

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23780041

研究課題名（和文）

疫病菌耐性ジャガイモの創出を目指したナス科植物の疫病菌抵抗性因子の探索と機能解析

研究課題名（英文） Functional analyses of Solanaceae genes required for resistance to potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*.

研究代表者

竹本 大吾 (TAKEMOTO DAIGO)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30456587

研究成果の概要（和文）：野生種タバコであるベンサミアナは、ジャガイモの重要病原菌であるジャガイモ疫病菌に抵抗性を示す。本研究では、ベンサミアナの疫病菌に対する抵抗性に必須な遺伝子をウイルス誘導型遺伝子サイレンシング法を用いて探索し、30種以上の新規遺伝子を単離した。得られた遺伝子群の機能解析より、植物が病原菌を認識し病害応答を活性化するための因子（NbSAR8.2m、NbCRT3、NbNup75 など）、抗菌物質の生合成に関わる酵素群（NbEAS など）、抗菌物質の分泌に関わるトランスポーター（NbPDR1）などの機能を明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Mature *Nicotiana benthamiana* shows strong resistance to the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. By screening using virus-induced random gene silencing, we isolated over 30 genes required for resistance of *N. benthamiana* to *P. infestans*. Further functional analyses revealed that isolated genes are involved in various processes for plant disease resistance including the activation of defense responses after the recognition of pathogen, production of anti-microbial compounds (phytoalexin), and secretion of phytoalexin at the site of pathogen attack.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：病害抵抗性、植物病原菌、植物ホルモン、ファイトアレキシン

1. 研究開始当初の背景

ジャガイモ疫病菌は、世界4大作物の一つであるジャガイモの難防除病原菌である。これまでにジャガイモ野生種から疫病菌に対する真性抵抗性遺伝子（*RI*, *Rpi-blb2* など）が単離されている。これら遺伝子は疫病菌認識に関わる受容体をコードしており、遺伝子を導入したジャガイモ品種は疫病菌抵抗性を獲得する。しかし、抵抗性遺伝子を育種的手法で導入した品種の栽培数年後には、認識を回避する変異菌株の出現により抵抗性遺伝子は効力を失ってしまうため、真性抵抗性遺伝子の導入は持続的な疫病菌抵抗性品種の作出にはあまり有効ではない。一方、同じナ

ス科のベンサミアナの抵抗性は、いかなるジャガイモ疫病菌菌株も打破出来ないことから、その抵抗性機構を明らかにすれば、その知見を応用することで新たなジャガイモの疫病菌防除法が確立できると期待された。

そこで、ベンサミアナのジャガイモ疫病菌への抵抗性に必須な遺伝子群の探索を進め、得られた遺伝子群のなかでも、特に抵抗性に必須な新奇分泌タンパク質 NbSAR8.2m および小胞体に局在するシャペロンである NbCRT3 の機能を明らかにすることを目指して本研究課題を設定した。

2. 研究の目的

本研究では、ベンサミアナのジャガイモ疫

病菌への抵抗性に必須な遺伝子群の機能解析を通じて、ナス科植物の疫病菌抵抗性に必須なプロセスの全容を明らかにすることを最終目標として、以下に示す課題を設定した。

- (1) ベンサミアナのジャガイモ疫病菌抵抗性遺伝子群の探索
- (2) ベンサミアナの疫病菌抵抗性に必須な分泌タンパク質の機能解析
- (3) ベンサミアナの疫病菌抵抗性の発動に必須な遺伝子群の機能解析
- (4) 探索によって得られた新奇遺伝子群の疫病菌抵抗性における機能の解析

3. 研究の方法

- (1) ウイルス誘導型遺伝子サイレンシング法を用いた疫病菌抵抗性低下株の探索

ジャガイモ疫病菌由来のエリシターである INF1 を処理したベンサミアナ cDNA を遺伝子サイレンシングベクター pTV00 に導入したライブラリーを作出した。このライブラリーを用いてランダムな遺伝子の発現が抑制されているベンサミアナ株群を作出し、ジャガイモ疫病菌に対して抵抗性の低下している株の選抜を行った。得られた抵抗性低下株のサイレンシングに用いたベクターから cDNA 断片を単離し、抵抗性に必須な遺伝子を特定した。

- (2) 大腸菌発現タンパク質による NbSAR8.2m の活性の解析

これまでに、ベンサミアナのジャガイモ疫病菌抵抗性に必須な遺伝子として、NbSAR8.2m を単離している。NbSAR8.2m は分泌シグナル配列を持つ約 7 kDa のタンパク質をコードしていた。この分泌タンパク質の活性を調べるために、マルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として大腸菌で発現した。発現タンパク質を精製し、病原菌および植物に処理することで、その活性を解析した。

- (3) 遺伝子サイレンシング法により、特定の遺伝子の発現を抑制した株を用いた抵抗性応答の解析

ベンサミアナはタバコ茎えそウイルス (TRV) を介した遺伝子発現抑制の実験系が確立されている。また、最近ベンサミアナのドラフトゲノム配列が公開され、標的の遺伝子をより特異的に抑制することが可能になった。本研究では、ゲノム配列を利用することで、抵抗性低下株のスクリーニングで単離された抵抗性に必須な遺伝子のベンサミア

ナにおける相同遺伝子群を解析し、それぞれの特異的遺伝子抑制を行うことで、抵抗性に必須な遺伝子を明確にした。得られた遺伝子サイレンシング株において、INF1 誘導性の過敏細胞死、抵抗性関連遺伝子群の発現、エチレンやサリチル酸の生成およびジャガイモ疫病菌抵抗性等を解析した。

- (4) パーティクルガンおよびアグロバクテリウムを介した一過的発現系を利用したタンパク質の細胞内局在性の解析

NbSAR8.2m タンパク質の N 末端側の疎水性領域が分泌シグナルとして機能するか否かを調べるため、予想分泌シグナルと成熟型 INF1 の融合タンパク質をアグロバクテリウムを介してベンサミアナ葉に一過的に発現させた。INF1 は細胞外に分泌されたときのみ細胞死を誘導する活性を持つため、細胞死誘導の有無を判別することにより、融合した配列の分泌シグナル活性を検出することが出来る。また、NbCRT3 タンパク質の細胞内局在性を調べるため、GFP-NbCRT3 を発現するベクターをパーティクルガンで植物に導入し、GFP 蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

- (1) ベンサミアナのジャガイモ疫病菌抵抗性遺伝子群の探索

ベンサミアナ cDNA を遺伝子サイレンシングベクター pTV00 に導入したライブラリーを用いてランダムな遺伝子の発現が抑制されているベンサミアナ株群を約 2000 株作出し、ジャガイモ疫病菌に対して抵抗性の低下した株を 75 株単離した。得られた抵抗性低下株のサイレンシングに用いたベクターから cDNA 断片を単離し、抵抗性に必須な遺伝子を特定したところ、本研究の申請時にすでに単離されていた遺伝子を含めて 32 種の遺伝子が抵抗性に必須な遺伝子として単離された。得られた遺伝子には、*Nicotiana* 属植物が生産するセスキテルペノイドの抗菌物質であるカプシジオールの生合成酵素遺伝子 (メバロン酸経路酵素遺伝子および *NbEAS*, *NbEAH*)、エチレン生成酵素遺伝子、核膜孔複合体遺伝子 (*NbNup75*)、PDR 型 ABC トランスポーター (*NbPDR1*)、機能未知の分泌タンパク質 (*NbSAR8.2m*)、機能未知の細胞壁局在性銅結合タンパク質 (*NbBCB*) などが含まれていた。

- (2) NbSAR8.2m の病害抵抗性における機能の解析

NbSAR8.2m サイレンシング株に疫病菌を接種すると接種部位をこえて疫病菌が全身的に蔓延する(図1)。そこで、*NbSAR8.2m* が他の病原菌に対する抵抗性に関与するかどうかを調べるため、灰色カビ病菌やウリ類炭疽病菌に接種し、抵抗性を評価した。その結果、



図1. 対象株(左)および *SAR8.2* サイレンシング株(右)における疫病菌病徴

NbSAR8.2m サイレンシング株のこれら病原菌に対する抵抗性は対照株と同等であった。この結果から、*SAR8.2* 遺伝子が疫病菌抵抗性特異的に働いていることが示唆された。また *NbSAR8.2m* の N 末端領域の配列を INF1 と結合したキメラタンパク質をベンサミアナで一過的に発現させたところ、細胞死の誘導が認められた。この結果より、*NbSAR8.2m* の N 末端は分泌シグナルとして機能することが示された。次にベンサミアナゲノムを解析し、5つの *NbSAR8.2* 相同遺伝子を単離した。*NbSAR8.2m* および *NbSAR8.2d* タンパク質を大腸菌に発現させ、疫病菌に対して抗菌活性を示すか否かを調べた。その結果、これら *SAR8.2* タンパク質は疫病菌に対して抗菌活性を示さなかった。一方、*NbSAR8.2m* および *NbSAR8.2d* タンパク質をベンサミアナ葉へ処理するとファイトアレキシン生成酵素遺伝子である *NbEAS* および *NbEAH* の発現を誘導した。これらの結果より、*SAR8.2* タンパク質は疫病菌感染時に内生エリシターとして機能し、病原菌の全身的蔓延を抑制する働きがあることが示された。

(2) *NbPDR1* 遺伝子の病害抵抗性における機能の解析

ベンサミアナの疫病菌抵抗性に必須遺伝子として、PDR 型 ABC トランスポーター (*NbPDR1*) が単離された。*NbPDR1* サイレンシング株におけるカプシジオールの蓄積を解析したところ、蓄積量の低下が認められた。さらに疫病菌の侵入に対する抵抗性の低下も認められた。次に、スクリーニングにより単離されたメバロン酸経路の酵素遺伝子 (*NbMVD*、*NbFPPS*) のサイレンシング株の侵入抵抗性を解析したところ、*NbMVD* サイレンシング株でのみ *NbPDR1* サイレンシング株と同様な侵入抵抗性の低下が観察された。ジテルペノイドの生合成は MVD より下流の

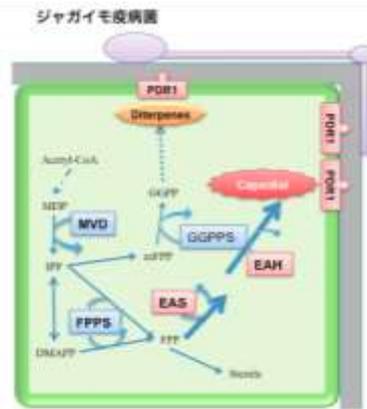


図2. テルペノイド化合物とそのトランスポーターの疫病菌抵抗性における役割

ジテルペノイドを介した侵入抵抗性と 2) セスキテルペノイドを介した拡大抵抗性の両方に必須なトランスポーターであることが示された。さらに、INF1 処理時のテルペノイド合成酵素遺伝子群の発現を調べた。その結果、INF1 処理により *NbFPPS* を含むメバロン酸経路酵素遺伝子群の発現が誘導される一方で、*NbGGPPS* の発現は抑制されていた。また、*NbGGPPS* サイレンシング株では疫病菌侵入抵抗性が低下していたが、INF1 誘導性のセスキテルペノイド蓄積が増加していた。この結果から、ベンサミアナは疫病菌感染時に生成するテルペノイドをスイッチすることで、効率的に病原菌の蔓延を抑制する機構をもつことが示された(図2)。

(3) *NbCRT3* 遺伝子の病害抵抗性における機能の解析

ベンサミアナの疫病菌抵抗性に必須遺伝子として、カルレティキュリン3 (*NbCRT3*) が単離された。*NbCRT3* サイレンシング株では、INF1 によって誘導されるカプシジオールの生成、活性酸素生成の誘導などが対照株と比較して顕著に抑制されており、疫病菌に対する抵抗性も低下していた。一方、相同遺伝子である *NbCRT2* サイレンシング株では、抗菌物質の生成能や疫病菌への抵抗性の低下は認められなかった。また *NbCRT3* サイレンシング株では、INF1 によって誘導されるエチレンの生成やカプシジオール生成酵素遺伝子の発現も抑制されていた。一方、抵抗性誘導に関わる MAPKK (*NbMEK2*) によって誘導される抵抗性は *NbCRT3* サイレンシングの影響を受けなかった。これらの結果から、*NbCRT3* は、病原菌の認識から抵抗性応答の

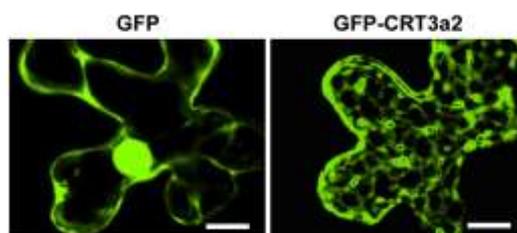


図3. GFP-*NbCRT3* の小胞体への局在(右)

グラニルゲラニルピロリン酸合成酵素 (GGPPS) に律速される。

NbGGPPS サイレンシング株の疫病菌抵抗性について解析したところ、顕著に侵入抵抗性の低下が観察され、病

徴の進展は認められなかった。このことから、PDR1 は疫病菌抵抗性において 1) ジテルペノイドを介した侵入抵抗性と 2) セスキテルペノイドを介した拡大抵抗性の両方に必須なトランスポーターであることが示された。さらに、INF1 処理時のテルペノイド合成酵素遺伝子群の発現を調べた。その結果、INF1 処理により *NbFPPS* を含むメバロン酸経路酵素遺伝子群の発現が誘導される一方で、*NbGGPPS* の発現は抑制されていた。また、*NbGGPPS* サイレンシング株では疫病菌侵入抵抗性が低下していたが、INF1 誘導性のセスキテルペノイド蓄積が増加していた。この結果から、ベンサミアナは疫病菌感染時に生成するテルペノイドをスイッチすることで、効率的に病原菌の蔓延を抑制する機構をもつことが示された(図2)。

誘導に至る情報伝達において早い段階に機能することが示唆された。また NbCRT3 の C 末端側には小胞体局在シグナルが見いだされ、GFP-NbCRT3 をパーティクルガンを用いて一過的に発現させたところ、小胞体への局在が観察された (図 3)。これらの結果から、NbCRT3 は疫病菌認識に関与する細胞表面の受容体の糖鎖修飾に関与する小胞体局在シヤペロンとして機能していると推察された。

(4) *NbNup75* 遺伝子の病害抵抗性における機能の解析

ベンサミアナの疫病菌抵抗性に必須遺伝子として、核膜孔複合体タンパク質をコードする *NbNup75* が単離された。*NbNup75* サイレンシング株では、INF1 の処理によるカプシジオール蓄積および生成成遺伝子 *NbEAS* の発現が抑制された。*NbEAS* の発現がエチレン誘導性であることから、INF1 処理あるいは恒常活性化型 NbMEK2 (MAPKK) を発現した *NbNup75* サイレンシング株におけるエチレン生成を調べたところ、エチレン生成量が対照株と比較して抑制されていた。一方、エチレンの処理による *NbEAS* の発現誘導は *NbNup75* サイレンシングの影響を受けなかった。また、シロイヌナズナの *Atnup75* 変異株においても灰色かび病菌接種時のエチレン生成量が減少していた。これらの結果から 1) Nup75 は植物の病害抵抗性誘導時のエチレン生成に関与すること、2) Nup75 はベンサミアナにおいては MEK2 活性化からエチレン生成誘導に至る情報伝達を調節する因子の核膜孔での輸送を制御しており、エチレン誘

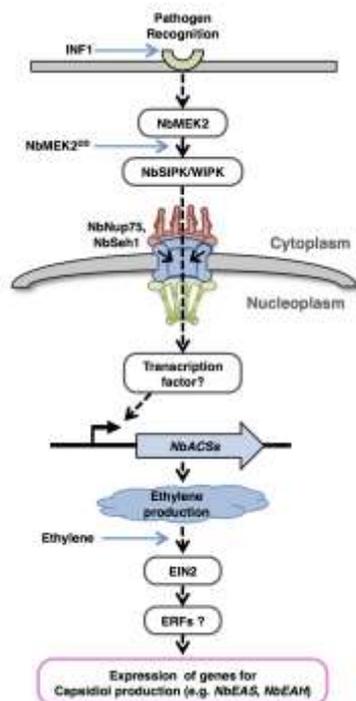


図 4. Nup75 を介した抵抗性遺伝子の発現誘導

導性のファイトアレキシン生成に関与すると推定された (図 4)。また、核膜孔複合体において Nup75 と結合する Seh1 は疫病菌抵抗性に必須であったのに対して、Nup133 は必要ではなかったことから、特異的な Nup がエチレン生成誘導に関与することが示された。

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 7 件)

(1) Matsukawa M., Shibata Y., Ohtsu M., Mizutani A., Mori H., Wang P., Ojika M., Kawakita K., Takemoto D. (2013) *Nicotiana benthamiana* Calreticulin 3a is required for the ethylene-mediated production of phytoalexins and disease resistance against oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. Mol. Plant-Microbe Interact. in press. 査読有り

(2) Kato H., Takemoto D. and Kawakita K. (2012) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in potato plant. Physiol Plant. in press. 査読有り

(3) Takemoto D., Rafiqi M., Hurley U., Lawrence G.J., Bernoux M., Hardham A.R., Ellis J.G., Dodds P.N. and Jones D.A. (2012) N-Terminal motifs in some plant disease resistance proteins function in membrane attachment and contribute to disease resistance. Mol. Plant-Microbe Interact. 25: 379-392. 査読有り

(4) Shibata Y., Kawakita K. and Takemoto D. (2011) SGT1 and HSP90 are essential for age-related non-host resistance of *Nicotiana benthamiana* against the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 75: 120-128. 査読有り

[学会発表] (計 27 件)

(1) 大津美奈・柴田裕介・田村謙太郎・西村いくこ・小鹿一・森仁志・川北一人・竹本大吾 Nup107-160 複合体に含まれるヌクレオポリンの病害抵抗性と病害ストレス応答性エチレン生成における役割 平成 25 年度日本植物病理学会大会. 岐阜大学. 岐阜. 2013.3.27

(2) 小嶋博樹・水谷安希・柴田裕介・川北一人・竹本大吾 ベンサミアナタバコの SAR8.2 はジャガイモ疫病菌抵抗性に必須な内生エリシタータンパク質である. 平成 25 年度日本植物病理学会大会. 岐阜大学. 岐阜. 2013.3.27

(3) 柴田裕介・小鹿一・川北一人・竹本大吾 ベンサミアナタバコはジャガイモ疫病菌侵入

前と侵入後に活性化するテルペノイド合成経路をスイッチする. 平成 25 年度日本植物病理学会大会. 岐阜大学. 岐阜. 2013.3.27

(4)大津美奈・柴田裕介・小鹿一・森仁志・川北一人・竹本大吾 ベンサミアナタバコの病害抵抗性応答誘導時のエチレン生合成における核膜孔タンパク質 NUP75 の機能解析. 平成 24 年度 日本植物病理学会関西西部会. とりぎん文化会館. 鳥取. 2012.9.28

(5)柴田裕介・小鹿一・川北一人・竹本大吾 ベンサミアナタバコの PDR1 を介した複数の抗菌性テルペノイドの分泌がジャガイモ疫病菌に対する侵入・拡大抵抗性に重要である. 平成 24 年度 植物感染生理談話会. 休暇村近江八幡. 近江八幡. 2012.8.31

(6)Otsu M., Shibata Y., Ojika M., Mori H., Kawakita K. and Takemoto D. A nuclear pore complex protein, Nup75, is involved in ethylene biosynthesis for phytoalexin production of *Nicotiana benthamiana* in the defense responses against *P. infestans*. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. 2012. 7.31

(7)Shibata Y., Ojika M., Kawakita K. and Takemoto D. NbPDR1, a PDR-type ABC transporter, confers pre- and post-invasion resistances of *Nicotiana benthamiana* against potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. 2012. 7.31

(8)Takemoto D. Imaging of pathogenic and symbiotic fungi in culture and during infection. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. 2012. 7.29

(9)大津美奈・柴田裕介・小鹿一・森仁志・川北一人・竹本大吾. ベンサミアナタバコのジャガイモ疫病菌抵抗性に必須な核膜孔タンパク質 NUP75 の機能解析. 平成 24 年度 日本植物病理学会大会. 福岡国際会議場. 福岡. 2012.3.29

(10)柴田裕介・小鹿一・川北一人・竹本大吾. ベンサミアナタバコ PDR1 を介したジャガイモ疫病菌侵入抵抗性に必須な抗菌物質の生合成系に関する研究. 平成 24 年度 日本植物病理学会大会. 福岡国際会議場. 福岡. 2012.3.29

(11)Shibata Y., Ojika M., Kawakita K. and Takemoto D. PDR-type ABC transporter contributes pre- and post-invasion resistance of *Nicotiana benthamiana* against *Phytophthora infestans*. The 2nd Korea-Japan Joint Symposium, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan. 2012. 3.27

(12)柴田裕介・川北一人・竹本大吾. ベンサミアナタバコの疫病菌抵抗性に必須な ABC トランスポーターPDR1 は複数の抵抗反応を制御する. 平成 24 年度 日本植物生理学会. 京都産業大学. 京都. 2012.3.16

(13)小嶋博樹・水谷安希・柴田裕介・川北一人・竹本大吾. ベンサミアナタバコのジャガイモ疫病菌抵抗性に必須な SAR8.2 遺伝子群の機能解析. 平成 23 年度 日本植物病理学会関西西部会. サンポートホール高松. 高松. 2011.10.1

(14)柴田裕介・小鹿一・川北一人・竹本大吾. ベンサミアナタバコのジャガイモ疫病菌抵抗性に必須な PDR 型 ABC トランスポーターの機能解析. 平成 23 年度 日本植物病理学会関西西部会. サンポートホール高松. 高松. 2011.10.1

(15)松川みずき・柴田裕介・小鹿一・川北一人・竹本大吾. ベンサミアナタバコのエリシター認識と疫病菌抵抗性におけるカルレテイキュリン遺伝子 *NbCRT3* の役割. 平成 23 年度 日本植物病理学会関西西部会. サンポートホール高松. 高松. 2011.10.1

〔図書〕 (計 1 件)

Takemoto D. and Jones D.A. (2013) Particle bombardment-mediated transient expression to identify localization signals in plant disease resistance proteins and target sites for the proteolytic activity of pathogen effectors. *Methods Mol. Biol.* in press. 査読有り

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~byori/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹本 大吾 (TAKEMOTO DAIGO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科
・准教授
研究者番号：30456587

