

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07637

研究課題名(和文) 園芸作物における熱ショック誘導抵抗性の機作解明

研究課題名(英文) Elucidating the Mechanisms of Heat Shock-Induced Resistance in Horticultural Crops

研究代表者

佐藤 達雄 (Tatsuo, Sato)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：20451669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究により、作物に40～50℃、数十秒の熱ショック処理を施すと病害に対する抵抗性が誘導されることが分かっていたが、その発現には既知の全身獲得抵抗性の反応に加え未知の反応系が平行して、または相互に作用しながら関与していることが示唆されていた。本研究ではキュウリならびにトマトを用い、熱ショック転写因子の挙動に着目し、熱ショック処理後、全身獲得抵抗性の誘導より早く熱ショック転写因子が活性化し、病害防御関連遺伝子上流の熱ショックエレメントに結合することによって局所的な病害抵抗性が発現することを明らかにした。この反応は紫外線照射では誘導されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤などに頼らず環境ストレスの1つである熱だけで植物の病害防御に関する複数の経路を活性化し実用水準の病害抵抗性を引き出すことができることが明らかになった。本成果は環境負荷軽減型農業の推進に寄与するだけでなく、熱ショック転写因子を介した防御反応のメカニズムは植物だけではなくヒト等の動物にも存在する可能性があることから医薬品開発など他分野への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have shown that heat shock treatment of crops at 45-50 °C for several tens of seconds induces disease resistance. It has been suggested that an unknown response system in addition to the known systemic acquired resistance response is involved in its induction, either in parallel or in interaction with it. In this study, we focused on the behavior of heat shock transcription factors in cucumber and tomato, and found that heat shock transcription factors are activated earlier than the induction of systemic acquired resistance after heat shock treatment, and that localized disease resistance is expressed by binding to heat shock elements upstream of disease defense-related genes. This reaction was not induced by UV irradiation.

研究分野：園芸学

キーワード：熱ショック 熱ショック転写因子 キュウリ トマト 病害抵抗性 獲得抵抗性 熱ショックエレメント

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

トマトをはじめとする様々な作物の茎葉を 40～50℃で短時間の熱ショック処理を施すことにより病害抵抗性を誘導することができる。申請者らはこの現象を熱ショック誘導抵抗性(Heat Shock-Induced Resistance; HSIR)と名付けた。HSIR 誘導時には作物体内にサリチル酸が周期的に集積し、ペルオキシダーゼなど全身獲得抵抗性(Systemic Acquired Resistance; SAR)の発現マーカー遺伝子が発現することから熱ショックにより SAR が誘導されることが確かめられた(芳野ら、2011、Ani ら、2011)。一方、熱ショック後の病原感染特異的(pathogenesis related; PR)タンパク質の発現は、そのシグナルであるサリチル酸の集積より早く、さらにサリチル酸含量や遺伝子発現量が上下動を繰り返すことがある。この現象はメロン、キュウリ、イチゴ、トマトなど様々な作物で共通している(Ani ら、2011、2013)。これにより HSIR 発現には SAR 以外のサリチル酸非依存の反応も関与していることが示唆される。さらに、SAR とは全く異なる抵抗性反応も存在する可能性があることも判明した。例えばシソ科ハーブのタイムでは、熱ショックによりそのタイムが含む様々なテルペノイドのうち、 γ -terpinene 生合成関連酵素の遺伝子発現レベルが上昇し、 γ -terpinene の揮発量が増加するとともに近傍の灰色かび病菌の生育が抑制される(江口ら、2016)。同様の現象はイチゴでも観察されている。Thea ら(2012)はシロイヌナズナにおいて熱ショック転写因子が耐熱性の獲得と SAR の誘導の双方に関与していると報告しているが、上記に記した HSIR と SAR の相違点には言及していない。

2. 研究の目的

HSIR の発現が SAR ならびに未解明の反応系の相加的または相乗的な効果であると仮定すると、これまでの知見から未解明の反応系に熱ショック転写因子が関与している可能性が高いと考えられる。そこで本研究では熱ショック転写因子(HSF)ならびに防御関連遺伝子のプロモーター領域の解析ならびに発現解析を行い、その機作を明らかにする。その結果、獲得抵抗性の付与方法が明らかになるとともに、健苗育成や環境保全型栽培を目的とした施設環境制御への応用が期待できる。

3. 研究の方法

1) サリチル酸濃度の変化による SAR 誘導のタイムコース

熱ショック処理後の植物体のサリチル酸濃度の変化を測定し、熱ショック処理から抵抗性発現までのタイムコースを明らかにする。

2) 全身獲得抵抗性(SAR)と同時かつ別経路で発現が誘導される遺伝子のスクリーニングと検証

HSF が病害抵抗性の発現に介在していると仮定し、トマト、キュウリにおいて、HSF や PR1 などの感染特異的タンパク質を含む HSIR の発現に関連が予想される遺伝子ファミリーのプロモーター領域を精査し、熱ショックエレメント(HSE)と推定される配列の有無で分類する。

3) 熱ショック処理による遺伝子発現制御機作

2)でスクリーニングした各遺伝子について、発現のタイムコースを明らかにし、1)の結果も併せ SAR と HSF 介在の抵抗性の反応時間による区別を試みる。

4) 阻害剤の利用

HSP90 inhibitor であるゲルダナマイシンや HSF1 inhibitor である KRIBB11 などの阻害剤で植物を処理し、抵抗性の発現に与える影響を明らかにする。HSF が抵抗性発現に介在しているとすれば前者により抵抗性誘導は促進され、後者により抑制されると予想される。

最終年においては、前年までに解明した機作について SAR との違いを明確にするため SAR の誘導剤である BIT 処理との比較、併用を検討する。また、病害抵抗性とは直接的な関係性がない遺伝子も含め、発現に関係する経路の相互関係を整理し、HSIR の多面的な機作を解明する。

最終的には実際に栽培試験や接種試験を行い具体的な誘導抵抗性を確認し、健苗育成や環境保全型栽培を目的とした温湿度管理などの施設環境制御への応用を図る。

4. 研究成果

材料にトマトと斑葉細菌病菌を用い、熱ショック処理後の細菌性病害に対する抵抗性の変化、葉中サリチル酸含量の変化ならびに病害抵抗性関連遺伝子の発現経過を調査した(Arofattullah ら、2019)。その結果、トマトの病害抵抗性は熱ショック処理後 12 時間後に最大となり、その後低下することが明らかになった。一方、葉中サリチル酸濃度は熱ショック処理後 12 時間でピークに達し時間とともに減少した。

供試した病害抵抗性関連遺伝子はいずれも熱ショック処理後 12 時間または 24 時間後にピークに達した。HSF 遺伝子についてはいずれも熱ショック処理後 6 時間程度で発現がピークに達し、その後発現レベルが維持されるもの、漸減するものがあった。これら遺伝子の開始コドン上流域のシーケンシングを行ったところ、すべての遺伝子で熱ショックエレメントの存在が確認された。以上の結果から、葉中サリチル酸濃度がピークに達するタイミングは熱ショック転写因子の発現レベルよりも 6 時間遅かった。これらのことから、これら病害抵抗性遺伝子の発現はサリチル酸により全身獲得抵抗性が誘導されるよりも早い時期に熱ショック転写因子によって誘導される可能性が高いと判断された。

熱ショックタンパク質 HSP90 阻害剤ゲルダナマイシンならびに熱ショック転写因子 HSF1 阻害剤 KRIBB11 を処理してから接種試験ならびに病害抵抗性関連遺伝子の発現を調査したところ、前者は病

害抵抗性の誘導を促進し、後者は抑制した。これらのことから SAR が誘導される前に HSF が活性化し、病害抵抗性関連遺伝子を含む熱ショックエレメントを持つ遺伝子群の発現を制御している可能性が明らかになった。なお、トマトにおいて熱ショックタンパク質 hsp90 ならびに熱ショック転写因子 hsfA2 が病害抵抗性誘導に及ぼす影響を RNA 干渉法によって解明することとした。まず、Infusion cloning のためのプライマーデザインを行うとともにトマト培養細胞を入手し、培養条件を検討した。しかしながら細胞の成長速度が遅く実験が進展しなかった。次にキュウリとうどんこ病菌を用いて上記同様の実験を行ったところ、トマトと同様の結果が得られたことから熱ショックに対する抵抗性誘導反応は種特異的なものではない可能性が示唆された(Widiastuti ら、2021)。そこでキュウリと灰色かび病菌の組み合わせで詳細な実験を行った(Kharisma ら、2021)。熱ショック処理 24 時間と 48 時間後に、それぞれ POX と PRI の発現レベル上昇が認められ、病斑面積が無処理に比べて減少した。両遺伝子の発現レベル上昇 hsfA2 および hsfB2 の発現レベル上昇の後だった。HSE モチーフは、POX、PRI、CI、POX73、POX43 の上流に見られ、これらの遺伝子発現レベルは熱ショック処理 24 時間後に上昇した。HSP90 阻害剤であるゲルダナマイシンは、HSE を持つ PR タンパク質遺伝子の発現レベルを維持し、無処理に対して灰色かび病の病斑面積が小さかった。ゲルダナマイシン処理は局所的な抵抗性を増強したのに対して熱ショックは全身的な抵抗性を誘導した。熱ショック処理とゲルダナマイシン処理の組み合わせは、HSE を持つ PR タンパク質遺伝子の発現を誘導し、灰色かび病菌に対する抵抗性をさらに強化した。抵抗性発現のタイムコースを考慮すると、HSIR は遅発性の SAR と早発性の HSF を介した局所的抵抗性のシグナル伝達経路の双方を含むことが明らかになった。

最後に、HSIR が熱ショックのみをトリガーとして生起する反応であるのか、非生物学的ストレスに対する普遍的な反応であるのかを明らかにするため紫外線(UV-B)照射による抵抗性誘導反応との比較をキュウリとうどんこ病を用いた実験系で行った(Fardhani ら、2022)。キュウリ幼苗に対し UV-B 照射(強度 5 μ W/cm²)を 4 時間/日行った後にうどんこ病菌を接種したところ、うどんこ病の発生が対照群に比べ 21.17%減少した。熱ショック処理とは異なり UV-B 照射ではキュウリの病害抵抗性関連遺伝子 *Chi2* および *ETR2* が照射部位にのみ局所的に発現し、全身的な反応は現れなかった。うどんこ病菌を接種したキュウリでは、事前の UV-B 照射の有無で *Chi2*、*ETR2*、*LOX6* の発現量が異なった。UV-B は、熱ショック処理により誘導される全身獲得抵抗性や熱ショック転写因子遺伝子の発現に大きな影響を与えなかった。熱ショック処理と UV-B 照射の併用はうどんこ病の減少に強い相乗効果を示した。この結果から、UV-B 照射は熱ショック処理とは異なるメカニズムでキュウリのうどんこ病に対する抵抗性を引き起こす可能性が高いことがわかった。したがって全ての環境ストレスが HSIR を誘導する訳ではないことが示された。

研究期間全体を通し、当初目標に掲げた熱ショック誘導抵抗性の複数の反応経路のうちの未解明の経路が熱ショック転写因子に介在されるものであることが明らかになった。また実用化されている非生物学的ストレス利用手法である紫外線照射とはメカニズムが異なることが分かった。このため育苗施設等では複数技術を併用することによりさらに高い病害予防効果を期待できると考えられる。

<引用文献>

- Arofathullah, N. A., Hasegawa, M., Tanabata, S., Ogiwara, I., Sato, T. Heat Shock-Induced Resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al. via Heat Shock Transcription Factors in Tomato. *Agronomy*. 9. 2. 2019.
- Fardhani, D. M., Kharisma, A. D., Kobayashi, T., Arofathullah, N. A., Yamada, M., Tanabata, S., Yokoda, Y., Widiastuti, A., Sato, T. Ultraviolet-B Irradiation Induces Resistance against Powdery Mildew in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) through a Different Mechanism than That of Heat Shock-Induced Resistance. *Agronomy*. 12: 3011. 2022.
- Kharisma, A. D., Arofathullah, N. A., Yamane, K., Tanabata, S., Sato, T. Regulation of defense responses via heat shock transcription factors in *Cucumis sativus* L. against *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant Pathol.* 88: 17-28. 2021.
- Widiastuti, A., Yoshino, M., Saito, H., Maejima, K., Zhou, S., Odani, H., Hasegawa, M., Nitta, Y., Sato, T. Induction of disease resistance against *Botrytis cinerea* by heat shock treatment in melon (*Cucumis melo* L.). *Physiol Mol Plant Pathol.* 75: 157-162. 2011.
- Widiastuti, A., Yoshino, M., Hasegawa, M., Nitta, Y., Sato, T. Heat shock-induced resistance increases chitinase-I gene expression and stimulates salicylic acid production in melon (*Cucumis melo* L.). *Physiol Mol Plant Pathol.* 82: 51-55. 2013.
- Widiastuti, A., Yoshino, M., Saito, H., Maejima, K., Zhou, S., Odani, H., Narisawa, K., Hasegawa, M., Nitta, Y., Sato, T. Heat shock-induced resistance in strawberry against crown rot fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol Mol Plant Pathol.* 84: 86-91. 2013.
- Widiastuti, A., Arofathullah, N. A., Kharisma, A. D., Sato, T. Upregulation of heat shock transcription factors, Hsp70, and defense-related genes in heat shock-induced resistance against powdery mildew in cucumber. *Physiol Mol Plant Pathol.* 116: 101730. 2021.
- Yoshino, M., Widiastuti, A., Hasegawa, M., Sato, T. Induction of Disease Resistance against Gray Mold by Heat Shock Using Hot Water Dipping in Cucumber and its Underlying Mechanism. *Hort. Res. (Japan)*. 10: 429-433. 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Widiastuti Ani, Arofathullah Nur Akbar, Kharisma Agung Dian, Sato Tatsuo	4. 巻 116
2. 論文標題 Upregulation of heat shock transcription factors, Hsp70, and defense-related genes in heat shock-induced resistance against powdery mildew in cucumber	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological and Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 101730 ~ 101730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pmpp.2021.101730	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 Kharisma Agung Dian, Arofathullah Nur Akbar, Yamane Kenji, Tanabata Sayuri, Sato Tatsuo	4. 巻 88
2. 論文標題 Regulation of defense responses via heat shock transcription factors in <i>Cucumis sativus</i> L. against <i>Botrytis cinerea</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 17 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-021-01041-6	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 Arofathullah Nur Akbar, Hasegawa Morifumi, Tanabata Sayuri, Ogiwara Isao, Sato Tatsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Heat Shock-Induced Resistance Against <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (Okabe) Young et al. via Heat Shock Transcription Factors in Tomato	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/agronomy9010002	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 Dinar Mindrati Fardhani, Agung Dian Kharisma, Tomoyuki Kobayashi, Nur Akbar Arofathullah, Makoto Yamada, Sayuri Tanabata, Yumi Yokoda, Ani Widiastuti 4, Tatsuo Sato,	4. 巻 12
2. 論文標題 Ultraviolet-B Irradiation Induces Resistance against Powdery Mildew in Cucumber (<i>Cucumis sativus</i> L.) through a Different Mechanism Than That of Heat Shock-Induced Resistance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 3011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/agronomy12123011	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

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Muhamad Hafidz Fadjri and Tatsuo Sato
2. 発表標題 Induced resistance against <i>Corynespora cassiicola</i> by heat shock in cucumber
3. 学会等名 The 2nd International Conference on Sustainable Agriculture for Rural Development 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Angung Dian Kharisma, Sayuri Tanabata, Tatsuo Sato
2. 発表標題 Heat shock-induced resistance: The involvement of heat shock transcription factors in the defense gene expression in cucumber plants
3. 学会等名 The 2nd International Conference on Sustainable Agriculture for Rural Development 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Zhou Yixuan, Tatsuo Sato
2. 発表標題 Effects of different heat shock treatment methods on the isolation and purification of strawberry active ingredients
3. 学会等名 The 2nd International Conference on Sustainable Agriculture for Rural Development 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤達雄
2. 発表標題 イチゴにおける炭疽病、うどんこ病防除技術の開発と課題
3. 学会等名 北海道養液栽培研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nur Akbar Arofathullah, Tatsuo Sato, Sayuri Tanabata
2. 発表標題 Novel Pathway of Heat Shock-Induced Resistance in Tomato
3. 学会等名 International conference 2018 “Health and Lifestyle in the Era of Disruption” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤達雄、Dinar Mindrati Fardhani、Agung Dian Kharisma、Nur Akbar Arofathullah、七夕小百合
2. 発表標題 キュウリにおける紫外線による病害抵抗性の誘導メカニズム
3. 学会等名 第 131 回日本熱帯農業学会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsuo Sato
2. 発表標題 Inducing plant resistance as a method to reduce agricultural chemicals
3. 学会等名 The 8th National Seminar of Biotechnology, Indonesia (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsuo Sato
2. 発表標題 Practical use of heat shock-induced resistance in agriculture
3. 学会等名 International Webinar of Agriexplosion 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤達雄	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 412
3. 書名 青果物の鮮度評価・保持技術 収穫後の生理・化学的特性から輸出事例まで	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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		
インドネシア	Universitas Gadjah Mada		