

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880020

研究課題名（和文） MAPキナーゼ抑制体を利用したサリチル酸/ジャスモン酸合成経路の活性化機構の解明

研究課題名（英文） Clarification of activation mechanisms underlying biosynthesis pathways of salicylic acid/jasmonic acid

研究代表者

加藤 新平 (KATOU SHINPEI)

信州大学・ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点・助教

研究者番号：10533614

研究成果の概要（和文）：WIPK/SIPK RNAi 形質転換タバコにおいては、傷害に応答したジャスモン酸の蓄積が抑制され、本来誘導されないサリチル酸の蓄積が誘導される。サリチル酸/ジャスモン酸生合成関連遺伝子の発現を解析し、WIPK/SIPK RNAi 形質転換タバコにおいては NtAOC と NtOPR3 の発現量が減少していることを明らかにした。また、両シグナル物質の生合成の場である葉緑体の可溶性タンパク質を網羅的に解析する基盤を確立した。

研究成果の概要（英文）：In WIPK/SIPK RNAi plants, wound-induced accumulation of jasmonic acid is reduced, whereas accumulation of salicylic acid is abnormally induced. The levels of transcript related to the biosynthesis of salicylic/jasmonic acids were investigated, and NtAOC and NtOPR3 were found to be reduced in WIPK/SIPK RNAi plants. And the basis has been established to systematically analyze soluble proteins of chloroplast where both signaling molecules are synthesized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：植物病理学

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、情報伝達、ジャスモン酸、サリチル酸、MAPキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

サリチル酸とジャスモン酸は植物の抵抗反応誘導を制御する二大シグナル物質であり、サリチル酸の蓄積は病原体ストレスにより、ジャスモン酸の蓄積は病原体ストレスおよび傷害により誘導される。サリチル酸とジ

ャスモン酸の生合成は共に葉緑体で開始される。サリチル酸はコリスミン酸由来のフェニルアラニンより PAL (phenylalanine ammonia lyase) を介して、あるいはコリスミン酸より ICS (isochorismate synthase) を介して合成されると考えられているが、その生合成経路に関しては不明な点が多い。一

方、ジャスモン酸はストレス応答だけでなく、植物の成長・発達に必須の植物ホルモンであり、その生合成経路は細部に至るまで明らかにされている。しかしながら、サリチル酸やジャスモン酸の生合成経路が病原体感染に応答し活性化される機構はほとんど不明である。

MAP キナーゼの活性化は、植物に普遍的に観察される初期病傷害応答の一つである。申請者らは、タバコの病傷害応答性 MAP キナーゼである WIPK と SIPK の発現が RNAi により抑制された形質転換体 (WIPK/SIPK RNAi 形質転換体) においては、傷害に応答したジャスモン酸の蓄積が抑制され、本来誘導されないサリチル酸の蓄積が誘導されることを明らかにした。この系を用いれば、病原体感染という複雑な過程を経ることなく、サリチル酸とジャスモン酸の生合成経路の活性化機構を同時にかつ同調的に調べることが可能である。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本研究では、サリチル酸/ジャスモン酸生合成経路の活性化機構の解明を最終目標とし、以下の2点を具体的な研究目的とした。

### 1. WIPK/SIPK RNAi 形質転換体におけるサリチル酸生合成経路の解明

サリチル酸は PAL を介した経路あるいは ICS を介した経路により合成されると考えられている。WIPK/SIPK RNAi 形質転換体における、傷害に応答したサリチル酸の生合成がどちらの経路により行われているか明らかにする。

### 2. WIPK/SIPK RNAi 形質転換体において蓄積量が増加する葉緑体タンパク質の同定

サリチル酸とジャスモン酸の生合成は共に葉緑体で開始される。従って、葉緑体は両シグナル物質生合成の鍵器官である。そこで、WIPK/SIPK RNAi 形質転換体の葉緑体に蓄積するタンパク質を対照植物と比較することにより、蓄積量に違いのあるタンパク質を同定

する。

## 3. 研究の方法

### (1) 傷害処理

タバコ葉より直径約 1 cm のコルクボーラーを用いてリーフディスクを打ち抜き、打ち抜いたリーフディスクを蒸留水に浮かべ 25℃ のインキュベーター内に静置することにより傷害処理とした。

### (2) 遺伝子発現解析

Trizol (Invitrogen) を用いてリーフディスクより全 RNA を抽出し、逆転写により cDNA を作製した。遺伝子特異的なプライマーを用いた定量 PCR により、cDNA 中の各遺伝子の相対量を定量した。内部標準にはアクチンを用い、各遺伝子の発現量はアクチンの発現量との相対比として表わされた。逆転写反応および定量 PCR 反応には、SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (Takara) を使用した。

### (2) PAL 活性の測定

リーフディスクより抽出した粗タンパク質にフェニルアラニンを添加後経時的に 290 nm の吸光度を測定し、290 nm の吸光度の上昇値より PAL 活性を測定した。バックグラウンドとして、粗タンパク質を加えずに反応させた物を同時に測定した。

### (3) ICS 活性の測定

ICS 活性の測定には、生成したイソコリスミン酸を直接定量する方法 (a) と生成したイソコリスミン酸をサリチル酸に変換し、サリチル酸を定量する方法 (b) の二通りを用いた。

粗タンパク質にコリスミン酸および  $MgCl_2$  を添加して反応を行い、生成したイソコリスミン酸量を HPLC で直接定量した (a)。あるいは、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 で 15 倍に希釈後、100℃ で 10 分間加熱することによりサリチル酸に変換し、サリチル酸量を HPLC で定量した (b)。

### (4) 葉緑体可溶性タンパク質の単離

タバコ葉を等張液中で破碎し、無傷の葉緑体を 30%と 80%のパーコールを用いた密度勾配遠心により単離した。

単離した葉緑体を低張液中で破碎し、20,000 x g および 100,000 x g で遠心することにより葉緑体可溶性タンパク質を単離した。

#### (5) 二次元電気泳動解析

試料を TCA/アセトン沈殿で沈殿させた後、二次元電気泳動用の緩衝液に懸濁した。等電点電気泳動にはプロティアン IEF (Bio-Rad) を二次元目の SDS-PAGE にはプロティアン XL (Bio-Rad) を用いた。泳動後のゲルを蛍光染色液である Oriole (Bio-Rad) で染色し、スポットを確認した。

## 4. 研究成果

### (1) WIPK/SIPK RNAi 形質転換体におけるサリチル酸生合成経路の解明

WIPK/SIPK RNAi 形質転換体における傷害にตอบสนองしたサリチル酸の蓄積に、PAL 経路あるいは ICS 経路が関与するか明らかにするため、*PALA*、*PALB* および *NtICS* mRNA の蓄積動向を傷害後経時的に測定した。その結果、WIPK/SIPK RNAi 形質転換体とコントロール植物の間には顕著な差は認められなかった。

同様に PAL 活性を比較したところ、WIPK/SIPK RNAi 形質転換体の方が有意に低い活性を示した。一方、ICS 活性は 2 通りの方法で測定を試みたが、有意な活性は検出されなかった。これまでに、複数のグループがタバコにおいては ICS 活性が検出されないことを報告していることから、タバコの ICS 活性は非常に低いと推定された。

WIPK/SIPK RNAi 形質転換体における傷害にตอบสนองしたサリチル酸の蓄積に関与する経路を推定するため、サリチル酸生合成の前駆体であるコリスミン酸を利用する酵素をコードすると推定される *NtASAI* と 2、*NtASBI*、*NtCMI* と 2 および *NtADCS* の発現量を、WIPK/SIPK RNAi 形質転換体とコントロール植物の間で比較したが、有意な差は認められなかった。

一方、ジャスモン酸生合成酵素をコードすると推定される *NtLOX2* と 3、*NtAOC*、*NtAOS* および *NtOPR3* の発現量を、WIPK/SIPK RNAi 形質転換体とコントロール植物の間で比較したところ、傷害にตอบสนองした *NtAOC* と *NtOPR3* の発現誘導が WIPK/SIPK RNAi 形質転換体において有意に抑制されることが明らかになった。

これらの結果から、WIPK/SIPK RNAi 形質転換体において認められる傷害にตอบสนองしたジャスモン酸蓄積量の減少には生合成系遺伝子の発現量の減少が伴うことが明らかになった。一方、サリチル酸の蓄積に相関する遺伝子発現および酵素活性は見出されず、WIPK/SIPK RNAi 形質転換体において認められる傷害にตอบสนองしたサリチル酸酸蓄に関与する経路を推定することはできなかった。

### (2) WIPK/SIPK RNAi 形質転換体において蓄積量に変化する葉緑体タンパク質の同定

葉緑体はサリチル酸およびジャスモン酸生合成の鍵器官である。WIPK/SIPK RNAi 形質転換体の葉緑体に蓄積するタンパク質を網羅的に解析するため、葉緑体の単離方法および二次元電気泳動の分離条件について検討した。

タバコ葉を等張液中で破碎し、得られた抽出物を 30%と 80%のパーコールを用いた密度勾配遠心により分離し無傷葉緑体画分を単離した。単離した葉緑体の純度を微分干渉および蛍光顕微鏡で観察したところ、純度の高い無傷葉緑体が単離できていることが確認できた。

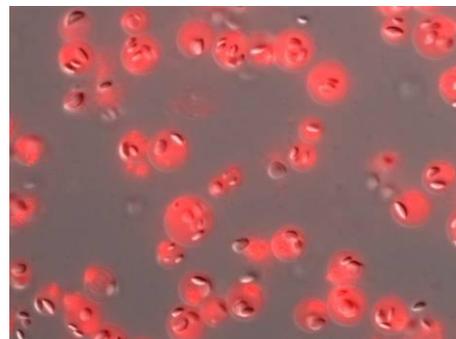


図 1. 無傷葉緑体画分の顕微鏡写真

単離した無傷葉緑体画分より可溶性タンパク質を抽出するため、単離した葉緑体を低

調液で懸濁し、超音波破碎した。破碎した葉緑体を超遠心分離で分離し、得られた上清および沈殿に含まれる可溶性タンパク質ルビスコの量を測定したところ、可溶性画分に多く含まれることが明らかになった。

単離した葉緑体可溶性タンパク質を網羅的に解析するため、二次元電気泳動により分離する条件について検討した。その結果、試料を TCA/アセトン沈殿により脱塩することによりきれいな泳動像を得ることができた。現在、WIPK/SIPK RNAi 形質転換体とコントロール植物の間でシグナル強度に違いのあるスポットを探索している。

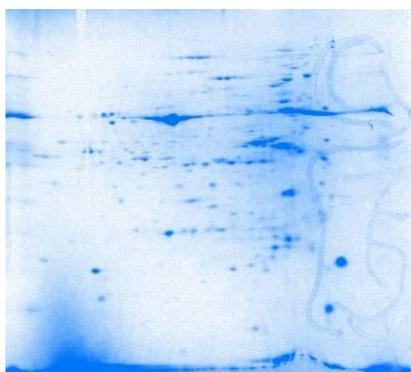


図 2. 二次元電気泳動の分離結果の一例

## 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 5 件)

- ① Katou, S. The biosynthetic pathways of salicylic acid in plants. Journal of the Faculty of Agriculture SHINSHU UNIVERSITY 47, 1-4, 2011, 査読有
- ② Kobayashi, M., Seo, S., Hirai, K., Yamamoto-Katou, A., Katou, S., Seto, H., Meshi, T., Mitsuahara, I. and Ohashi, Y., Silencing of WIPK and SIPK mitogen-activated protein kinases reduces *Tobacco mosaic virus* accumulation but permits systemic viral movement in tobacco possessing the *N* resistance gene. Mol. Plant-Microbe Interact. 23, 1032-1041, 2010, 査読有
- ③ Hiraga, S., Sasaki, K., Hibi, T., Yoshida, H., Uchida, E., Kosugi, S., Kato, T., Mie, T., Ito, H., Katou, S., Seo, S., Matsui, H., Ohashi, Y. and

Mitsuahara, I., Involvement of two rice *ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE* genes in wound signaling. Mol. Genet. Genomics 282, 517-529, 2009, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 朝倉信英. タバコの病傷害応答性 MAP キナーゼである WIPK と SIPK によるジャスモン酸/サリチル酸蓄積の制御機構の解析. 平成 23 年度日本植物病理学会大会, 2011 年 3 月 27 日, 東京都府中市東京農工大学府中キャンパス
- ② 大西泰朗. WIPK/SIPK 抑制タバコにおける傷害に応答したサリチル酸蓄積機構の解析. 平成 23 年度日本植物病理学会大会, 2011 年 3 月 27 日, 東京都府中市東京農工大学府中キャンパス
- ③ 加藤新平. タバコのカルモジュリン結合性 MAP キナーゼ脱リン酸化酵素・NtMKP1 の傷害による制御. 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011 年 3 月 20 日, 宮城県仙台市東北大学川内キャンパス
- ④ 小林光智衣. MAPK である WIPK と SIPK を抑制したタバコにおけるタバコモザイクウイルス増殖抑制機構の解析. 平成 22 年度日本植物病理学会大会, 2010 年 4 月 19 日, 京都府京都市国立京都国際会館
- ⑤ 加藤新平. The mitogen-activated protein kinases WIPK and SIPK regulate the levels of jasmonic and salicylic acids in wounded tobacco plants. 14th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009 年 7 月 20 日, Centre des Congrès de Québec, Canada

[その他]

ホームページ等

<http://www.wakate-shinshu.com/resercher/18katou.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 新平 (KATOU SHINPEI)

信州大学・ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点・助教

研究者番号: 10533614