

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21310

研究課題名(和文) 食害昆虫によって誘導される植物免疫シグナルの細胞間移行に関する分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis for cell-to-cell transfer of plant immune signals induced by feeding insects

研究代表者

吉岡 博文(Hirofumi, Yoshioka)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30240245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニジュウヤホシテントウの食害による隣接細胞への時空間的MAPKの活性化を、傷害処理とHAMPの同時処理によって模倣することができた。このシステムを用いることで、隣接細胞のMAPKの活性化を抑制するジャガイモ疫病菌エフェクターを探索することが可能になる。エフェクターと細胞質局在型MAPKセンサーを発現させたベンサムアナ葉にHAMPおよび傷害処理した。MAPKセンサーを用いた対照区では、処理部から周辺の細胞へFRET蛍光の拡散が確認された。一方、各種エフェクターを導入した場合、5つのエフェクターを発現させた区においてFRET蛍光の拡散が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MAPKバイオセンサーを開発し、MAPKの活性化動向を観察した結果、ニジュウヤホシテントウの加害は植物免疫シグナルを細胞間で移行させ、集団協調的な生体防御機構を誘導することを明らかにした。本研究では、MAPK活性の拡散を阻害する植物病原菌エフェクターをスクリーニングすることで、細胞間ネットワークに関わる中核植物因子を同定する。咀嚼昆虫と植物間における新たなシグナルネットワークの発掘を可能にする先駆的モデルを提示し、病害虫抵抗性付与の戦略を構築すると共に、未踏の研究領域の開拓を目指す。

研究成果の概要(英文)：Spatio-temporal activation of MAPKs in neighboring cells by 28-spotted ladybug feeding damage could be mimicked by the simultaneous treatment with injury and HAMPs. Using this system, it is possible to search for potato blight pathogen effectors that inhibit MAPK activation in neighboring cells. *Nicotiana benthamiana* leaves expressing effectors and cytoplasm-localized MAPK sensors were treated with HAMP and injury, then, diffusion of FRET fluorescence from the treated area to surrounding cells was observed. On the other hand, when various effectors were introduced, the diffusion of FRET fluorescence was suppressed in the plots expressing five effectors.

研究分野：植物免疫学

キーワード：ニジュウヤホシテントウ MAPキナーゼ バイオセンサー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

咀嚼昆虫が抵抗性誘導物質を生産する例が報告され、HAMPs (herbivore-associated molecular patterns) と呼ばれるようになってきた (図1)。しかし、咀嚼昆虫に対する植物免疫機能の実態は依然としてよくわかっていない。この大きな理由として、HAMPs の同定例が少ない上に、植物の遺伝子操作の煩雑さが主な原因であると考えられる。

病害応答性 MAPK として SIPK と WIPK が同定されている。ベンサミアナタバコ葉でこれら MAPK を一過的にサイレンシングしたところ、ニジュウヤホシテントウは本来食べることのできないベンサミアナを激しく加害した (図2)。申請者は、図3に示したように MAPK センサーを開発し、ニジュウヤホシテントウが摂食した細胞およびその周辺細胞による集団協調的な生体防御反応を観察した。この結果から、植物は自身を護るため、食害を受けると迅速に免疫シグナルを周辺細胞に拡大する戦略をとると推定された。

本 MAPK センサーは、MAPK の基質である WRKY8 由来の D ドメインと SP クラスタ、ヒト由来のリン酸化セリン認識ドメイン (Pin1 WW)、そして YFP と CFP を両端に連結した構造である。SP クラスタが MAPK にリン酸化されると、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET) が起こり、蛍光シグナルとして観察できる (図3)。

植物病原菌は植物免疫経路を抑制するために、エフェクターと呼ばれる一群のタンパク質を植物細胞内に送り込み、様々なシグナル伝達因子を抑制することで感染を支えていることが解ってきた。これらのことから、MAPK 活性の拡散を阻害するエフェクターをスクリーニングすることで、細胞間ネットワークに関わる中核植物因子の同定に挑戦することを思いついた。

2. 研究の目的

ニジュウヤホシテントウによって加害されたベンサミアナタバコ葉では、MAPK (MAP キナーゼ) カスケードに依存した抵抗性が誘導される。さらに、MAPK バイオセンサーを開発し、時間的に MAPK の活性化動向を観察した結果、加害部から MAPK 活性を示す FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) 蛍光が拡散する様子が確認された (図4)。この結果は、植物が咀嚼昆虫に対して集団協調的な生体防御機構を備えていることを示している。

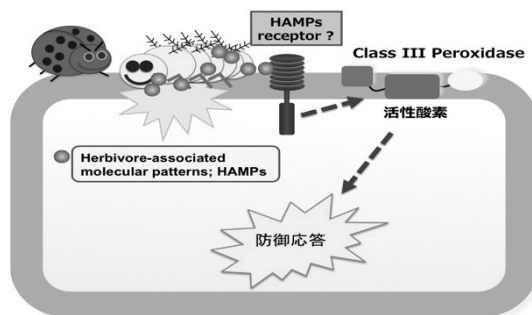


図1 害虫に対する免疫応答

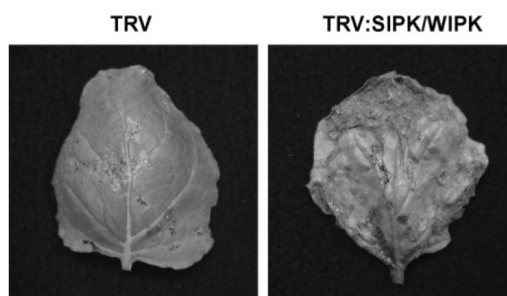


図2 ニジュウヤホシテントウの加害に対する MAPK のサイレンシングの影響

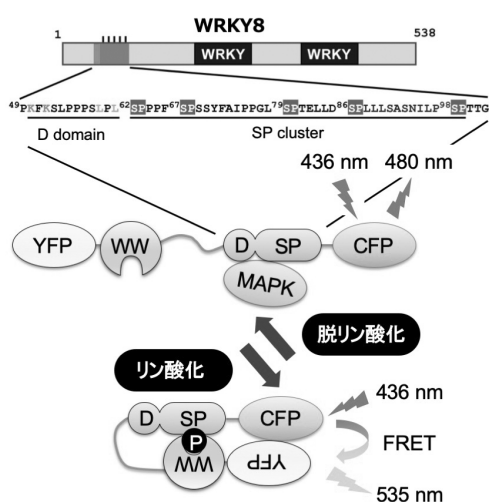


図3 MAPK センサーの構造

本研究では、ニジュウヤホシテントウの加害によって誘導される植物免疫シグナルの細胞間移行を担う機構を、植物病原菌の抵抗性抑制因子群（エフェクター）を利用することによって明らかにすることを第一の目的とする。本研究の成果によって、咀嚼昆虫と植物間における新たなシグナルネットワークの発掘を可能にする先駆的モデルを提示するとともに、病害虫抵抗性付与の戦略を構築する。

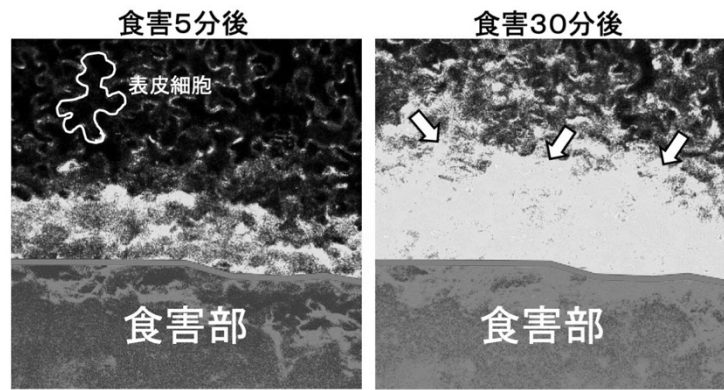


図4 MAPK センサーによる FRET 蛍光写真
ニジュウヤホシテントウの食害によって MAPK 活性が誘導された様子を示す (矢印)。

3. 研究の方法

- ❶ MAPK 活性の拡散を阻害するエフェクター遺伝子の網羅的解析：一過的にエフェクターと MAPK センサーを導入した葉にニジュウヤホシテントウを放飼し、FRET 蛍光を観察してシグナルの拡散が抑制されるエフェクター遺伝子をスクリーニングする。
- ❷ 得られた候補エフェクターを発現させたベンサミアナタバコ葉に HAMP を処理し、処理部と周辺部からタンパク質を抽出する。ウエスタン解析によって、処理部と周辺部における MAPK 活性を調べる。
- ❸ 候補エフェクターに GFP を連結し、発現させたベンサミアナタバコ葉を顕微鏡下で観察して各エフェクターの局在を調べる。
- ❹ 候補エフェクターの標的因子の獲得：得られたエフェクターが標的とするベンサミアナタバコ因子を酵母ツーハイブリッド法によって獲得する。
- ❺ 標的因子の機能解析：標的遺伝子をサイレンシングし、食害で誘導される FRET 蛍光に対する影響を調べ、細胞間移行シグナルを理解する。

4. 研究成果

ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) はジャガイモ疫病の原因菌であり、半活物寄生的な感染様式を示す。ジャガイモ疫病菌は植物への感染時に、600 種以上のエフェクターと呼ばれるタンパク質を分泌し、植物の免疫機構を抑制すると考えられている。このようなエフェクターの中には、隣接細胞の MAPK の活性化を抑制するものが含まれると考えた。ニジュウヤホシテントウの食害による隣接細胞への時空間的 MAPK の活性化を、傷害処理と HAMP の同時処理によって模倣することができた。このシステムを用いることで、隣接細胞の MAPK の活性化を抑制するジャガイモ疫病菌エフェクターを探索することが可能になると考えた。

エフェクターのシグナルペプチドを排し、過剰発現型バイナリーベクターに導入し、そのプラスミドをアグロバクテリウムに導入した。エフェクターを発現するアグロバクテリウムと、細胞質局在型 MAPK センサーを発現するアグロバクテリウムのそれぞれの菌液を混合し、ベンサミアナ葉に一過的に導入した。そのベンサミアナ葉に HAMP を滴下し、その上からパターンホイールで傷害処理した。MAPK センサーを用いた対照区では、傷害処理部から周辺の細胞へ FRET

蛍光の拡散が確認された。一方、各種エフェクターを導入した場合、5つのエフェクター (E1～E5) を発現させた区において FRET 蛍光の拡散が抑制された。さらに、得られた候補エフェクターを発現させたベンサミアナタバコ葉に数本をまとめた爪楊枝で傷害を加え、10 mM の HAMP で処理し、処理部と周辺部から 30 分後にタンパク質を抽出した。ウエスタン解析によって、処理部と周辺部における MAPK 活性を調べた (図 5)。その結果、E2、E3、E4、E5 において対照区の GUS 発現と比較して MAPK 活性の抑制が認められた。

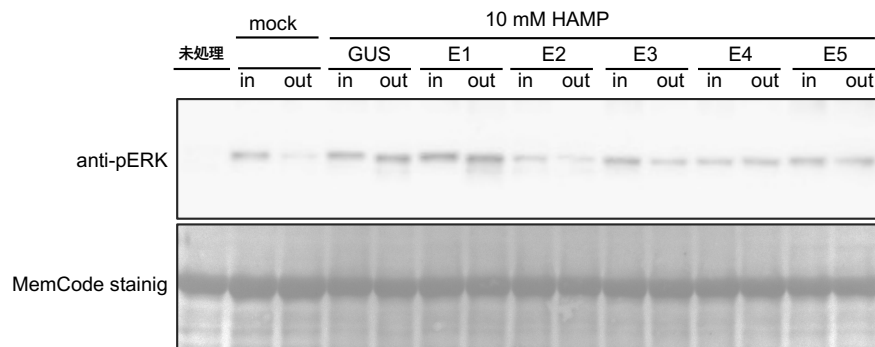


図 5 ウエスタン解析による MAPK 活性の確認

各エフェクター (E1～E5) お発現させたベンサミアナタバコ葉を HAMP で処理し、処理部 (in) と周辺部 (out) における MAPK 活性を調べた。抗 pERK 抗体 (anti-pERK) は、リン酸化した MAPK に結合する。

これらエフェクターに GFP を連結して、その局在について顕微鏡下で観察した。その結果、いずれも原形質膜近傍に存在することが示された。次に、5つのエフェクターの植物相互作用因子を探索する目的で Y2H を試みた。しかしながら、これらエフェクターを形質転換した酵母細胞の増殖能が著しく阻害された結果、Y2H の結果が得られることはなかった。今後は、免疫沈降など、他の手法を用いて候補エフェクターの標的因子を探索する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 Chikami, Y., Kawaguchi, H., Suzuki, T., Yoshioka, H., Sato, Y., Yaginuma, T. and Niimi, T.	4. 巻 94
2. 論文標題 Oral RNAi of diap1 results in rapid reduction of damage to potatoes in <i>Henosepilachna vigintioctopunctata</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pest Science	6. 最初と最後の頁 505-515
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10340-020-01276-w	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 吉岡博文・吉岡美樹・鳴坂義弘・鳴坂真理・大高剛史・上田真澄	4. 巻 5
2. 論文標題 ナノ粒子による植物免疫システムの誘導と病害防除戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 75-79
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 -

1. 著者名 Chikami, Y., Kawaguchi, H., Suzuki, T., Yoshioka, H., Sato, Y., Yaginuma, T. and Niimi, T.	4. 巻 94
2. 論文標題 Oral RNAi of diap1 results in rapid reduction of damage to potatoes in <i>Henosepilachna vigintioctopunctata</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pest Science	6. 最初と最後の頁 505-515.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10340-020-01276-w	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 吉岡博文・吉岡美樹・鳴坂義弘・鳴坂真理・大高剛史・上田真澄	4. 巻 5
2. 論文標題 ナノ粒子による植物免疫システムの誘導と病害防除戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 75-79.
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日野雄太・岡本溪太・稲田太一・吉岡美樹・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 ROSセンサータンパク質は植物病原糸状菌に対する抵抗性を正に制御する
3. 学会等名 植物微生物研究会 第30回研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日野雄太・岡本溪太・稲田太一・吉岡美樹・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 Mining for ROS sensor proteins involved in plant immune response
3. 学会等名 The Institute of Plant Science and Resources (IPSR), International Plant Web Forum 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日野雄太・岡本溪太・稲田太一・吉岡美樹・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 ROS センサータンパク質の候補である GLR は植物免疫応答に関与する
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会関西西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日野雄太・岡本溪太・稲田太一・吉岡美樹・近藤竜彦・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 ROS センサータンパク質は標的システインに依存して植物免疫応答を正に制御する
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉岡美樹・田中達己・尾中南海・荒川花子・別役重之・多田安臣・鳴坂真理・鳴坂義弘・上田真澄・大高剛史・安達広明・吉岡博文
2. 発表標題 サリチル酸とジャスモン酸シグナルの拮抗作用を反映するバイオセンサーの構築
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>経口投与による RNA 干渉法を用いた害虫の早期食害停止の誘発に成功 https://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20200925_agr1.pdf</p>
--

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
研究分担者	近藤 竜彦 (Kondo Tatsuhiko) (30362289)	名古屋大学・生命農学研究科・講師 (13901)	

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