

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19128

研究課題名（和文）アグロバクテリウムのステルス化による植物の形質転換効率の向上

研究課題名（英文）Enhancing Plant Transformation Efficiency by Understanding Immunity Against Agrobacterium

研究代表者

門田 康弘（Kadota, Yasuhiro）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：80548975

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：植物は病原体由来のPAMPs (pathogen-associated molecular patterns)と総称される物質を細胞膜上の受容体を介して認識して免疫反応を誘導する。本研究はアグロバクテリウム由来のPAMPと植物による認識機構を理解することを目的とした。アグロバクテリウムの培養上清にPAMP活性物質が存在することを発見し、単一ピークにまで精製することに成功した。また、ゲノム情報を元に非モデル植物よりPAMP受容体を探索する独自の実験系を立ち上げた。これにより、アグロバクテリウムを含む様々な細菌を認識する受容体の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アグロバクテリウムは植物の遺伝子組み換えに用いられる重要な基礎技術であるが、この技術はアグロバクテリウムが感染できない非宿主植物には利用できないなどの問題がある。このアグロバクテリウムの感染を抑える要因の1つが植物免疫である。そこで、本研究ではアグロバクテリウムのPAMPの精製と、細菌において高度に保存されたPAMPを認識する新規受容体を同定した。この受容体を作物へ導入することにより、様々な病原細菌に対して抵抗的な作物作出が期待できるとともに、この受容体を持っている植物では破壊することにより、アグロバクテリウムの形質転換効率の亢進が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Plants detect pathogen-derived molecules known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) through receptors on their plasma membranes. This study aims to elucidate the mechanisms through which plants recognize PAMPs from Agrobacterium. We detected PAMP-active substances in the culture supernatant of Agrobacterium, successfully purified them, and are currently working to identify the active molecule. Furthermore, we developed a novel experimental system using genomic information to identify PAMP receptors in non-model plants. Through this system, we have successfully identified a receptor that recognizes various pathogenic bacteria, including Agrobacterium.

研究分野：植物免疫

キーワード：植物免疫 PAMP 植物微生物相互作用 病害抵抗性

1. 研究開始当初の背景

アグロバクテリウムによる形質転換は植物の遺伝子機能解析、遺伝子組換え作物の作出、及びゲノム編集等に必要不可欠な基盤技術である。しかし、この技術はアグロバクテリウムが感染できない非宿主植物には利用できない。実際、有用作物を含む多くの植物種では形質転換が難しい。このアグロバクテリウムの感染を阻むのは植物免疫である。しかし、アグロバクテリウムに対する植物の免疫機構、特に植物によるアグロバクテリウムの認識機構については未知な部分が多い。

2. 研究の目的

植物は病原由来の PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) と総称される物質を細胞膜上の PAMP 受容体を介して認識して免疫反応を誘導する。そこで、本研究ではアグロバクテリウム由来の PAMP と植物の受容体を同定することで、植物によるアグロバクテリウムの認識機構を理解することを目的とした。

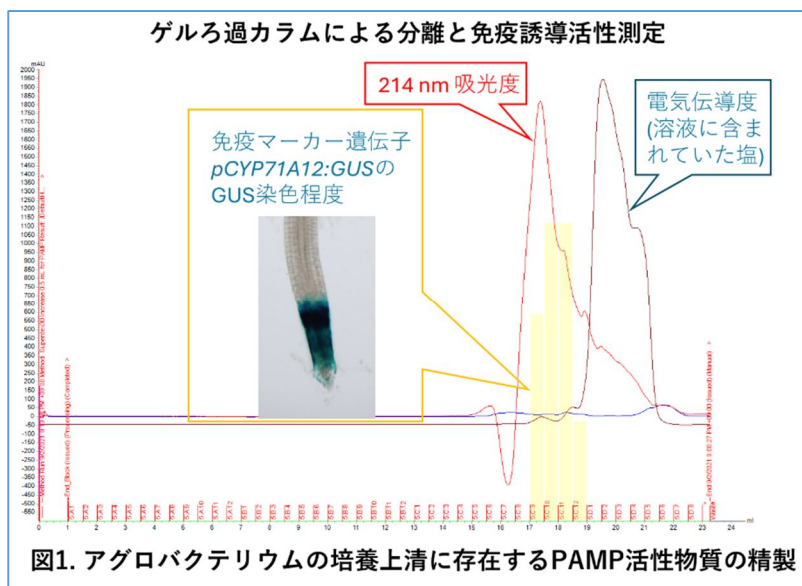
3. 研究の方法

生化学的アプローチにより、アグロバクテリウム由来の新規 PAMP の探索を行った。また、様々な植物によるアグロバクテリウムの認識機構を解明するため、350 種の植物、及び藻類のゲノム情報から PAMP 受容体として機能する候補因子を絞り込み、その中からアグロバクテリウムを認識して活性化する受容体を探索した。また、アグロバクテリウムを認識して活性化した受容体については病害抵抗性における役割を調べた。

4. 研究成果

(1) アグロバクテリウムの培養上清に存在する PAMP 活性物質の精製

植物によるアグロバクテリウムの認識機構を分子レベルで解明するため、アグロバクテリウムより PAMP 活性物質の単離を試みた。PAMP 活性の測定にはマーカー遺伝子である *CYP71A12* のプロモーター-GUS 植物 (*pCYP71A12::GUS*) を用いて、根における発現を簡便に調べるシステムを構築した。*CYP71A12* はインドールグルコシノレート系の抗菌性物質の合成に関わる酵素であり、PAMP 活性画分処理により、根、特に根端部位で強い発現が誘導される(図1)。この



PAMP 活性測定システムを用いて調べた結果、アグロバクテリウムの液体培養上清に強い PAMP 活性が存在することを発見した。そこで、様々なカラムクロマトグラフィーを用いた精製を行ったところ、最終的に PAMP 活性と一致する 214 nm の吸光度の単一ピークを得ることができた。現在は、このピークに含まれる物質の同定を進めている。

(2) 350種のゲノム情報より、アグロバクテリウム由来のPAMP受容体候補の絞り込み

植物によるアグロバクテリウムの認識機構を解明するため、アグロバクテリウム由来の新規免疫受容体の同定を試みた。まず、植物の免疫受容体として機能すると考えられる遺伝子を公開されている350種の植物、及び藻類のゲノム情報の中から抽出した。この中には同じPAMPを認識する受容体が多数含まれると考えられるため、細胞外領域の保存性を考慮に入れて同じPAMPを認識する受容体をグループ化した。得られたグループからそれぞれ1遺伝子ずつクローニングしてアグロバクテリウム破砕液を処理後に活性化するPAMP受容体を探索した。その結果、3つの受容体がアグロバクテリウム破砕液処理により活性化することが分かった。このうちの1つの受容体はアグロバクテリウム破砕液だけでなく、様々な病原細菌破砕液に反応して活性化した。さらに、この受容体を発現した植物は病原菌の増殖を抑制したことから、PAMP受容体として機能することが分かった。以上の成果は、特許出願、及び論文発表を予定しているため、詳細については後日再度報告する。

(3)まとめ

本研究により、アグロバクテリウムの培養上清にPAMP活性物質が存在することが明らかとなり、物質同定までの道筋をつけることができた。また、350種のゲノム情報をもとに、様々な植物よりPAMP受容体を探索する実験系を立ち上げ、アグロバクテリウムを認識する新規PAMP受容体を3つ同定することに成功した。その中の1つはアグロバクテリウムだけでなく様々な細菌に保存された物質を認識して活性化し、病害抵抗性を誘導できることが分かった。PAMP受容体は異なる植物種に発現させても機能することが知られている。よって、この受容体を発現させることで様々な病原細菌に抵抗的な作物を作出できると考えられる。一方、この受容体を持つ植物において、この遺伝子を破壊することによりアグロバクテリウムの形質転換効率の亢進が期待できる。現在、この受容体が認識するPAMPをアグロバクテリウムの破砕液からカラムクロマトグラフィーによる精製しており、既に有望なPAMP候補タンパク質を同定している。今後、このPAMPと受容体との結合を確認するとともに、耐病性作物の作出に取り組む。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ngou Bruno Pok Man, Wyler Michele, Schmid Marc W., Kadota Yasuhiro, Shirasu Ken	4. 巻 15
2. 論文標題 Evolutionary trajectory of pattern recognition receptors in plants	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-44408-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang Wei, Zhou Zhaoyang, Noman Ali, Kadota Yasuhiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Editorial: Regulation of plant immunity by immune receptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1320509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2023.1320509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Goto Yukihisa, Maki Noriko, Sklenar Jan, Derbyshire Paul, Menke Frank L. H., Zipfel Cyril, Kadota Yasuhiro, Shirasu Ken	4. 巻 241
2. 論文標題 The phagocytosis oxidase/Bem1p domain containing protein <sc>PB1CP</sc> negatively regulates the <sc>NADPH</sc> oxidase <sc>RBOHD</sc> in plant immunity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1763 ~ 1779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.19302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Goto Yukihisa, Kadota Yasuhiro, Mbengue Malick, Lewis Jennifer D, Matsui Hidenori, Maki Noriko, Sklenar Jan, Derbyshire Paul, Shibata Arisa, Ichihashi Yasunori, Guttman David S., Nakagami Hirofumi, Suzuki Takamasa, Menke Frank L.H., Robatzek Silke, Desveaux Darrell, Zipfel Cyril, Shirasu Ken	4. 巻
2. 論文標題 The leucine-rich repeat receptor kinase QSK1 is a novel regulator of PRR-RBOHD complex and is employed by the bacterial effector HopF2<i>_{Pto}</i> to modulate plant immunity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.12.13.571443	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Bender Kyle W., Couto Daniel, Kadota Yasuhiro, Macho Alberto P., Sklenar Jan, Derbyshire Paul, Bjornson Marta, DeFalco Thomas A., Petriello Annalise, Font Farre Maria, Schwessinger Benjamin, Ntoukakis Vardis, Stransfeld Lena, Jones Alexandra M. E., Menke Frank L. H., Zipfel Cyril	4. 巻 118
2. 論文標題 Activation loop phosphorylation of a non-RD receptor kinase initiates plant innate immune signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2108242118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2108242118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murata Gaku, Uehara Taketo, Lee Hyoung Jae, Mizutani Masaharu, Kadota Yasuhiro, Shinmura Yoshimi, Saito Takeo, Uesugi Kenta	4. 巻 170
2. 論文標題 Solanum Dunal as a potential eggplant rootstock resistant to root knot nematodes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Phytopathology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jph.13067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yasuhiro Kadota, Pok Man Ngou, Michele Wyler, Marc W Schmid, Ken Shirasu
2. 発表標題 植物の免疫受容体LRR-RLPの進化の軌跡について
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yasuhiro Kadota, Pok Man Ngou, Michele Wyler, Marc W Schmid, Ken Shirasu
2. 発表標題 Evolutionary Trajectory of Pattern Recognition Receptors in Plants
3. 学会等名 第65回 植物生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 飯野 絵里香, 門田 康弘, 佐藤 一輝, 植原 健人, 横 紀子, 鈴木 孝征, 白須 賢
2. 発表標題 植物における寄生線虫認識メカニズムの探究
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤 一輝, 門田 康弘, Gan Pamela, 植原 健人, 横 紀子, Mukhtar M Shahid, 白須 賢
2. 発表標題 免疫を負に制御するRNA結合タンパク質を標的としたネコブセンチュウエフェクターの機能解析
3. 学会等名 令和6年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤 一輝, 門田 康弘, Gan Pamela, 植原 健人, 横 紀子, Mukhtar M Shahid, 白須 賢
2. 発表標題 RNA結合タンパク質を標的とする線虫エフェクターの機能解析
3. 学会等名 日本線虫学会 第30回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯野 絵里香, 佐藤 一輝, 横 紀子, 鈴木 孝征, 門田 康弘, 白須 賢
2. 発表標題 植物による寄生線虫認識機構の解明
3. 学会等名 日本線虫学会 第30回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名	Yukihisa Goto, Hidenori Matsui, Jan Sklenar, Paul Derbyshire, Frank L.H. Menke, Hirofumi Nakagami, Darrell Desveaux, Cyril Zipfel, Yasuhiro Kadota, Ken Shirasu
2. 発表標題	A bacterial type effector requires the LRR-RK KIN7 to negatively regulate FLS2 homeostasis in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名	The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2023) (国際学会)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	佐藤 一輝, 門田 康弘, ガン パメラ, 植原 健人, 横 紀子, ムフタル M シャヒード, 白須 賢
2. 発表標題	RNA結合タンパク質を標的とするネコブセンチュウエフェクターによる免疫抑制機構の解析
3. 学会等名	令和5年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	Kazuki Sato, Yasuhiro Kadota, Pamela Gan, Taketo Uehara, Noriko Maki, M. Shahid Mukhtar, Ken Shirasu
2. 発表標題	Understanding the molecular basis of plant and root-knot nematode interaction
3. 学会等名	International Symposium on Plant Development and Biotic Interaction (招待講演)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Pok Man Ngou, Yasuhiro Kadota, Ken Shirasu
2. 発表標題	Exploring Pathogen-Associated Molecular Patterns and their Receptors in Plants
3. 学会等名	International Symposium on Plant Development and Biotic Interaction (招待講演)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 Erika Iino, Yasuhiro Kadota, Ken Shirasu
2. 発表標題 Exploring the mechanism of nematode recognition in plants
3. 学会等名 International Symposium on Plant Development and Biotic Interaction (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 一輝, 門田 康弘, Gan Pamela, 植原 健人, 榎 紀子, Mukhtar M. Shahid, 白須 賢
2. 発表標題 ネコブセンチュウエフェクターによる植物免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 日本線虫学会 第29回大会 2022年11月
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Sato, Yasuhiro Kadota, Pamela Gan, Taketo Uehara, Takahiro Bino, Katsushi Yamaguchi, Yasunori Ichihashi, Hideaki Iwahori, Noriko Maki, Shuji Shigenobu, Takamasa Suzuki, Bruno Favery, Shahid M. Mukhtar, Ken Shirasu
2. 発表標題 Molecular insights into an interaction of resistant plant <i>Solanum torvum</i> and virulent/avirulent root-knot nematodes
3. 学会等名 7th International Congress of Nematology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 一輝, 門田 康弘, Gan Pamela, 植原 健人, 榎 紀子, Mukhtar Shahid M., 白須 賢
2. 発表標題 ネコブセンチュウエフェクターによる植物免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Sato Kazuki, Uehara Taketo, Holbein Julia, Sasaki-Sekimoto Yuko, Gan Pamela, Bino Takahiro, Yamaguchi Katsushi, Ichihashi Yasunori, Maki Noriko, Shigenobu Shuji, Ohta Hiroyuki, Franke Rochus B., Siddique Shahid, Grundler Florian M. W., Suzuki Takamasa, Kadota Yasuhiro, Shirasu Ken
2. 発表標題	Transcriptomic analysis of resistant and susceptible responses in a new model root-knot nematode infection system using <i>Solanum torvum</i> and <i>Meloidogyne arenaria</i>
3. 学会等名	IS-MPMI Congress: eSymposia Series (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	佐藤 一輝、植原 健人、Gan Pamela、榎 紀子、鈴木 孝征、門田 康弘、白須 賢
2. 発表標題	新規モデル感染システムを用いた線虫抵抗性・感受性応答のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名	日本線虫学会 第28回大会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	門田康弘
2. 発表標題	植物免疫の改変によるアグロバクテリウムの形質転換効率向上の試み
3. 学会等名	筑波大学 形質転換植物デザイン研究拠点報告会
4. 発表年	2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>理化学研究所 環境資源科学研究センター 植物免疫研究グループ http://plantimmunity.riken.jp/</p> <p>理研プレスリリース 植物免疫受容体の進化の軌跡を解明 - 発生・成長を担う受容体と共通の祖先から派生 - https://www.riken.jp/press/2024/20240201_5/index.html</p> <p>Plant receptors that control immunity and development share a common origin https://www.riken.jp/en/news_pubs/research_news/pr/2024/20240201_5/index.html</p> <p>Researchmap プレスリリース https://researchmap.jp/press_releases/press_releases/view/633014/f4c336b2fa4a5ff0f421149cc7ac0c83?frame_id=1601185</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	野中 聡子 (Satoko Nonaka) (50580825)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スイス	University of Zurich	MWSchmid GmbH		
英国	The Sainsbury Laboratory			
ドイツ	University of Munich			
カナダ	University of Toronto			
米国	University of California Berkeley			