

## 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 31 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580156

研究課題名（和文） 新規ジカルボン酸によってシラカンバ幼植物体内に誘導される全身植物免疫機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanisms for systemic plant immunity induced in the Japanese birch plantlet treated with a new dicarboxylic acid

研究代表者

横田 信三 (YOKOTA SHINSO)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：60210613

研究成果の概要（和文）：3ヶ月生のシラカンバ幼植物体に、サリチル酸(SA)またはアゼライン酸(AA)を投与した。処理後2日目に、各植物体からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動で分離後、処理特異的タンパク質を検出した。これらの特異的タンパク質を解析した結果、SA処理では11種類、AA処理では8種類のタンパク質を同定することが出来た。前者で同定されたタンパク質は、エネルギー生産、代謝及びタンパク質合成に関与するものであった。一方、後者で同定されたタンパク質は、光呼吸代謝、糖代謝及びアスコルビン酸生合成、脂肪酸分解、光合成、光化学系I、防御応答、及び分子シャペロンに関与するものであった。得られた結果から、SA及びAAとも、シラカンバ幼植物体内に全身植物免疫を誘導するために、一次代謝及びエネルギー生産を活性化させるが、それぞれの誘導機構が異なることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Salicylic acid (SA) or azelaic acid (AA) were administered to 3-month-old Japanese birch plantlets. Two days after the treatments, proteins were extracted from the plantlets, separated by two-dimensional electrophoresis, and then the treatment-specific proteins were detected. As the results of analyses of these proteins, 11 and 8 kinds of proteins were identified from SA and AA treatments, respectively. The formers were involved in energy production, metabolisms, and protein syntheses, while the latters in photorespiration metabolism, sugar metabolism and ascorbic acid biosynthesis, fatty acid degradation, photosynthesis, photosystem I, defensive response, and molecular chaperone. Based on the obtained results, it was clarified that both SA and AA activate primary metabolism and energy production to induce systemic plant immunity in Japanese birch plantlet, although the induction mechanisms are different between them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：森林生態・保護・保全、樹病、菌類病、プロテオミクス、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の免疫には、基礎免疫と先天性免

疫があるが、病原体に対する病原抵抗性において重要なのは、先天性免疫である。先天性免疫には、病原体関連分子パターン誘発性免疫とエフェクター誘発性免疫がある。

(2) 2009年に、細菌に感染したシロイヌナズナの維管束液汁から、炭素数9のジカルボン酸であるアゼライン酸が検出されており、この化合物をシロイヌナズナに投与すると、全身獲得抵抗性(SAR)を誘導するサリチル酸が蓄積し、全身植物免疫が誘導されることが見出されている。

(3) これまで研究代表者が行ってきた研究において、カンバ類の癌腫病菌カバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体内に、炭素数の異なる新規のジカルボン酸が生成していることが示唆されている。また、植物体内に、感染初期特異的タンパク質として2種類のヒートショックタンパク質(Hsp70, Hsp60)及びグルタチオン *S*-トランスフェラーゼが生成することを見出した。これらのタンパク質は、オキシダティブバースト(OB)及びSARに関与するタンパク質であり、これら2つの機構(OBとSAR)が、菌に感染したシラカンバ幼植物体内で生じていることが判明した。

## 2. 研究の目的

本研究では、カバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体に生成すると考えられる、新規ジカルボン酸及びアゼライン酸を抽出し、同定・定量する。次に、新規ジカルボン酸又はアゼライン酸を幼植物体に投与し、植物体内に蓄積すると予想されるサリチル酸を定量する。また、新規ジカルボン酸又はアゼライン酸を幼植物体に投与し、処理後1週間、定期的に植物体からタンパク質を抽出する。得られたタンパク質をプロテオーム解析の手法によって、処理特異的タンパク質を検出・同定する。得られるデータを基に、新規ジカルボン酸又はアゼライン酸が、シラカンバ幼植物体に誘導する全身植物免疫機構を分子レベルで解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 無菌シラカンバ・クローン幼植物体 No. 8の腋芽を、Murashige & Skoog培地に2% ショ糖、2.5µM インドール酪酸、0.1µM α-ナフタレン酢酸及び1%寒天を添加した培地で培養し、3ヶ月生の幼植物体を大量に育成した。得られた幼植物体は、3ヶ月毎に同組成の培地で腋芽培養により、継代・増殖させた。

(2) 幼植物体の茎頂から3番目の節間にメスで傷を付け、ここに0.5mMサリチル酸(SA)水溶液1µLを投与した( $T_{SA}$ )。対照として、無処理のもの(C1)及び傷を付けて超純水1µL投与したもの(C2<sub>SA</sub>)も用意した。処理後2日

目に、各植物体からタンパク質を抽出し、これを二次元電気泳動にかけ、ゲルをクーマシーブリアントブルー(CBB)染色した。各処理区のゲルを画像解析し、 $T_{SA}$ 特異的タンパク質を検出した。同様に、別の $T_{SA}$ タンパク質サンプルを二次元電気泳動し、CBB染色後、 $T_{SA}$ 特異的タンパク質スポットをゲルから切り出した。これらのゲルをトリプシンによりゲル内消化し、得られたペプチドを高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)により分析した。得られたシークエンスタグ・データをデータベース検索し、相当するタンパク質を同定した。

(3) SAの場合と同様に、シラカンバ幼植物体の第三節間に傷をつけ、ここに1mMアゼライン酸バッファー溶液1µLを投与した( $T_{AA}$ )。また、対照としてC1、及び傷を付けてバッファー1µL投与したもの(C2<sub>AA</sub>)も用意した。処理2日後に、各植物体からタンパク質を抽出し、これを二次元電気泳動にかけ、ゲルをCBB染色した。各処理区のゲルを画像解析し、 $T_{AA}$ 特異的タンパク質を検出した。これとは別に、 $T_{AA}$ タンパク質サンプルを二次元電気泳動し、CBB染色後、 $T_{AA}$ 特異的タンパク質スポットをゲルから切り出した。これらのゲルをゲル内消化し、得られたペプチドをLC/MS/MSにより分析した。取得したシークエンスタグ・データをデータベース検索し、相当するタンパク質を同定した。

## 4. 研究成果

(1) SA処理特異的タンパク質の検出・同定  
二次元電気泳動後のゲルを画像解析した結果、 $T_{SA}$ 特異的タンパク質が23個、発現量が有意に増加したタンパク質が5個、発現量が有意に減少したタンパク質が4個、それぞれ検出された(図1, 2)。これらのタンパク質の内、18個をゲルから切り出し、ゲル内消化後、LC/MS/MS分析した。得られたデータをデータベース検索した結果、11種類のタンパク質が同定された。これらのタンパク質は

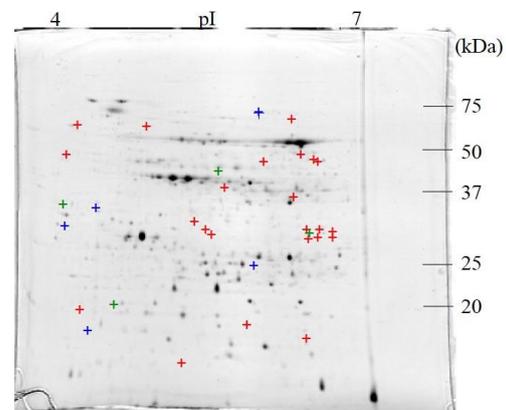


図1  $T_{SA}$ タンパク質サンプルの二次元電気泳動ゲル

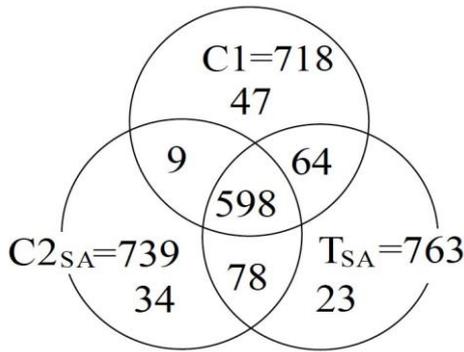


図2 各処理区で検出されたタンパク質スポット数

次の通りである。

- ① リンゴ酸脱水素酵素。この酵素は、トリカルボン酸回路において、リンゴ酸をオキサロ酢酸へ酸化し、NADP<sup>+</sup>をNADPHへ還元する。この酵素は、シラカンバ幼植物体においてNADPHを増加させることにより、病害抵抗性を高め、シグナル化合物の生成を増加させると考えられる。
- ② SDH1-1; ATP 結合/コハク酸脱水素酵素。この酵素は、ミトコンドリアの電子伝達系において、FADをFADH<sub>2</sub>へ還元することにより、コハク酸をフマル酸へ酸化する。この酵素は、シラカンバ幼植物体における病害抵抗性化合物の生成のために、FADH<sub>2</sub>の生成とTCA回路へのフマル酸の供給を増加させると考えられる。
- ③ ホスホグリセリン酸キナーゼ。この酵素は、解糖系とカルビン-ベンソン回路に関与する。SA処理によって、この酵素の発現が減少したことから、この減少がシラカンバ幼植物体における病原体抵抗性化合物の生合成経路に影響することが考えられる。
- ④ ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素。この酵素は、ジアミノピメリン酸経路において、メソ-2,6-ジアミノピメリン酸を脱炭酸してリジンに変換する。この酵素の病害抵抗性に対する機能は、不明である。
- ⑤ アルギナーゼ。この酵素は、L-アルギニンをL-オルニチンと尿素に加水分解する。この酵素は、シラカンバ幼植物体において、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成と過敏様細胞死に関与するポリアミンの生成を、L-オルニチンの生成増加によって増加させると考えられる。
- ⑥ コリスミン酸ムターゼ。この酵素は、シキミ酸経路において、コリスミン酸をプレフェン酸へ変換する。SA処理によって、この酵素の発現が増加したことから、この増加が、シラカンバ幼植物体において、病害抵抗性とシグナル経路に関わる、SAを含むフェノール性化合物の生成量を増

加させると考えられる。

- ⑦ ペプチジルプロリル・イソメラーゼ。この酵素は、プロリン-ペプチド結合の回転を触媒し、シャペロンとしてタンパク質の折り畳み過程に関与すると考えられている。この酵素は、シラカンバ幼植物体において、病原体誘導タンパク質を折り畳み、他のタンパク質を分解及び集合化から防護すると思われる。
- ⑧ アミノペプチダーゼ。この酵素は、ペプチドのN末端から1個のアミノ酸を除去する。SA処理によって、この酵素の発現が増加したことから、この増加が、シラカンバ幼植物体において、タンパク質のN末端の除去によって、タンパク質の安定化とシグナル経路に影響を与えると思われる。
- ⑨ 上記以外に、1種の予想タンパク質と2種の仮想的タンパク質が同定された。これらのタンパク質の機能については、不明である。

(2) AA処理特異的タンパク質の検出・同定  
二次元電気泳動後のゲルを画像解析した結果、T<sub>AA</sub>特異的タンパク質が8個、C1特異的タンパク質が4個、C2<sub>AA</sub>特異的タンパク質が7個、それぞれ検出された(図3, 4)。T<sub>AA</sub>特異的タンパク質8個をゲルから切り出し、ゲル内消化後、LC/MS/MS分析した。得られたデータをデータベース検索した結果、8個のタンパク質全てが同定出来た。同定されたタンパク質は次の通りである。

- ① プラスチド・セリン・ヒドロキシメチルトランスフェラーゼ。この酵素は、プラスチド中において、グリシン及び5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸の生合成に関与する。この酵素が、シラカンバ幼植物体において、SARに関連した、酸化ストレスに対する効率的防御に関与すると考えられる。
- ② GDP-D-マンノース-3', 5' -エピメラー

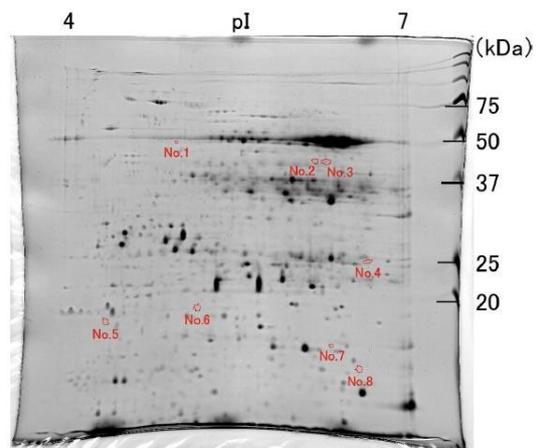


図2 T<sub>AA</sub>タンパク質サンプルの二次元電気泳動ゲル

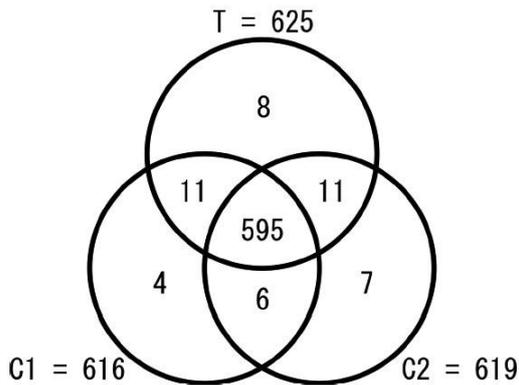


図4 各処理区で検出されたタンパク質スポット数

ぜ。この酵素は、GDP-D-マンノースの可逆的エピマー化を触媒し、GDP-L-ガラクトースの生合成に関与する。この酵素が、シラカンバ幼植物体において、SARに関わる酸化ストレスに対する効率的な防御、及び健全な生育に必要な代謝プロセスに関わると考えられる。

- ③ アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ。この酵素は、アセチル CoA 及びアシル CoA の生成に関与する。この酵素が、シラカンバ幼植物体において、SAR におけるエネルギー源となる、ATP 生産のための代謝プロセスに関わると考えられる。
- ④ リブロース二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ・アクティバーゼ。この酵素は、不活性状態のリブロース二リン酸カルボキシラーゼを、活性型にする働きがある。この酵素が、シラカンバ幼植物体において、SAR に関わる光合成能力の向上、並びに光化学系に必要とされる活性化作用を行うと考えられる。
- ⑤ 仮想的な新生ペプチド関連複合  $\alpha$  鎖。このタンパク質は、イネで最初に同定されたものであるが、その機能は不明である。
- ⑥ 光化学系 I 反応中心サブユニット II。このタンパク質は、光化学系 I を構成する複合体に含まれるサブユニットである。このタンパク質が、シラカンバ幼植物体において、SAR に関わる光化学系 I の機能促進に関与すると考えられる。
- ⑦ 1 Sc-3 タンパク質。このタンパク質は、感染特異的 (PR) タンパク質である PR-10 とアミノ酸配列相同性を示す。また、シラカンバの主要な花粉アレルゲンでもある。このタンパク質が、シラカンバ幼植物体において、病原体感染に対する準備的な SAR を誘導すると考えられる。
- ⑧ ヒートショックタンパク質 70。このタンパク質は、新生タンパク質のフォールディング機能、及び熱や乾燥などの環境的ストレスにより変性したタンパク質の、

リフォールディングに関与する。このタンパク質が、シラカンバ幼植物体において、SAR の準備に関わる細胞損傷に対する再生作用により、細胞損傷の拡大を防ぐと考えられる。

(3) 上記したように、SA または AA を投与したシラカンバ幼植物体 No. 8 において、両処理の場合とも、エネルギー生産及び一次代謝が活性化されることが判明した。しかし、両処理間において、それぞれ活性化に関わる詳細な機構が異なると考えられる。何故なら、SA または AA 処理の間で、検出・同定されたタンパク質が全く異なるからである。従って、SA と AA とでは、シラカンバ幼植物体 No. 8 における全身植物免疫の誘導機構が異なると考えられる。また、シロイヌナズナで発見されたように、シラカンバ幼植物体 No. 8 の場合でも、AA が、SA が誘導する SAR を生じさせる、植物体内を移動するシグナル物質として機能していることが推察される。

本研究で得られた成果は、林木に関しては初めての知見であり、その学術的意義は非常に大きい。今後、本研究の成果を基に、シラカンバ以外の林木に関しても、全身植物免疫誘導機構が徐々に解明されていくと期待される。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 17 件)

- ① C. Ri, H. Suzuki, A. Yoshinaga, H. Kamitakahara, F. Ishiguri, K. Iizuka, N. Yoshizawa, S. Yokota, MALDI imaging mass spectrometry for peroxidase localization on the cross sections from Japanese birch plantlet No. 8 infected with *Inonotus obliquus*, 2<sup>nd</sup> Symposium on Biotechnology Applied to Lignocelluloses, 2012 年 10 月 14 日～17 日、福岡市アクロス福岡
- ② S. Yokota, C. Ri, H. Suzuki, A. Yoshinaga, H. Kamitakahara, F. Ishiguri, K. Iizuka, N. Yoshizawa, Image analysis of peroxidase localization on the cross section prepared from Japanese birch plantlet No. 8 infected with *Inonotus obliquus* I0-U1 strain, The American Phytopathological Society 2012 Annual Meeting, 2012 年 8 月 4 日～8 日、プロヴィデンス、ロードアイランド州、米国
- ③ S. Yokota, H. Suzuki, F. Ishiguri, K. Iizuka, N. Yoshizawa, Profiling of

- specific proteins induced in Japanese birch plantlet treated with salicylic acid or azelaic acid, XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012年7月29日～8月2日、京都市国立京都国際会館
- ④ 鈴木拓、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、シラカンバ幼植物体 No. 8 におけるサリチル酸応答性タンパク質の同定及び菌感染による内生サリチル酸量の変化、平成 24 年度日本植物病理学会大会、2012年3月29日、福岡国際会議場
- ⑤ 李智慧、鈴木拓、吉永新、上高原浩、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、カバノアナタケ IO-U1 株に感染したシラカンバ幼植物体 No. 8 の横断面切片上におけるペルオキシダーゼ分布解析の試み、第 62 回日本木材学会大会、2012年3月15日、北海道大学学術交流会館
- ⑥ H. Suzuki, A. Salavati, S. Komatsu, F. Ishiguri, K. Iizuka, N. Yoshizawa, S. Yokota, Protein profile changes induced by salicylic acid in Japanese birch plantlets, 3<sup>rd</sup> International Symposium on Frontiers in Agriculture Proteome Research, 2011年11月8日、つくば国際会議場 (エポカル)
- ⑦ 鈴木拓、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、サリチル酸投与によってシラカンバ幼植物体に誘導される植物免疫に係わるペルオキシダーゼの解析、第 56 回リグニン討論会、2011年9月16日、山形大学農学部
- ⑧ 鈴木拓、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、シラカンバ幼植物体におけるサリチル酸による植物免疫誘導機構の解明、第 29 回日本植物細胞分子生物学会 (福岡) 大会・シンポジウム、2011年9月8日、九州大学箱崎キャンパス・旧工学部地区
- ⑨ 田口典裕、鈴木拓、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、カバノアナタケ菌 IO-B2 株の感染によりシラカンバ No. 8 幼植物体内に生成する菌感染特異的タンパク質のプロファイリング
- ⑩ H. Suzuki, Y. Takashima, F. Ishiguri, K. Iizuka, N. Yoshizawa, S. Yokota, Protein profile changes in Japanese birch plantlets by the treatment of salicylic acid, 2<sup>nd</sup> International Symposium on Frontier in Agriculture Proteome Research, 2010年11月18日、つくば市つくば農林ホール
- ⑪ 鈴木美帆、鈴木拓、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、組織化学的観察及びペルオキシダーゼアイソザイム分析によるカバノアナタケ菌 IO-U1 株に対するシラカンバ No. 8 幼植物体の防御応答の解明、平成 22 年度日本植物病理学会関東部会、2010年9月16日、つくば市文部科学省研究交流センター
- ⑫ 鈴木美帆、鈴木拓、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、アイソザイム分析及び NALDI-TOF-MS 分析によるカバノアナタケ菌 IO-U1 株に感染したシラカンバ No. 8 幼植物体の防御応答の解明、第 28 回日本植物細胞分子生物学会 (仙台) 大会・シンポジウム、2010年9月3日、仙台市東北大学大学院農学研究科
- ⑬ 鈴木美帆、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、カバノアナタケ菌 IO-U1 株に感染したシラカンバ No. 8 幼植物体内における防御機構と菌糸伸長の経時変化、第 28 回日本植物細胞分子生物学会 (仙台) 大会・シンポジウム、2010年9月3日、仙台市東北大学大学院農学研究科
- ⑭ 鈴木拓、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、サリチル酸応答性タンパク質の網羅的解析によるシラカンバ幼植物体における全身獲得抵抗性誘導機構の解明、第 28 回日本植物細胞分子生物学会 (仙台) 大会・シンポジウム、2010年9月3日、仙台市東北大学大学院農学研究科
- ⑮ S. Yokota, H. Suzuki, Y. Takashima, F. Ishiguri, K. Iizuka, N. Yoshizawa, Proteomic analysis of salicylic-acid-responsive proteins in *Betula platyphylla* var. *japonica* No. 8 plantlet, 21<sup>st</sup> International Conference on Arabidopsis Research, 2010年6月8日、横浜市パシフィコ横浜
- ⑯ 鈴木美帆、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、シラカンバ No. 8 幼植物体内におけるカバノアナタケ菌 IO-U1 株の菌糸伸長過程と防御機構の関係、平成 22 年度日本植物病理学会大会、2010年4月19日、京都市国立京都国際会館
- ⑰ 鈴木拓、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、シラカンバ No. 8 幼植物体におけるサリチル酸応答性タンパク質のプロテオーム解析、平成 22 年度日本植物病理学会大会、2010年4月19日、京都市国立京都国際会館

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 信三 (YOKOTA SHINSO)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：60210613