

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05651

研究課題名(和文) リン脂質代謝による植物免疫制御を介した広耐病性の分子機構の解明と病害防除への展開

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of plant immunity by phospholipid turnover and plant disease management

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：PAの合成に関わるフォスホリパーゼC、およびD(PLC、PLD)に着目した。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は植物の基礎的な免疫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。一方、PLC1、PLC3、PLC4は自己細胞死を伴う過敏反応(HR)の抑制に関わることも明らかとなった。また、PA合成に関わる別の経路を構成する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。本研究の研究成果から、PTI制御とリン脂質代謝(PLC2、PLD)、HR制御とリン脂質代謝(PLC1、3、4)の関連を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物免疫の人為的な活性化は病害防除につながるという概念で、植物免疫の活性化機構の解明が精力的に進められている。一方、病原体は植物免疫を抑制することで、感染～発病に至るため、病原因子の研究も対極の研究も進められている。本研究では、DS1-PAPが関連する広耐病性の解明、DS1-PAP発現制御機構の解明、感染に必須な病原細菌・卵菌・ウイルスの病原因子の発見と発病機構の解明は、未知の基礎的な植物免疫機構と病原体の感染戦略を見いだすことができる極めて重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Phospholipid signaling plays an important role in plant immune responses. Here, we isolated phospholipase C (PLC) orthologs in the *Nicotiana benthamiana*. Induction of the hypersensitive response (HR), including HR cell death and bacterial population reduction, was accelerated in both PLC1, 3, 4-silenced plants challenged with *N. benthamiana*-incompatible *Ralstonia solanacearum* 8107. The PLC1, 3, 4-silenced plants also showed enhanced expression of *Nbhin1*, a HR marker gene. Expressions of genes for salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) signaling were drastically increased in PLC1, 3, 4-silenced plants by *R. solanacearum* inoculation. In addition, PLC1, 3, 4-silencing triggered reactive oxygen species (ROS) hyper-production. These results suggest that PLC1, 3, 4 are closely associated with JA, SA, and ROS signaling and act as negative regulators of the HR in *N. benthamiana*.

研究分野：植物病理学

キーワード：フォスファチジン酸 耐病性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の病害は糸状菌、細菌、ウイルス等多様であり、各々の病原体に対策を行う必要がある。この状況を打破するため、植物免疫の病害防除への利用が、サリチル酸(SA)経路を活性化する薬剤を中心に解析・実用化されてきた。しかし、SAを介した免疫は活物寄生菌には有用であるが、殺生菌には効果を示さない。また、SA経路の活性化は薬害も問題となる。つまり、SA経路は万能ではなく、SA経路以外の標的を見いだす必要性が生じている。

2. 研究の目的

フォスファチジン酸(PA)は植物免疫誘導に必須なシグナル物質である。申請者は、PAの脱リン酸化酵素(DS1-PAP)を人為的に抑制した植物は、PAの蓄積に伴い耐病性を示す。DS1-PAP抑制植物は、免疫の恒常的な活性化はなく正常に生育するにも関わらず、細菌、卵菌、ウイルスに至る幅広い病原体に耐病性を示す(広耐病性と命名)。一方、病原体は病原力因子・エフェクターの作用により、DS1-PAPの発現を誘導、PAの分解の結果、免疫を阻害し感染していることを見いだした。本計画では、DS1-PAP欠損タバコ・トマト植物の作出と広耐病性の分子機構の解明。DS1-PAPの発現制御機構の解明。DS1-PAP酵素活性、DS1-PAP遺伝子発現阻害剤のデザイン・選抜を行う。本計画の成果をもとに、DS1-PAP抑制による広耐病性を利用した、新奇防除法の確立を目指した基礎研究を行う。

3. 研究の方法

1: DS1-PAP欠損による広耐病性機構の解明

広耐病性という、これまでにない植物の耐病性の分子機構を解明する。そのため、ゲノム編集によるDS1-PAP遺伝子欠損ベンサムアナ植物を作出し、トランスクリプトーム、メタボローム解析を行う。実用作物トマトのDS1-PAP植物を作製し、広耐病性の分子育種への展開を進める。

2: DS1-PAP発現制御機構の解明

病原体がPAの分解と広耐病性の抑制に利用しているDS1-PAPの発現制御機構を2つの方法で解明する。酵母One-HybridによるDS1-PAP遺伝子の発現制御に関わる植物由来の転写因子を同定する。DS1-PAPプロモーター配列とレポーター遺伝子との融合遺伝子を導入したDS1-P植物を用いてDS1-PAP遺伝子の発現制御機構(植物細胞内情報伝達や病原体エフェクター)の解析、DS1-PAP発現抑制化合物の選抜を行う。

3: DS1-PAPを標的にした病害防除法開発への展開

DS1-PAP活性を人為的に抑制する薬剤の開発を目的に、in vitro DS1-PAP酵素活性測定系の確立・結晶構造の解析と阻害剤の選抜を行う。

4. 研究成果

本研究ではPAの合成に関わるフォスホリパーゼC、およびD(PLC、PLD)、PAの下流のシグナル伝達因子PDK1に着目した。Nicotiana benthamianaのゲノムにPLCは12個存在し、7つのグループに類別できた。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分子パターン(PAMPs)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。一方、PLC1、PLC3、PLC4は自己細胞死を伴う過敏反応(HR)の抑制に関わることも明らかとなった。すなわち、PLCは同じ酵素活性を示すことが推定されるが、ファミリーによって防御応答制御における役割は異なることが示唆された。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、PLC8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。近年見いだされたNPLCもジーンファミリーを形成しており、N. benthamianaのゲノムにNPLCは8個存在し、6つのグループに類別できた。さらにPAのターゲットとされるPDKはHRの誘導に関わることを示した。さらに、PAPが局在する葉緑体におけるリン脂質代謝の重要な因子であり、葉緑体と小胞体間のリン脂質輸送に関わるTGDタンパク質の機能の解析を行ったところ、青枯病菌に対する抵抗性の低下がみられたことから、小胞体-葉緑体間のリン脂質輸送が抵抗性誘導に重要であることがわかった。

本研究の研究成果から、PTI制御とリン脂質代謝(PLC2、PLD8)および小胞体-葉緑体

間のリン脂質輸送、HR 制御とリン脂質代謝（PLC 1 , 3、 4 ）の関連を明らかにできた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Watanabe Maho, Ohnishi Kouhei, Hikichi Yasufumi, Kiba Akinori	4. 巻 40
2. 論文標題 Suppressed expression of ErbB3-binding protein 1 (EBP1) genes compromised the hypersensitive response cell death in <i>Nicotiana benthamiana</i>;	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 77～81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.22.1121a	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Fukui Kotoko, Ohnishi Kouhei, Hikichi Yasufumi, Kiba Akinori	4. 巻 40
2. 論文標題 Phosphatidylinositol-phospholipase C4 suppresses the hypersensitive response of <i>Nicotiana benthamiana</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 87～92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.22.1207a	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Shuhei Tagami, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, Akinori Kiba	4. 巻 38
2. 論文標題 Trigalactosyldiacylglycerol 3 protein orthologs are required for basal disease resistance in <i>Nicotiana benthamiana</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 373-378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.0624a	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 Yukiko Ueta, Yuka Mizutani, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, Akinori Kiba	4. 巻 116
2. 論文標題 Phosphatidylinositol-phospholipase C1 negatively regulates the hypersensitive response in <i>Nicotiana benthamiana</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological and Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 101724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pmpp.2021.101724	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 -

1. 著者名 Kiba Akinori, Nakano Masahito, Hosokawa Miki, Galis Ivan, Nakatani Hiroko, Shinya Tomonori, Ohnishi Kouhei, Hikichi Yasufumi	4. 巻 71
2. 論文標題 Phosphatidylinositol-phospholipase C2 regulates pattern-triggered immunity in <i>Nicotiana benthamiana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 5027 ~ 5038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/eraa233	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 Kiba Akinori, Fukui Kotoko, Mitani Maki, Galis Ivan, Hojo Yuko, Shinya Tomonori, Ohnishi Kouhei, Hikichi Yasufumi	4. 巻 37
2. 論文標題 Silencing of phosphoinositide dependent protein kinase orthologs reduces hypersensitive cell death in <i>Nicotiana benthamiana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 363 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.0511b	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 Akinori Kiba, Masahito Nakano, Miki Hosokawa, Ivan Galis, Hiroko Nakatani, Tomonori Shinya, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi	4. 巻 in Press
2. 論文標題 Phosphatidylinositol-phospholipase C2 regulates pattern-triggered immunity in <i>Nicotiana benthamiana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 in Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Akinori Kiba, Kotoko Fukui, Maki Mitani, Ivan Galis, Yuko Hojo, Tomonori Shinya, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi	4. 巻 in Press
2. 論文標題 Silencing of phosphoinositide dependent protein kinase orthologs reduces hypersensitive cell death in <i>Nicotiana benthamiana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 in Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Akinori Kiba, Masahito Nakanoa, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi	4. 巻 125
2. 論文標題 The SEC14 phospholipid transfer protein regulates pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in <i>Nicotiana benthamiana</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 212-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plaphy.2018.02.002.	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 Mori Y., Hosoi Y., Ishikawa S., Hayashi K., Asai Y., Ohnishi H., Shimatani M., Inoue K., Ikeda K., Nakayashiki H., Nishimura Y., Ohnishi K., Kiba A., Kai K., Hikichi Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Ralfuranones contribute to mushroom-type biofilm formation by <i>Ralstonia solanacearum</i> strain OE1-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 975-985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.12583.	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 Chen Li, Dahal Amol, Zhang Yong, Rokunuzzaman Md, Kiba Akinori, Hikichi Yasufumi, Ohnishi Kouhei	4. 巻 102
2. 論文標題 Involvement of avirulence genes <i>avrA</i> and <i>popP1</i> of Japanese <i>Ralstonia solanacearum</i> strains in the pathogenicity to tobacco	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiological and Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 154 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pmpp.2017.12.007	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 Mori Y., Ishikawa S., Ohnishi H., Shimatani M., Morikawa Y., Hayashi K., Ohnishi K., Kiba A., Kai K., Hikichi Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Involvement of ralfuranones in the quorum sensing signalling pathway and virulence of <i>Ralstonia solanacearum</i> strain OE1-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 454-463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.12537	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 Hayashi Kazusa, Kai Kenji, Mori Yuka, Ishikawa Shiho, Ujita Yumeto, Ohnishi Kouhei, Kiba Akinori, Hikichi Yasufumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Contribution of a lectin, LecM, to the quorum sensing signalling pathway of <i>Ralstonia solanacearum</i> strain OE1-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 334 ~ 345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.12757	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8件(うち招待講演 3件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 坂東卓弥・高里詩織・大西浩平・曳地康史・木場章範
2. 発表標題 Nicotiana benthamiana 植物由来のホスホリパーゼC3による過敏反応抑制における MAPKカスケードの関与
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木場章範・福井誼子・大西浩平・曳地康史
2. 発表標題 Nicotiana benthamiana植物由来ホスホリパーゼC4は過敏反応を負に制御する
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂東卓弥・高里詩織・大西浩平・曳地康史・木場章範
2. 発表標題 Nicotiana benthamiana植物由来のホスホリパーゼC3はジャスモン酸、サリチル酸、活性酸素シグナルを介して過敏反応を負に制御する
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akinori Klba
2. 発表標題 Role of phospholipase C on plant immunity in <i>Nicotiana benthamiana</i>
3. 学会等名 8th Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木場章範、今仲優布、大西浩平、曳地康史
2. 発表標題 <i>Nicotiana benthamiana</i> の免疫制御におけるSucrose Nonfermenting-Related Kinase 1の役割
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木場章範・中野真人・大西浩平・曳地康史
2. 発表標題 リン脂質代謝による植物免疫の制御
3. 学会等名 平成30年度植物感染生理談話会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高里詩織・大西浩平・曳地康史・木場章範
2. 発表標題 <i>Nicotiana benthamiana</i> 植物由来ホスホリパーゼC3は過敏反応を抑制する
3. 学会等名 平成30年度日本植物脂質科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高安 範・大西 浩平・曳地 康史・木場 章範
2. 発表標題 Nicotiana benthamiana 植物においてホスホリパーゼC は基礎的抵抗性の誘導に関与する
3. 学会等名 平成30年度日本植物脂質科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	大西 浩平 (Ohnishi Kouhei) (50211800)	高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授 (16401)	
研究分担者	曳地 康史 (Hikchi Yasufumi) (70291507)	高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授 (16401)	

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