、第22回（2012年）植物微生物研究会研究交流会、2012.9.25-27、神戸大学
- 7) 田中佳織・豊田和弘・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、サブプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション法による *Medicago truncatula* からの細胞外 ATP 応答性遺伝子のスクリーニング、第22回（2012年）植物微生物研究会研究交流会、2012.9.25-27、神戸大学
- 8) 豊田和弘・石井寛子・山岸紀子・吉川信行・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、エンドウにおけるサリチル酸を介した防御応答は褐紋病菌に対する侵入抵抗性に関与している、第22回（2012年）植物微生物研究会研究交流会、2012.9.25-27、神戸大学
- 9) Meguro, A., Toyoda, K., Ogiyama, H., Hasegawa, S., Nishimura, T., Kunoh, H. and Shiraishi, T., Genes expressed in tissue-cultured seedlings of mountain laurel (*Kalmia latifolia* L.) with colonizing *Streptomyces padanus* AOK30, XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012.7.29-8.2, Kyoto, Japan
- 10) Iio, K., Kamada, C., Watanabe, T., Izumi, M., Inagaki, Y., Ichinose, Y., Toyoda, K. and Shiraishi, T., Infection inhibitor(s) generated in the cell wall preparation from *Pisum sativum* L., XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012.7.29-8.2, Kyoto, Japan
- 11) Uchioki, M., Toyoda, K., Tanaka, K., Takagi, M., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T., The apoplastic oxidative burst and induced extracellular defense: production of an anti-fungal compound(s) in the extracellular space of cowpea leaves challenged with the fungal elicitor, XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012.7.29-8.2, Kyoto, Japan
- 12) Tanaka, K., Toyoda, K., Yamagishi, N., Yoshikawa, N., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T., Extracellular apyrase (ecto-ATPase) regulates the peroxidase-catalyzed apoplastic oxidative burst in cowpea (*Vigna sinensis* Endl.): implication in nonhost resistance, XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012.7.29-8.2, Kyoto, Japan
- 13) Toyoda, K., Plant cell wall is the first line of defense: a host-specific modulation for induced susceptibility, XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012.7.29-8.2, Kyoto, Japan
- 14) Toyoda, K., Shiobara, Y., Nagai, H., Kawakami, E., Amano, M., Tanaka, K., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T., Cell wall-associated apyrase, a key player for conditioning susceptibility/resistance in plant-pathogen interactions, The 3<sup>rd</sup>

- International Ascochyta Workshop, 2012. 4. 22-26, Córdoba, Spain
- 15) Tanaka, K., Toyoda, K., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T., Extracellular apyrase participates in elicitor-induced superoxide generation and impacts on non-host resistance of cowpea, The 3<sup>rd</sup> International Ascochyta Workshop, 2012. 4. 22-26, Córdoba, Spain
- 16) 田中佳織・豊田和弘・山岸紀子・吉川信行・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、アピラーゼは ATP の加水分解を介して細胞外ペルオキシダーゼに依存した  $O_2^-$  生成を調節し、細胞壁での防御応答に関与している、平成24年度日本植物病理学会大会、2012. 3. 28-30、福岡市
- 17) 山本智樹・豊田和弘・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、エンドウ褐紋病菌は宿主の ATPase を標的とし、ジャスモン酸シグナル伝達系を介して定着や病斑形成を促進している!?, 平成24年度日本植物病理学会大会、2012. 3. 28-30、福岡市
- 18) 飯尾賢太郎・鎌田智絵・渡辺智和・泉実・稲垣善茂・一瀬勇規・豊田和弘・白石友紀、エンドウ細胞壁で生成される感染阻害物質、平成24年度日本植物病理学会大会、2012. 3. 28-30、福岡市
- 19) 内沖真紀・豊田和弘・田中佳織・高木麻衣・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、エリシター処理したササゲで生成される感染阻害因子、平成24年度日本植物病理学会大会、2012. 3. 28-30、福岡市
- 20) Tanaka, K., Toyoda, K., Yamagishi, N., Yosikawa, N., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T., Cell wall-associated apyrase, a key regulator of extracellular peroxidase-catalyzed superoxide generation, contributes to non-host resistance of cowpea (*Vigna sinensis* Endl.), The 2<sup>nd</sup> Korea-Japan Joint Symposium, 2012. 3. 27-29, Fukuoka, Japan
- 21) Yamamoto, S., Toyoda, K., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T., The role of jasmonic acid-mediated signaling in conditioning susceptibility in *Medicago truncatula* and pea (*Pisum sativum* L.), The 2<sup>nd</sup> Korea-Japan Joint Symposium, 2012. 3. 27-29, Fukuoka, Japan
- 22) Uchioki, M., Toyoda, K., Tanaka, K., Takagi, M., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T., Elicitor-induced generation of superoxides and infection-inhibitor(s) in cowpea (*Vigna sinensis* Endl.), The 2<sup>nd</sup> Korea-Japan Joint Symposium, 2012. 3. 27-29, Fukuoka, Japan
- 23) 田中佳織・豊田和弘・山岸紀子・吉川信行・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、ササゲにおける細胞外ペルオキシダーゼを介した活性酸素生成と細胞壁アピラーゼによる制御、日本植物生理学会第53回年会、2012. 3. 16-18、京都産業大学
- 24) 田中佳織・豊田和弘・山岸紀子・吉川信行・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、ササゲの細胞壁アピラーゼ VsNTPase1 は細胞外ペルオキシダーゼに依存した  $O_2^-$  生成を制御し、非宿主抵抗性を担っている、平成23年度日本植物病理学会関西西部会、2011. 9. 30-10. 1、高松市
- 25) 山本智樹・川本優理子・川西由利子・森実まゆみ・栗原千明・稲垣善茂・一瀬勇規・豊田和弘・白石友紀、エンドウ褐紋

- 病菌に対する罹病性成立における宿主のジャスモン酸シグナル伝達系の役割、第21回（2011年）植物微生物研究会研究交流会、2011.9.20-22、岡山大学
- 26) 天野政史・豊田和弘・木場章範・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、病原菌シグナルによる植物の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  エフラックスの制御、第21回（2011年）植物微生物研究会研究交流会、2011.9.20-22、岡山大学
- 27) 田中佳織・豊田和弘・山岸紀子・吉川信行・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、ササゲの細胞壁アピラーゼ VsNTPase1 の発現抑制はペルオキシダーゼを介した  $\text{O}_2^-$  生成を低下させ、非病原菌であるエンドウ褐紋病菌の感染を可能にする、第21回（2011年）植物微生物研究会研究交流会、2011.9.20-22、岡山大学
- 28) Toyoda, K., Morizane, M., Kawamoto, Y., Kawanishi, Y., Yamamoto, S., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T., Jasmonate signaling in *Medicago truncatula* and its role in conditioning susceptibility in the interaction with the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella pinodes*, Model Legume Congress 2011, 2011.5.15-19, Sainte Maxime, France
- 29) Tanaka, K., Takahashi, H., Amano, M., Inagaki, Y., Ichinose, Y., Toyoda, K. and Shiraishi, T., Role of cell wall-associated ATPase/apyrase in cowpea-*Mycosphaerella pinodes* nonhost interaction, Model Legume Congress 2011 (Sainte-Maxime, France 2011.5.15-19)
- 30) 鎌田智絵・渡辺智和・泉 実・稲垣善茂・一瀬勇規・豊田和弘・白石友紀、エンドウ細胞壁で生成する感染阻害物質、平成

23年度日本植物病理学会大会、  
2011.3.27-3.29、東京農工大学

- 31) 小倉智史・豊田和弘・多賀正節・稲垣善茂・一瀬勇規・白石友紀、エンドウ褐紋病菌の核型解析、平成22年度日本植物病理学会関西西部会、2010.9.30-10.1、福井市
- 32) 川本優理子・川西由利子・稲垣善茂・一瀬勇規・豊田和弘・白石友紀、*Medicago truncatula* におけるジャスモン酸合成系遺伝子とそれらのサプレッサーによる制御、平成22年度日本植物病理学会大会、2010.4.18-20、京都市

〔図書〕（計1件）

- 1) Toyoda, K., Kawamoto, Y., Kawanishi, Y., Niwa, M., Takahashi, H., Suzuki, T., Kasai, T., Takahara, H., Amano, M., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. Suppression of defense-The role of fungal suppressors in conditioning plant susceptibility. In: Wolpert T, Shiraishi T, Collmer A, Akimitsu K, Glazebrook J (eds) Genome-Enabled Analysis of Plant-Pathogen Interactions. APS Press, St. Paul, Minnesota, 2011, pp. 139-147.

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊田 和弘 (TOYODA KAZUHIRO)

岡山大学・大学院環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：50294442