

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05642

研究課題名(和文)植物表皮プロテオミクスを用いた病原菌に対する侵入抵抗性の制御因子の探索と機能解析

研究課題名(英文)Proteomic study of plant epidermal tissues in response to phytopathogen invasion

研究代表者

西内 巧(Nishiuchi, Takumi)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号：20334790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物表層における病原菌との相互作用に関わるタンパク質を同定するため、シロイヌナズナの葉に赤かび病菌の胞子懸濁液を滴下接種した表皮組織を用いて、ショットガンプロテオーム解析を行った。接種4時間後の表皮において、MAPKKK等のシグナル伝達因子やタンパク質分解に関わるタンパク質の発現量が増加していた。接種24時間後の表皮では、転写因子、PRタンパク質の発現も増加していたが、葉全体ではこれらの発現増加は見られなかった。また、赤かび病菌のエフェクター様タンパク質も多く検出されたことから、接種表皮を用いたプロテオーム解析は、植物と病原菌の相互作用に関わるタンパク質の検出に有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物と病原菌の相互作用にはタンパク質が重要な役割を担っており、感染過程で発現変動を示すタンパク質を明らかにすることが、植物を病気から守る上で重要な基盤的知見となります。本研究では、病原菌を接種した植物の表皮組織のみを用いて網羅的なタンパク質の発現解析を行う実験系を構築し、感染初期に発現応答を示す多くのタンパク質を同定することに成功しました。今後は、同定したタンパク質の機能を解明することで、植物と病原菌の相互作用における分子機構を紐解いていきます。

研究成果の概要(英文)：The plant epidermis is the first line of plant defence against pathogen invasion and likely contains important regulatory proteins related to the plant-pathogen interaction. We performed comparative proteomic studies to identify differentially expressed proteins in the leaf epidermis challenged with fungal phytopathogen. The conidia solutions were dropped onto the Arabidopsis leaf surface and then collect the epidermal tissues from inoculated and mock treated leaves at 4 and 24 hpi. Label free quantification methods showed that proteins related to defence signaling, transcription factors, and cell wall organization were up-regulated in the inoculated leaf epidermis. More than 300 fungal proteins expressed on the Arabidopsis epidermis were also identified and about 13% of them were predicted as effector-like proteins. These results suggested that our method is useful for understanding the early expressions of plant and fungal proteins related to their interactions.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物免疫 植物表皮 プロテオミクス 病原性糸状菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原糸状菌であるムギ類を宿主とする赤かび病菌に対する植物の抵抗性について、オオムギやコムギに加えて、本菌に罹病性のシロイヌナズナを活用して研究を進めていた。ムギ類の穂における赤かび病菌の主な侵入経路として、開花期の花への侵入に加えて、外穎表皮の開口した気孔からも侵入することが知られていた。シロイヌナズナの葉に赤かび病菌の孢子懸濁液を滴下接種すると、葉の表皮上で発芽後、菌糸を進展させ気孔から植物組織内に侵入することを明かにしていた。接種したシロイヌナズナの葉全体を用いて、プロテオーム解析を行ったところ、多くのタンパク質は同定できたものの顕著な発現応答を示したタンパク質は少なく、特に感染初期においては、発現変動を示すタンパク質には植物免疫に関連するものがほとんど見られなかった。

シロイヌナズナの葉の表層では、赤かび病菌が接触することで局所的なタンパク質の発現誘導は起こっていると思われるが、葉全体を用いて場合には検出が難しいと考えられた。そこで、植物病原菌を接種した葉の表皮を迅速に回収することができれば、感染初期の植物の免疫応答を正確にトレースできると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、植物と病原菌の接触面となる表皮組織のみを用いて、高感度プロテオミクスを実施し、植物側と病原菌側の双方から新たな制御因子を探索する点が特色の1つである。実験系を確立できれば、植物表皮を調整できれば実施可能であり、幅広い植物と微生物の相互作用に適用できる汎用性の高い解析技術となる。これまでにない解析手法であり、さらに翻訳後修飾やタンパク質相互作用について、より深く解析を進めることで、新たな制御タンパク質の機能を見出せる可能性が高く、学術的に新規性の高い知見が期待される。

3. 研究の方法

表皮プロテオミクスの実験系の構築(Fig.1 参照)

材料として、シロイヌナズナの野生株(CoI-0)、ムギ類赤かび病菌(H3株)を用いる。

葉の背軸側の表皮に赤かび病菌の分生子を滴下接種(分生子なしも準備)

ナイロンメッシュ(ポアサイズ62 μ m)を被せる

表皮組織の接触面における分生子の濃度も高くなることで、

病徴の進展が早くなり、植物と病原菌の両方のタンパク質の発現解析に適した実験系である。

多湿状態を維持

接種部位から表皮をピンセットで回収し、3分以内にサンプリング(液体窒素凍結)

接種後4時間、24時間後等の葉の表皮組織からタンパク質抽出

タンパク質をトリプシン消化・精製

質量分析計を用いてショットガンによる同定と定量解析

MSのイオンピーク強度に基づいたラベルフリー定量(LFQ)を用いる

葉全体でも同様に解析し、表皮での結果と比較して、

接種によって、表皮組織で特異的に発現応答を示すタンパク質等を同定する。

- ・ 平行して、植物への侵入過程で発現する病原菌のタンパク質についても解析を行う。

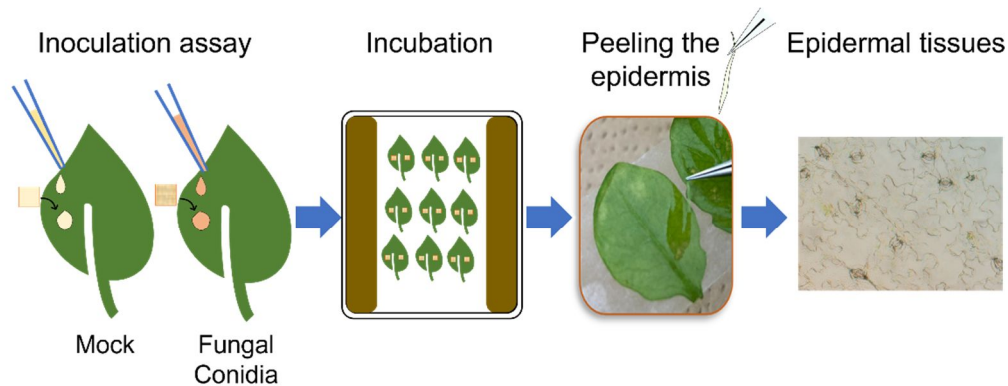


Fig. 1. Preparation of epidermal tissues inoculated with fungal conidia.

4. 研究成果

(1) 植物表皮プロテオミクスの実験系の構築とシロイヌナズナの変異体を用いた解析

赤かび病菌の分生子懸濁液を滴下接種した葉の表皮組織からタンパク質を抽出し、精製後に濃度測定を行い、トリプシン消化・脱塩後のペプチド断片を nanoLC で分離して、質量分析計 (Thermo Orbitrap QE plus) を用いて MS/MS による分析を行った。抽出溶液、精製工程、及び nanoLC カラムと分離方法について検討を進めた結果、シロイヌナズ及び赤かび病菌のタンパク質を同定し、大規模なラベルフリー定量が可能な実験系を構築した。また、赤かび病抵抗性を示す *ein3* 変異体では、接種後の表皮における気孔の開度が野生株に比べて有意に小さいことを明らかにし、確立した表皮プロテオミクスの実験系を用いて解析を行ったところ、アブシジン酸応答に関わる複数のタンパク質の発現が野生株に比べて有意に上昇していることが分かった。また、野生株に比べて赤かび病に罹病性を示す *pen1* 変異体では、ユビキチン-プロテアソーム系に関わる多くのタンパク質群が有意に変動していることを見出した。

(2) 接種葉における表皮組織と葉全体のプロテオミクスの比較解析

シロイヌナズナについては、葉に水を滴下した表皮組織をコントロールサンプルとして比較定量解析を行った。本実験系においては、接種後約 4 時間以内に胞子の発芽が見られ、24 時間後には気孔からの植物組織内への菌糸侵入が観察されるため、接種後 4 時間と 24 時間のサンプルを用いて、解析を行った。また、葉全体から抽出したタンパク質との比較も行った。接種した表皮組織から、シロイヌナズナの約 5000 タンパク質を検出し、接種 4 時間後の表皮組織において、MAPKKK などのシグナル伝達因子やタンパク質分解に関わるタンパク質の発現量が増加していた。さらに、接種 24 時間後の表皮組織では、転写因子、PR タンパク質、細胞壁関連のタンパク質の発現も増加していたが、葉全体から抽出したサンプルでは、これらのタンパク質の発現増加は見られなかった。

(3)植物表層における病原菌側の発現タンパク質の検出系の改善

葉の表皮組織を用いた解析では、赤かび病菌側の同定タンパク質におけるエフェクター様タンパク質の割合が低く、植物由来の分子量の大きいタンパク質が病原菌由来の低分子タンパク質の検出が妨げていると考えられた。そこで、葉に孢子懸濁液を滴下接種して、大きめにカットしたメッシュを被せて、高湿度に保つことで、植物と病原菌が相互作用する疑似的なインターフェースを作り、一定時間経過に溶液を回収して TCA アセトン沈殿によりタンパク質を精製した試料を用いてプロテオーム解析を行ったところ、同定した 1000 種以上の菌側タンパク質には多くの分泌タンパク質に加えて、エフェクター様のタンパク質も多く検出することができた。また、植物由来のタンパク質も検出され、多くの PR タンパク質が含まれていた。以上のことから、疑似的なインターフェースを用いることで、植物と病原菌の相互作用に関わるタンパク質を効率的に双方から多数同定できることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Asano T, Nguyen HT, Yasuda M, Sidiq Y, Nishimura K, Nakashita H, Nishiuchi T.	4. 巻 71
2. 論文標題 The Arabidopsis MAPKKK -1 is required for full immunity against bacterial and fungal infection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Exp Bot.	6. 最初と最後の頁 2085-2097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erz556.	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 -

1. 著者名 Yasir Sidiq, Masataka Nakano, Yumi Mori, Takashi Yaeno, Makoto Kimura and Takumi Nishiuchi	4. 巻 22
2. 論文標題 Nicotinamide Effectively Suppresses Fusarium Head Blight in Wheat Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22062968	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 西内 巧
2. 発表標題 安全で効果的な赤かび病防除に向けた植物由来の新規抵抗性誘導剤の開発
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会第 81回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yasir Sidiq, Daisuke Tamaoki, Takumi Nishiuchi
2. 発表標題 Proteomic study of plant leaf epidermis challenged with Fusarium graminearum.
3. 学会等名 IS-MPMI（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Daisuke Tamaoki, Daishi Iekada, Yasir Sidiq, Ichiro Karaha, Takumi Nishiuchi
2. 発表標題 Proteomic analysis of leaf epidermis inoculated with <i>Fusarium graminearum</i> in <i>Arabidopsis ein3</i> mutant.
3. 学会等名 IS-MPMI (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Daishi Iekada, Takumi Nishiuchi, Ichiro Karaha, Daisuke Tamaoki
2. 発表標題 Ethylene signaling negatively regulates the stomata movement by infection of <i>Fusarium graminearum</i>
3. 学会等名 IS-MPMI (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Rina Horita, Mai Inoue, Tomoka Fujita, Miyuki Kusajima, Takumi Nishiuchi, Hideo Nakashita
2. 発表標題 Heat-shock treatment induces SA-dependent NPR1-independent disease resistance in <i>Arabidopsis</i>
3. 学会等名 IS-MPMI (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Sayo Kodama, Takumi Nishiuchi, Yasuyuki Kubo
2. 発表標題 Type II phosphatidate phosphatase gene <i>CoPAP2</i> of <i>Colletotrichum orbiculare</i> is involved in fungal pathogenesis and host defense responses.
3. 学会等名 IS-MPMI (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 玉置大介, 池田大志, 唐原一郎, 西内巧
2. 発表標題 シロイヌナズナの表皮におけるムギ類赤かび病菌接種によるタンパク質の発現変動の解析
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 玉置大介, 西内巧
2. 発表標題 ムギ類赤かび病菌を接種したシロイヌナズナの葉の表皮におけるプロテオーム
3. 学会等名 北陸線植物バイオサイエンス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田大志, 西内巧, 玉置大介
2. 発表標題 エチレン非感受性変異体 ein3-1 におけるムギ類赤かび病菌に対する病害抵抗性の定量解析
3. 学会等名 北陸線植物バイオサイエンス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takumi Nishiuchi
2. 発表標題 Proteome analysis of plant epidermis challenged with phytopathogen.
3. 学会等名 International Joint Conference on Genetics and Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 玉置 大介、池田大志、唐原一郎、西内巧
2. 発表標題 ムギ類赤かび病菌に抵抗性を示すシロイヌナズナein3-1変異体における表皮プロテオーム 解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasir Sidiq, Takumi Nishiuchi
2. 発表標題 Secretome Study at Plant-Pathogen Interface
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学遺伝子研究施設西内研究室 https://nishiuchitakumi.com/

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	玉置 大介 (Tamaoki Daisuke) (20793053)	富山大学・学術研究部理学系・助教 (13201)	

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