

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658100

研究課題名(和文)トレハロース誘導抵抗性をモデルにした根部から地上部へのシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of trehalose-induced systemic resistance through root to shoot signaling

研究代表者

今井 亮三 (Imai, Ryozo)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター寒地作物研究領域・上席研究員

研究者番号：90291913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：根部のトレハロース処理により，抵抗性に関与する転写因子WRKY10およびWRKY45の発現がまず短時間で根部に誘導され，6-12時間目以降に地上部にも誘導された．転写因子の下流で実際に抵抗性の発現に関与している防御(PR)タンパク質の発現も2-4時間後から蓄積を始め，地上部では12-48時間後にかけて強く誘導された．これらの結果から，根部で発生したシグナルが地上部に伝えられることが示唆された．トレハロース処理後根部において1時間以内に急激なジャスモン酸(JA)およびその活性体(JA-Ile)の蓄積が見られたことから，ジャスモン酸およびその代謝物がシグナル分子である可能性が示唆された．

研究成果の概要(英文)：In response to trehalose treatment in roots, defense-related transcription factors, WRKY10 and WRKY45, were induced immediately in root and then in shoot after 6-12 h. Pathogenesis-related (PR) proteins are also found to be induced in root at 2-4 h after the treatment and 12-48 h in shoot. Trehalose-induced immediate JA and JA-Ile accumulation, suggesting JA-related compounds can be a signaling molecule that delivers the signal from root to shoot.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：トレハロース 病害抵抗性 植物ホルモン シグナル イネ

## 1. 研究開始当初の背景

トレハロースは、グルコースが  $\alpha$ -1,1 結合した二糖であり、主に貯蔵糖あるいはストレス保護物質として、細菌、糸状菌、無脊椎動物など広範囲の生物群に蓄積する。一方、高等植物においては、トレハロースは極微量にしか存在せず、シグナル様物質として機能することが示唆されている。我々は、イネ根部を 5 mM のトレハロース溶液で処理すると防御応答が誘導され、いもち病抵抗性が獲得されることを見出した。その過程で、防御関連植物ホルモンであるジャスモン酸やエチレンの生合成遺伝子も発現誘導されたことから、これらのホルモン作用を介した応答が起きていることが示唆された。また、WRKY や JAmyb といった抵抗性関連転写因子群もトレハロース処理により誘導され、更にその下流で働く PR (抗菌性)タンパク質遺伝子や、抗菌性化合物 (ファイトアレキシン) 生合成遺伝子の誘導も観察される。従ってトレハロースは、抵抗性 (植物免疫) 応答シグナルの上位に位置し、抵抗性応答全体を活性化していると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、トレハロースにより誘導される抵抗性の分子機構について次の点を明らかにすることを目的とした。1) 根部トレハロース処理により、茎葉部に病害抵抗性が誘導される分子機構を解析する。2) 作用部位 (根組織) において起こる一次的な抵抗性応答の全体像とその制御メカニズムを解明する。3) 根より放出され茎葉部に抵抗性応答を誘導する移動性シグナル物質を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) トレハロース処理法

水耕栽培した発芽後 7 日目のイネ幼苗に対して、水耕液をトレハロース (5 mM) 水溶液に代え、トレハロース処理を行った。細かくタイムコースを取って、経時的に根及び茎葉組織をサンプリングした。

### (2) 遺伝子発現解析

リアルタイム PCR は SYBR Green Real time PCR master mix -plus- (TOYOBO) を用いた。cDNA サンプルは希釈したものを合計容量 20  $\mu$ l につき 2  $\mu$ l 用いた。反応条件は 95  $^{\circ}$ C、1 分間の熱変性後、94  $^{\circ}$ C、30 秒間の熱変性、60  $^{\circ}$ C、15 秒間のアニーリング、72  $^{\circ}$ C、45 秒間の伸長反応を 40 サイクル行った。プライマーセットは Table に示したものを使用した。反応および検出は ABI Prism 7500 Sequence Detection system (PE Applied Biosystems) を用いた。検量線はそれぞれ cDNA を段階希釈して用いた。内部標準遺伝子として、Ubiquitin を用い、その発現量を基に補正した。

### (3) マイクロアレイ解析

組織より Total RNA を抽出し、RNA Spike In Kit で蛍光ラベルした。アジレント社製 44K

イネマイクロアレイを用いて 65  $^{\circ}$ C で 17 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションを行ったスライドガラスを室温で Gene Expression 洗浄バッファ 1、0.05% Triton X-102 で 1 分間、Gene Expression 洗浄バッファ 2 で 1 分間、アセトニトリル中で 30 秒洗浄した後に、Agilent Stabilization and Drying Solution で洗浄した。アジレント社製マイクロアレイスキャナーで蛍光シグナルを検出した。遺伝子発現レベルの解析は Genespring ソフトウェアを用いて行った。

### 4) 植物ホルモンの定量

ホルモンの抽出はメタノール-水-酢酸 (80:19.5:0.5v/v) で組織より抽出し、C-18 カラムで精製し、UPLC-MS/MS を用いて定量した。

## 4. 研究成果

### (1) システミックな抵抗性誘導機構

根部のトレハロース処理により、葉で病害抵抗性が獲得されることから、トレハロース受容部位である根組織と、抵抗性発現部位である葉組織における抵抗性関連遺伝子の発現誘導機構を解析した。根部を 5mM トレハロース処理後、根及び葉組織を経時的にサンプリングし、それぞれの組織においてトレハロース処理による防御関連遺伝子の誘導をリアルタイム PCR を用いて解析した。まず根組織においては、トレハロース処理後 2 時間でジャスモン酸合成遺伝子である LOX 及び AOS、の発現誘導が観察された。4 時間で一旦ピークを迎えた後、24 時間で再びピークを示した。両遺伝子の発現量の変化はパラレルであった。防御応答の転写因子 WRKY10、WRKY45、は異なった応答を示した (図 1)。WRKY45 はジャスモン酸生合成遺伝子の挙動との相関性が見られた。また、PR タンパク質遺伝子 PBZ1、CHI-1 についても発現がトレハロース処理により誘導されることが示された (図 1)。葉部における発現についてであるが、全ての遺伝子において根部同様トレハロース処理による誘導が観察された。しかし、発現パターンは大きく異なっており、根部における誘導から数時間から十数時間のタイムラグの後に誘導が観察された。また発現誘導率も、PBZ1 以外は根部に比べて低くなっていた (図 1)。これらの結果から、トレハロースシグナルを受容した根組織で、防御関連遺伝子の発現が誘導された後、情報伝達物質を介して葉茎でそれらの遺伝子の発現が誘導されると推定された。情報伝達物質に関してはジャスモン酸である可能性も考えられるが、葉部へのシグナル伝達に要する時間が比較的長いことから、その代謝物あるいは全く別の物質である可能性も考慮する必要がある。

### (2) 根におけるローカル応答の解析

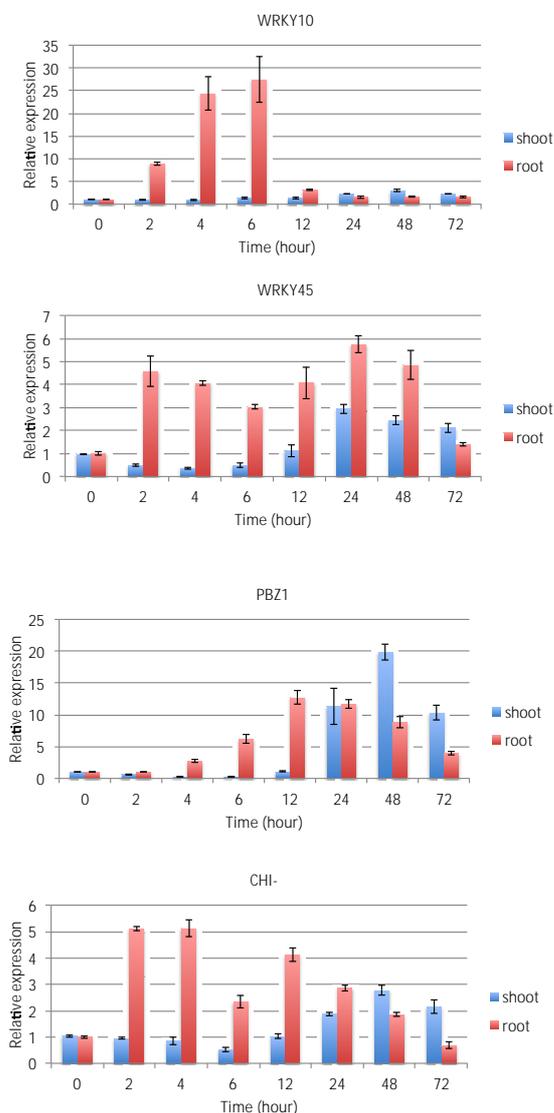


図1.トレハロース(5mM)根部処理による防御関連遺伝子の発現

トレハロース誘導獲得抵抗性における遺伝子発現レベルの解析から、トレハロース誘導抵抗性は、根部のトレハロース処理より数時間後に見られる根組織におけるローカルな反応と、数時間～十数時間後に見られる茎葉部におけるシステミックな応答からなることが明らかとなった。そこで、根部におけるローカル反応について詳細に解析した。マイクロアレイを用いて30分以内に5倍以上誘導される遺伝子を網羅的に解析したところ、220個の遺伝子が同定された。これらのうち転写因子に着目して解析したところ、17個の転写因子が含まれており、その内訳は7個のWRKY、2個のMYB、2個のZAT、2個のCBFの各転写因子とERF, bHLH, RAP2.6, ICE1の各転写因子が各1個であった。これらの発現は処理後30分で最大となるもの、処理後2時間にかけて更に誘導されるもの、処理後2時間でほぼ一定のもの3種類のパターンが見られた。特に処理後30分で最大となる遺伝子は、

トレハロース誘導抵抗性のマスター転写因子である可能性が高いことから、今後詳細な解析が必要である。

### (3) 移動シグナルの解析

次に、トレハロース処理時に根部で生成される移動性シグナルについて解析した。トレハロース処理後経時的に根組織を回収し、メタノール/酢酸抽出後のサンプルをUPLC-MS/MSにより解析した。その結果、トレハロース処理後1-2時間で、ジャスモン酸(JA)、ジャスモン酸イソロイシン(JA-Ile)、アブジジン酸(ABA)のレベルが急激に上昇することが明らかとなった(図2)。この上昇は、処理後2時間以降は速やかに消失した。このことからTSRの1次的なシグナルとしてJAあるいはABAが関与していることが示唆された。一方、サリチル酸(SA)の蓄積はトレハロースの処理で大きく変動しなかったことから、SAは移動性シグナルではないことが示唆された(図2)。興味あることにJAやABA生合成遺伝子は短時間のトレハロース処理では誘導されず、もっと生合成を伴わないレベルの上昇、例えば配糖体等不活化体からの活性化が起こっているのではないかと推定された。

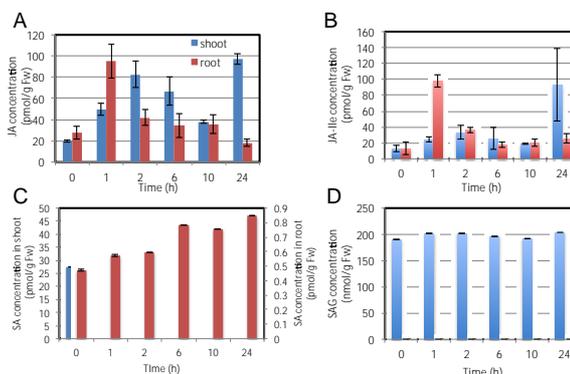


図2.トレハロース(5mM)根部処理による根部と茎葉部におけるホルモン蓄積量の変化

### 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 0件)

〔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

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 亮三 (IMAI RYOZO)  
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究  
機構・北海道農業研究センター・寒地作物研  
究領域・上席研究員  
研究者番号：90291913