

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688005

研究課題名(和文)人為的サリチル酸誘導系を用いたサリチル酸生合成・輸送機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanisms underlying biosynthesis and transport of salicylic acid using experimental systems in which salicylic acid is artificially inducible

研究代表者

加藤 新平 (KATOU, Shinpei)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：10533614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,100,000円

研究成果の概要(和文)：サリチル酸(SA)は植物の病害抵抗性において重要な役割を果たす。本研究では、1)人為的にSAの合成を誘導できる実験系を用いて、タバコのSA合成経路およびその転写調節因子の候補として、ペルオキシソームの酸化経路とCBP60型の転写因子を同定した。2) SAの合成に関与することが明らかになっているシロイヌナズナのAtICS1と各種植物のICSホモログの比較解析から、AtICS1のみが高い機能を持つ分子機構を明らかにした。3) 各種細菌のSA合成仲介酵素を融合させることにより、植物葉において非常に高い活性を示す人工SA合成酵素を開発した。

研究成果の概要(英文)：Salicylic acid (SA) plays an important role in plant resistance to pathogens. Three main results of this study are as follows: 1) Peroxisomal  $\beta$ -oxidation and CBP60-type transfactor were identified as candidates for an intermediate of the SA biosynthesis pathway and its transcriptional regulator using an experimental system in which SA biosynthesis is artificially inducible. 2) Molecular mechanisms underlying high performance of AtICS1, known to be involved in SA synthesis in *Arabidopsis thaliana*, were clarified by comparative analyses with ICS homologs from other plant species. 3) An artificial SA synthase which shows high activity in plant leaves was produced by fusing bacterial enzymes that mediate SA synthesis.

研究分野：植物病理学

キーワード：病害抵抗性 サリチル酸 生合成機構 輸送機構 人為的誘導系

## 1. 研究開始当初の背景

サリチル酸 (Salicylic acid, SA) は植物の抵抗反応を誘導する内性シグナル物質であり、病害抵抗性において必須の役割を果たす。また、化学合成した SA やその機能類似体を植物に処理すれば、植物の抵抗反応を誘導することが可能である。これらの事実から、SA の生合成機構に関する知見は、植物の抵抗反応を誘導することにより病害を防除する“Plant activator”農薬や、病原体感染時に SA を合成し抵抗性を獲得する病害抵抗性植物などの新規病害防除法の開発に寄与すると期待されている。しかしながら、SA 生合成経路の構成因子や生合成経路が活性化される機構には不明な点が多い。

植物における SA 生合成経路として、色素体に存在するコリスミ酸を起点とした二つの経路が提唱されてきた (図 1)。一つ目はコ

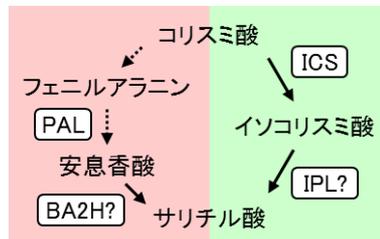


図 1. 提唱されている SA 生合成経路.

リスミ酸由来のフェニルアラニンから PAL により開始されるフェニルプロパノイド経路である。二つ目は細菌と同じく、ICS がコリスミ酸をイソコリスミ酸に変換し、IPL がイソコリスミ酸を SA に変換する経路である。シロイヌナズナにおいては、*AtICS1* を欠損する変異体の SA 蓄積量が減少することが明らかになり、細菌と同様にイソコリスミ酸を介して SA が合成されると考えられてきた。しかしながら、PAL の多重変異体の SA 蓄積量も減少することが明らかになり、イソコリスミ酸を SA に変換する IPL 様の遺伝子もゲノム上に見当たらないことから、植物の SA 生合成経路は細菌ほど単純ではないと考えられている。

一方、放射線を用いたトレーサー実験より、イネやジャガイモといった作物においては、SA はフェニルアラニンを介して合成されると考えられている。また、タバコにおいては、フェニルアラニン由来の安息香酸を BA2H が水酸化し SA を合成すると報告されたが、現在まで BA2H タンパク質および遺伝子は同定されていない。

SA 生合成系は、1) シロイヌナズナの ICS が色素体に局在すること、2) 細菌の ICS と

IPL を色素体で発現するタバコ (ICS/IPL 植物) が恒常的に SA を蓄積し、SA 応答性の抵抗反応を誘導することから、色素体中に存在すると考えられている。しかしながら、色素体中で合成された SA が色素体外に輸送される機構は全く不明である。

申請者らは、二つの病傷害応答性 MAP キナーゼである WIPK と SIPK を RNAi により抑制したタバコ (W/SIPK RNAi 植物) において、本来傷害に応答し誘導されない SA の蓄積が傷害により誘導されることを明らかにした。この“W/SIPK RNAi 植物”や前述した“ICS/IPL 植物”を用いれば、病原体感染という複雑な過程を経ることなく、SA の生合成および輸送を同調的かつ簡易に誘導することが可能である。本研究では、これらの知見をもとに以下の 3 点を明らかにする。

## 2. 研究の目的

### (1) SA 生合成経路の新規構成因子の同定

W/SIPK RNAi 植物を用いて、SA 生合成に関与する新規色素体タンパク質を同定する。

### (2) SA 生合成への BA2H および ICS の関与

BA2H タンパク質を精製・同定し、BA2H および ICS が SA 生合成を司るか明らかにする。

### (3) SA の色素体外輸送機構の解明

ICS と IPL の発現を薬剤処理により誘導できる“薬剤誘導性 ICS/IPL 植物”を作製し、SA 輸送体を色素体包膜より同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) SA 生合成経路の新規構成因子の同定

実験材料として、W/SIPK RNAi 植物の系統 WS2、WS3 および WS5 ならびに空ベクターのみを形質転換した V1 を対照として用い、以下の実験を行った。

W/SIPK RNAi 植物における傷害に応答した SA 蓄積の特性解析

タバコ葉からコルクボーラーを用いてリーフディスクをくり抜き、くり抜いたリーフディスクを蒸留水に浮かべることにより傷害処理とした。傷害後のリーフディスクから継時的に SA を抽出し、HPLC で分離後蛍光検出器により SA 量を定量した。

SA 蓄積に新規のタンパク質合成が必要か調べるため、タンパク質合成の阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) の影響を調べた。

SA 蓄積に及ぼす HSP90 阻害剤と高温 (32 °C) の影響を調べた。

#### W/SIPK RNAi 植物のトランスクリプトーム解析

SA 生合成に相関して発現が誘導される遺伝子を同定するため、傷害後 9、12、13.5 および 15 時間後の WS3 と V1 より RNA を抽出し、Tobacco Oligo Microarray (Agilent 021113) を用いたマイクロアレイによりそれらの遺伝子発現を網羅的に比較した。

#### W/SIPK RNAi 植物のプロテオーム解析

SA 生合成に相関して蓄積量が増加するタンパク質を同定するため、傷害後 9、12、13.5 および 15 時間後の WS3 と V1 よりタンパク質を抽出し、二次元電気泳動によりそれらのタンパク質を網羅的に比較した。

SA は色素体で合成される可能性が高い。そこで、WS3 と V1 から色素体を単離後、色素体に含まれるタンパク質を網羅的に比較した。

#### (2) SA 生合成への BA2H および ICS の関与

##### SA 生合成への BA2H の関与

傷害を与えた W/SIPK RNAi 植物およびタバコモザイクウイルス (TMV) を接種した野生型のタバコにおける BA2H 活性を、既報の方法に従って測定した。

##### SA 生合成への ICS の関与

実験材料として、シロイヌナズナの *AtICS1*、ベンサミアナタバコの *NbICS*、タバコの *NtICS*、イネの *OsICS* および大腸菌の *EntC* を用いた。各 ICS 遺伝子の組換えタンパク質を大腸菌で発現させ、それらの *in vitro* における ICS 活性を比較した。各 ICS 遺伝子の組換えタンパク質をベンサミアナタバコ葉で発現させ、それらタンパク質の蓄積量および *in vitro* における ICS 活性を比較した。また、各 ICS 遺伝子の組換えタンパク質を蛍光菌の IPL である *PmsB* と一緒に、あるいは *PmsB* との融合タンパク質としてベンサミアナタバコ葉に発現させ、蓄積した SA 量を HPLC で定量することにより植物細胞中における ICS 活性を比較した。

*AtICS1* と *OsICS* 間で各種キメラを作製し、ICS 活性やベンサミアナタバコ葉におけるタンパク質の蓄積量に關与する領域を同定した。同定した領域中に存在する *AtICS1* と *OsICS* 間で配列が異なるアミノ酸については、*AtICS1* のアミノ酸配列を *OsICS* の配列で置

換し、ICS 活性に及ぼす影響を調べた。

立体構造が解読されている大腸菌の ICS (*EntC* および *MenF*) と比較することにより、*AtICS1* の活性中心付近の立体構造を予測した。置換により活性に影響を及ぼしたアミノ酸については、活性発現に果たす役割について考察した。

#### (3) SA の色素体外輸送機構の解明

細菌の ICS として大腸菌の *EntC* と緑膿菌の *PchA* を、IPL として蛍光菌の *PmsB* と緑膿菌の *PchB* を実験に用いた。また、コリスミ酸を直接 SA に変換する腸炎エルシニア菌の *Irp9* も用いた。IPL と ICS の融合遺伝子および *Irp9* に葉緑体移行シグナルを付加した物を、アグロインフィルトレーション法によりベンサミアナタバコ葉に一過的に発現させた。葉に蓄積した SA 量を HPLC により定量し、最も多量の SA が蓄積した *PmsB-EntC* を以降の実験に用いた。

*PmsB-EntC* を、エストラジオール誘導性プロモーターを持つ pER8 ベクターおよびデキサメタゾン誘導性プロモーターを持つ pTA7001 ベクターにクローニングした。得られたコンストラクトを用いてタバコの形質転換体を作製すると共に、アグロインフィルトレーション法によりタバコ葉に一過的に発現させた。

#### 4. 研究成果

##### (1) SA 生合成経路の新規構成因子の同定

W/SIPK RNAi 植物における傷害に回答した SA 蓄積の特性解析

W/SIPK RNAi 植物 (WS3) および対照の空ベクター形質転換体 (V1) の葉から、コルクポーターを用いてリーフディスクをくり抜き水に浮かべた。リーフディスクに含まれる SA 量を継続的に測定した所、SA の蓄積は傷害後 12 時間頃から始まり、15 時間頃にピークを迎えることが明らかになった。水の代わりに、タンパク質合成の阻害剤である CHX 溶液にリーフディスクを浮かべた所、SA の蓄積は完全に抑制された。SA 合成に必要な傷害後の時間を調べるため、水に一定時間浮かべた後 CHX 溶液に移したリーフディスクに含まれる SA 量を測定した。その結果、水に 4 時間以上浮かべれば、SA の蓄積が誘導されることが明らかになった。また、水に 6 時間以上浮かべた後 CHX 溶液に移すと、SA の蓄積量が非常に増大することが明らかになった。そこで以降の実験には、水に 9 時間

浮かべた後、CHX 溶液に移したリーフディスクを用いた。

#### W/SIPK RNAi 植物のトランスクリプトーム解析

SA 生合成に相関して発現が誘導される遺伝子を同定するため、傷害後 9、12、13.5 および 15 時間後の WS3 と V1 における遺伝子発現を、マイクロアレイにより網羅的に比較した。その結果、SA の合成が開始される傷害後 12 時間頃の WS3 においては、TMV に対する抵抗性遺伝子である *N* 遺伝子や抵抗性遺伝子様の遺伝子等の病害抵抗性関連遺伝子の発現が上昇していた。また、抵抗性タンパク質の機能を阻害する HSP90 阻害剤と高温条件により SA の蓄積が抑制されたことから、抵抗性遺伝子を初めとした病害抵抗性関連遺伝子の傷害による発現誘導が SA の合成を誘導すると考えられた。

SA 生合成に関与する遺伝子を同定するため、抵抗性遺伝子よりも遅く、SA 応答性遺伝子よりも早く、傷害により WS3 で特異的に誘導される遺伝子をマイクロアレイの結果から選抜した。選抜した候補遺伝子の全長 cDNA をクローニングし、その一過的な過剰発現により SA の蓄積を誘導する遺伝子を選抜した所、CBP60 のホモログが同定された。シロイヌナズナにおいては、2 つの CBP60 型タンパク質である CBP60g と SARD1 が *AtICS1* の転写を活性化することにより、SA の合成に関与することが報告されている。一方、タバコの ICS 遺伝子 (*NiICS*) の発現は SA の蓄積と相関しないことから、タバコの CBP60 ホモログは ICS 以外の SA 合成関連遺伝子の転写を活性化すると考えられた。

SA 生合成に関与する酵素遺伝子を同定するため、CBP60 ホモログよりも遅く、SA の下流因子 (*SA3H*、*NPR1*) よりも早く、傷害により WS3 で特異的に誘導される遺伝子をマイクロアレイの結果から選抜した (図 2)。選

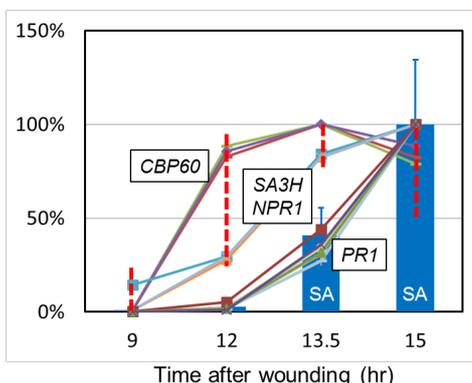


図 2. SA の合成と相関する遺伝子の探索。

抜された遺伝子を、それらタンパク質の予想される機能に基づいて分類した所、最も主要なグループは二次代謝に関与する酵素群であった。特にペルオキシソームにおける酸化を仲介する酵素遺伝子が複数含まれていた。これらペルオキシソームの酸化関連遺伝子の発現は、TMV に対して抵抗反応を誘導したタバコ葉においても SA の蓄積に先行して誘導されたことから、SA の生合成にペルオキシソームの酸化反応が関与することが示唆された。

#### W/SIPK RNAi 植物のプロテオーム解析

SA 生合成に相関して蓄積するタンパク質を同定するため、傷害後 0、9、12、13.5 および 15 時間後の WS3 と V1 におけるタンパク質の蓄積量を次元電気泳動により網羅的に比較した。また、WS3 と V1 の色素体に含まれるタンパク質についても同様に比較した。その結果、SA の合成と相関して WS3 で特異的に蓄積するタンパク質スポットは検出されなかったが、WS3 において蓄積量が変動するスポットが複数同定された (図 3)。これらのスポットに含まれるタンパク質を LC-MS/MS により同定したところ、GrpE 等のシャペロンタンパク質である可能性が示された。

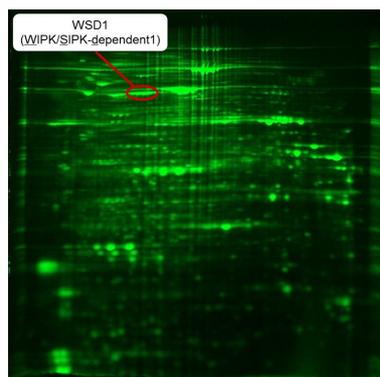


図 3. 二次元電気泳動後のゲル。

#### (2) SA 生合成への BA2H および ICS の関与

##### SA 生合成への BA2H の関与

最初に過去の報告の再現性を取るため、TMV を接種したタバコの BA2H 活性を既報の方法に従って測定したが、活性を検出することはできなかった。また、傷害を与えた W/SIPK RNAi 植物の活性も測定したが、同様に活性は検出されなかった。過去の報告を再現できない理由は不明であるが、BA2H に関する報告から 20 年が経過するにも関わらず、BA2H 遺伝子がクローニングされない原因はこのような点にあるのかもしれない。

### SA 生合成への ICS の関与

シロイヌナズナとベンサミアナタバコにおいては、ICS が SA の合成に必要である。一方、タバコにおいては、ICS は SA の合成に関与しないと考えられている。また、健全な葉に含まれる SA の濃度は植物の種により大きく異なり、イネにはシロイヌナズナやタバコの 100 倍以上高濃度の SA が含まれている。これらの植物種間の相違は、これらの植物種が持つ ICS 遺伝子の機能にも相違があることを示唆する。そこで、これら植物種の ICS 遺伝子 (*AtICS1*、*NbICS*、*NtICS* および *OsICS*) をクローニングし、コードするタンパク質の性質を以下の 4 点で比較した。1) 大腸菌で発現させたタンパク質の *in vitro* における ICS 活性、ベンサミアナタバコ葉で発現させたタンパク質の、2) 蓄積量、3) *in vitro* における ICS 活性、4) ベンサミアナタバコ葉中における ICS 活性。その結果、いずれの点においても、*AtICS1* のみが高い活性あるいはタンパク質の高蓄積を示した。

*AtICS1* と *OsICS* 間で種々のキメラを作製し、その ICS 活性とベンサミアナタバコ葉におけるタンパク質の蓄積量を調べた所、*AtICS1* の N 末端領域がタンパク質の高蓄積に、C 末端領域が高い活性に必要であることが明らかになった。タンパク質の高蓄積に関与する *AtICS1* の領域をさらに絞り込んだ所、葉緑体移行配列が必要かつ十分であることが明らかになった。一方、高い ICS 活性に関与する *AtICS1* の領域をさらに絞り込み、候補のアミノ酸を対応する *OsICS* のアミノ酸と置換した所、3 つの置換 (図 4) が *AtICS1* の活性を低下させた。また、これらの置換を組み合わせ、二重、三重変異体を作製した所、*AtICS1* の活性はほとんど消失した。

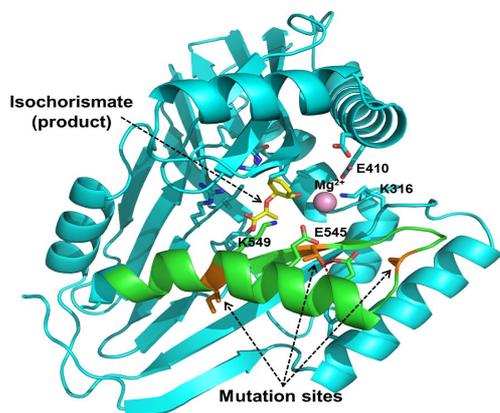


図 4. 既報の大腸菌 ICS の構造から作成した *AtICS1* の立体構造モデルと変異導入部位。

### (3) SA の色素体外輸送機構の解明

初めに、“薬剤誘導性 ICS/IPL 植物”の作製に用いる細菌の ICS と IPL を選抜した。ICS として大腸菌の *EntC* と緑膿菌の *PchA* を、IPL として蛍光菌の *PmsB* と緑膿菌の *PchB* を実験に用いた。また、コリスミ酸を直接 SA に変換する腸炎エルシニア菌の *Irp9* も用いた。IPL と ICS の融合遺伝子および *Irp9* に葉緑体移行シグナル (ss) を付加した物を、アグロインフィルトレーション法によりベンサミアナタバコ葉に一過的に発現させた。葉に蓄積した SA 量を HPLC により定量し、最も多量の SA を蓄積した *ss-PmsB-EntC* を薬剤誘導性 ICS/IPL 植物の作製に用いることにした。

*ss-PmsB-EntC* を pER8 ベクターのエストラジオール誘導性プロモーター下流に挿入した。得られたコンストラクトでタバコを形質転換し、11 系統の形質転換体を得た。得られた形質転換体当分の薬剤応答性を調べた所、2 系統が薬剤に反応して SA を蓄積した。そこで、薬剤応答性を示した 2 系統から採種し、次世代を実験に用いたが、次世代においては薬剤に反応した SA の蓄積が認められなかった。そのため、*ss-PmsB-EntC* を pTA7001 ベクターのデキサメタゾン誘導性プロモーター下流に挿入したコンストラクトを用いて、薬剤誘導性 ICS/IPL 植物の作製をやり直している。また、得られた形質転換体が再び薬剤に反応しない可能性を考慮し、アグロインフィルトレーション法を用いた一過的発現系についても条件検討を行っている。

### 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 2 件)

Shinpei Katou, Nobuhide Asakura, Tomoya Kojima, Ichiro Mitsuhashi and Shigemi Seo (2013) Transcriptome analysis of WIPK/SIPK-suppressed plants reveals induction by wounding of disease resistance-related genes prior to the accumulation of salicylic acid. *Plant & Cell Physiology* 54: 1005-1015 (DOI: 10.1093/pcp/pct055), 査読有。

Kumiko Oka, Yuta Amano, Shinpei Katou, Shigemi Seo, Kei Kawazu, Atsushi Mochizuki, Kazuyuki Kuchitsu and Ichiro Mitsuhashi (2013) Tobacco MAP kinase phosphatase (NtMKP1) negatively regulates wound response and induced resistance

against necrotrophic pathogens and lepidopteran herbivores. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26: 668-675 (DOI: 10.1094/MPMI-11-12-0272-R), 査読有.

[学会発表](計25件)

加藤新平、光原一朗、瀬尾茂美、WIPK/SIPK抑制体における傷害誘導性サリチル酸蓄積を利用したサリチル酸合成関連遺伝子の探索. 平成27年度日本植物病理学会大会, 2015年3月30日, 明治大学駿河台キャンパス (東京都・千代田区)

鈴木那奈、松井英謙、中神弘史、高橋章、光原一朗、新井亮一、加藤新平. *AtICS1*の顕著なICS活性およびベンサミアナタバコにおける高蓄積に必要な領域の同定. 平成27年度日本植物病理学会大会, 2015年3月30日, 明治大学駿河台キャンパス (東京都・千代田区)

高木公美子、光原一朗、瀬尾茂美、加藤新平. タバコのサリチル酸合成関連転写因子ホモログNtCBP60gおよびNtSARD1の機能解析. 平成27年度日本植物病理学会大会, 2015年3月30日, 明治大学駿河台キャンパス (東京都・千代田区)

Shinpei Katou, Tomoya Kojima, Nobuhide Asakura, Ichiro Mitsuhara and Shigemi Seo. Tobacco mitogen-activated protein kinases WIPK and SIPK play opposite roles in the induction of salicylic acid and phytoalexin capsidiol in the wounded leaves. 16th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, poster, 2014年7月9日, Rhodes island (Greece)

横尾尚平、天川奈穂、松井英謙、中神弘史、高橋章、光原一朗、加藤新平. イソコリスミン酸合成酵素の生化学的特性の比較解析 - *AtICS1* タンパク質の高蓄積と高活性には異なる領域が関与している - . 第55回日本植物生理学会年会, 2014年3月20日, 富山大学五福キャンパス (富山県・富山市)

横尾尚平、天川奈穂、村田和美、小島知弥、松井英謙、中神弘史、高橋章、光原一朗、加藤新平. シロイヌナズナ、タバコおよびイネのイソコリスミン酸合成酵素(様)タンパク質の比較解析. 平成25年度日本植物病理学会大会, 2013年3月29日, 岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)

加藤新平、朝倉信英、小島知弥、光原一朗、瀬尾茂美. WIPK/SIPK抑制植物においてはサリチル酸の蓄積に先行して病害抵抗性関連遺伝子の発現が傷害により誘導される. 第54回日本植物生理学会年会, 2013

年3月23日, 岡山大学津島キャンパス (岡山県・岡山市)

Shinpei Katou, Yasuro Onishi, Nobuhide Asakura, Ichiro Mitsuhara, Shigemi Seo. Proteome and transcriptome analysis of wound-induced accumulation of salicylic acid in WIPK/SIPK-suppressed plants. 15th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, poster, 2012年7月30日, Kyoto (Japan)

大西泰朗、光原一朗、瀬尾茂美、加藤新平. タバコの病傷害応答性MAPキナーゼであるWIPKとSIPKの発現を抑制した植物で蓄積量が変動するタンパク質の探索. 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 (福岡県・博多市)

村田和美、光原一朗、加藤新平. 薬剤処理によりサリチル酸の合成を誘導できる形質転換体の作製に向けた細菌サリチル酸合成酵素の選抜. 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 (福岡県・博多市)

Shinpei Katou, Nobuhide Asakura, Shohei Yokoo, Ichiro Mitsuhara and Shigemi Seo. Characterization of wound-induced accumulation of salicylic acid in the WIPK/SIPK-suppressed plants. The 2nd Korea-Japan Joint Symposium, 2012年3月27日, Fukuoka (Japan)

加藤新平、朝倉信英、横尾尚平、光原一朗、瀬尾茂美. WIPK/SIPK抑制タバコにおける傷害誘導性サリチル酸蓄積の特性解析. 第53回日本植物生理学会年会, 2012年3月18日, 京都産業大学 (京都府・京都市)

[その他] ホームページ等

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.HmAejFkV.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 新平 (KATOU, Shinpei)  
信州大学・学術研究院農学系・准教授  
研究者番号: 10533614

(4) 研究協力者

藤原 正幸 (FUJIWARA, Masayuki)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教  
研究者番号: 70403350

新井 亮一 (ARAI, Ryoichi)  
信州大学・学術研究院繊維学系・助教  
研究者番号: 50344023