

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07314

研究課題名(和文) フォスファチジン酸を介した植物免疫プライミング誘導機構の解明と耐病性付与への展開

研究課題名(英文) Analysis of phosphatidic acid mediated plant immune priming and application for disease resistance plants.

研究代表者

木場 章範 (KIBA, Akinori)

高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授

研究者番号：50343314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リン脂質輸送SEC14の免疫誘導における機能、特にリン脂質代謝系の活性化について明らかにした。また、リン脂質代謝酵素としてPLC2を単離し、病害抵抗性への関与明らかにした。さらに、PAを介した抵抗性機構に関わる伝子群を単離するとともに、PAの直接のターゲット分子として、SnRK1の関与の可能性を見出した。これらの2種の酵素は、自己細胞死を伴う過敏感反応(HR)には関与せず、植物の基礎的な免疫への関与を示した。

研究成果の概要(英文)：Phospholipids-based signaling cascades are common signal transduction mechanisms in plant immune responses. We have been identified genes related to phospholipid turnovers from *Nicotiana benthamiana*. The SEC14 phospholipid transfer protein (NbSEC14)-silencing compromised jasmonic acid (JA)-dependent immune responses. Activities of phospholipase C and D, and the synthesis of phosphatidic acid (PA) was significantly reduced in NbSEC14-silenced plants. The NbSEC14-silencing compromised pathogen associated molecular patterns (PAMPs)-triggered immune responses and basal defense against *Ralstonia solanacearum* and *Pseudomonas syringae*. Among the reported PA-target proteins, we found that respiratory burst oxidase homolog B, phosphoinositide dependent protein kinase 1 and sucrose non-fermenting 1 related kinase are closely related to immune responses.

研究分野：植物病理学

キーワード：SEC14脂質輸送タンパク質 フォスホリパーゼC フォスホリパーゼD、 SnRK1 PAMPs誘導免疫 病害抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

植物—病原体相互作用における防御応答時にリン脂質代謝が変化し、シグナルリン脂質であるフォスファチジン酸 (PA) やジアシルグリセロールの蓄積が起こる。また、リン脂質代謝酵素であるフォスホリパーゼ C および D が免疫応答の誘導に関与していることが報告されている。しかしながら、植物の病害感受化・受容化過程における植物のリン脂質代謝の変化や役割、関与に関しては未知な部分が多い。さらに、病原体による免疫抑制機構とリン脂質代謝の関係については情報が皆無である。これまでに、PA の蓄積が植物免疫応答の ON に、PA の消去が植物免疫の OFF に関与すること。植物病原体は植物の PA 分解をすることにより、感染していることを示してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、PA を介した植物免疫誘導機構の解明と、PA 蓄積量を人為的に上昇させることによる植物免疫の亢進と耐病性の付与の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### リン脂質代謝酵素の機能解析

*Nicotiana benthamiana* のデータベース (sol gemomics) を用いてリン脂質代謝関連遺伝子をを検索する。標的遺伝子としてはリン脂質輸送タンパク質、フォスホリパーゼ遺伝子を中心に解析する。単離したリン脂質輸送タンパク質、フォスホリパーゼ遺伝子をウイルス誘導ジーンサイレンシングにより抑制植物を用いて耐病性検定を行う。

### PAP 遺伝子抑制形質転換植物の作製

PAP 遺伝子は *Nicotiana benthamiana* ゲノム中に 2 コピー存在するため、PAP 遺伝子の第一エキソンで 2 つ PAP の遺伝子に共通の配列を標的にクリスパーキャス 9 を用いたゲノム編集コンストラクトを作製する。

アグロバクテリウムを介して *Nicotiana benthamiana* を形質転換する。PAP 遺伝子破壊形質転換植物を選抜する。PAP 遺伝子破壊形質転換植物と対照植物に病原体を接種し、病原体の増殖、発病、防御関連遺伝子の発現を解析する。

### PAP プロモーター活性を指標とした受容性情報伝達系の解明

PAP の発現が病原性青枯病菌、およびタバコ野火病菌の感染時に特異的に誘導される。そこで、*N. benthamiana* ゲノムより PAP のプロモーター (PAP-P) 領域をインバース PCR 法によって単離する。レポーター遺伝子 (GUS) との融合遺伝子を作製する。本融合遺伝子をアグロバクテリウムを介して、遺伝子導入した形質転換タバコ植物 (PAP-P 植物) を作製する。レポーター遺伝子の活性を指標に、PAP を誘導能を有する因子の解析を行う。

## 4. 研究成果

### PAP 遺伝子抑制形質転換植物の作製

PAP 遺伝子破壊形質転換植物を作製した。T3 植物系統を 4 系統について、PAP 遺伝子の配列を確認したところ、1 つの PAP 遺伝子を欠損した植物と 2 遺伝子を欠損した植物の両方を得ることができた。生育調査の結果、野生株と比較して生育の変化は見られなかった。現在耐病性検討を進めている。

### リン脂質代謝酵素の機能解析

リン脂質 Sec14P 抑制植物では、青枯病菌、タバコ野火病菌に対する抵抗性が低下する。SEC14 は自己細胞死を伴う過敏反応 (HR) には関与せず、病原体由来の共通的分分子パターン (PAPMs) で誘導される、植物の基礎的な免疫である PAMPs 誘導免疫 (PTI) の特徴的な現象であるカロース沈着、PTI マーカー遺伝子の発現に関与していることを見出した。次に、フォスホリパーゼ C、および D (PLC、PLD)、PA の下流のシグナル伝達因子タンパク質リン酸化酵

素に着目した。PLC はジーンファミリーを形成していることから、植物免疫に関与する PLC の検索を行った。その結果、PLC2 抑制植物では青枯病に対する抵抗性の低下が観察された。PLC2 は自己細胞死を伴う過敏反応 (HR) には関与せず、病原体由来の共通的分子パターン (PAPMs) で誘導される、植物の基礎的な免疫である PAMPs 誘導免疫 (PTI) の特徴的な現象であるカロール沈着、PTI マーカー遺伝子の発現に関与していることを見出した。

また、PA 合成に関わる別の経路を構成する PLD もジーンファミリーを形成していることから、植物免疫に関与する PLD の検索を行った。その結果、PLC 抑制植物では青枯病に対する抵抗性の低下が観察された。

さらに、PA の下流で機能するタンパクリン酸化酵素である SnRk1 抑制植物の解析から、SnRk1 も ETI には関与せず、PTI の誘導に影響を与えることを見出した。

#### **PAP プロモーター活性を指標とした受容性情報伝達系の解明**

*N. benthamiana* ゲノムより PAP のプロモーター (PAP-P) 領域を PCR により単離し、PAP 遺伝子上流の 2000bp の DNA を得た。プロモーター上のシス配列を特定する目的で、全長 2000bp、1000bp、500bp の 3 種の DNA を調製した。これらをレポーター遺伝子 (GUS) との融合遺伝子を導入した形質転換タバコ植物 (PAP-P 植物) を作製した。現在、PAP 遺伝子の発現パターンを GUS を指標に解析している。

#### 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)

Akinori Kiba, Masahito Nakano, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi (2018) The SEC14 phospholipid transfer protein regulates

pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 125: 212–218. (査読有)

Sumida S, Ito M, Galis I, Nakatani H, Shinya T, Ohnishi K, Hikichi Y, Kiba A. (2017) Phosphoinositide 3-kinase participates in L-methionine sulfoximine-induced cell death via salicylic acid mediated signaling in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Plant Physiology* 218: 167–170. (査読有)

Akinori Kiba, Yu Imanaka, Masahito Nakano, Ivan Galis, Yuko Hojo, Tomonori Shinya, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi (2016) Silencing of *Nicotiana benthamiana* SEC14 phospholipid transfer protein reduced jasmonic acid dependent defense against *Pseudomonas syringae* *Plant Biotechnology* 33, 111–115. (査読有)

Kazuhiro Toyoda, Sachiyo Yao, Mai Takagi, Maki Uchioki, Momiji Miki, Kaori Tanaka, Tomoko Suzuki, Masashi Amano, Akinori Kiba, Toshiaki Kato, Hiroataka Takahashi, Yasuhiro Ishiga, Hidenori Matsui, Yoshiteru Noutoshi, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose, Tomonori Shiraishi. (2016) The plant cell wall as a site for molecular contacts in fungal pathogenesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 95:44-49. [doi:10.1016/j.pmpp.2016.02.006](https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.02.006) (査読有)

Masahito Nakano, Hirofumi Yoshioka, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, Akinori Kiba. (2015) Cell death-inducing stresses are required for defense activation in DS1-phosphatidic acid phosphatase-silenced *Nicotiana benthamiana*. [Journal of Plant Physiology](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.06.007), 20: 15–19. [doi:10.1016/j.jplph.2015.06.007](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.06.007) (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

Akinori Kiba (2017) Lipid transfer proteins regulates plant immunity in *Nicotiana benthamiana*. The 7th Asian Symposium on Plant Lipids Academia Sinica. 2017/11/29-12/2 (国際学会)

Akinori Kiba, Ivan Galis, Tomonori Shinya, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi (2017) SEC14 phospholipid transfer protein regulates plant immunity in *Nicotiana benthamiana*. The Asian Conference on Plant Pathology 2017. International Convention Center Jeju. 2017/9/13-17. (国際学会)

木場章範、中野真人、細川美樹、大西浩平、曳地康史 (2017) 植物免疫におけるリン脂質代謝の役割 ~ フォスホリパーゼ C について ~ 第 30 回日本植物脂質科学シンポジウム。お茶の水女子大学。2017/9/10-11.

今仲優布、イヴァンガリス、北条優子、新屋友規、大西浩平、曳地康史、木場章範 (2016) Sucrose-non-farmenting related kinase はフォスファチジン酸を介した植物免疫シグナルに関与する。第 58 回日本植物生理学会。大阪大学。2017/3/14-18.

今仲優布、大西浩平、曳地康史、木場章範 (2016) Sucrose-non-farmenting related kinase はフォスファチジン酸の下流において *N. benthamiana* の防御応答の制御に関与する。第 29 回日本植物脂質科学シンポジウム。大阪大学。2016/11/25-26.

木場章範、小山梨奈、大西浩平、曳地康史 (2017) 脂質輸送タンパク質による植物免疫の制御。第 29 回日本植物脂質科学シンポジウム。大阪大学。2016/11/25-26.

Akinori Kiba (2016) Implication of phospholipid turnover in plant immunity. 2nd International Symposium of Plant Lipids. eorge-August-Universitat Gottingen. 2016/7/3-7/8. (国際学会)

Akinori Kiba (2015) Phosphatidic acid primes plant immunity required cell death inducible stress fro defense activatio The 5th Asian Symposium on Plant Lipids シンガポール大学. 2015/11/30-12/2 (国際学会)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木場章範 (KIBA Akinori)

高知大学教育研究部総合科学系・教授

研究者番号 : 50343314

(2) 研究分担者

曳地康史 (HIKICHI Yasufumi)

高知大学教育研究部総合科学系・教授

研究者番号： 70291507

大西浩平 (OHNISHI Kouhei)

高知大学教育研究部総合科学系・教授

研究者番号： 50211800

(3)連携研究者

( )

研究者番号：