

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580044

研究課題名（和文）植物の効率的な生体防御反応（プライミング）機構を探る

研究課題名（英文）Study on the priming of plant defense reactions

研究代表者

長谷 修（HASE SHU）

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：10261497

研究成果の概要：

ジャスモン酸の情報伝達によって誘導されるトマトのプロテアーゼ阻害遺伝子（PIN2）発現のプライミングに関与する遺伝子を探ることを目的として、トマト cDNA マイクロアレイによりメチルジャスモン酸で早期に誘導される遺伝子を探索した。転写因子とキナーゼに着目した結果、転写因子（様）が8遺伝子含まれることが判明した。また、キナーゼ（様）が8遺伝子存在した。特に転写因子のなかにはジャスモン酸処理により高い誘導を示すエチレン応答性の遺伝子が得られた

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：誘導抵抗性、プライミング、ジャスモン酸

1. 研究開始当初の背景

植物は有用微生物との共存により病原微生物に対する防御反応を活性化することが知られている。有用微生物による抵抗性の誘導は、根圏息性細菌（*Pseudomonas fluorescens* WCS417系統）を介したシロイヌナズナの全身誘導抵抗性（ISR）が分子レベルで詳細に解析されている。ISRは変異体を用いた解析からジャスモン酸とエチレンの情報伝達系に依存することがすでに明らかにされている。一方、非病原性の卵菌類からも植物に抵抗性を誘導する菌が見つかった。土壌生息菌の *Pythium oligandrum* (PO)は北海道の病害抑止土壌から発見された非病原性の卵菌類で、POが根に定着した

作物では、テンサイ苗立枯病、ピーマン半身萎凋病、オオムギ brown rot 病など多くの土壌病害が抑制される。POは菌寄生性や根圏域で栄養と生息域を占める能力が高い特性を有することから、病害の抑制は主として病原菌に対する直接的な拮抗作用によるものと考えられてきた。しかしながら、トマト、テンサイ、コムギを用いた実験からPOには病害抵抗性を誘導するエリシター分子を生産していることが明らかとなり、植物はそのエリシターを認識して防御反応を活性化させることも病害抑制の一因であることが明らかとなった。

POのエリシターを処理した植物はジャスモン酸とエチレンの情報伝達に依存した防御遺伝子の発現誘導が特徴である。一方、全

身獲得抵抗性(SAR)に関わるサリチル酸(SA)の情報伝達に依存した遺伝子は明確な発現変動が認められない。各情報伝達系の関与についての詳細な解析はトマトの品種マイクロトムを用いて行われている。POをマイクロトムの根に処理するとジャスモン酸誘導性の防御遺伝子として知られるProteinase inhibitor II (PIN 2)の発現が顕著に上昇する。PIN2の発現がジャスモン酸の情報伝達に依存するかを確かめるためにジャスモン酸非感受性変異体のjail-1を用いて解析した結果、発現は誘導されなかった。また、POを処理したjail-1変異体は青枯病菌に対する抵抗性も誘導されなかった。以上のような研究から、POによる誘導抵抗性の発現はジャスモン酸の情報伝達系の活性化を必須とすることが明らかとなっている。また、POのエリシターを根に処理したマイクロトムではエチレン量が処理後数時間で一過的に上昇し、エチレン受容体(ETR4)、エチレン反応性転写因子(ERF2)、塩基性の感染特異的遺伝子(PR遺伝子)の発現量も増加することがノーザン解析により明らかとなっている。一方、POを処理したトマトにおいてSA誘導性のPR遺伝子の発現は認められず、SAの蓄積量の有意な増加も認められない。以上のように、POを介した植物の誘導抵抗性発現においてもジャスモン酸とエチレンの情報伝達系の活性化が深く関与することが分子レベルで明らかにされている。

ジャスモン酸とエチレンの情報伝達系は防御反応の活性化に協調的に働くのが特徴である。代表的な例としては、シロイヌナズナの防御遺伝子であるPDF1.2の発現はジャスモン酸とエチレンの両情報伝達系の活性化が必須であることが明らかにされている。また、リゾバクテリアのPseudomonas fluorescensによるシロイヌナズナのISR発現も、ジャスモン酸とエチレンの協調したシグナル伝達系に依存している。

さらにリゾバクテリアを介したISRの場合、病原体の感染によってジャスモン酸とエチレン情報伝達系が迅速に活性化されるといわれる“プライミング”が特徴である。防御反応のプライミングとは、病原体の感染時に防御反応を効率的に活性化させる反応のことであり、植物が病原体の感染に備えてあらかじめ防御反応を迅速に発揮できるようにスタンバイしているとたとえられている。Pseudomonas fluorescensによるシロイヌナズナのISR発現では、細菌が根に定着しただけでは防御遺伝子の発現など主な変化は起きないが、病原体が感染するとジャスモン酸やエチレン誘導性の防御遺伝子(リボキシゲナーゼ遺伝子、ディフェンシン遺伝子及び貯蔵タンパク質遺伝子)の発現にプライミ

ングが起きることがわかっている。プライミングを説明する因子として、エチレン生合成系で働くエチレン前駆体の酸化酵素(ACC酸化酵素)活性の恒常的な増加が考えられている。すなわち、ACC酸化酵素遺伝子の転写量自体には量的変化がないことから、ACC酸化酵素の翻訳後の修飾によって活性が維持されていると推察しており、プライミングは酵素タンパク質のリン酸による活性化と関連があると予想している。また、ヨーロッパのグループによる報告では、プライミング誘導剤を処理すると転写因子の量的増加とともに防御遺伝子発現活性が上昇し、その後防御遺伝子発現活性は落ちるが転写因子量は維持されることで、防御遺伝子の再活性化を潜在的に高めていることが一因であると推察している。

プライミング反応の分子マーカーは、特に有用微生物を介した誘導抵抗性の場合、ジャスモン酸やエチレンが関与する防御関連遺伝子が考えられる。さらにプライミングの分子機構を解明するには、プライミングの調節に関わる主因となる分子の同定が望まれる。プライミング機構解明の鍵と成り得る遺伝子は、上述のようにプライミング反応の特徴から、(1)防御関連遺伝子発現のシグナル伝達系で機能する転写因子の持続的な発現と、(2)シグナル伝達系で働くタンパク質の活性化の調節に関与するキナーゼ類、あるいはその基質と関わりがあると考えられる。そこで、本研究課題では、トマトのジャスモン酸情報伝達系に関与する新規の遺伝子群を同定し、特に転写因子とキナーゼ遺伝子に焦点をあてて解析しプライミング機構を探ることとした。

2. 研究の目的

(1) メチルジャスモン酸(MeJA)処理によるプロテアーゼインヒビターPIN2 遺伝子の発現誘導解析

ジャスモン酸誘導性のトマトプロテアーゼインヒビター遺伝子(PIN II)は防御反応の分子マーカーとして知られている。PIN II発現のプライミングに関わる遺伝子はPIN II発現の上流で機能する遺伝子の中に存在する。そこで、はじめにPIN IIの発現量とメチルジャスモン酸(MeJA)処理後時間の関係を明らかにすることを目的とした。そしてこの情報によりPIN II遺伝子発現より速く発現する遺伝子群を選抜するのに有効な実験条件を確立することを目的とした。

(2) MeJA処理トマトの網羅的遺伝子発現解析

トマトではすでに約1万の遺伝子プローブの発現を解析できるマイクロアレイが作製されている。新規の遺伝子を探索するためにマイクロアレイを用いて MeJA 処理により発現変動する mRNA の比較解析を行い、PIN II 遺伝子遺伝子発現より速い発現を示す遺伝子群を網羅的に解析することを目的とした。

(3) プライミングの調節に関与する遺伝子の候補

網羅的解析からプライミングの調節に関わる因子として転写因子とキナーゼ遺伝子群に絞り込み、これらの遺伝子とジャスモン酸情報伝達系との関連性を PIN II の発現に対する誘導活性の解析により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MeJA処理によるプロテアーゼインヒビターPIN2 遺伝子の発現誘導解析

トマト品種マイクロトムを供試材料として 3 から 4 葉期のマイクロトムの根を 100uM の MeJA に浸漬し、処理後の PIN II の発現量とメチルジャスモン酸 (MeJA) 処理後時間の関係を解析した。すなわち、浸漬後 0 ~ 24 時間の間に経時的に根から全 RNA を抽出し、DIG 標識した PIN II 遺伝子の cDNA をプローブとしてノーザン解析を行った。

(2) MeJA処理トマトの網羅的遺伝子発現解析

(1) の解析結果より導いた浸漬後 2 時間目のトマト試料を供試材料として、トマトのマイクロアレイを用いて網羅的発現解析を行った。すなわち、100uM の 0.1% ETOH で溶解した MeJA 処理および 0.1% ETOH を対象として根を 2 時間浸漬処理した。処理後の試料から全 RNA を抽出し、マイクロアレイの解析に用いた。

4. 研究成果

(1) MeJA処理によるプロテアーゼインヒビターPIN2 遺伝子の発現誘導解析

マイクロトムトマトの根部に MeJA (100uM) を処理し PIN2 遺伝子の発現誘導パターンをノーザン分析により経時的に解析した。その結果、PINII 遺伝子は 4 ~ 8 時間で最大になった。この結果より、4 時間よりも早い 2 時間目で網羅的な遺伝子発現解析を行うことがよいと判断した。

(2) MeJA処理トマトの網羅的遺伝子発現解析

メチルジャスモン酸と対照処理 2 時間目のトマト根部での遺伝子発現をトマトの cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に比較解析した。比較解析の結果、約 1 万遺伝子のうち約 19% が有意に増加し、約 10% が減少した。このうちメチルジャスモン酸処理で 2 倍以上発現が多かった遺伝子は 186、逆に少なかった遺伝子が 131 存在した。変動が認められたこれらの遺伝子についてトマトのゲノム情報により機能を推定した結果、3 割程度の機能しか推定することができなかった。そこで、全ゲノム情報が明らかになっているシロイヌナズナ、イネゲノムのデータベースを活用してより詳細に機能推定を行なった。その結果、7 割の遺伝子について機能を推定することができた。機能が推定できた遺伝子には、糖、アミノ酸、脂質などの代謝、転写因子、タンパク質活性化、防御・ストレスなどに関連すると推定される遺伝子が認められた (図 1)。

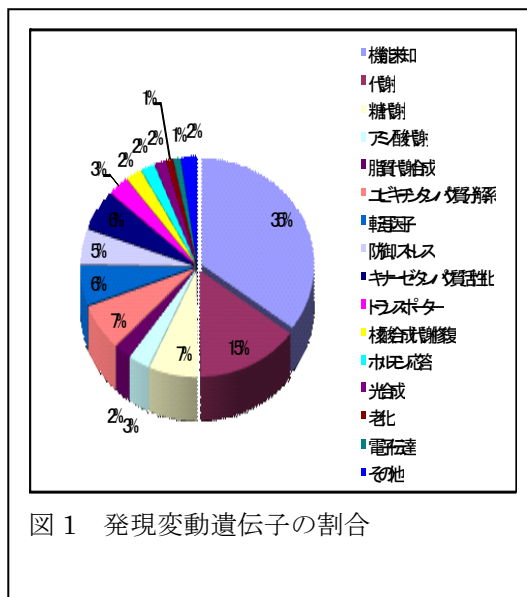


図 1 発現変動遺伝子の割合

(3) プライミングの調節に関与する遺伝子の候補

プライミング機構を解明する鍵となる遺伝子は (1) 防御遺伝子の発現にかかわる転写因子の持続的な活性化と、(2) シグナル伝達系で働くタンパク質の活性化の調節に関与するキナーゼが関わりと推察されている。

① 転写因子 (様) 遺伝子の変動
はじめに転写因子の遺伝子について解析した。その結果、転写因子は 6 遺伝子存在した。さらに、転写因子様の遺伝子をふくめると 18 遺伝子存在することが推定された。これらの

遺伝子はちょうど50%の割合で増加および減少する遺伝子であった。特に Ethylene-responsive element binding factor (EREBF)、WRKY 転写因子 1 IAA protein は、メチルジャスモン酸処理により4

表1 発現変動した転写因子(様)遺伝子

プローブID	Log2 比率	シグナル強度(対照)	シグナル強度(JA処理)	推定機能
Tomato_08906	2.9	593.8	4086.5	ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 13
Tomato_03231	2.3	34	85	WRKY transcription factor Ite-1
Tomato_03046	2.2	10.8	84.1	IAA11 protein
Tomato_09906	1.5	42.6	151.8	RD26 (RESPONSIVE TO DESSICATION 26); transcription factor
Tomato_03159	1.4	204.3	557.3	ethylene responsive element binding protein
Tomato_03406	1.3	288.3	728.6	transcription factor
Tomato_03055	1.3	66.6	195.4	AP2 protein
Tomato_09589	1.1	223.2	418	AP2 domain-containing transcription factor, putative
Tomato_04303	1.1	96.2	194.6	ATHB13; DNA binding / transcription factor
Tomato_08749	-1	889.2	373.3	transcription activator / transcription factor [Arabidopsis thaliana]
Tomato_04905	-1	159.3	76.1	IAA29 (indoleacetic acid-induced protein 29); transcription factor
Tomato_09877	-1.1	493.2	208.1	AP2 domain-containing transcription factor
Tomato_03201	-1.1	311.5	117.8	Hypothetical protein LOC778199
Tomato_08752	-1.2	801.7	311.6	DNA binding / transcription factor
Tomato_03232	-1.2	289.5	110.2	WRKY transcription factor Ild-2
Tomato_02875	-1.2	348.1	142.7	ethylene-responsive transcriptional coactivator
Tomato_08131	-1.2	74.5	33.5	Arabidopsis NAC domain containing protein 71; transcription factor
Tomato_08751	-1.3	68.3	23.8	DNA binding / transcription factor

倍以上(Log2 比率が2以上)高発現した。ジャスモン酸の情報伝達系とエチレンの情報伝達系は協動的に働くことが知られている。エチレン情報伝達系で機能する EREBF がジャスモン酸の情報伝達系の調節にも関与する可能性は高いことから、ジャスモン酸誘導性の防御遺伝子発現のプライミングにも関与する可能性が示唆された。

②キナーゼ(様)遺伝子発現の変動

メチルジャスモン酸処理により変動が認められた遺伝子のうちキナーゼは4遺伝子存在した。さらにキナーゼ様遺伝子をふくめると8遺伝子に変動が認められた(表2)。しかし、変動の比率はどの遺伝子においても2倍あるいは1/2程度(log2 比率は1~1.2、-1~-1.2)

表2 発現変動したキナーゼ遺伝子

プローブID	Log2 比率	シグナル強度(対照)	シグナル強度(JA処理)	推定機能
Tomato_01996	1.2	31	82.9	protein kinase
Tomato_02817	1.1	806.5	1913.8	auxin-regulated dual specificity cytosolic kinase
Tomato_00604	1.1	132.5	291.2	TK1-like deoxyribonucleoside kinase
Tomato_09373	1	187	378.9	pyrophosphate-dependent 6-phosphofructose-1-kinase, putative
Tomato_09041	-1.1	97.1	47.5	protein kinase, putative
Tomato_05934	-1.1	170.5	71.9	pectinesterase, putative
Tomato_04564	-1.1	2346.4	1289.7	ATMPK13 (ARABIDOPSIS THALIANA MAP KINASE 13); MAP kinase / kinase
Tomato_01491	-1.2	575.6	258.6	protein kinase family protein

であり、顕著な変動とはいえなかった(表2)。転写レベルでの解析に加え、キナーゼの活性の違いを解析することが重要なかもしれない。キナーゼは、タンパク質の活性化に関与することから、キナーゼ以外にもタンパク質の活性化に関与すると推定される遺伝子についても調べた結果、10遺伝子存在した。

③ユビキチン-プロテアソーム系関連遺伝子発現の変動

ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質の分解は、標的タンパク質を分解することによって情報伝達系の調節に関わる報告例が近年増えている。POによるジャスモン酸情報伝達系の活性化においても LeATL6 が E3 ユビキチンリガーゼとして機能し情報伝達の調節に関わる可能性が見られた。そこで、網羅的発現解析の結果からユビキチン-プロテアソーム系関連遺伝子発現の変動を調べた結果、13遺伝子が発現変動した。この13遺伝子のうち、10遺伝子についてはメチルジャスモン酸処理により負の調節を受けた。

表3 発現変動したユビキチン-プロテアソーム分解系関連遺伝子発現の変動

プローブID	Log2 比率	シグナル強度(対照)	シグナル強度(JA処理)	推定機能
Tomato_02619	1.4	388.5	927.6	F-box family protein
Tomato_02620	1.3	273.8	662.2	F-box family protein
Tomato_02618	1	284.7	776.3	F-box family protein
Tomato_08747	-1.1	3043.1	1346.3	zinc finger (C2H2 type) family protein
Tomato_09931	-1.2	1961.1	921.7	GLP4 (GERMIN-LIKE PROTEIN 4); manganese ion binding
Tomato_05968	-1.2	94.9	41	F-box family protein (FBX13)
Tomato_08748	-1.3	1669.6	659.5	zinc finger (C2H2 type) family protein
Tomato_08520	-1.6	158.6	54.7	zinc-finger protein Lsd1
Tomato_08906	-1.8	355.5	81.1	GERMIN-LIKE PROTEIN 1
Tomato_06615	-2.8	2478.1	354.7	GLP2A (GERMIN-LIKE PROTEIN 2A); manganese ion binding / metal ion binding / nutrient reservoir
Tomato_06616	-2.9	4090	527.4	GLP2A (GERMIN-LIKE PROTEIN 2A); manganese ion binding / metal ion binding / nutrient reservoir
Tomato_09120	-3.6	8263.2	633.6	germin-like protein, putative
Tomato_09121	-4.2	1650.2	96.2	germin-like protein, putative

また、germin-like gene が複数あり、それらはいずれもジャスモン酸処理によって4倍以上減少した。減少率が極めて高いこれらの遺伝子についてはジャスモン酸誘導性の防御遺伝子発現のプライミングに対して負に調節する可能性について今後詳細に検討することが望まれた。

(4) まとめ

本研究課題では、ジャスモン酸処理により早期に遺伝子発現変動が認められるトマトの転写因子、キナーゼに着目し、特に高い変動を示した転写因子についてプライミングの調節に関与しうる候補を得ることができた。また、情報伝達系の調節にも関わることが最近言われているユビキチン-プロテアソーム系の関連遺伝子の中にジャスモン酸処理により発現量の減少が著しい遺伝子があることがわかった。この遺伝子についてもプライミングの調節機構に関わる因子の候補としてさらに詳細な検討が必要であると考えられた。

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0件)

[学会発表] (計1件)

① 長谷修・竹中重仁・高橋英樹
マイクロトムのゲノム情報を活用した
*Pythium oligandrum*による誘導抵抗性の分子機構解明、日本植物病理学会平成20年度
日本植物感染生理談話会、平成20年8月8日、茨城県 大子町

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 修 (HASE SHU)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号：10261497

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし

