

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06058

研究課題名(和文)植物の免疫応答を活性化するナミハダニ由来HAMPの受容機構の解明

研究課題名(英文)Characterization of Tetranychus urticae-derived elicitors recognition system and responses

研究代表者

出崎 能丈 (Desaki, Yoshitake)

東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・助教

研究者番号：80711647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ナミハダニ由来のHAMPであるテトラニンは、植物の細胞膜上の受容体で認識されることで防御応答を誘導すると考えられる。本研究では、既に同定したら2つのテトラニンに加え、新規に2つの異なるテトラニンを同定し、既知のものを含め4つが異なる活性を持つことを示した。加えてナミハダニの異なる宿主植物ではテトラニンの防御応答誘導能が異なること、ナミハダニの宿主適応の過程でナミハダニの発現量が調整されていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既知の2つのテトラニンだけでは、ナミハダニが誘導する防御応答が完全に模倣できていなかった。その中で新規に2つのテトラニンを示し、これらがそれぞれ異なる防御応答誘導能を持つことが示され、実際の加害現場では複数のHAMPが協調的に機能していることが示された。これまでの微生物由来MAMPの研究でも複数のMAMPの同時認識に関する知見は無く、実際の加害の現象を理解する上で重要な知見となった。加えてナミハダニの宿主適応にHAMPの発現量の変化があることは、逆に言えば、HAMPによって誘導される防御応答がナミハダニにとって乗り越えるべき障壁であることが示され、本系の応用利用価値を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Tetranychus urticae-derived elicitors known as Tetranins were recognized by pattern recognition receptors located on the plasma membrane of plants. In this study, we identified two novel tetranins, Tet3 and Tet4. The four tetranins, including Tet1 and Tet2, induced different defense responses. Furthermore, it was shown that the induction of defense responses by tetranins varies among different host plants of the spider mite. Additionally, it was revealed that the expression levels of tetranins are regulated during the process of host adaptation by the spider mite.

研究分野：植物保護、生物間相互作用

キーワード：HAMP エリシター ナミハダニ

1. 研究開始当初の背景

食害や病原菌媒介を引き起こす植食性害虫にも微生物由来で防御応答を誘導する MAMPs (Microbe-associated molecular patterns) に対応する HAMPs (Herbivore-associated molecular pattern) の存在が認められ、地球温暖化による害虫の数・生育範囲が増大する中で、HAMPs 認識に基づく害虫制御技術は有用で持続可能な仕組みとなることが期待されている。世界的な研究から MAMPs 認識・応答に関する知見は蓄積されつつある中、植食性の害虫に対する植物の応答は、遺伝子発現誘導など微生物に対する応答と共通点もあるが、揮発性物質を用いて害虫を捕食する天敵の誘引を行うなど相違点も多く、HAMPs 認識・応答機構の解明は新規害虫制御技術の開発基盤として不可欠である。

これまでに鱗翅目の咀嚼性害虫を中心にポリシチン(脂肪酸とアミノ酸の化合物)やインセプチン(ペプチド)など複数の HAMP が報告されている(Uemura et al., 2019)。しかし、研究開始前の時点においてはSteinbrennerらが biorxiv 上に発表したインセプチン受容体(Steinbrenner et al., 2020)を除き、HAMPs 受容体、特に本研究で扱う吸汁性害虫由来 HAMPs の受容機構に関する報告はなく、認識の最前線となる受容体の同定は学術的にも重要であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は我々がすでに同定した吸汁性害虫ナミハダニ由来 HAMP の受容体の同定、シグナル伝達活性化機構の解明である。ナミハダニ等のハダニ類は体長が 0.5mm 程度と非常に小さく、果樹・チャ・野菜・花卉など幅広い作物に寄生し、吸汁加害する(図1)。ハダニはゲノム変異のスピードが速く、農薬に即座に適応するため、農薬使用に代わる駆除法の確立が期待されている。我々は HAMPs 認識機構に基づく、植物のハダニ感受性の増大や植物活性化型農薬などによる害虫制御技術開発を最終目標に、先行研究においてナミハダニ由来 HAMP の同定を試みた。ナミハダニのゲノム情報から唾液腺に発現する分泌型タンパク質を選抜し、それぞれをインゲンの葉に一過的に発現させた。このインゲン葉にナミハダニを接種、致死率を評価することで HAMP として植物に防御応答を誘導する分子を探索した。結果、ナミハダニ由来の2つのタンパク質(テトラニン、Tet1 および Tet2)を HAMP として示した(図2 a、Iida and Desaki et al., 2019)。また、このテトラニンは外部から処理しても、インゲンやナス、シロイヌナズナに対して HAMP として機能した。さらに、インゲンでは揮発性物質生産を誘導し、ハダニの捕食性天敵であるチリカブリダニを誘引する間接防御も見出した。これら防御応答誘導には、細胞表層でのテトラニン認識後に活性酸素生成、防御応答関連遺伝子の発現誘導、植物ホルモン合成等が引き起こされることを示したが、未だ受容体同定には至っておらず、本研究ではまずこの解明を目指した(図2 b)。



図1 ナミハダニの生態

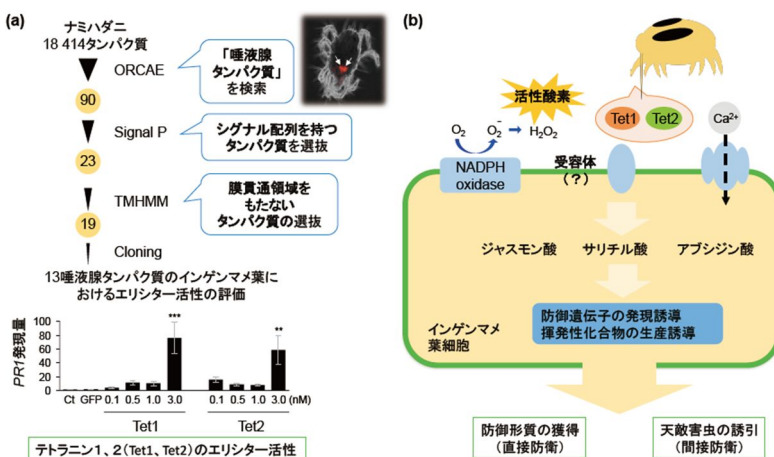


図2 先行研究におけるテトラニンの同定(a)と作用モデル(b)

3. 研究の方法

1) Tet2 活性エピトープの同定

微生物由来のタンパク質型 MAMP はその断片のペプチドが活性エピトープとして機能することが一般的である。このことからナミハダニ由来 Tet2 もその断片が機能すると考え、その同定を目指した。当初の計画では、これまで大腸菌で発現、精製して用いてきた Tet2 を 100 残基程度ごとに分割して同様に調製、植物に処理した際の遺伝子発現を評価することで活性部位の絞り込みを行うと予定していた。しかし、効率を考慮し、インゲンマメ葉に分割した Tet2 をアグロバクテリウム法によって導入し、その葉上でのナミハダニの致死率を評価することで絞り込みを行った。

では機械的に Tet2 を分割したが、次に 2 次構造予測を基に ヘリックスや シートといった単位で分割し、活性部位の絞り込みを継続した。

2) シロイヌナズナ Tet2 受容体の同定

シロイヌナズナ受容体キナーゼ遺伝子欠損変異体ライブラリーに対し、大腸菌発現系で調製した完全長の Tet2 を処理し、防御応答関連遺伝子である *FRK1* の発現誘導が野生型に処理した場合よりも低下する個体を探索することで受容体候補を得た。

得られた4つの受容体候補遺伝子それぞれに関して異なる変異体株(アリル)をリソースセンターから入手し、ホモ化、これらの個体における Tet2 応答性を 同様に野生型と比較評価することで、原因遺伝子の特定を目指した。

合わせて4つの候補遺伝子の過剰発現体を作成し、Tet2 処理時の防御応答関連遺伝子の発現を評価することで、原因遺伝子の裏付けを得ようとした。

3) 新規 Tet の同定

先行研究における Tet1、Tet2 の機能解析から、これら2つのテトラニンのみではナミハダニ個体に対する植物の防御応答を完全に模倣できないことが示されていたことから、これら2つ以外にも未知の HAMP の寄与が想定された。そこで、ナミハダニの唾液腺から分泌が示されたいタンパク質を候補として、更なる HAMP の同定を目指した。具体的には Tet1、Tet2 の同定と同様に、遺伝子をクローニングし、アグロバクテリウム法でインゲンマメ葉に発現させ、その葉上でのナミハダニの致死率を評価することで、防御応答を誘導する分子を探索した。

得られた新規 HAMP 候補に関して、大腸菌発現系で調製し、インゲンマメ葉に接種した時の防御応答関連遺伝子 (*PR1* および *PR3*) を評価することで、HAMP 活性を示した。

得られた2つの新規 HAMP (Tet3 および Tet4) の活性を既知の Tet1 および Tet2 と比較して評価した。

4つのテトラニンの機能を複数のナミハダニ宿主植物において解析し、比較した。

4. 研究成果

1) Tet2 活性エピトープの同定

当初は、Tet2 (全長 200 残基程度) の上流 100 残基に活性が見出されていたが、初年度途中で再現性が得られなくなり、再度評価を行った結果、機械的に分割したいずれの断片(上流、中間、下流の 100 残基程度、互いに 50 残基程度の重複を含む)にも活性が保持されていないことが示された。これを踏まえて2次構造予測に基づき、ヘリックスや シート構造を維持する形で再度分割を行い同様の検討をしたが、いずれも活性を示さなかった。このことから、これまでの微生物のタンパク質型エリターとは異なり、一部のエピトープが活性を示すのではなく、Tet2 自体の機能(未知)あるいは立体構造が HAMP 活性に重要であることが示された。

2) シロイヌナズナ Tet2 受容体の同定

シロイヌナズナの受容体キナーゼ遺伝子欠損変異体の各個体に Tet2 を処理し、*FRK1* の発現誘導レベルを指標に評価した結果、4種の変異体で野生型に比べて応答が低下することが示された。そこで、それぞれの遺伝子の別アリルの変異体をリソースセンターから入手し、ホモ化、再度同様に Tet2 誘導性の *FRK1* の発現レベルを評価した。しかし、いずれの変異体も当初の変異体と同様の結果を示さなかった。そこで、当初のアリルに加えて作成した各遺伝子の過剰発現体を用いて、再度検討を行ったが、いずれの候補遺伝子においても一貫する結果を得ることはできなかった。これらのことから、4候補は Tet2 認識に関わらないものと断定した。これは、網羅的な解析において植物の生理的条件が整わなかったことによって、スクリーニングが失敗したためであると考えられた。当初の計画では、シロイヌナズナのエコタイプスクリーニングを代替案として提案していたが、研究期間内にその結果を得ることができなかったため、今後の課題となった。

3) 新規 Tet の同定

先行研究において、同定した2つのテトラニン (Tet1 および tet2) だけでは、実際にナミハダニがインゲンマメを加害したときに誘導される防御応答を完全には模倣できないことが明らかとなっていた。このことから、ナミハダニの唾液中には更なる HAMP が存在することが示唆されていた。Jonckheere ら(2016)が示した、ナミハダニの唾液に分泌されているタンパク質を候補に、分子サイズが小さく、機能未知のタンパク質に絞り込みを行い、18 遺伝子をクローニングした。この遺伝子を1つずつアグロバクテリウム法によってインゲンマメ葉に発現させ、その葉上でのナミハダニの致死率を評価した。その結果、2つの新規 HAMP 候補を得ることができた。これら候補を大腸菌発現系で調製し、インゲンマメ葉に処理したところ、防御応答関連遺伝子である *PR1* および *PR3* の発現が誘導された。これらのことから新規 HAMP として Tet3 および Tet4 を同定した。これら新規 HAMPs と Tet1 および Tet2 の活性を、カルシウム流入、ROS 生産、植物ホルモン蓄積、間接防御に関わる揮発性物質の放出量を指標に比較評価した。その結果、4つのテトラニンはそれぞれの指標ごとに誘導の強度が異なることが示された。これらのことから、実際のナミハダニの加害時には少なくともこれら4つのテトラニンが協調的に防御応答を誘導していることが示された。

さらにこれら4つの防御応答誘導能をインゲンマメ以外の他のナミハダニ宿主植物において評価した結果、キュウリやコマツナでは防御応答を誘導するものの、トマトやトウモロコシでは防御応答を誘導しないことが示され、宿主植物に機能が依存することが示された。また、インゲ

ソマメ葉上で生育したナミハダニとキュウリ葉上で生育したナミハダニの体内でのテトラニンの発現量を比較した結果、キュウリ葉上では 4 つのテトラニン全ての遺伝子発現量が低下することが示された。このことは、ナミハダニの宿主適応の結果として、自身の HAMP 発現量を変化させていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Desaki Yoshitake, Morishima Minami, Sano Yuka, Uemura Takuya, Ito Ayaka, Nemoto Keiichirou, Nozawa Akira, Sawasaki Tatsuya, Arimura Gen-ichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Cytoplasmic Kinase Network Mediates Defense Response to Spodoptera litura in Arabidopsis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 1747 ~ 1747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants12091747	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 Shimizu Kohei, Suzuki Hitomi, Uemura Takuya, Nozawa Akira, Desaki Yoshitake, Hoshino Ryosuke, Yoshida Ayako, Abe Hiroshi, Nishiyama Makoto, Nishiyama Chiharu, Sawasaki Tatsuya, Arimura Gen-ichiro	4. 巻 110
2. 論文標題 Immune gene activation by NPR and TGA transcriptional regulators in the model monocot Brachypodium distachyon	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 470 ~ 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15681	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 Uemura Takuya, Hachisu Masakazu, Desaki Yoshitake, Ito Ayaka, Hoshino Ryosuke, Sano Yuka, Nozawa Akira, Mujiono Kadis, Galis Ivan, Yoshida Ayako, Nemoto Keiichirou, Miura Shigetoshi, Nishiyama Makoto, Nishiyama Chiharu, Horito Shigeomi, Sawasaki Tatsuya, Arimura Gen-ichiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Soy and Arabidopsis receptor-like kinases respond to polysaccharide signals from Spodoptera species and mediate herbivore resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0959-4	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 該当する
1. 著者名 Maruyama Shingo, Shibuya Naoto, Kaku Hanae, Desaki Yoshitake	4. 巻 15
2. 論文標題 Arabidopsis cell culture for comparable physiological and genetic studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1781384 ~ 1781384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2020.1781384	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口純奈, 林海斗, 出崎能丈, Abdelaziz Ramadan, 西川舞, 野澤彰, 根本圭一郎, 澤崎達也, 有村源一郎
2. 発表標題 E3ユビキチンリガーゼJUL1によるエチレン応答性因子ERF15を介した遺伝子制御機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 出崎能丈, 森島実奈美, 佐野友香, 上村卓矢, 伊藤綾華, 根本圭一郎, 野澤彰, 澤崎達也, 有村源一郎
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける受容体様細胞質キナーゼネットワークを介した 虫害防御応答機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中未来, 谷村香織, 若谷晃汰, 小澤理香, 北條優子, 新屋友規, Galis Ivan, 出崎能丈, 有村源一郎
2. 発表標題 ナミハダニのタンパク質エリシター「テトラニン」の機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森島実奈美, 佐野友香, 上村卓矢, 出崎能丈, 伊藤綾華, 根本圭一郎, Galis Ivan, 野澤彰, 澤崎達也, 有村源一郎
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるPBL27-CRK2を介した虫害防御応答機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山真吾、高橋勇人、小川晃弘、渋谷直人、賀来華江、出崎能丈
2. 発表標題 比較可能な生理学的、遺伝学的研究に資するシロイヌナズナ培養細胞の開発
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷村香織、安野文乃、田中未来、若谷晃汰、高藤健人、飯田隼也、安部洋、出崎能丈、有村源一郎
2. 発表標題 ナミハダニ由来エリシターである tetranin の分子機能および応答機構の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野友香、森島実奈美、上村卓矢、伊藤綾華、星野稜介、出崎能丈、野澤彰、澤崎達也、Ivan Galis、有村源一郎
2. 発表標題 シロイヌナズナの食害エリシター応答分子HAKを介したシグナル伝達機構の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
---------	---------