

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：11601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15527

研究課題名（和文）エフェクターの網羅的局在解析を通じた植物病原細菌の感染機構の研究

研究課題名（英文）Study of infection mechanisms of phytopathogenic bacteria through comprehensive localization analysis of effectors

研究代表者

岡野 夕香里（Okano, Yukari）

福島大学・食農学類・准教授

研究者番号：90734872

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細菌が引き起こす植物の病害は防除が難しい。植物は細菌に対して複数の抵抗性機構を有するが、細菌はタイプⅠエフェクターと呼ばれる低分子のタンパク質を植物体内に分泌し、抵抗性機構を抑制する。本研究では植物の抵抗性のシグナル伝達に関わる植物ホルモンであるサリチル酸やタイプⅠエフェクターに関してイメージング質量分析を行い、その結果、細菌接種時のサリチル酸の局在の様子を明らかとした。また、Xanthomonas属細菌接種時のタバコで、強い抵抗性反応である過敏感反応に類似した反応が起こっていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の細菌に対する病害応答の際のサリチル酸の組織的な局在を可視化した報告は無く、本研究が初めての報告である。本研究により得られた知見は、細菌に対する病害抵抗性の誘導メカニズムの解明の一端を担うものであり、将来的には植物の抵抗性反応を利用した新規な細菌病の防除法の確立に繋がるものである。

研究成果の概要（英文）：Plant diseases caused by bacteria are difficult to control. Plants have multiple resistance mechanisms against bacteria, but bacteria secrete small proteins called type I effectors into plant cells to suppress the resistance mechanisms. In this study, we performed imaging mass spectrometry on salicylic acid, a plant hormone involved in signaling in plant resistance, and type I effectors. Imaging mass spectrometry elucidated the localization of salicylic acid in leaves during bacterial inoculation. I also found that a response similar to the hypersensitive response, which is a strong resistance response, occurs during inoculation with Xanthomonas sp in tobacco.

研究分野：植物病理学

キーワード：イメージング質量分析

1. 研究開始当初の背景

農作物の病害は菌類、細菌、ウイルスなどの病原性微生物により引き起こされ、収量の減少や品質の低下などの被害を生じる。したがって病害の防除は農業生産上重要な課題である。特に植物病原細菌による病害は効果のある化学農薬のバリエーションが少なく、防除が難しい病害である。

病害の防除を考える上で、植物が備える抵抗性の理解が重要である。一般に植物の抵抗性機構はPAMP triggered immunity (PTI) とeffector triggered immunity (ETI) から成る [Chisholm et al., 2006, Cell]。PTIは、植物の受容体 (PRR) が、細菌などの病原体に共通する共通分子パターン (PAMPs) を認識して誘導する抵抗性である。対して細菌は、タイプ エフェクターと呼ばれる低分子のタンパク質を植物体内に分泌し、宿主の代謝を攪乱してPTIを抑制する。植物はさらに、各タイプ エフェクターに対応する抵抗性タンパク質を持ち、タイプ エフェクターを認識するとETIを誘導する。現在、一細菌種あたり十数個から数十個のタイプ エフェクターを持つと推測されている。

これまで、様々な細菌に関して多くのタイプ エフェクターが同定され、機能解析が行われてきた。しかしながら、詳細な機能が不明なものも未だに多い。タイプ エフェクターの細胞レベルでの局在については、一部解析されており [Alfano & Collmer, 2004, Annu. Rev. Phytopathol.], 機能を明らかにする手がかりとなってきた。細菌においては、タイプ エフェクターは型分泌機構を介して植物細胞内に注入される。しかし、感染時のタイプ エフェクターの挙動にはまだ明らかになっていない点が多い。サリチル酸は植物ホルモンの一種であり、植物が主に活物寄生性の病原体の攻撃を受けた際に誘導される病害抵抗性のシグナル伝達物質として機能する。植物では、病原体の攻撃を受けた組織だけではなく、上位葉においても病原体に対する抵抗性(全身獲得抵抗性)が誘導されるが、この抵抗性の誘導にはサリチル酸が重要な役割を果たしている。しかし、植物の病害応答の際に、サリチル酸の組織的な局在を可視化した報告はない。

2. 研究の目的

植物病原細菌のタイプ エフェクターの局在解析を通じ、感染過程におけるタイプ エフェクターの機能を明らかにすることが目的である。また、病害抵抗性反応におけるシグナル伝達物質であるサリチル酸の分布を明らかとし、細菌感染時の抵抗性反応のメカニズムの一端を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

健全植物または *Xanthomonas* 属菌を接種した植物の葉について、matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry (MS)を用いてイメージング質量分析を行い、タンパク質やサリチル酸の局在解析を行った。また、タバコに *Xanthomonas* 属菌を接種し、過酸化水素の生成や細胞死、サリチル酸応答性の防御応答関連遺伝子の発現の解析を行った。

4. 研究成果

植物病原微生物が分泌するタイプ エフェクターのイメージング質量分析を行うため、アブラナ科植物から切片を作成し解析を行ったところ、蓄積量が多いタンパク質に関しても検出されるシグナルが低かった。これはタンパク質が高分子量であり、イオン化されにくいことに起因すると考えられた。したがって、切片に対してさらにタンパク質分解などの処理をして、断片化する必要があることが明らかとなった。そこで、より低分子な物質のイメージング質量分析を行い、植物病原体と植物の相互作用を解析することとした。タバコが植物病原細菌である *Xanthomonas* 属菌の接種時に起こす、抵抗性様の反応に着目し解析を行った。まず、抵抗性様の反応について、*Xanthomonas* 属菌をタバコに注入接種したところ、接種部位の黄色から褐色への変色が見られた。この接種葉について DAB 染色およびトリパンブルー染色すると接種部位で染色が観察された。したがって、接種により過酸化水素の生成と細胞死が生じていることが示された。過酸化水素の生成と細胞死は、植物が特定の植物病原体を認識して起こす強い抵抗性反応である過敏感反応(hypersensitive response: HR)の指標であることから、これにより *Xanthomonas* 属菌によってタバコでHRに類似した反応が起こっていることが示唆された。また、サリチル酸に応答して発現するタバコの防御関連遺伝子である *PR1a* および *PR5* 遺伝子を接種部位で解析した。両遺伝子の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR により定量した結果、*Xanthomonas* 属菌の注入部位では、これらの遺伝子の発現が有意に上昇した。また、接種葉だけではなく、上位葉でも両遺伝子の発現が有意に上昇した。よって、*Xanthomonas* 属菌が誘導する HR 様反応の際にタバコのサリチル酸応答性の防御関連遺伝子が誘導され、全身獲得抵抗性も誘導されることが示唆された。*Xanthomonas* 属の一部の種では、タイプ エフェクターの Hpa1 が非宿主植物における HR の誘導を担っていることが報告されており、今回見られた HR 様の反応の誘導メカニズムにも興

味が持たれる。*Xanthomonas* 属菌の接種により、サリチル酸応答性の防御関連遺伝子が誘導されたことから、この防御応答にはサリチル酸が関与している可能性が高い。そこで、サリチル酸をターゲットとしてイメージング質量分析を行った。*Xanthomonas* 属菌を接種したタバコの葉を用いてイメージング質量分析を行ったところ、接種部位とその周辺の部位では、周辺の部位の方がサリチル酸のシグナルが強く検出された。周辺部位でのサリチル酸の分布に明らかな偏りは無く、一様にサリチル酸の蓄積量が増加することが明らかとなった。以上より、植物の病害応答の際のサリチル酸の組織的な局在を初めて可視化することができた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Vaughan-Hirsch John, Li Dongdong, Roig Martinez Albert, Roden Stijn, Pattyn Jolien, Taira Shu, Shikano Hitomi, Miyama Yoko, Okano Yukari, Voet Arnout, Van de Poel Bram	4. 巻 13
2. 論文標題 A 1-aminocyclopropane-1-carboxylic-acid (ACC) dipeptide elicits ethylene responses through ACC-oxidase mediated substrate promiscuity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2022.995073	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡野夕香里
2. 発表標題 植物ウイルスに対する多重抵抗性付加に向けた研究
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野夕香里
2. 発表標題 Xanthomonas arboricola pv. pruni が引き起こすタバコのHR様反応の解析
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------