

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02961

研究課題名(和文) アミノ酸類による病害抵抗性誘導機構の解明と未知防御物質の探索

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of plant disease resistance induced by amino acids and exploration of new defense-related compounds

研究代表者

瀬尾 茂美 (Shigemi, SE0)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・グループ長

研究者番号：80414910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,600,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸であるL-Hisによって誘導される植物の青枯病抵抗性の分子機構の解明に資するべく、L-Hisの代謝に関わる遺伝子及びL-His処理によって新たに生産される物質の探索を実施した。L-His処理によって誘導されるシロイヌナズナ及びトマト遺伝子を特定し、当該遺伝子の発現を抑制したトマト系統ではヒスタミンの生産が抑制されることが示された。L-His処理によって新たに生産される青枯病発病抑制活性を示す物質として新規構造を有するテルペノイドを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミノ酸は生物を構成する必要不可欠な因子であり、様々な生理応答に関わることが知られているが、植物の病害抵抗性における役割については十分に理解されていない。本課題では、アミノ酸であるL-Hisが植物体内で代謝されるときに関与する遺伝子候補を見つけるとともに、L-Hisの下流で機能すると考えられる物質を見つけた。これらの知見は植物におけるアミノ酸の機能や作用機構に関する深い理解に繋がるのみならず、新しい病害防除技術の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of L-His-induced bacterial wilt disease resistance, we tried to identify plant genes involving metabolism of L-His and L-His-induced substances. We identified a L-His-induced gene from Arabidopsis and tomato and found that tomato plants in which the corresponding gene was silenced exhibited reduced histamine production. We also identified a new terpenoid that has an inhibitory effect on bacterial wilt disease.

研究分野：植物病理、天然物化学

キーワード：アミノ酸 青枯病抵抗性 ヒスチジン アミノ酸代謝 エチレン

1. 研究開始当初の背景

病原体や害虫の攻撃に対して植物はサリチル酸、ジャスモン酸、エチレンなどの防御物質を生産することにより対処している。蓄積したこれら物質は pathogenesis-related (PR) 遺伝子などの病害虫抵抗性に関わる遺伝子群の発現を誘導することから、防御シグナルとして働いていると考えられている(文献)。これら防御物質のうちでも病原体や害虫を直接殺すことなく病害虫抵抗性を誘導する物質は、耐性菌や薬剤抵抗性害虫の出ない環境低負荷型病害虫防除剤の素材として注目されている(文献)。しかし、抵抗性誘導物質の探索法が確立されていないこと等により、これまで見つかった物質の数そのものが少ないこと等から、実用化に至った例は少ない。実際、国内で農薬として上市されている抵抗性誘導剤は主にサリチル酸経路に作用する3種(プロベナゾール等の有効成分としてカウントした場合)のみであり、対象病害もイネいもち病等数種に限定される。サリチル酸が有効でない病害も多数あることから、新たな作用点を有する抵抗性誘導物質を見出すことは重要であるが、ジャスモン酸やエチレン経路を活性化する物質の情報は限られていた。

このような中、本報告者らは、アミノ酸の1種であるL-ヒスチジン(L-His)が青枯病に対してトマトやシロイヌナズナに抵抗性を誘導すること、その抵抗性誘導にはエチレン生合成とEIN3(エチレンシグナル伝達因子)を介したシグナル伝達経路の活性化が必要であることを見出した(文献)。一方、本報告者らは先行研究によりL-His処理した植物ではヒスタミンやピリドキサルリン酸(PLP)が蓄積することを見出した。このことは、L-His処理した植物ではL-Hisがヒスタミンに変換することを示唆しているが、その変換に関わる因子の実体は不明であった。また、L-Hisによる青枯病抵抗性はEIN3の機能喪失変異株(*ein3*)では完全に喪失せず、従ってエチレンを介さないことから、未知の因子が媒介する経路の存在も示唆されたが、この未知因子の実体についても不明であった。

2. 研究の目的

本課題では、L-Hisによるエチレン経路活性化機構を明らかにするために、L-Hisの代謝に関わる遺伝子を同定し、その機能を解析する。また、エチレン非依存的な青枯病抵抗性の誘導に関わる未知因子を同定することを目的とする。これらの解析を通じてL-Hisによる青枯病抵抗性の誘導の分子機構の理解に資する。

3. 研究の方法

植物材料及び青枯病菌

トマト(*Solanum lycopersicum*)はPonderosa、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)は野生型としてCol-0を用いた。トマトとシロイヌナズナの栽培条件は文献 及び に記載の方法に従った。本課題では青枯病菌は既報に記載した strain を用いた(文献 、)。

青枯病抵抗性検定

青枯病抵抗性は文献 及び に従って、発病程度を計測することにより評価した。

トランスクリプトーム解析

L-His処理したシロイヌナズナ葉を用いてL-His処理により発現が変動するシロイヌナズナ遺伝子の網羅的解析を実施した。

リアルタイムPCR

植物組織からのRNA抽出及びその後のリアルタイムPCRは既法(文献 、)に従った。

ヒスタミン定量

ヒスタミンの定量は既法 (文献) に従った。

青枯病抵抗性誘導物質の精製

L-His 処理したトマト根をアセトン抽出し、抽出物を酢酸エチル可溶性の酸性、中性、塩基性画分に分離した。中性画分はシリカゲルのオープンカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン-酢酸エチル-メタノール系でステップワイズ溶出した。溶出画分は青枯病抵抗性検定に供試、活性を示した画分は solid-phase extraction カラムに供し、アセトニトリル-水系でステップワイズ溶出した。溶出画分は青枯病抵抗性検定に供試、活性を示した画分は逆相系 HPLC (アセトニトリル-水系) で精製した。

構造解析

活性を示した精製物は、高分解能質量分析、800 MHz ^1H -NMR 及び ^{13}C -NMR に供した。

4. 研究成果

(1) エチレン経路活性化機構の解明

L-His の代謝に関わる植物遺伝子に関する知見は少ない。そこで、L-His によって発現が誘導されるシロイヌナズナ遺伝子の網羅的解析を行い、発現上昇がみられた遺伝子群のなかから、アミノ酸代謝に関係すると推測される遺伝子を選抜した。選抜した5つの遺伝子 (便宜上、遺伝子 A ~ E とする) についてリアルタイム PCR を行ったところ、遺伝子 A と遺伝子 E は L-His により誘導が起こった (図 1)。これら5つの遺伝子について、対応するトマト相同性遺伝子の L-His による発現誘導を調べたところ、シロイヌナズナ同様に、特に遺伝子 E は L-His による強い発現誘導が認められた (図 2)。

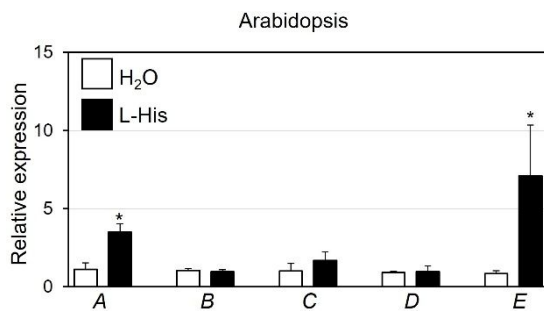


図 1. シロイヌナズナ遺伝子の L-His 応答性
10 mM L-His を 48 時間処理したシロイヌナズナ葉における遺伝子 A, B, C, D, E のリアルタイム PCR 解析。
平均 ± SE (n=3), **P<0.05

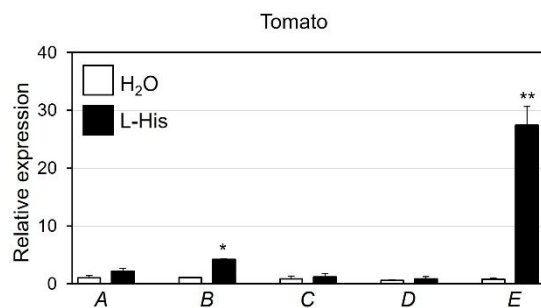


図 2. トマト遺伝子の L-His 応答性
10 mM L-His を 48 時間処理したトマト葉における遺伝子 A, B, C, D, E のリアルタイム PCR 解析。
平均 ± SE (n=3), **P<0.05

強い誘導がみられた遺伝子 *E* について、トマトを用いてサイレンシングによる発現抑制体を作出を試みた。内在性の遺伝子 *E* の発現抑制が確認できた系統では、L-His によるヒスタミン蓄積が非組換え体に比較して減衰されていた (図 3)。このことは、トマトにおいて遺伝子 *E* は L-His からヒスタミンへの変換に關与する可能性があることを示す。なお、シロイヌナズナについては、遺伝子 *E* について入手可能な機能喪失変異株が存在しなかったことから、ゲノム編集による遺伝子破壊を行っているところである。今後はこれらの抑制体等を用いて青枯病抵抗性がどのように変化しているのか、エチレン経路の活性化がどのようにになっているのかを解析する。

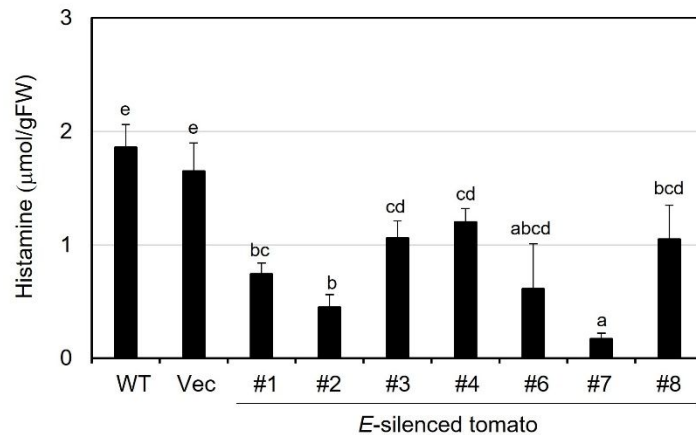


図 3. トマト遺伝子 *E* サイレncing 系統のヒスタミン量
10 mM L-His を 48 時間処理した各系統 (T_1) の葉におけるヒスタミン量。Vec はベクターのみを導入した系統。平均 ± SE (n=3), 異なるアルファベットは有意差があることを示す (p<0.05)。

(2) 青枯病抵抗性に関わる未知因子の探索

青枯病抵抗性に関わる未知因子を探索するために、L-His 処理したトマト (Ponderosa) 根をアセトン抽出し、抽出物を酢酸エチル可溶性の酸性、中性、塩基性画分に分画した。各画分を青枯病抵抗性検定に供したところ、中性画分に強い青枯病発病抑制活性を見出した (図 4)。当該画分にはヒスタミンは含まれていないことを確認した。同様に水処理もしくは D-His 処理したトマト根から調製した酢酸エチル可溶性中性画分にはそのような抑制活性は認められなかった。抑制活性を示した中性画分を種々のクロマトグラフィーに供し、最終的に HPLC のクロマトグラフ上で単一ピークになるまで精製した。精製物は高分解能質量分析と NMR に供し、解析の結果、新規構造を有するテルペノイドの 1 種であることが推定された。当該物質は 10 μM で青枯病発病抑制活性を示した (図 5)。今後は、得られた推定構造の正確性を検証するため当該物質の合成を行い、精製物と合成物の構造が一致することを確認する必要がある。

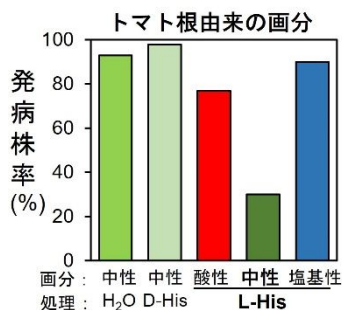


図 4. L-His 処理トマト根から調製した酢酸エチル可溶性画分の青枯病発病抑制効果
各処理根から調製した各画分液に第 3 本葉期トマト (15 個体) の根を 48 時間浸漬し、青枯病菌接種 7 日目の発病株率を求めた。

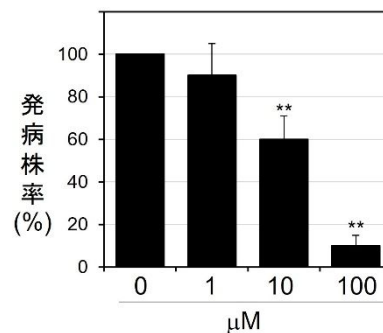


図 5. 精製した活性物質の青枯病発病抑制効果
所定濃度の水溶液第 3 本葉期トマトの根を 48 時間浸漬し、青枯病菌接種 7 日目の発病株率を求めた。
平均 ± SE (n=15), **P<0.01

<引用文献>

Pieterse, CMJ., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, SC. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* (2009) 5: 308–316

Walters, DR., Ratsep, J., and Havis, ND. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany* (2013) 64: 1263–1280

Seo, S., Nakaho, K., Hong, Si, Won, Takahashi, H., and Mitsuhara, I. L-Histidine induces resistance in plants to the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* partially through the activation of ethylene signaling. *Plant and Cell Physiology* (2016) 57: 1932–1942

Seo, S., Gomi, K., Kaku, H., Abe, H., Seto, H., Nakaho, K., Nakatsu, S., Neya, M., Kobayashi, M., Ichinose, Y., Mitsuhara, I., and Ohashi, Y. Identification of natural diterpenes that inhibit bacterial wilt disease in tobacco, tomato and Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* (2012) 53: 1432–1444.

Tran, QH., Nguyen TT., and Pham, KP. Development of the high sensitivity and selectivity method for the determination of histamine in fish and fish sauce from Vietnam by UPLC-MS/MS. *International Journal of Analytical Chemistry* (2020) Article ID 2187646

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yariyama, S., Ando, S., Seo, S., Nakaho, K., Miyashita, S., Kanayama, Y., Takahashi, H.	4. 巻 68
2. 論文標題 Exogenous application of L histidine suppresses bacterial diseases and enhances ethylene production in rice seedlings	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1072 ~ 1078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ppa.13037	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 Yokoyama, M., Yamashita, T., Kaida, R., Seo, S., Tanaka, K., Abe, S., Nakano, M., Fujii, Y., Kuchitsu, K.	4. 巻 85
2. 論文標題 Ultrafine bubble water mitigates plant growth in damaged soil	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2466 ~ 2475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab169	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 瀬尾茂美・中保一浩	4. 巻 56
2. 論文標題 アミノ酸による病害虫抵抗性誘導	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 102 ~ 105
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 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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀬尾茂美
2. 発表標題 天然からの抵抗性誘導物質の探索とその作用機作
3. 学会等名 東京農業大学総合研究所研究会 生物防除部会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬尾茂美
2. 発表標題 アミノ酸による病害虫抵抗性の誘導機構
3. 学会等名 生物刺激制御研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内香純・姜昌杰・小木曾真佐代・瀬尾茂美
2. 発表標題 植物保護細菌によるダイズ茎疫病の防除効果に対するグルタミン酸の影響
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 瀬尾茂美、中保一浩	4. 発行年 2020年
2. 出版社 農文協	5. 総ページ数 5
3. 書名 農業技術大系追録31号「アミノ酸によるトマト青枯病の抑制効果」	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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