

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18780028
 研究課題名 (和文) 植物免疫研究におけるマイクロアレイ技術を用いた遺伝子診断法の開発
 研究課題名 (英文) The development of genetic diagnostics method using microarray on plant immunity
 研究代表者
 鳴坂 真理 (NARUSAKA MARI)
 岡山大学・農学部・特別研究員
 研究者番号：80376847

研究成果の概要:作物の病気の発生を防ぐことは農業にとって最も重要な課題である。しかし、植物の病気には病原体認識、その後のシグナル伝達、抗菌性物質の産生など多くの遺伝子が関与するため、少数の遺伝子を用いた遺伝子発現解析では病害応答を精緻に理解することは困難である。そこで、一度に千から数万の遺伝子の動きを解析できるマイクロアレイを用いて、「カスタムアレイ設計の方法論の確立」および「遺伝子診断法の確立」を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

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：病害防除、病害抵抗性、感染生理、植物・病原体相互作用、マイクロアレイ、遺伝子診断

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA マイクロアレイは、医療分野において遺伝子研究、医薬品開発、医療、診断、検査などの必須アイテムとして使用されている。特に、医療分野においては癌診断、ストレス診断、うつ診断用の DNA チップの開発が進められている。一方、植物科学分野においても作物育種や遺伝子組換え植物の優良検定、変異体解析、農薬のゲノム創薬への利用が考えられており、植物のストレス診断による環境モニタリングシステムの開発が試みられている。

代表者は、日本で初めてシロイヌナズナ完全長 cDNA マイクロアレイの作製に成功し、これまでに、1,300 (1.3K) および 7K 遺伝子マイクロアレイを用いて、病害ストレス (病原

微生物接種)、シグナル物質および植物ホルモン (サリチル酸、ジャスモン酸、エチレン、アブシジン酸)、活性酸素誘導剤 (パラコート、ローズベンガル)、環境ストレス (重金属、紫外線、乾燥、塩、傷処理) において経時的かつ網羅的な遺伝子発現解析を行い、得られた発現プロファイルの集積データを保有している。遺伝子診断を確立するためには、基礎となるデータベースを有しており、多検体解析が可能な技術基盤が必要である。代表者は、アレイ作製からスキャニングまでの全ての装置を有していること、アレイ作製技術から解析手法に熟練していることで、受託解析よりも格段に低コストで解析できるカスタムアレイを開発済みである。以上の解析データおよびカスタムマイクロアレイの作製

技術を植物の病害防除に活用することによる新たな病害防除法の開発に貢献できる研究基盤を有している。

2. 研究の目的

農業にとって、作物の病気の発生を防ぐことは最も重要な課題である。しかし、植物の病気には病原体認識、その後のシグナル伝達、抗菌性物質の産生など多くの遺伝子が関与している。そこで、その診断には、一度に千から数万の遺伝子の動きを検証できるマイクロアレイが最適なデバイスとなる。また、病害応答に関わる網羅的な遺伝子群の発現解析の方法論を構築することは、新たな病害防除法の開発に貢献することが期待できる。そこで、現在までに取得したマイクロアレイデータを用いて「カスタムアレイ設計の方法論」を確立し、シロイヌナズナに病原菌もしくは抵抗性シグナル誘導物質を処理したカスタムアレイデータを集積し、統計学的解析を中心とした「遺伝子診断法の確立」をめざした。

また、モデル植物で得られた知見を農作物に応用することを目的として、ハクサイのESTを用いて、ハクサイ 2.0K マイクロアレイを構築した。ハクサイ cDNA マイクロアレイを用いて、病原菌処理により誘導される抵抗性遺伝子群の発現プロファイルを取得し、モデル植物と農作物において比較解析することにより、遺伝子診断法を用いた新たな病害防除法の確立をめざした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子診断用シロイヌナズナ cDNA マイクロアレイの構築

① 1.2K マイクロアレイを用いた病害感受度検定

研究代表者がこれまでに遂行したマイクロアレイデータベースから、病害ストレス、環境ストレス処理において発現した遺伝子、植物のハウスキーピング遺伝子を搭載した 1.2K マイクロアレイを用いて、アブラナ科野菜類炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*) を感受性および抵抗性エコタイプのシロイヌナズナに接種し、網羅的に遺伝子の発現プロファイルを解析した。

② ハクサイ遺伝子比較用シロイヌナズナ

1.7K マイクロアレイの構築

ハクサイESTクローンに対して高い相同性を持つ約400のシロイヌナズナRAFLクローンを①の1.2Kマイクロアレイに加え、1.7Kマイクロアレイの構築を行い、ハクサイとシロイヌナズナにおけるアブラナ科野菜類炭疽病菌の攻撃に対する応答遺伝子の比較解析を行った。

(2) ハクサイESTクローンの取得およびcDNA マイクロアレイの構築

ハクサイ遺伝子を網羅的に解析するため、数種のシグナル誘導物質を処理したハクサイ葉からcDNAライブラリーを構築し、約2000のESTクローンおよび約5000の完全長cDNAクローンの取得を行った。取得したcDNAクローンからPCR産物を調製し、約7000遺伝子を搭載したハクサイ7.0Kマイクロアレイを作製した。本アレイを用いて、ハクサイにおけるアブラナ科野菜類炭疽病菌の攻撃に対する応答遺伝子の網羅的な遺伝子発現プロファイルを取得し、(1)項で取得したモデル植物の遺伝子発現プロファイルと比較解析した。

(3) 炭疽病菌を処理したシロイヌナズナおよびハクサイの病原菌感染における比較解析

シロイヌナズナおよびハクサイに炭疽病菌を処理し、経時的に顕微鏡による菌の感染行動の観察を行い、マイクロアレイにより得られたデータと比較解析して遺伝子診断の正否を検討する。

4. 研究成果

シロイヌナズナの病害および環境ストレス応答遺伝子1,200個を搭載したシロイヌナズナ1.2Kマイクロアレイにより、アブラナ科野菜類炭疽病菌の攻撃に対するシロイヌナズナの応答遺伝子の解析を行った。その結果、感受性のエコタイプ Co1-0 と抵抗性エコタイプ Ws および Ei1-0 の遺伝子発現プロファイルには明らかな差が認められ、マイクロアレイによる解析により、病原菌に対する病害感受度の判定ができることが示唆された。そこで、シロイヌナズナにおける病害応答診断の方法論の構築を検討し、(1)基本となるサリチル酸 (SA)、エテフォン (ET)、メチルジャスモン酸 (JA) 処理のデータベースの構築、(2) SA、ET、JA シグナル伝達経路上のマーカー遺伝子の発現プロファイル、(3) 実験系統樹解析、(4) 発現遺伝子の相関解析を統合して解析することにより、病害感受度を判定できる可能性が示された。さらに、1.2K および 1.7K シロイヌナズナマイクロアレイを用いて、病原菌接種とシグナル物質処理により得られた遺伝子発現プロファイルの相関解析により、活性化した抵抗反応経路を推定する方法論を構築した。病原糸状菌アブラナ科野菜類炭疽病菌を接種したシロイヌナズナについて、本評価法を用いて解析した結果、炭疽病菌の攻撃に対するシロイヌナズナの初期の抵抗反応はサリチル酸経路を介して活性化されることが示唆された。次に、7.0K ハクサイマイクロアレイを用いて、サリチル

酸ナトリウム、BTH、メチルジャスモン酸処理およびアブラナ科野菜類炭疽病菌の接種により発現誘導される遺伝子群を網羅的に解析するとともに、ハクサイ-シロイヌナズナ間のカウンターパート遺伝子を同定し、両植物間の病害応答性を比較解析した。その結果、シロイヌナズナの SA 経路、ET/JA 経路、JA 経路に関わる主要な病害応答性遺伝子である *PR1*、*PR5*、*BGL2* (以上 SA 経路)、*PDF1.2* (以上 ET/JA 経路)、*VSP2*、*LOX2* (以上 JA 経路) を取得した。また、シロイヌナズナで構築した遺伝子診断評価法を用いて、アブラナ科野菜類炭疽病菌に対する抵抗反応を解析した結果、シロイヌナズナよりも感受度の高いハクサイでは、初期のサリチル酸経路の活性化は認められないが、ET/JA 経路はシロイヌナズナと同様に活性化されることが示唆された。さらに 7.0K ハクサイマイクロアレイを用いた解析により、遺伝子診断アレイ用の遺伝子の選抜を行った。選抜基準として次のいずれかを満たす遺伝子を選抜した。(1) シグナル物質処理または病原菌接種により 5 倍以上の発現活性を有する。(2) シロイヌナズナの防御応答遺伝子のカウンターパート。以上により、約 1000 遺伝子の遺伝子診断キット用ハクサイ病害応答性遺伝子を選抜した。現在、本診断アレイによるアブラナ科作物の病害応答について解析を遂行している。

また、シロイヌナズナにおいて、炭疽病菌に対する抵抗性には 2 つの異なる抵抗性遺伝子が必要であることを明らかにした。現在、本遺伝子セットをアブラナ科作物へ形質転換しており、抵抗性遺伝子を用いた病害抵抗性作物の分子育種を試みている。

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 6 件)

- (1) Narusaka, M., Kawai, K., Izawa, N., Seki, M., Shinozaki, K., Seo, S., Kobayashi, M., Shiraishi, T., Narusaka, Y. Gene coding for SigA-binding protein from *Arabidopsis* appears to be transcriptionally upregulated by salicylic acid and NPR1-dependent mechanisms. *Journal of General Plant Pathology*, 74, 345-354 (2008) (査読有り)
- (2) Abe, H., Ohnishi, J., Narusaka, M., Seo, S., Narusaka, Y., Tsuda, S., Kobayashi, M. *Arabidopsis*-thrips system for

analysis of plant response to insect feeding. *Plant Signaling & Behavior* 3(7), 1-2 (2008) (査読有り)

- (3) Abe, H., Ohnishi, J., Narusaka, M., Seo, S., Narusaka, Y., Tsuda, S., Kobayashi, M. Function of jasmonate in response and tolerance of *Arabidopsis* to thrips feeding. *Plant Cell Physiol*, 49, 68-80 (2008) (査読有り)
- (4) 鳴坂義弘, 鳴坂真理, 白石友紀, 河合清, 井沢典彦, 畠山勝徳, 安部洋, 小林正智. ハクサイ炭疽病および黒すす病に対するプラントアクティベーターの効果と影響. 日本農薬学会誌 33(2), 196-200 (2008) (査読有り)
- (5) 鳴坂義弘, 鳴坂真理, 白石友紀, 畠山勝徳, 安部洋, 小林正智. ハクサイにおけるアブラナ科野菜類炭疽病および黒すす病に対するプラントアクティベーターの効果の評価. 岡山県生物科学総合研究所 平成 19 年研究年報, pp81-87 (2008) (査読無し)
- (6) Narusaka, M., Abe, H., Kobayashi, M., Kubo, Y., Narusaka, Y. Comparative analysis of expression profiles of counterpart gene sets between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana* during fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum* infection. *Plant Biotechnology*, 23, 503-508 (2006) (査読有り)

[学会発表] (計 25 件)

- (1) 安部洋, 立石剣, 下田武志, 大西純, 釘宮聡一, 鳴坂真理, 瀬尾茂美, 今野浩太郎, 服部誠, 鳴坂義弘, 津田新哉, 小林正智. モデル植物シロイヌナズナを用いた植物-昆虫間相互作用研究. 第 53 回日本応用動物昆虫学会, 2009. 3. 30, 北海道
- (2) 小林正智, 佐々木一誠, 鳴坂真理, 畠山勝徳, 深海-小林薫, 鳴坂義弘, 安部洋. シロイヌナズナゲノム情報を利用したハクサイ cDNA リソース整備とデータベース開発. 育種学会・作物学会合同講演会, 2009. 3. 27-28, つくば
- (3) 安部洋, 下田武志, 大西純, 釘宮聡一, 鳴坂真理, 瀬尾茂美, 鳴坂義弘, 津田新哉, 小林正智. 微小昆虫アザミウマの食害に対するシロイヌナズナの防御応答. 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009. 3. 21, 名古屋

- (4) 鳴坂真理, 白須賢, 久保泰之, 井内聖, 小林正智, 白石友紀, 岩淵雅樹. デュアルR-遺伝子システムによる異なる3種の病原体認識機構の解明(その1). 平成21年度日本植物病理学会大会, 2009. 3. 27, 山形
- (5) 鳴坂義弘, 鳴坂真理, 白須賢, 能年義輝, 向原隆文, 白石友紀, 久保泰之, 岩淵雅樹. デュアルR-遺伝子システムによる異なる3種の病原体認識機構の解明(その2). 平成21年度日本植物病理学会大会, 2009. 3. 27, 山形
- (6) 鳴坂真理, 安部洋, 小林正智, 白石友紀, 鳴坂義弘. ハクサイ-シロイヌナズナ間の比較ゲノム解析によるハクサイの病害防御機構解明の試み. 平成20年度日本植物病理学会関西部会, 2008. 9. 18, 和歌山
- (7) 小林正智, 鳴坂真理, 鳴坂義弘, 安部洋. ゲノムリソースと情報を農学分野で活用する. 第26回日本植物細胞分子生物学会 大阪大会・シンポジウム, 2008. 9. 2, 大阪
- (8) Hiroshi ABE, Jun OHNISHI, Mari NARUSAKA, Shigemi SEO, Takeshi SHIMODA, Sohichi KUGIMIYA, Yoshihiro NARUSAKA, Shinya TSUDA and Masatomo KOBAYASHI. Analyses of Arabidopsis response to thrips feeding, 19th International Conference on Arabidopsis Research, 2008. 7. 26、カナダ・モントリオール
- (9) 鳴坂義弘, 鳴坂真理, 安部洋, 小林正智, 畠山勝徳, 宇野久仁子, 白石友紀. シロイヌナズナのゲノム情報を利用したアブラナ科作物の病害防御機構解明の試み. 平成20年度日本植物病理学会大会, 2008. 4. 26, 松江
- (10) 安部洋, 立石剣, 大西純, 鳴坂真理, 下田武志, 瀬尾茂美, 今野浩太郎, 服部誠, 鳴坂義弘, 津田新哉, 小林正智. モデル実験植物シロイヌナズナを用いた植物-昆虫間相互作用研究. 日本応用動物昆虫学会, 2008. 3. 26-28, 宇都宮
- (11) 鳴坂真理, 白須賢, 井内聖, 宇野久仁子, 小林正智, 白石友紀, 鳴坂義弘. アブラナ科野菜類炭そ病菌に対するシロイヌナズナ抵抗性遺伝子の同定. 第49回日本植物生理学会年会, 2008. 3. 20-22, 札幌
- (12) 鳴坂義弘, 鳴坂真理, 安部洋, 畠山勝徳, 宇野久仁子, 白石友紀, 小林正智. シロイヌナズナのゲノム情報からアブラナ科作物の病害応答を診断する. 第49回日本植物生理学会年会, 2008. 3. 22, 札幌
- (13) 宇野久仁子, 鳴坂真理, 平塚和之, 安部洋, 畠山勝徳, 白石友紀, 鳴坂義弘. ハイスループットスクリーニングシステムによる新規 Plant activator の探索. 第49回日本植物生理学会, 2008. 3. 20-22, 札幌
- (14) 安部洋, 佐々木一誠, 鳴坂真理, 深海薫, 畠山勝徳, 鳴坂義弘, 小林正智. シロイヌナズナのゲノム情報を利用したハクサイ cDNA の整備. 第49回日本植物生理学会年会シンポジウム「モデル植物の“ゲノム”情報をどのように利用するか」、平成20年3月22日(札幌)
- (15) 安部洋, 大西純, 鳴坂真理, 瀬尾茂美, 下田武志, 鳴坂義弘, 津田新哉, 小林正智. 微小昆虫アザミウマの食害に対するシロイヌナズナの応答機構に関する解析. 第49回日本植物生理学会年会, 2008. 3. 20, 札幌
- (16) 鳴坂真理, 安部洋, 小林正智, 白石友紀, 鳴坂義弘. フォーカスマイクロアレイを用いたプラントアクティベーターの評価と病害応答診断技術の開発. 平成19年度日本植物病理学会関西部会, 2007. 10. 7, 岐阜
- (17) 鳴坂義弘, 鳴坂真理, 安部洋, 小林正智, 畠山勝徳, 白石友紀. プラントアクティベーターを利用したハクサイに発生する病害の防除. 平成19年度日本植物病理学会関西部会, 2007. 10. 7, 岐阜
- (18) Hiroshi ABE, Jun Ohnishi, Mari NARUSAKA, Shigemi SEO, Yoshihiro NARUSAKA, Shinya TSUDA and Masatomo KOBAYASHI. Analyses of plant response to thrips feeding using *Arabidopsis* system, 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, 2007. 9. 12、つくば
- (19) 畠山勝徳, 鳴坂義弘, 鳴坂真理, 吉秋斎, 石田正彦, 松元哲. 根こぶ病抵抗性系統・罹病性系統の根で発現する遺伝子の解析. 育種学会大会, 2007. 3. 30, 茨城
- (20) 平山隆志, 鳴坂義弘, 安田美智子, 鳴坂真理, 北畑信隆, 黒森崇, 浅見忠男, 篠崎一雄, 仲下英雄, 西村宜之. シロイヌナズナ polyA specific ribonuclease の機能とホルモン応答. 第48回日本植物生理学

会年会, 2007. 3. 28-30, 松山

- (21) 安部洋, 大西純, 鳴坂真理, 瀬尾茂美, 鳴坂義弘, 津田新哉, 小林正智. 微小昆虫アザミウマの食害に対するシロイヌナズナの応答機能に関する解析. 第48回日本植物生理学会年会, 2007. 3. 30, 松山
- (22) 鳴坂真理, 安部洋, 保浦徳昇, 小林正智, 鳴坂義弘. アブラナ科植物ハクサイーシロイヌナズナ間における病原糸状菌に対する応答遺伝子の比較ゲノム解析. 第48回日本植物生理学会年会, 2007. 3. 28-30, 松山
- (23) 西村宜之, 鳴坂義弘, 鳴坂真理, 安田美智子, 北畑信隆, 黒森崇, 浅見忠男, 仲下英雄, 篠崎一雄, 平山隆志. シロイヌナズナ polyA specific ribonuclease の機能低下はアブシジン酸およびサリチル酸応答を誘導する. 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 2006. 12. 8, 名古屋
- (24) 鳴坂真理, 安部洋, 小林正智, 鳴坂義弘. 植物免疫研究におけるフォーカスマイクロアレイを用いた Plant activator の評価と遺伝子診断技術の開発. 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 2006. 12. 7, 名古屋
- (25) 鳴坂義弘, 鳴坂真理, 安部洋, 小林正智. 植物免疫研究におけるアブラナ科植物ハクサイーシロイヌナズナ間の比較ゲノムおよび機能ゲノム解析. 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 2006. 12. 6, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳴坂 真理 (NARUSAKA MARI)

岡山大学・農学部・特別研究員

研究者番号 : 80376847