

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06057

研究課題名(和文) トマトの病害抵抗性におけるレクチンの役割解明

研究課題名(英文) Functional roles of lectins in disease resistance in tomato.

研究代表者

小栗 秀 (Oguri, Suguru)

東京農業大学・生物産業学部・教授

研究者番号：70277250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、トマトに発現するレクチンの役割解明を通して耐病性品種の選抜や分子育種への目標となる知見の集積を目的として実施された。トマトにおいて、キチン結合性を示す二種のイソレクチンTL-FとTL-Lが同定された。本研究では第一に、TL-F遺伝子とTL-L遺伝子のトマト品種における分布を複数の固定品種において調べ、両遺伝子対立遺伝子の関係にあることをホモ系統間の交配実験から示した。第二に、トマト小葉において傷害誘導性を示すTL-Lの抗生物活性を評価した。TL-L遺伝子の発現を抑制したトマトRNAi系統は、野生型に比べてBotrytis cinerea感染において病斑面積の有意な増加が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トマト果実レクチン(TL-F)は、糖鎖構造解析に広く利用されてきたが、その生物学的役割は不明であった。本研究において我々は、トマト小葉において発現する第二のレクチン遺伝子TL-Lがトマトの病害抵抗性に寄与していることをTL-L遺伝子の発現抑制体を用いた解析から示した。TL-LとTL-Fは対立遺伝子の関係にあり、トマト固定品種はどちらか一方の遺伝子のみを保有するという本研究の結果は、TL-L遺伝子の保持を糸状菌抵抗性の育種選抜に際して利用可能であることを示している。今後は、TL-Lの作用機序の解明を通して感染過程における宿主と病原菌との相互作用について新たな知見が得られることを期待する。

研究成果の概要(英文)：Tomato is known to produce chitin-binding lectin in ripe fruits, which has been used for analyzing sugar chain structures. However, the physiological roles of the lectin remained unknown. We have identified the second lectin gene expressed in the leaves, and designated it as TL-L, distinguishing it from the authentic lectin (TL-F) expressed in fruits. The expression of the TL-L gene was induced in leaflets by wound treatment of tomato plants. These observations suggested that TL-L is involved in plant defense. We analyzed the distribution of both lectin genes among inbred tomato cultivars and found that tomatoes possess either of the two lectin genes. Both genes behaved as alleles in crossing experiments with homozygote of each lectin gene. Reduction of TL-L expression by RNA interference resulted in reduced resistance to *B. cinerea* infection. These observations are expected to contribute to a better understanding of disease resistance in tomato.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：レクチン キチン Botrytis cinerea トマト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

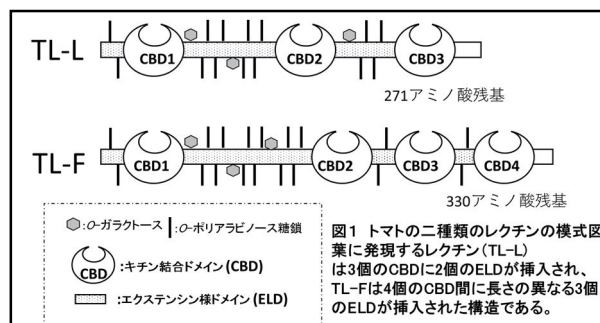
レクチンは糖と特異的に結合して赤血球凝集活性を示すタンパク質の総称であり、中でも植物由来の多くのレクチンが研究対象とされ、植物レクチンは現在までに糖結合ドメインの構造に基づき 12 種のファミリーに分類されている¹⁾。糖との結合を介して植物の生体防御や環境ストレス応答、糖代謝の調節などの様々な役割が示されている²⁾。

我々は、トマト果実に発現するレクチン遺伝子を単離し、その構造を明らかにした³⁾。トマトレクチンは、植物界に分布する約 40 アミノ酸残基からなるキチン結合ドメイン (CBD) をプロトマーあたり 4 個含み、それらの CBD 間にヒドロキシプロリンに富む細胞壁糖タンパク質エクステンシンに類似のモチーフを多数繰り返すエクステンシン様ドメインが挿入された 2 種類のドメインの組み合わせで構成される (図 1、TL-F 参照)。

トマトレクチンの結合糖鎖であるキチンは、糸状菌や昆虫の構造多糖成分である。また、CBD は、植物の生体防御タンパク質であるクラス I キチナーゼの糖結合ドメインでもある。これらのことから、レクチンはトマトにおける防御タンパク質として予想されるが、トマトレクチンの生体内の役割は未解明のままである。本研究テーマにおける学術的「問い」は、ナス科植物に分布するこれらのキチン結合タンパク質が、どのような役割を担っているのか明らかにすることであった。

2. 研究の目的

我々はトマト商業品種「サンチェリー」を材料として研究を行う過程において、その小葉に果実レクチンと異なる新規レクチンをコードする遺伝子が発現していることを発見し、既知の果実由来レクチン (TL-F) と区別してこのレクチンを TL-L と命名した。TL-L は TL-F とアミノ酸レベルで 88% の一致を示したが、TL-L は 3 個の CBD で構成され、TL-F よりも残基数が少ない (図 1)。TL-L はトマト傷害葉において高発現し、メチルジャスモン酸応答性を示した。一方、TL-F は緑熟期以降の果実と根に発現し、小葉においてメチルジャスモン酸応答性を示さなかった。これらの結果は、トマトにおいてレクチンは病害抵抗性タンパク質として機能していることを強く予想させた。本研究では、トマトレクチンの役割解明を通して、耐病性品種の選抜や分子育種への目標となる知識を集積することを目的とした。そのために、第一に、二種類のトマトレクチンについて、トマト栽培品種と野生品種における分布を明らかにし、第二にレクチン遺伝子を過剰発現する異種植物や、遺伝子発現抑制体を作成し、これらを用いて TL-F と TL-L の発現と病原菌感染抵抗性および昆虫への食害抵抗性を評価することにした。



3. 研究の方法

(1) トマト品種におけるレクチン活性と二種のレクチン遺伝子の分布

トマト (*Solanum lycopersicum*) 固定栽培種 7 品種とナス属のトマト近縁種 5 品種の種子はナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) から提供された。トマトは温室において栽培され、小葉および熟した果実の抽出液を作製した。レクチン活性は、ウサギ血球の凝集を指標に検出した。レクチンタンパク質は、抗 TL-F ウサギポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。レクチンの遺伝子型はゲノム PCR により判定した。

(2) 二種のトマトレクチン遺伝子の遺伝様式の解析

マナーメーカーとマイクロトムの交配により作出した F₁ 世代の自殖個体 (F₂ 世代) 133 個体のレクチン遺伝子型を PCR により判別した。

(3) TL-L 遺伝子を過剰発現するシロイヌナズナの作出とバイオアッセイ

コドンを変換した TL-L 遺伝子を CaMV35S プロモーター下に配置した植物発現ベクターを構築し、アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ Col-0 を形質転換した。TL-L 過剰発現シロイヌナズナ T₃ 世代と野生型 (Col-0) を用土で栽培し、1 個体あたりエゾスジグロシロチョウ (*Pieris dulcinea*) 1 齢幼虫 1 匹を供試し 1 試験区とし、23 区で 6 日間飼育した。10 試験区の幼虫体重を計測した。

(4) TL-L 発現抑制トマトの灰色カビ病感染

TL-F と TL-L の共通領域をトリガー DNA として含むヘアピン RNA を CaMV35S プロモーター下で過剰発現する RNAi 誘導ベクターを構築し、アグロバクテリウムを介してトマト品種マナーメーカーを形質転換した。トリガー DNA の挿入が認められた 4 系統の自殖 T₁ 個体を栽培して検定に

用いた。PDA 寒天平板培地上で 2 週間培養した *Botrytis cinerea* MAFF306658 株の培地片を切り取って小葉の裏面に置き 25℃ で 4 日間培養した。葉に形成された病斑の面積を計測した。

4. 研究成果

(1) トマト固定品種におけるレクチン活性と二種のレクチン遺伝子の分布

NBRP に収集された栽培トマト (*Solanum lycopersicum*) 7 種とトマト近縁種 5 種を栽培し、果実と小葉のレクチン活性を調べた。調査したすべての品種の果実にレクチン活性が検出されたが、品種間の活性差は大きく、栽培種の中で活性が最も高いマイクロトム (MT と略) と低いマナーメーカー (MM と略) との間に約 10 倍の差があった。果実においてレクチン活性が最も高い種は、トマト近縁種 *S. pimpinellifolium* であり、MT のおよそ 1.4 倍の値を示した。一方、葉においてレクチン活性を示したものは MM を含む二種の栽培種であった。ゲノムに *TL-F* または *TL-L* が検出される遺伝子型をそれぞれ *F* と *L* とし、レクチン遺伝子の保持を調べた。トマト近縁二種の遺伝子型は判別不能であったが、それ以外は *F* または *L* のいずれかに分類された。小葉にレクチン活性が検出された二品種は *L* 型であり、近縁種 *S. pimpinellifolium* を含む他の栽培品種はすべて *F* 型であった。*F* 遺伝子と *L* 遺伝子の両方をゲノムに保持した固定品種は存在しなかった。

レクチン遺伝子 *F* 型の品種として MT を、*L* 型の品種として MM を用いてレクチン活性を比較した (図 2)。MT 果実においてレクチン活性は緑熟期以降に上昇し、開花後 40 日で水平に達した。MM では開花 10 日の未熟果で比活性はピークに達し以降は低下した (図 2A)。MT 果実は *TL-F* タンパク質を MM 果実は *TL-L* タンパク質を生産していることがウエスタンブロットから示された。小葉において MT は傷害処理の有無にかかわらずレクチン活性が検出されなかったが、MM のレクチン活性は傷害処理 24 時間後に健常時の 8 倍に上昇した (図 2B)。以上の結果から、トマト栽培品種において二種のレクチン遺伝子型が存在し、遺伝子型と一致して果実と小葉のレクチン活性の程度が異なることが示された。

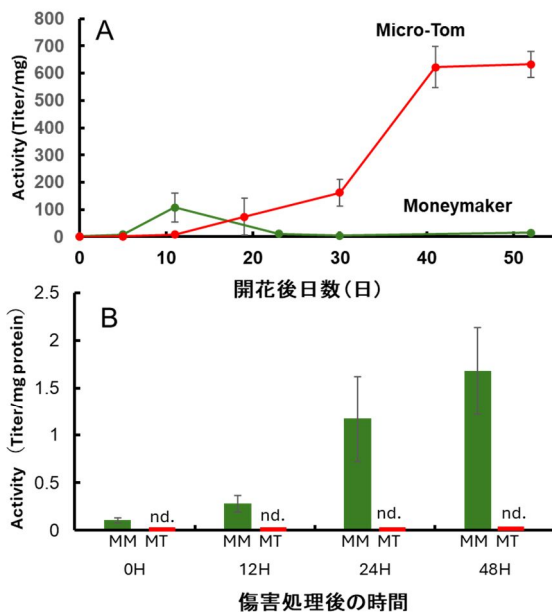


図2. 果実と小葉におけるレクチン活性の変化
 トマト品種マイクロトムとマナーメーカーの各器官の抽出液についてレクチン活性を測定した。(A) 果実の活性。開花後の子房を経時的に回収した。開花後10日以前の果実は複数個を1区画とし、3区画の反復を設けて測定した。10日以降の果実は3~5個の果実の活性を測定した。平均±SD。(B) 鉗子ではさんで傷をつけた後の小葉を経時的に回収した。MM:マナーメーカー; MT:マイクロトム。n = 3, 平均±SD

(2) 二種のトマトレクチン遺伝子の遺伝様式の解析

固定栽培品種 MT (*F* 遺伝子のホモ: *F/F*) と MM (*L* 遺伝子のホモ: *L/L*) の交配により得られた F_1 の遺伝子型はすべてヘテロ (*F/L*) であり、その自殖 F_2 世代 133 個体の遺伝子型の分離比は *F/F*:*F/L*:*L/L* = 1:2:1 に適合することが、カイ二乗検定から示され、両遺伝子は対立遺伝子の関係にあることが示唆された。 F_2 世代の個体において遺伝子型 *F/F* の個体は果実のみに、*L/L* の個体は小葉と同じ遺伝子型の交配親と同程度のレクチン活性を示し、*F/L* の個体は果実と小葉の両方に活性を示した。

公開された MT のゲノム配列において *TL-F* 遺伝子は第 3 番染色体 (GenBank ID: AP028937.1) の末端付近に座乗する。一方、我々は、MM ゲノム上の *TL-L* 遺伝子の 5' 上流約 3 kbp の配列をゲノムウォーキング法により解析し、両レクチン遺伝子の 5' 上流配列を比較した。MM における *TL-L* 5' 上流約 3 kbp の DNA 配列内に MT の *TL-F* 遺伝子の 5' 上流においては、20 kbp の挿入が認められた。果実と小葉におけるレクチン活性のトマト品種による違いは、*TL-F* と *TL-L* の 5' 上流配列の違いに起因すると予想された。

(3) *TL-L* の異種植物発現とシロチョウ幼虫を用いた抗昆虫活性の評価

CaMV35S プロモーター下において *TL-L* を過剰発現するシロイヌナズナ (*35S::TL-L*) を作出した。組換え体 T_3 世代の抽出液はレクチン活性を示し、ウエスタンブロット分析において *TL-F* よりも低い分子量位置に抗 *TL-F* 抗体と交差する組換え型 *TL-L* タンパク質の生産が確認された (図 3)。本課題において *TL-F* 遺伝子の異種植物発現を試みたが、*TL-F* 遺伝子を保持したシロイヌナズナ形質転換体において組換え *TL-F* タンパク質の生産が確認できなかった。このため、*TL-L* の抗昆虫活性のみ評価した。アブラナ科植物を食草とするエゾスジグロシロチョウ (*Pieris dulcinea*) の幼虫に *35S::TL-L* シロイヌナズナを供試し、6 日後の幼虫の体重を測定した (図 4)。野生型シロイヌナズナを給餌した試験区と *35S::TL-L* シロイヌナズナ二系統 (#4 と #9) を給餌

した試験区との間に有意な差が検出されず（図4）、TL-Lはエゾスジグロシロチョウの成長に影響を与えないことが示された。

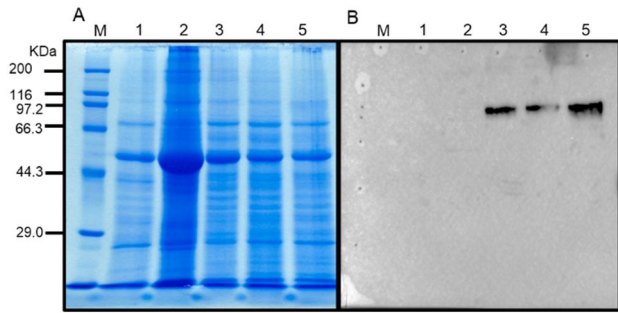


図3. 35S:TL-L形質転換シロイヌナズナT₃世代にける組換えTL-Lの生産タンパク質100 μgを含むシロイヌナズナの抽出液をSDS-PAGEで分析した。泳動後のゲルに含まれるタンパク質はCBBで染色(A)またはPVDF膜に転写し、抗TL-F抗血清を用いて検出した(B)。レーン: 1. 野生型(Col-0); 2. ベクターコントロール; 3-5. 35S:TL-L形質転換シロイヌナズナT₃系統#1, #4, #9; M. サイズマーカー。矢頭は天然型TL-Fの泳動位置を示す。

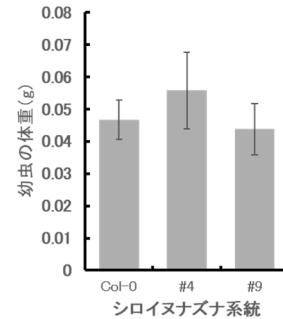


図4. 35S:TL-L形質転換シロイヌナズナを供試したシロチョウ幼虫の体重。野生型(Col-0)と35S:TL-L形質転換体T₃系統(#4と#9)各1個体に1匹のシロチョウ1齢幼虫を放ち、6日後に体重を測定した。10個体の試験の平均値±SDを示した。

(4) TL-Lの発現を抑制したトマトにおける *Botrytis cinerea* 感染

RNAiによりTL-Lの発現が抑制されたMM形質転換体T₁世代の小葉に灰色カビ病菌(*B. cinerea*)の培養菌糸を接種した。接種4日後の感染率は野生型が25.0%に対して、TL-L発現抑制体の小葉では58.3%(系統#20)~91.7%(系統#42および#45)と高い値を示した。また、TL-L発現抑制体における病斑の面積は、野生型(WT)に比べて有意に増加し(図5A)、発現抑制体小葉では病斑上に旺盛な*B. cinerea*菌糸の成長が観察された(図5B)。以上の結果から、TL-Lの発現を抑制したトマト小葉では、*B. cinerea*感染の進行が亢進し、TL-Lの発現は、*B. cinerea*感染の抵抗性に寄与することが示された。

この感染実験において接種7日後の野生型の感染率は50%まで上昇したが、野生型トマト小葉に形成された病斑の菌糸密度はTL-L抑制体に比べて薄かった。*B. cinerea*の育成に対するTL-Lの効果は殺菌作用ではなく、菌糸の成長抑制であることが示唆された。

今後は、TL-Lの作用機序の解明を通して感染過程における宿主と病原菌との相互作用について植物防御において新たな知見が得られることを期待する。

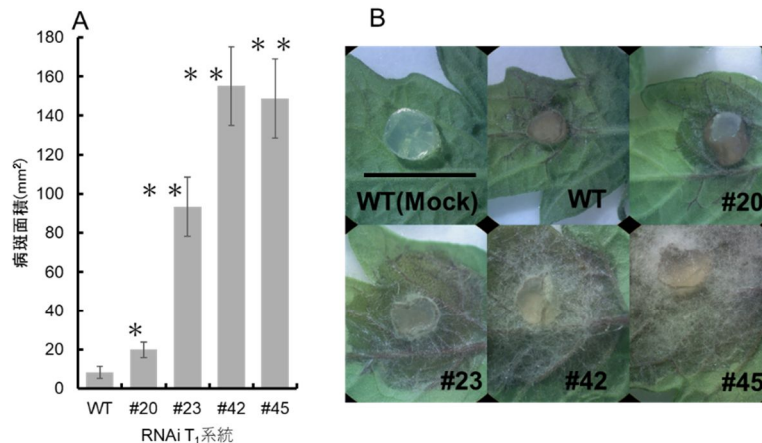


図5. RNAiによりTL-Lの発現を抑制したトマトの小葉における*B. cinerea*感染 (A) トマト品種マナーメーカー野生型(WT)とRNAiによりTL-Lの発現を抑制したマナーメーカー形質転換体T₁系統(#20-#45)の小葉を切り取り、*B. cinerea*菌糸が育成した寒天片を置いた。4日間培養した後形成された病斑の面積を計測した。24枚の試験の平均値±SEを示した。*: WTとの間に有意差あり(p<0.05); **: WTとの間に有意差あり(p<0.001)。(B) Aにおける代表的な病徴。バー: 1 cm

<謝辞>

本課題で使用したTL-L発現抑制トマト形質転換体は、形質転換ネットワークの支援において課題名「トマトレクチン遺伝子の発現抑制体の作製」として江面 浩 教授(筑波大学)との共同研究において2010年に作製された。

<参考文献>

- 1) Tsaneva, M., and Van Damme, E. J. M. (2020) *Glycoconj J* **37**, 533-551
- 2) De Coninck, T., and Van Damme, E. J. M. (2021) *Plant Sci* **313**, 111096
- 3) Oguri, S. et al. (2008) *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 2640-2650

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oguri Suguru	4. 巻 34
2. 論文標題 Structure and Function of Plant Chitin-binding Lectins and Tomato Lectin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E75 ~ E80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.2123.1E	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 小栗 秀	4. 巻 8
2. 論文標題 植物細胞工学と糖鎖工学の融合を目指してトマトレクチンの役割と応用	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 529 ~ 532
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小栗 秀、絵面香央梨、東野さとみ、坂本 光
2. 発表標題 Distribution of lectin genes in wild and cultivated tomato species.
3. 学会等名 第17回日本ナス科コンソーシアム年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小栗 秀、絵面 香央梨、岡本 三奈、佐藤 里杏人、長澤 将太、坂本 光
2. 発表標題 Comparison of the lectin activities among various tomato cultivars.
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小栗 秀, 八十祐樹, 石原彰子, 坂本 光
2. 発表標題 トマト固定品種を用いた二種のイソレクチンの性質の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024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

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