

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292024

研究課題名(和文)ナス科植物に特異的な病害抵抗性誘導ペプチドSAR8.2の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of a secretory peptide SAR8.2 on induced disease resistance of Solanaceae plants

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナス科のモデル植物であるベンサミアナを用いて、ジャガイモ疫病菌抵抗性に関する植物の抵抗性機構に関する遺伝子群の探索を行った。その結果、これまでに機能解析例のないナス科特異的な低分子量の分泌タンパク質SAR8.2mが抵抗性に必須であることが示された。SAR8.2mサイレンシング株にジャガイモ疫病菌を接種すると、病原菌の感染が植物体全身に蔓延してしまう極めて重篤な病徴が認められる一方で、他の病原菌に対する抵抗性に影響は認められなかった。解析の結果、SAR8.2には植物の抵抗性を誘導する活性があること、ジャガイモ疫病菌感染時に病原菌の感染行動を抑制する活性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nicotiana benthamiana is resistant to the potato blight pathogen, *Phytophthora infestans*. Screening using virus-induced gene silencing identified NbSAR8.2m, a secretory peptide, as an essential factor for the resistance. NbSAR8.2m-silenced plant is highly susceptible to *P. infestans*, leading systemic infection of the pathogen. In contrast, silencing of NbSAR8.2m showed no effect on the resistance to other pathogens, indicating that NbSAR8.2m is specifically involved in the resistance to *P. infestans*. While induction of cell death is impaired in NbSAR8.2m-silenced plants during the infection of *P. infestans*. Production of reactive oxygen species (ROS) was suppressed in SAR8.2m-silenced plants during the infection of *P. infestans*, but ROS production induced by elicitor was comparable between control and NbSAR8.2m-silenced plants. These results suggested that NbSAR8.2m may suppress the effectors activity of *P. infestans*.

研究分野：植物病理学

キーワード：病害抵抗性 ジャガイモ疫病菌 ナス科植物 分泌ペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* は、世界 4 大作物の 1 つであるジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の難防除病原菌である。当研究グループでは、タバコ野生種であるベンサミアナ (*Nicotiana benthamiana*) の成熟個体が試験した全ての疫病菌レースに抵抗性であることを示し、さらにタバコ茎えそウイルス (TRV) を介して遺伝子発現を抑制 (サイレンシング) する技術を利用して、病害抵抗性に必須な遺伝子群の単離と機能解析を行なっている。これまでに、細胞外 LRR 型レセプターの成熟化や糖鎖修飾に関わる因子 (カルレティキュリン)、エチレン合成酵素群 (ACC 酸化酵素など)、ファイトアレキシン生合成酵素群 (FPP 合成酵素など) や抗菌物質の輸送に関わると推定

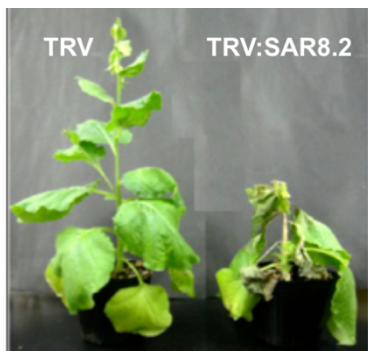


図 1. 対照株 (左) および SAR8.2 サイレncing 株 (右) における疫病菌病徴

される因子 (ABC トランスポーター) などの遺伝子を抵抗性に必須な遺伝子として単離している。このスクリーニングによって、ナス科植物に特異的に見出されている機能未定の分泌ペプチド (NbSAR8.2m) 遺伝子がベンサミアナのジャガイモ疫病菌抵抗性に必須であることが示された。これまでに 15 種の NbSAR8.2 遺伝子がタバコ (*N. tabacum*) よりエリシター誘導性遺伝子として単離されていたが、その機能は全く解っていない。大腸菌で発現した NbSAR8.2m をベンサミアナタバコに処理したところ、ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子群の発現が誘導された。この結果は、NbSAR8.2m が内生エリシターとして機能する可能性を示した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ベンサミアナの疫病菌抵抗性に主導的な役割をもつことが示されたペプチド NbSAR8.2 について、内生エリシターとしての活性と NbSAR8.2 認識に関与する細胞内情報伝達の解析、様々な病原菌への抵抗性についての解析、植物細胞で生産された後に細胞間隙に分泌された成熟型 NbSAR8.2m の構造解析を中心に行い、NbSAR8.2 のジャガイモ疫病菌抵抗性における機能と、作用機作を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) NbSAR8.2m ペプチドの構造決定および活性部位の特定

分泌シグナルを除いた NbSAR8.2m は 39 アミノ酸からなるペプチドである。そこで、野生株と NbSAR8.2m 発現抑制株の分泌タンパク質を質量分析により比較し、植物で生産されている成熟型 NbSAR8.2m を同定し、その構造の解明を目指す。

(2) NbSAR8.2m により活性化される植物の抵抗性応答の解明

NbSAR8.2m 処理したベンサミアナ葉において発現が誘導される遺伝子群を解析する。また、NbSAR8.2m をジャガイモに処理し、NbSAR8.2m ペプチドが他のナス科植物に対して活性を示すか否かを調査する。

(3) NbSAR8.2 ファミリーペプチドの機能比較  
これまでに NbSAR8.2m の相同遺伝子として、NbSAR8.2d を単離している。NbSAR8.2d サイレncing 株では、疫病菌への抵抗性が低下しなかったことより、NbSAR8.2 ペプチド間では機能分化があることが示された。

そこでベンサミアナタバコより全ての SAR8.2 相同遺伝子群を単離し、サイレンシング株の表現型の解析およびペプチドのエリシター活性を比較することで、NbSAR8.2 ファミリーペプチドの機能分化を明らかにする。

(4) NbSAR8.2m により活性化される植物情報伝達系の解明

NbSAR8.2m がベンサミアナ細胞に認識され、病害抵抗性に関連する遺伝子の発現を誘導する機構を解明するために、これまでにベンサミアナの疫病菌抵抗性に関与することが示されている遺伝子群のサイレンシング株を作成し、それらの NbSAR8.2m 応答性を調査する。

(5) ジャガイモ由来 StSAR8.2 のエリシター活性の解析

ジャガイモゲノムから NbSAR8.2m と同じ分泌シグナルをもつ複数の遺伝子を見いだしている (図 2)。そこで、ジャガイモ由来の StSAR8.2 ペプチドがジャガイモへのエリシター活性を持つか否かを調べる。

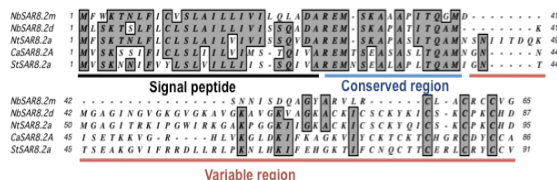


図 2. ナス科植物の SAR8.2 様タンパク質の構造

(6) NbSAR8.2m サイレncing 株の様々な病原菌への抵抗性の解析

NbSAR8.2m のジャガイモ疫病菌以外の病原菌抵抗性への役割を調べる。NbSAR8.2m サイレncing 株にダイズ茎疫病菌、灰色かび病菌、ウリ類炭疽病菌および青枯病菌を接種し、抵抗性や罹病性の程度を調査する。比較対照として、広範な病原菌に対する抵抗性に必須で

ある NbWIPK/NbSIPK サイレンシング株を用いる。

(7) ジャガイモ疫病菌感染時の NbSAR8. 2m の挙動の解析

NbSAR8. 2m のジャガイモ疫病菌感染時の挙動を調べるため、アグロバクテリウムを介した一過的発現により SAR8. 2m-GFP を発現し、ジャガイモ疫病菌接種前および接種後の GFP 蛍光の分布を調査する。

(8) SAR8. 2m 相互作用因子の単離

ジャガイモ疫病菌を接種したベンサミアナの cDNA から作製したライブラリーを用いて、SAR8. 2m と相互作用するジャガイモ疫病菌の因子を探索する。

#### 4. 研究成果

(1) NbSAR8. 2m ペプチドの構造決定および活性部位の特定

野生株と NbSAR8. 2m 発現抑制株の分泌タンパク質を質量分析により比較したところ、NbSAR8. 2m の推定シグナルペプチドを取り除いた 39 アミノ酸に相当すると予想されるピークが検出されたが、NbSAR8. 2m のサイレンシングによって多くの分泌タンパク質の生産に影響が認められ、明確な成熟型 NbSAR8. 2m 構造の決定には至らなかった。

(2) NbSAR8. 2m により活性化される植物の抵抗性応答の解明

NbSAR8. 2m を大腸菌に MBP との結合タンパク質として発現させ、精製したタンパク質を植物への処理に用いた。精製 NbSAR8. 2m を処理したベンサミアナ葉において発現が誘導される遺伝子の解析したところ、主にサリチル酸情報伝達に制御されている *PR1a* およびエチレンに制御されているフファイトアレキシン（カプジジオール）の合成酵素遺伝子である *EAS* の発現の誘導が認められ、NbSAR8. 2m が複数の植物ホルモン誘導性の遺伝子を活性化するエリシターであることが示された。また、精製 NbSAR8. 2m をジャガイモに処理したところ、ベンサミアナに対する活性と比較して誘導の程度は低いものの、*PR1a* やジャガイモのファイトアレキシン生合成遺伝子である *PVS3* の発現の誘導が認められた。

(3) NbSAR8. 2 ファミリーペプチドの機能比較

ベンサミアナのドラフトゲノムを解析したところ、NbSAR8. 2m 以外に 4 つの相同遺伝子が単離され、これを NbSAR8. 2a-d とした。これらの発現を調査したところ、NbSAR8. 2c については通常時及び抵抗性誘導時のいずれにおいても発現誘導が認められなかったため、偽遺伝子であると推定された。NbSAR8. 2a, b, d を同時にサイレンシングするベンサミアナを作出して疫病菌への抵抗性を調査したところ、抵抗性の顕著な低下は認められなかった。この結果から、NbSAR8. 2m が疫病菌抵抗性に主導的な役割を担っていることが示された。

一方で、NbSAR8. 2d を大腸菌に発現させ、精製したタンパク質をベンサミアナに処理したところ、NbSAR8. 2m と同等かそれ以上のエリシタ

一活性を示した。この結果から、NbSAR8. 2 ペプチドは内生エリシターとしての活性はあるものの、NbSAR8. 2m の疫病菌抵抗性における役割は、エリシター活性以外の機構によるものが中心的な役割を担っている可能性が高いこと示された。

(4) NbSAR8. 2m により活性化される植物情報伝達系の解明

細胞外 LRR 型レセプターの成熟化に必須な因子 (*CRT3*)、レセプター安定化に働く因子 (*SGT1*, *RAR1*)、MAP キナーゼ情報伝達因子 (*SIPK*, *WIPK*) およびエチレン情報伝達因子 (*EIN2*) の各サイレンシング株を作出し、NbSAR8. 2m ペプチド処理によって発現誘導される抵抗性関連遺伝子 *PR1* および *EAS* の発現への影響を調査した。その結果、*RAR1* 以外のサイレンシング株において、*PR1* あるいは *EAS* の発現量の低下が認められた。以上の結果から、SAR8. 2m は通常のエリシターの応答と同様の情報伝達系を介して、抵抗性遺伝子の発現を誘導していることが示唆された。

(5) ジャガイモ由来 SAR8. 2 のエリシター活性の解析

ジャガイモゲノムの解析を行ったところ、4 つの SAR8. 2 相同遺伝子が見出され、これらを *StSAR8. 2a*, *b*, *c*, *d* とした。そこで、4 つの *StSAR8. 2* 相同遺伝子の発現を調査したところ、*StSAR8. 2c* および *d* においてエリシター応答性の発現が認められた。そこで、*StSAR8. 2c* を MBP との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、精製したタンパク質をベンサミアナやジャガイモに接種したところ、抵抗性関連遺伝子の発現誘導が認められた。この結果から、ジャガイモの SAR8. 2 も病原菌の抵抗性に関与している可能性が示された。

(6) NbSAR8. 2m サイレンシング株の様々な病原菌への抵抗性の解析

NbSAR8. 2m および NbWIPK/NbSIPK サイレンシング株にダイズ茎疫病菌、灰色かび病菌、ウリ類炭疽病菌および青枯病菌を接種し、抵抗性あるいは罹病性の程度を対照株と比較した。その結果、NbWIPK/NbSIPK サイレンシング株では、いずれの病原菌に対する抵抗性も著しく低下していたのに対して、NbSAR8. 2m サイレンシング株では対照株と顕著な違いは認められなかった。この結果から、SAR8. 2m が疫病菌抵抗性に極めて特異的に働いていることが示された。

(7) ジャガイモ疫病菌感染時の NbSAR8. 2m の挙動の解析

NbSAR8. 2m-GFP の発現ベクターを導入したアグロバクテリウムをベンサミアナ葉に接種し、GFP 蛍光の観察によりその挙動を調べた。NbSAR8. 2m-GFP を発現した葉では、細胞表面に顆粒状の蛍光が観察され、NbSAR8. 2m が細胞外に分泌されている様子が観察された。ジャガイモ疫病菌を接種したところ、SAR8. 2m-GFP の蛍光が病原菌の内部に移行するようなパターンを示した (図 3)。

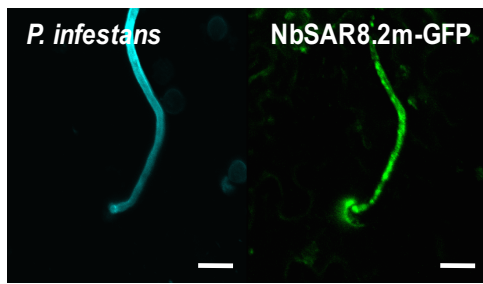


図 3. ジャガイモ疫病菌の菌糸内への NbSAR8.2m-GFP の移行. Bars= 30  $\mu$ m

(8) SAR8.2m 相互作用因子の単離  
 ベンサミアナ葉にジャガイモ疫病菌を接種し、様々な時間が経過した後のサンプルから cDNA を合成し、Yeast two hybrid 用のライブラリーを作成した。SAR8.2m と相互作用するジャガイモ疫病菌の因子の遺伝子を探索したところ、疫病菌の生育や病原性に関与すると推定されるいくつかの候補遺伝子が候補として見出された。

#### 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. Rin S., Mizuno Y., Shibata Y., Fushimi M., Katou S., Sato I., Chiba S., Kawakita K. and Takemoto D. (2017) EIN2-mediated signaling is involved in pre-invasion defense in *Nicotiana benthamiana* against potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. *Plant Signal Behav.* 12:e1300733. (査読有り)
2. Shibata Y., Ojika M., Sugiyama A., Yazaki K., Jones D.A., Kawakita K. and Takemoto D. (2016) The full-size ABCG transporters Nb-ABCG1 and Nb-ABCG2 function in pre- and post-invasion defense against *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 28: 1163-1181. (査読有り)
3. Mizuno Y. and Takemoto D. (2015) Detection of poly (A) RNA in mesophyll cells of *Nicotiana benthamiana* using in situ hybridization. *Bio-protocol* 5: e1576. (査読有り)
4. Sbaihat L., Takeyama K., Koga T., Takemoto D. and Kawakita K. (2015) Induced resistance in *Solanum lycopersicum* by algal elicitor extracted from *Sargassum fusiforme*. *Sci World J.* 2015: 870520. (査読有り)
5. Monjil M.S., Nozawa T., Shibata Y., Takemoto D., Ojika M. and Kawakita K. (2015) Methanol extract of mycelia from *Phytophthora infestans*-induced resistance in potato. *C. R. Biol.* 338: 185-96. (査読有り)
6. Ohtsu M., Shibata Y., Ojika M., Tamura K., Hara-Nishimura I., Mori H., Kawakita K. and Takemoto D. (2014) Nucleoporin 75 is involved in the ethylene-mediated production

of phytoalexin for the resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27: 1318-1330. (査読有り)

7. Sbaihat L., Takemoto D. and Kawakita K. (2014) The water extract of *Sargassum fusiforme* is a potential elicitor of induced resistance in *Solanum lycopersicum* but not in *Nicotiana benthamiana*. *Internat. J. Biosci. Biotech.* 2: 11-19. (査読有り)

[学会発表] (計 13 件)

1. Rin, S., Mizuno, Y., Fushimi, M., Ojika, M., Sato, I., Chiba, S., Kawakita, K. And Takemoto, D. (2016) Analysis of promoter region of a *Nicotiana benthamiana* ABC transporter gene, NbABCG2a, which is involved in pre- and post-invasion defense against *Phytophthora infestans*. 平成 28 年度 日本植物病理学会関西支部会, 静岡県コンベンションアーツセンター, 静岡
2. 水野 邑里・柴田裕介・大津美奈・小鹿 一・佐藤育男・千葉壮太郎・川北一人・竹本大吾 (2016) ベンサミアナの RanBP1 を介した mRNA の効率的な核外輸送はジャガイモ疫病菌感染時の迅速なファイトアレキシン生成に必須である. 平成 28 年度植物感染生理談話会, シーパル須磨, 神戸
3. Mizuno Y., Shibata Y., Otsu M., Ojika M., Sato I., Chiba S., Kawakita K. and Takemoto D. (2016) Factors for nuclear export of mRNA are involved in the resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans*. XVII International Congress on Molecular Plant - Microbe Interactions, Oregon Convention Center, USA
4. 水野 邑里・柴田裕介・大津美奈・小鹿 一・佐藤育男・千葉壮太郎・川北一人・竹本大吾 (2016) ベンサミアナの RanBP1 を介した mRNA の効率的な核外輸送はジャガイモ疫病菌感染時の迅速なファイトアレキシン生成に必須である. 平成 28 年度 日本植物病理学会 岡山コンベンションセンター, 岡山
5. 水野 邑里・柴田裕介・大津美奈・小鹿 一・佐藤育男・千葉壮太郎・川北一人・竹本大吾 (2015) ベンサミアナの Ran 結合タンパク質 RanBP1 は mRNA の核外輸送を介してジャガイモ疫病菌抵抗性に関与する. 平成 27 年度 日本植物病理学会関西支部会, あわぎんホール, 徳島
6. 水野 邑里・大津美奈・小鹿 一・森 仁志・川北一人・竹本大吾 (2015) ベンサミアナの核膜孔を介した mRNA の核外輸送はジャガイモ疫病菌抵抗性の誘導に関与する. 平成 27 年度 感染生理談話会, メルパルク松山, 松山
7. 近藤洋平・宮崎江里・小嶋宏樹・水谷安希・柴田裕介・川北一人・竹本大吾 (2015) ベンサミアナタバコの SAR8.2m はジャガイモ

疫病菌感染に応答した抵抗性誘導に必須である。平成 27 年度 日本植物病理学会, 明治大学, 東京

8. 津田康介・Monjil Shahjahan・佐藤育男・竹本大吾・川北一人 (2015) ジャガイモ疫病菌由来エリシターによるシロイヌナズナの防御応答。平成 27 年度 日本植物病理学会, 明治大学, 東京
9. 伏見真由香・小鹿一・加藤新平・川北一人・竹本大吾 (2015) ベンサミアナタバコのアイトアレキシン合成酵素遺伝子 NbEAS のプロモーター領域の解析。平成 27 年度 日本植物病理学会, 明治大学, 東京
10. 水野邑里・大津美奈・小鹿一・森 仁志・川北一人・竹本大吾 (2015) ベンサミアナタバコの核膜孔 Nup107-160 複合体を介して輸送される低分子量 G タンパク質 Ran はジャガイモ疫病菌抵抗性に関与する。平成 27 年度 日本植物病理学会, 明治大学, 東京
11. 山下将武・松田健太郎・Monjil Shahjahan・佐藤育男・竹本大吾・川北一人 (2015) ジャガイモ疫病菌由来エリシターにより誘導されるジャガイモ植物の抵抗反応。平成 27 年度 日本植物病理学会, 明治大学, 東京
12. 竹本大吾 (2015) 宿主特異性を決定する多様な機構。日本植物病理学会創立 100 周年記念シンポジウム, 明治大学, 東京
13. 水野邑理・大津美奈・川北一人・竹本大吾 (2014) ベンサミアナタバコの核膜孔 Nup107-160 複合体は、抵抗性誘導時の低分子量 G タンパク質 Ran の核外輸送に関与する。平成 26 年度 日本植物病理学会関西部会, 富山大学, 富山

[図書] (計 1 件)

1. Takemoto D. and Mizuno Y. (2016) Belowground and aboveground strategies of plant resistance against *Phytophthora* species. In: Belowground Defence Strategies in Plants (Bos CMF, Kazan K, eds). Springer. 151-168.

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)  
該当なし

○取得状況 (計 件)  
該当なし

[その他]

ホームページ

<http://nagoyaplantpathol.wixsite.com/nagoya-plant-pathol>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

近藤竜彦 (Kondo Tatsuhiko)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号 : 30362289

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

該当なし