

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究(A)

研究期間： 2007~2010

課題番号： 19208004

研究課題名(和文) 植物免疫を統御する転写因子の分子機構解明と耐病性化への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanism of transcription factor controlling plant immunity and its application in the production of pathogen-resistant plants.

研究代表者

吉岡 博文 (Yoshioka Hirofumi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号： 30240245

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 農学 ・ 植物病理学

キーワード： シグナル伝達、植物免疫、WRKY 型転写因子、耐病性植物、MAP キナーゼ

1. 研究計画の概要

PPS8・WRKY8は、リグニン合成に関与するNADP-malic enzyme (NADP-ME)の発現を制御することを見出した。その機能は、防御応答に関わる一次代謝の制御であると考えられる。これまでの結果で、WRKY8がリン酸化による翻訳後制御を受けていることは強く推察されるが、リン酸化がWRKY8の制御にどのような役割をはたしているかは不明である。そこで本研究では、リン酸化がWRKY8の制御において果たす役割を明らかにすることを目的とする。さらに、病原菌の感染で誘導されるプロモーターを用いて耐病性組換えジャガイモ植物を作出する。本研究では、(1)WRKY8のリン酸化アミノ酸残基を特定する。(2)リン酸化アミノ酸をアスパラギン酸に置換し、擬似的にリン酸化された状態のWRKY8を作製する。(3)病原菌応答プロモーター(PVS3)と活性型WRKY8を利用して、他の要因に応答する可能性を排除した耐病性ジャガイモ植物を作出する。(4)作出した組換え植物について、様々な病原菌に対する抵抗性を検定し、その遺伝子発現を解析する。

2. 研究の進捗状況

(1)WRKY8がSIPKおよびWIPKによりリン酸化されると、シス配列であるW-boxに対する結合活性が高まることがゲルシフトアッセイにより明らかとなった。(2)WRKY8の62、67、79、86、98番目のセリン残基がリン酸化されていることを、アラニンスクランニングにより明らかにした。79および86番目のリン酸化セリン残基を特異的に認識するそれぞれの抗体を作製し、

WRKY8が組織内でMAPキナーゼの活性化に依存してリン酸化されることを証明した。(3)リン酸化されるセリンをアスパラギン酸に置換した恒常的活性変異体WRKY8^{DDDDD}を葉に一過的に発現させ、NADP-MEの発現誘導を調べた。その結果、NADP-MEはWRKY8^{DDDDD}によって顕著に発現誘導された。この結果は、セリンをアスパラギン酸に置換することにより疑似リン酸化されたWRKY8が活性型となり、下流の遺伝子を制御することを示している。(4)WRKY8^{DDDDD}一過的発現により転写誘導される遺伝子を探索した。その結果、セスキテルペノイドファイトアレキシンの鍵酵素である3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR)がWRKY8^{DDDDD}で誘導されることが明らかとなった。ジャガイモ疫病菌感染およびSIPK・WIPKを誘導するMEK2^{DD}(活性型)の発現により、HMGR遺伝子が顕著に誘導されること、また、その誘導は、ウイルスベクターによるWRKY8のノックダウンにより抑制されることを確認した。これらの結果は、WRKY8がHMGRを直接の標的遺伝子としてファイトアレキシン合成に寄与する可能性を示している。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

WRKY8のMAPキナーゼによるリン酸化部位を解析し、セリンをアスパラギン酸に置換した恒常的活性変異体WRKY8^{DDDDD}を作製し、MAPキナーゼによるリン酸化が転写制御能を活性化することを示した。さらに、WRKY8の標的遺伝子であるHMGRを特定した。現在、薬剤誘導プロモーター、または病

原菌応答性である PVS3 プロモーターにジャガイモの WRKY8^{DDDDD} を連結してジャガイモに導入した植物を作製中である。作製した組換えジャガイモの各種病原菌に対する耐性や、実際に誘導される防御応答を調べる予定である。以上のように、到達目標通りの成果を上げることができたと考えている。

4. 今後の研究の推進方策

現在、薬剤誘導プロモーター、または病原菌応答性である PVS3 プロモーターにジャガイモの WRKY8^{DDDDD} を連結してジャガイモに導入した植物を作製中である。平成22年度での予定として、これらの組換え植物を用いることにより、ジャガイモで WRKY8^{DDDDD} が実際にファイトアレキシンやリグニン合成に関与し、ジャガイモに抵抗性を付与することができるか調べる予定である。

5. 代表的な研究成果

(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 Asai, S., Mase, K. and Yoshioka, H. A key enzyme for flavin synthesis is required for nitric oxide and reactive oxygen species production in disease resistance. *Plant J.* 査読有 DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04221.x
- ② Asai, S. and Yoshioka, H. Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 査読有 22, 619-629. (2009)
- ③ Asai, S., Ohta, K. and Yoshioka, H. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 査読有 20, 1390-1406. (2008)

[学会発表] (計33件)

- ① Ishihama, N., Yamada, R. and Yoshioka, H. MAPKs phosphorylate WRKY8 and induce defense-related genes in *Nicotiana benthamiana*. XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. 2009年7月 Quebec, Canada

[図書] (計3件)

- ① Yoshioka, H., Asai, S., Miyagawa, N., Ichikawa, T., Yoshioka, M. and Kobayashi, M. Molecular mechanisms of the radical burst in plant immunity. *In* Molecular Plant-Microbe Interactions. (Bouarab, K., Brisson, N. and Daayf, F. eds), CAB International, Oxfordshire, UK, (2009) pp. 59-74.