

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14856

研究課題名（和文）植物サイトカインによる免疫システムの解明

研究課題名（英文）Analysis of the rice immune system regulated by phyto cytokines

研究代表者

深田 史美（Fukada, Fumi）

岡山大学・資源植物科学研究所・特任助教

研究者番号：80740414

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：植物は緻密な免疫系を備えており、病原体を認識後、内因性のホルモン様ペプチド「植物サイトカイン」を分泌し、自身の免疫反応を調整する。植物サイトカインは極微量で細胞間の情報伝達を担うため、その分子的な機能解析が期待されるが、現在はシロイヌナズナにおける研究が中心であり、イネにおける植物サイトカインの報告はほぼない。本研究では、いもち病菌感染時に、イネが分泌する植物サイトカイン RALF7に着目し、RALF7ペプチドがキチン誘導性の免疫反応を増強すること、それがRALF7特異的受容体を介して行われる事を明らかにした。さらに、RALF7-受容体ペアの下流で制御される遺伝子候補の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、穀物でほぼ未知であった植物サイトカインの作用機序に着目し、イネにおける植物サイトカイン RALF7とその受容体の同定による免疫制御機構を明らかにすることで、学術的に重要な知見を得た。植物サイトカインは微量で生理活性を示すことから、その有効性が期待されるが、実際にRALF7ペプチド処理により、イネは直ちに免疫応答を活性化させ、植物病原菌に対する抵抗性に寄与することが明らかとなった。このことから、本研究を基盤に、生理活性の高いRALF7ペプチドの開発、効率的なペプチドの合成系、圃場での有効性が確立できれば、RALF7ペプチドを用いた穀物の耐病性の向上が期待される。

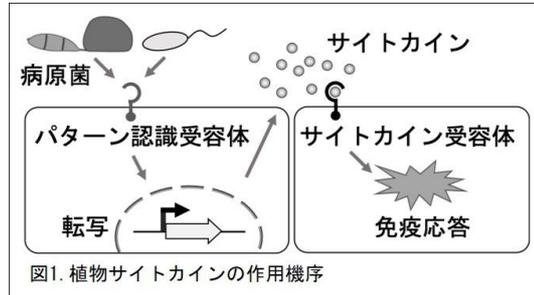
研究成果の概要（英文）：Plants regulate the immunity through secretion of phyto cytokines, endogenous hormone-like peptides, after recognition of the plant pathogen invasion. The functional characterization of phyto cytokines can be beneficial for agronomical usage because many phyto cytokines studied so far are highly active at a low concentration and play important roles in the regulation of plant development, reproduction, immunity, and adaptation to environmental stresses. However, the mode of action of phyto cytokines in crops are largely lacking. In this study, we functionally characterized the mechanism on how phyto cytokine RALF7 in rice regulates immunity after infection of rice blast fungus. We showed that RALF7 induces chitin-triggered immunity through its specific receptor. The candidate genes that are regulated by RALF7-receptor pair were also identified by RNAseq analysis.

研究分野：植物病理学

キーワード：ペプチド RALF イネ 免疫 イネいもち病菌 ROS

1. 研究開始当初の背景

植物は緻密な免疫システムを備えており、膜貫通型のパターン認識受容体で病原体を認識すると耐病性反応が速やかに誘導される(図1)。その耐病性反応の一つとして重要な役割を果たすのが内因性ホルモン様ペプチドの一種である「植物サイトカイン」である。植物は病原菌を感知して植物サイトカインを分泌すると、植物サイトカイン受容体を介して自律的、非自律的に作用して迅速な免疫応答を引き起こす(図1)。



パターン認識受容体の研究と比較して、植物サイトカインとその受容体の解析は遅れており、現在のところRALFやPSKなどの限られたペプチドファミリーしか報告例がない。さらに、植物サイトカインの研究はシロイヌナズナが中心であり、イネにおいて植物サイトカインとその免疫応答を報告した例はほとんどない。そのため、「植物サイトカインが制御する下流のシグナル伝達機構」は、植物免疫分野における重要課題の一つである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、イネが病原菌を認識後に、顕著に発現が誘導される植物サイトカインRALF7の免疫制御機構を解明する事である。近年、申請者の所属する研究室で、イネにおける新規サイトカインを同定するために、マルチオミクスを利用した分泌ペプチド同定法を開発した。これにより、イネが病原菌を認識後、236個もの分泌ペプチドが発現誘導されることを見出した。そのうち、最も顕著に発現が誘導される植物サイトカインRALF7が免疫を正に制御する分子であることを世界に先駆けて明らかにし、その受容体の単離にも成功した。そこで、本研究ではRALF7がRALF7特異的受容体を介して免疫を制御する機構の解明に迫る。

3. 研究の方法

本研究では、イネが病原菌感染後に分泌する植物サイトカインRALF7の免疫制御機構を明らかにするために、以下の4点を中心として研究を遂行した。

(1) RALF7ペプチドが誘導するイネの免疫応答の解析

合成RALF7ペプチドと、イネの培養細胞およびリーフディスクを用いて、ROS(活性酸素種)の産生および防御応答遺伝子の発現変動をqPCRにより解析する。また、RALF7欠損体を作製し、糸状菌の細胞壁構成成分であるキチンを処理して、野生株と比較してキチン応答が低下するかを解析する。

(2) RALF7受容体の同定

先行研究にて、RALF7の受容体として受容体候補Aが単離されている。そこで受容体候補Aの欠損体を取得し、培養細胞の系を用いて、RALF7ペプチドによって誘導されるROSの産生、防御応答遺伝子の発現上昇が変化するかを解析する。また、受容体候補Aの欠損体を用いて、イネの重要病原菌であるイネいもち病菌を接種し、病原菌への抵抗性反応を解析する。

(3) RALF7とパターン認識受容体、受容体様細胞質キナーゼとの関与の解析

キチンを受容するパターン認識受容体であるCERK1、その下流の受容体様細胞質キナーゼであるBSR1の欠損体入手し、培養細胞を作成してRALF7ペプチドを添加し、ROSの産生および防御応答遺伝子の発現変動を解析する。

(4) 大規模 RNAseq 解析による RALF7 ペプチド-受容体ペアの下流因子の探索

野生株および受容体候補 A 欠損体のイネ培養細胞に対して、RALF7 ペプチドを処理して経時的なサンプリングを行い、RNAseq により発現変動遺伝子の解析を行う。なお、本解析は先端ゲノム支援の助成を受けて行われた。

4. 研究成果

(1) RALF7 ペプチドが誘導するイネの免疫応答の解析

合成 RALF7 ペプチドを用いて、RALF7 が誘導するイネの免疫応答を解析した。イネの培養細胞に合成 RALF7 ペプチドを処理すると、典型的な PTI 反応として、ROS (活性酸素種) の産生および防御応答遺伝子の発現上昇が認められた。そこで、RALF7 の欠損体にキチンを処理したところ、野生株と比較して、ROS の産生および防御応答遺伝子の発現が低下した。培養細胞と植物体とで、エリシターに対する反応性が異なる場合も報告されているため、イネ葉から作製したリーフディスクを用いた解析も同様に行った。その結果、培養細胞の結果と同様に、RALF7 とキチンの同時処理により、キチン単独処理と比較して ROS 産生が顕著に増加し、RALF7 欠損体では、キチン処理による ROS 産生が低下した。このことから、RALF7 は ROS の産生および防御応答遺伝子の発現を介して、免疫応答を正に制御することが明らかとなった。

(2) RALF7 受容体の同定

先行研究では RALF7 の受容体として、受容体候補 A が単離されており、プルダウンアッセイから RALF7 と受容体候補 A が結合する事が示されている。そこで、受容体候補 A の欠損体を用いて、受容体候補 A が RALF7 の受容体として機能するかを解析した。培養細胞の系にて、RALF7 ペプチドによって誘導される免疫反応 (ROS の産生、防御応答遺伝子の発現上昇) の変化を調べたところ、受容体候補 A 欠損体では野生株と比較して、これらの免疫応答が顕著に低下していた。さらに、受容体候補 A の欠損体では、いもち病菌への抵抗性が顕著に低下した。よって、受容体候補 A が RALF7 の受容体であると分子遺伝学的にも確かめられた。

(3) パターン認識受容体、受容体様細胞質キナーゼと RALF7 との関与の解析

RALF7 ペプチドが PTI 反応を誘導することから、この反応には既知のパターン認識受容体に関わると考えられた。キチンのパターン認識受容体である CERK1、その下流の受容体様細胞質キナーゼである BSR1 に着目し、これらの欠損体の培養細胞に RALF7 ペプチドを添加したところ、CERK1 および BSR1 欠損体では野生株と同程度の ROS 産生が認められた。よって、RALF7 ペプチドが誘導する PTI において CERK1 および BSR1 は重要な役割を果たす因子ではないと考えられた。

(4) 大規模 RNAseq 解析による RALF7 ペプチド-受容体ペアの下流因子の探索

RALF7 ペプチド-受容体ペアの下流因子の探索を目的として、RNAseq 解析を用いて、RALF7 ペプチド処理により誘導される発現変動遺伝子群の解析を行った。その結果、RALF7 ペプチド-受容体ペアの下流では、特に細胞壁構成成分の代謝経路に参与する遺伝子群、耐病性関連の遺伝子群、カルシウムシグナルに関連する遺伝子群が発現変動している事が示された。

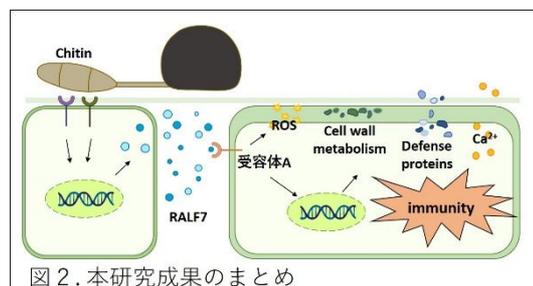


図 2. 本研究成果のまとめ

本研究成果のまとめを図 2 に示す。

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 1件）

1. 著者名 深田史美、Guo Ting、Wng Pingyu、河野洋治	4. 巻 第56号
2. 論文標題 植物-病原系状菌相互作用における分泌タンパク質・ペプチドの解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本植物病理学会植物感染生理談話会論文集 (ISSN 1345-8086)	6. 最初と最後の頁 45-54
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 Akamatsu Akira, Fujiwara Masayuki, Hamada Satoshi, Wakabayashi Megumi, Yao Ai, Wang Qiong, Kosami Ken-ichi, Dang Thu Thi, Kaneko-Kawano Takako, Fukada Fumi, Shimamoto Ko, Kawano Yoji	4. 巻 62
2. 論文標題 The small GTPase OsRac1 forms two distinct immune receptor complexes containing the PRR OsCERK1 and the NLR Pit	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1662 ~ 1675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab121	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 該当する

1. 著者名 Jing Zihuan, Wacera W. Fiona, Takami Tsuneaki, Takanashi Hideki, Fukada Fumi, Kawano Yoji, Kajiya-Kanegae Hiromi, Iwata Hiroyoshi, Tsutsumi Nobuhiro, Sakamoto Wataru	4. 巻 11
2. 論文標題 NB-LRR-encoding genes conferring susceptibility to organophosphate pesticides in sorghum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19828 ~ 19828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98908-7	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 6件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 深田 史美、Ting Guo、藤井 巳芳子、小西 直美、Falk-Fooken Decker、Pingyu Wang、西村 秀希、小野 奈津子、河野 洋治
2. 発表標題 イネいもち病菌はイネ由来のRALFペプチドを認識して付着器形成を誘導する
3. 学会等名 令和6年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 深田 史美
2. 発表標題 イネの免疫を制御するRALFペプチドの機能解析
3. 学会等名 第39回資源植物科学シンポジウム及び第15回植物ストレス科学研究シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 深田史美, Ting Guo, Pingyu Wang, 河野洋治
2. 発表標題 植物-病原糸状菌相互作用における分泌タンパク質・ペプチドの解析
3. 学会等名 令和4年度植物感染生理談話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深田史美, Nicole Rossel, Timo Glatzer, Karin Muench, Petra Happel, Regine Kahman
2. 発表標題 A secreted virulence effector protein of the biotrophic fungal plant pathogen <i>Ustilago maydis</i>
3. 学会等名 第96回日本細菌学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 深田史美, Ting Guo, Wang Wanqing, 西村秀希, 小野奈津子, 水口洋平, 豊田敦, 古田智敬, 河野洋治
2. 発表標題 イネ免疫を制御するRALFファミリーペプチドの機能解析
3. 学会等名 令和4年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深田史美
2. 発表標題 植物-病原糸状菌相互作用における分泌タンパク質・ペプチドの機能解析
3. 学会等名 第52回岡山植物病理セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深田史美
2. 発表標題 病原菌に対する植物の分泌ペプチドを介した防御戦略
3. 学会等名 令和3年度女性研究者シーズ発信会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深田史美、Ting Guo、Wang Wanqing、西村秀希、小野奈津子、水口洋平、豊田敦、古田智敬、河野洋治
2. 発表標題 A secreted RALF peptide modulates rice immune response upon Magnaporthe oryzae infection
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深田史美、Ting Guo、Wang Wanqing、西村秀希、小野奈津子、水口洋平、豊田敦、古田智敬、河野洋治
2. 発表標題 植物-病原糸状菌相互作用における分泌タンパク質・ペプチドの解析
3. 学会等名 令和4年度（第56回）植物感染生理談話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学資源植物科学研究所 植物免疫デザイングループ ホームページ
https://www.rib.okayama-u.ac.jp/plant_design/

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