

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：85301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580071

研究課題名(和文) プラントアクティベーターが標的とする植物因子群の同定と植物免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of plant immune systems controlled by plant activator

## 研究代表者

鳴坂 義弘 (NARUSAKA, Yoshihiro)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・その他部局等・その他

研究者番号：20335459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物自身を持つ免疫力を高めることで病害を防除するプラントアクティベーター(PA)は次世代型の病害防除剤として注目されている。PAは病原体に直接作用せず、環境への負荷が小さい、耐性菌の発生リスクが低いといった特徴を有する。PAの開発には、殺菌性を指標とした開発手法が通用しないため、これまで効率的な選抜方法が存在しなかった。そこで、私たちが独自に開発した選抜法により、これまでに3万種以上の化合物を選抜した結果、植物の免疫力をアップする新規化合物を発見した。本剤を処理した植物は病原菌に対する抵抗力を発揮し、病原菌の感染を抑制した。本剤による環境低負荷型の農薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Plant activators are chemicals that induce plant defense responses to a broad spectrum of pathogens. Plant activator is regarded as environmentally friendly. Plant activators that enhance host defense activity are less likely to encounter fungal resistance than are many conventional systemic fungicides. In this study, we performed large-scale screening using a high-throughput screening system for plant activators. In the results, we identified a new potential plant activator, 5-(cyclopropylmethyl)-6-methyl-2-(2-pyridyl)pyrimidin-4-ol, named A1. During bacterial infection, Arabidopsis plants pretreated with A1 showed dramatically decreased disease symptoms. Microarray data revealed that A1-treated leaves not challenged with pathogen showed up-regulation of genes related to reactive oxygen species and defenses. Our results indicate that A1 enhances plant defenses against pathogen invasion and has broad potential applications in agriculture.

研究分野：植物病理学

キーワード：プラントアクティベーター 抵抗性誘導剤 植物免疫 病害防除 環境低負荷 シロイヌナズナ 病害  
抵抗性 農薬

1. 研究開始当初の背景

世界の食料生産の約15%に相当する作物が病害により失われている。これは実に8-10億人分の食料に相当する。病害は食料の安定生産を阻害する最大の要因であり、病害を防除するために必要不可欠な農業用資材として殺菌剤が使用されている。しかし殺菌剤を中心に据えた防除戦略は「環境」および「生態系」への影響が懸念される。近年、植物自身が持つ防御システムを活性化して病害を防除する環境負荷低減型の病害防除法が注目されており、その中の一つとして、植物の免疫システムを活性化する病害防除剤であるプラントアクティベーターの開発が試みられている。これまでに、オリゼメート、バイオン、ブイゲット、ルーチンなどが開発され市場に投入された(文献 1)。同時に、これら化合物は植物の免疫システムを理解するためのツールとして基礎研究に用いられてきた。

病原体の攻撃に対する植物の主要な防御応答シグナル伝達経路はサリチル酸(SA)、エチレン(ET)、および、ジャスモン酸(JA)シグナル伝達経路であることが知られている(図1)。

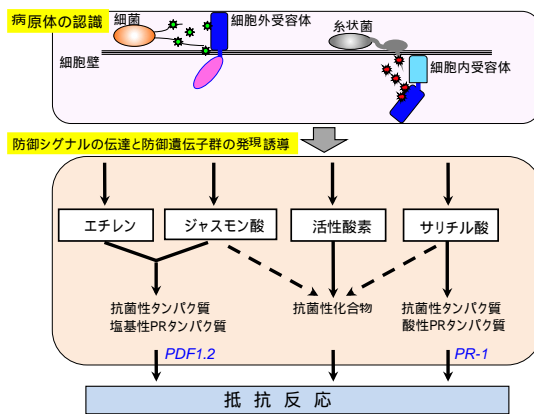


図1 植物の防御応答シグナル伝達経路の概略図

前述した既存のプラントアクティベーターは SA シグナル伝達経路に作用すると想定されているが、これらに対応する植物側のリセプターや作用機作の詳細は解明されておらず、プラントアクティベーターを開発する上でのブラックボックスとなっている。また、プラントアクティベーターによって誘導される植物の病害抵抗性は、抵抗反応に関わる多数の遺伝子の働きの総和と考えられることから、これら遺伝子を統括的に制御する転写因子が重要な役割を担っていると想定される。そのため、ネットワーク上の制御因子(転写因子)を明らかにすることはプラントアクティベーターの作用機作を理解するために重要である。私はこれまでにプラントアクティベーターのハイスループットスクリーニングシステムおよび評価システムの開発に成功し(文献 2)、本システムを用いて、50 種以上の植物の免疫システムを活性化す

る低分子化合物を取得した。これら低分子化合物は既存剤とは異なる化学構造を有しており、構造が異なる化合物それぞれが異なる植物側因子に対応している可能性があることから、これら低分子化合物は病害防御シグナル伝達ネットワークの主要因子群を明らかにするためのツールとして期待できる。例えば、私たちが発見した A1 剤は、シロイヌナズナの SA 経路を活性化し、病害を防除することを明らかにした。さらに本化合物の類縁体や展開化合物を得、植物免疫を活性化するために必要な活性中心構造の推定に成功した。また、これらを用いた予備的な独自の構造-転写プロファイル相関解析により、活性中心構造特異的に発現する遺伝子群を推定した。

<引用文献>

鳴坂義弘、平塚和之、能年義輝、プラントアクティベーターによる植物免疫の活性化と化学遺伝学への利用. 化学と生物, vol. 48, 706-712 (2010)  
 Narusaka Y. (1 番目、他 6 名) High-throughput screening for plant defense activators using a *-glucuronidase-reporter gene assay in Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* 26, 345-349 (2009)

2. 研究の目的

これまでに取得した植物免疫を活性化する 50 種以上の低分子化合物のうち、活性の高い 2~3 種の化合物を選抜し、その類縁体を取得した。これら化合物について構造-転写プロファイル相関解析を実施し、発現変動する遺伝子群を取得する。このような活性中心構造特異的に発現変動する遺伝子群には、病害防御シグナル伝達ネットワーク上の制御因子(転写因子)や、化合物の結合因子が含まれていることが期待される。現在までに、予備的な構造-転写プロファイル相関解析により、転写因子および DNA 結合蛋白質をコードする遺伝子が得られている。このような候補因子について、シロイヌナズナにより破壊株および形質転換体を取得または作製して、遺伝子産物の機能を解明することにより病害防御シグナル伝達ネットワーク上にこれら因子をマップしていく。また、シロイヌナズナ変異体ライブラリーをスクリーニングし、植物免疫を活性化する低分子化合物に対する不感受性変異体を得る。本変異体の原因遺伝子をマッピングし、病害防御シグナル伝達ネットワークに関わる因子を同定する。次いで、私たちが解明した *Brassica rapa* のゲノム情報を活用して(文献 3)、シロイヌナズナで発見した植物免疫の主要因子についてアブラナ科植物との比較解析により、シロイヌナズナで得た知見を農作物へ移管するための基礎・基盤技術を確立する。さらに将来は上述により同定された因子を利用した病

害耐性植物の作製を試みる。

#### <引用文献>

Narusaka Y. (104 番目、他 109 名), The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics*, 43, 1035-1039 (2011)

### 3. 研究の方法

植物免疫を活性化する低分子化合物を処理したシロイヌナズナにおいて構造-転写プロファイル相関解析を実施して標的遺伝子群を同定し、当該遺伝子の変異体を利用して遺伝子の機能を解析した。具体的には、既に取得した植物免疫を活性化する 2~3 種の低分子化合物のうち、その類縁体および構造展開した化合物について構造-転写プロファイル相関解析を実施し、標的となる遺伝子群を取得した。さらに、本遺伝子について *Brassica rapa* との比較ゲノム解析により、モデル実験植物の知見を農作物に利用するための基礎データを得た。

(材料) シロイヌナズナ Columbia (Col-0; *Arabidopsis thaliana*) (炭疽病菌に感受性)、アブラナ科野菜類炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*)

(1) 植物免疫を活性化する低分子化合物を処理したシロイヌナズナにおける構造-転写プロファイル相関解析による標的遺伝子の同定

既に取得している植物免疫を活性化する低分子化合物とその類縁化合物をシロイヌナズナに前処理し、処理 2 日後にアブラナ科野菜類炭疽病菌を接種して、各化合物の病害防除効果を評価した。本データを構造-転写プロファイル相関解析の生物活性データとして用いた。また、本化合物処理による炭疽病の防除は抗菌活性によらないことを確認した。

既に取得している 2~3 種の低分子化合物を用いて構造-転写プロファイル相関解析を実施し、標的遺伝子を探索した。具体的には以下に記述する。シロイヌナズナの防御応答遺伝子群を活性化する A1 剤 : 5-(cyclopropylmethyl)-6-methyl-2-(2-pyridyl)pyrimidin-4-ol はシロイヌナズナへの前処理により、その後の炭疽病菌接種に対する病害防除効果を有している。A1 剤の類縁化合物 A2 剤 : 6-(methoxymethyl)-2-[5-(trifluoromethyl)(2-pyridyl)]pyrimidin-4-ol は A1 剤と同等以上の炭疽病抑制効果が認められている。これに対して、類縁化合物 A3 剤 : 5-chloro-4-methyl-6-piperidyl-2-[5-(trifluoromethyl)(2-pyridyl)]pyrimidine は炭疽病抑制効果を示さない。このような病害防除効果 (生物活性) の異なる類縁化合物をシロイヌナズナに処理して継続的にサンプリ

ングした。次いで、それぞれのサンプルを用いてマイクロアレイ解析を実施することにより遺伝子発現プロファイルを取得した。生物活性データをもとに各化合物処理の遺伝子発現プロファイルを比較解析し、病害防除時特異的に発現または抑制する遺伝子群を絞り込んだ。

(2) 標的遺伝子の破壊株および過剰発現株を用いた標的因子の機能解析

前項で取得した各低分子化合物の病害防除効果に関連して発現プロファイルが変動した遺伝子群について、これまでに解析した防御応答に関する遺伝子発現プロファイルデータベースと比較解析し、遺伝子の機能を推定するとともに、候補遺伝子を絞り込んだ。次いで、選択した遺伝子について、シロイヌナズナの遺伝子破壊株および過剰発現株を ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) から取得または独自に作製した。

取得および作製したシロイヌナズナの遺伝子破壊株および過剰発現株に炭疽病菌を接種し、病害感受度を検定した。表現型が変化した変異株の原因遺伝子は当該化合物処理により活性化する病害防御シグナル伝達ネットワークに関する因子と考えられる。

(3) 植物免疫を活性化する低分子化合物に対する不感受性変異体の解析

シロイヌナズナ変異体ライブラリーをスクリーニングし、植物免疫を活性化する低分子化合物に対する不感受性変異体を得た。本変異体の原因遺伝子をマッピングし、病害防御シグナル伝達ネットワークに関わる因子の同定を試みた。

(4) シロイヌナズナ-*Brassica rapa* 間比較ゲノム解析による標的因子の機能解析

前項で明らかになった病害防御シグナル伝達ネットワークに関する遺伝子について、*B. rapa* (ハクサイ) のホモログを解析することにより、病害防御応答の普遍性を明らかにすることを試みた。

### 4. 研究成果

(1) 植物免疫を活性化する低分子化合物を処理したシロイヌナズナにおける構造-転写プロファイル相関解析による標的遺伝子の同定

既に取得している植物免疫を活性化する低分子化合物 A1 剤およびその類縁体をシロイヌナズナ (生態型 Col-0) に前処理し、処理 2 日後にアブラナ科野菜類炭疽病菌を接種して、各化合物の病害防除効果を評価した。その結果、A1 剤の類縁化合物 A2 剤は A1 剤と同等以上の炭疽病抑制効果を示した。これに対して、類縁化合物 A3 剤は炭疽病抑制効果を示さなかった。

このような病害防除効果 (生物活性) の異なる低分子化合物 A1 剤およびその類縁体を

用いて構造-転写プロファイル相関解析を実施し、標的遺伝子の同定を試みた。これら化合物をシロイヌナズナに処理して継時的にサンプリングした。次いで、それぞれのサンプルを用いてマイクロアレイ解析を実施し遺伝子発現プロファイルを取得した。さらに、低分子化合物処理による炭疽病抑制効果（生物活性データ）と各化合物処理した植物の遺伝子発現プロファイルとの相関解析を実施し、病害防除時特異的に発現または抑制する遺伝子群を絞り込み、これらをリスト化した。本成果によりこれら遺伝子群の特性が明らかになり、プラントアクティベーターの開発のための標準化システムの構築に資することが可能となった。

農業現場では、畑作物について植物細菌病を効果的に防除できる農薬の開発が求められている。そこで、プラントアクティベーターの社会実装を考慮し、候補剤の植物細菌病に対する防除効果を評価した。

A1 剤およびその類縁体をシロイヌナズナ（生態型 Col-0）に前処理し、処理 2 日後に黒斑細菌病菌（*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*）を噴霧接種して、各化合物の病害防除効果を評価した。その結果、A1 剤および A2 剤は黒斑細菌病に対する病害抑制効果を示した。これに対して、類縁化合物 A3 剤の感染抑制効果は限定的であった（図 2）。

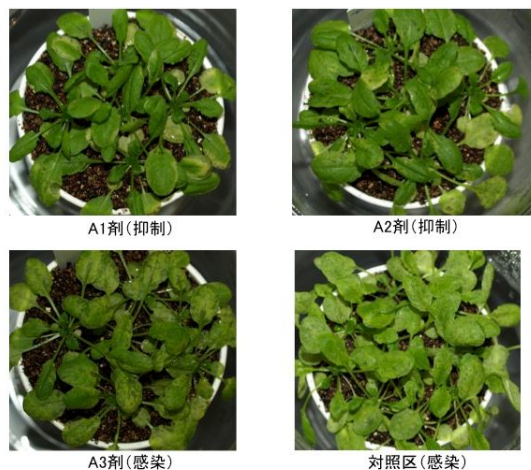


図2 化合物処理後、黒斑細菌病菌を接種して3日後の病徴

生物学的な解析により、A1 剤処理したシロイヌナズナは病原体（黒斑細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*、灰色かび病菌 *Botrytis cinerea*）の攻撃に対して速やかに活性酸素種を細胞に蓄積することが明らかになった。活性酸素種は病原体に対する直接的な抗菌活性を有するだけでなく、細胞壁のリグニン化や糖タンパク質架橋反応を促進し防御壁を強化することで病原体の進入を阻止する。また、活性酸素種は防御応答のシグナル物質として重要な役割を担っている。以上により、A1 剤は抵抗性誘導のプライミング効果を有すると考えられる。

(2) 標的遺伝子の破壊株および過剰発現株を用いた標的因子の機能解析

前項でリスト化した遺伝子群を用い、各低分子化合物の病害防除効果に関連して発現プロファイルが変動した遺伝子群について、これまでに解析した防御応答に関する遺伝子発現プロファイルデータベースと比較解析し、遺伝子の機能を推定するとともに、候補標的遺伝子を絞り込んだ。次いで、選択した遺伝子について ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) からこれら遺伝子の破壊株を取得し、自殖により null 変異体を作製した。また、選択した遺伝子について過剰発現株を独自に作製した。

これら変異体に A1 剤を処理し、処理 2 日後にアブラナ科野菜類炭疽病菌を接種して、各化合物の病害防除効果を評価した。その結果、A1 剤を処理した変異体は炭疽病の発病を抑制せず、A1 剤の効果が消失した。以上により、変異体における原因遺伝子は A1 剤による抵抗性誘導に重要な因子と考えられた。本遺伝子はサリチル酸シグナル伝達系に位置している。

(3) 植物免疫を活性化する低分子化合物に対する不感受性変異体の解析

独自に作製した EMS 処理シロイヌナズナ Col-0 変異体ライブラリーを用い、植物免疫を活性化する低分子化合物 A1 剤に対する不感受性変異体のスクリーニングを実施した。その結果、高濃度 A1 剤含有培地上で生育する数個の変異体を得た。これらについて後代を得、化合物に対する感受度を解析した結果、表現系が消失した。そこで、再度選抜を行い、新たに数個の変異体を得た。現在、後代の表現系を解析している。

(4) シロイヌナズナ-*Brassica rapa*間比較ゲノム解析による標的因子の機能解析

シロイヌナズナを用いたマイクロアレイ解析によって明らかになった A1 剤処理により発現誘導する遺伝子群について、シロイヌナズナと *B. rapa* (ハクサイ) 間の比較ゲノム解析を行った。*B. rapa* におけるマイクロアレイ解析の結果から、A1 剤は *B. rapa* においてもシロイヌナズナと同様にサリチル酸シグナル伝達系に作用することが示唆された。また、これら遺伝子群は *B. rapa* における植物免疫の活性化のマーカー遺伝子としての利用が考えられ、新たなプラントアクティベーター開発のツールとして期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Sun TJ, Lu Y, Narusaka M, Shi C, Yang YB, Wu JX, Zeng HY, Narusaka Y, Yao N. A novel pyrimidin-like plant activator stimulates plant disease resistance and promotes growth. PLoS One, 査読有, 10,

2015, e0123227.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0123227.

Narusaka M, Minami T, Iwabuchi C, Hamasaki T, Takasaki S, Kawamura K, Narusaka Y. Yeast cell wall extract induces disease resistance against bacterial and fungal pathogens in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica* crop. *PLoS One*, 査読有, 10, 2015, e0115864.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0115864.

Narusaka Y, Shinya T, Narusaka M, Motoyama N, Shimada H, Murakami K, Shibuya N. Presence of LYM2 dependent but CERK1 independent disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 査読有, 8, 2013, e25345.  
DOI: 10.4161/psb.25345.

Narusaka M, Yao N, Iuchi A, Iuchi S, Shiraishi T, Narusaka Y. Identification of *Arabidopsis* accession with resistance to *Botrytis cinerea* by natural variation analysis, and characterization of the resistance response. *Plant Biotechnology*, 査読有, 30, 2013, 89-95  
DOI: <http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.12.1226a>

〔学会発表〕(計10件)

鳴坂真理、鳴坂義弘. 環境にやさしい革新的病害防除技術の開発研究、平成26年度県立研究機関協議会研究交流発表会、2015年2月18日(総社)

鳴坂義弘. 環境負荷低減型の新規病害防除資材の創製、平成26年度県立研究機関協議会研究交流発表会、2015年2月18日(総社)

鳴坂真理、鳴坂義弘. 環境にやさしい革新的病害防除技術の開発研究、第14回RIBSバイオサイエンスシンポジウム「進化する果樹育種」、2014年11月14日(岡山)

山口公志、山田健太、白川友美、石川和也、鳴坂真理、鳴坂義弘、市村和也、深溝慶、川崎努. MAPKKKa はキチンに応答したMAPキナーゼの活性化を制御する、平成26年度日本植物病理学会関西西部会、2014年9月27-28日(富山)

鳴坂義弘、南太一、浜崎隆史、高崎智子、北川隆徳、安原貴臣、鳴坂真理. 植物に病害抵抗性を誘導するビール類酵母抽出物の作用機作の解明、平成26年度日本植物病理学会関西西部会、2014年9月27-28日(富山)

山口公志、山田健太、白川友美、船間亮

汰、石川和也、鳴坂真理、鳴坂義弘、市村和也、深溝慶、渋谷直人、川崎努. AtRLCK1はMAPKKKaを介してキチンに応答したMAPキナーゼの活性化を制御する、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18-20日(富山)

鳴坂義弘、南太一、浜崎隆史、高崎智子、川村公人、鳴坂真理. ビール類酵母抽出物による病害抵抗性誘導機構の解明、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18-20日(富山)

新屋友規、山口公志、出崎能文、成澤知子、前田佳菜子、小林佳弘、鈴木丸陽、谷本匠、竹田潤、船間亮汰、山田健太、鳴坂真理、鳴坂義弘、賀来華江、川崎努、渋谷直人. MAMPsシグナリングにおける受容体様細胞質キナーゼAtRLCK1の機能解析、平成25年度日本植物病理学会関西西部会、2013年9月26-27日(岡山)

新屋友規、山口公志、出崎能文、成澤知子、前田佳菜子、小林佳弘、鈴木丸陽、谷本匠、竹田潤、船間亮汰、山田健太、鳴坂真理、鳴坂義弘、賀来華江、川崎努、渋谷直人. キチンシグナリングに關与する受容体様細胞質キナーゼAtRLCK1の機能解析、平成25年度植物感染生理談話会、2013年8月19-21日(小松)

山口公志、新屋友規、船間亮汰、石川和也、山田健太、鳴坂真理、鳴坂義弘、多田安臣、市村和也、渋谷直人、川崎努. イネとシロイヌナズナで保存されたキチンシグナル伝達経路の解析、平成25年度日本植物病理学会大会、2013年3月27-29日(岐阜)

〔その他〕

ホームページ等

岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所 植物免疫研究グループ

HP:<http://www.kibi.ne.jp/~narusaka/index.html>

岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所

HP:<http://www.pref.okayama.jp/soshiki/203/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳴坂 義弘 (NARUSAKA, Yoshihiro)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・専門研究員

研究者番号: 20335459