

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580066

研究課題名(和文)植物のフォスファチジン酸合成の人為的コントロールによる耐病性付与に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of conferred disease resistance by artificial control of phosphatidic acid metabolism in plants

研究代表者

木場 章範 (Kiba, Akinori)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号：50343314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：タバコ植物 *Nicotiana benthamiana* をモデル植物として、植物の自然免疫誘導機構の概要を明らかにしてきた。その結果、フォスファチジン酸代謝に関わる DS1 は親和性の病原細菌、青枯病に対して発揮される基礎的抵抗性にかかわることを明らかにした。一方で、フォスファチジン酸キナーゼは植物免疫の制御に関与しないことを示した。また、フォスファチジン酸の下流で働く情報伝達因子として、ジャスモン酸、活性酸素代謝が関わることを明らかにした。また、DS1 発現抑制形質転換タバコ、トマトの作製、DS1 遺伝子変異体シロイヌナズナの本系統も単離できた。DS1 遺伝子プロモーターの単離に成功した。

研究成果の概要(英文)：DS1 plants that showed accelerated defense responses in response to compatible *Ralstonia solanacearum* infection. We analyzed activation mechanisms of defense responses in DS1 plants. DS1 plants showed hyper induction of hypersensitive response and reactive oxygen species generation. Acceleration of HR and ROS was closely associated with enhanced phosphatidic acid contents. We created DS1-knockdown transgenic tobacco, that showed resistance against *R. solanacearum*. We also created DS1-knockdown transgenic tomato. In addition, we screened DS1-deficient mutant of *Arabidopsis*. Therefore, we will analyze immune response using DS1-knockdown tobacco and tomato, and DS1-deficient *Arabidopsis*. In addition, we successfully isolated promoter region of DS1 gene, and we started promoter analysis of DS1 gene.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物 免疫 フォスファチジン酸 耐病性

## 1. 研究開始当初の背景

植物—病原体相互作用における防御応答時にリン脂質代謝が変化し、シグナルリン脂質であるフォスファチジン酸 (PA) やジアシルグリセロールの蓄積が起こる。また、リン脂質代謝酵素であるフォスホリパーゼ C および D が免疫応答の誘導に関与していることが報告されている。しかしながら、植物の病害感受化・受容化過程における植物のリン脂質代謝の変化や役割、関与に関しては未知な部分が多い。さらに、病原体による免疫抑制機構とリン脂質代謝の関係については情報が皆無である。これまでに、PA の蓄積が植物免疫応答の ON に、PA の消去が植物免疫の OFF に関与すること。植物病原体は植物の PA 分解をすることにより、感染していることを示してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、PA を介した植物免疫誘導機構の解明と、PA 蓄積量を人為的に上昇させることによる植物免疫の亢進と耐病性の付与の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### PAP 遺伝子抑制形質転換植物の作製

CaMV 由来 35S プロモーターの下流にヘアピン構造の RNA を発現する (RNAi コンストラクト) ように PAP 遺伝子を挿入する。アグロバクテリウムを介して形質転換 *Nicotiana tabacum* (普通タバコ) およびトマトを作成する。PAP 遺伝子抑制形質転換植物および対照植物に病原体を接種し、病原体の増殖、発病、防御関連遺伝子の発現を解析する。シロイヌナズナの PAP 遺伝子の欠損変異体を選抜し、耐病性を解析する。

### PA キナーゼ (PAK) の機能解析

シロイヌナズナの PAK 遺伝子をもとに、BLAST データベースより植物由来の PAK 遺伝子を検索する。植物 PAK 遺伝子の共通

保存配列をもちいて作成したデジェネレートプライマーを用いた PCR によって *N. benthamiana* 由来の PAK 遺伝子を単離する。ウイルス誘導遺伝サイレンシング植物を用いて耐病性検定を行う。

### PAP プロモーター活性を指標とした受容性情報伝達系の解明

PAP の発現が病原性青枯病菌、およびタバコ野火病菌の感染時に特異的に誘導される。そこで、*N. benthamiana* ゲノムより PAP のプロモーター (PAP-P) 領域をインバース PCR 法によって単離する。レポーター遺伝子 (GUS) との融合遺伝子を作製する。本融合遺伝子をアグロバクテリウムを介して、遺伝子導入した形質転換タバコ植物 (PAP-P 植物) を作製する。レポーター遺伝子の活性を指標に、PAP を誘導能を有する因子の解析を行う。

## 4. 研究成果

### PAP 遺伝子抑制形質転換植物の作製

PAP 遺伝子抑制形質転換タバコ、トマト植物を作製した。タバコに関しては 10 系統、トマトについては 5 系統の形質転換植物を得た。タバコ 10 系統のうち 3 系統で青枯病菌の増殖が抑制される傾向がみられた。トマト植物に関しては T3 ホモの種子を採取中である。また、シロイヌナズナの PAP 遺伝子の欠損変異体についてはホモ系統を得たので、現在耐病性検討を進めている。

### PA キナーゼ (PAK) の機能解析

PAK サイレンシング植物を用いて耐病性検定を行ったところ、対照植物と比較して顕著な影響は認められなかった。PAK の植物免疫制御への関与は低いと考えた。

### PAP プロモーター活性を指標とした受容性情報伝達系の解明

*N. benthamiana* ゲノムより PAP のプロモーター (PAP-P) 領域を単離し、レポーター遺伝子 (GUS) との融合遺伝子を導入した形質転換タバコ植物 (PAP-P 植物) を作製中であ

る。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Makoto Ito, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, Akinori Kiba Molecular chaperons and co-chaperons, Hsp90, RAR1, and SGT1 negatively regulate bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in *Nicotiana benthamiana*. Plant signaling & behavior, 2014, DOI: 10.4161/15592316.2014.970410. 査読有

Akinori Kiba, Ivan Galis, Yuko Hojo, Kouhei Ohnishi, Hirofumi Yoshioka, Yasufumi Hikichi. SEC14 phospholipid transfer protein involve in lipid signaling-mediated plant immune response in *Nicotiana benthamiana*. PLOS ONE, 2014, 9: e98150. 査読有

Masahito Nakano, Masahiro Hirofumi Yoshioka, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, Akinori Kiba. Silencing of DS2 aminoacylase-like genes confirms basal resistance to *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. Plant signaling & behavior, 2014, 10: 9: e28004. 査読有

Masahito Nakano, Masahiro Nishihara, Hirofumi Yoshioka, Hirotaka Takahashi, Tatsuya Sawasaki, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, Akinori Kiba Suppression of DS1 phosphatidic acid phosphatase confirms resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Nicotiana benthamiana*. PLoS One, 2013, 8, e75124. 査読有

Daisuke Komori, Masahiro Nishihara, Akiko Takahashi, Meenu Gupta, Hirofumi Yoshioka, Hiroyuki Mizumoto, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, Akinori Kiba. Isolation and characterization of an

asparagine-rich protein that regulates hypersensitive cell death-mediated resistance in *Nicotiana* plants. Plant Biotechnology, 2012, 292-300. 査読有

Akinori Kiba, Masahito Nakano, Patrick Vincent-Pope, Hirotaka Takahashi, Tatsuya Sawasaki, Yaeta Endo, Kouhei Ohnishi, Hirofumi Yoshioka, Yasufumi Hikichi. Novel Sec14 phospholipid transfer protein from *Nicotiana benthamiana* up-regulated in response to *Ralstonia solanacearum* infection, pathogen associated molecular patterns and effector molecules and involved in plant immunity. Journal of Plant Physiology, 2012, 1017-1022. 査読有

Ken-Taro Sekine, Reiko Tomita, Shigeharu Takeuchi, Go Atsumi, Hiromasa Saitoh, Hiroyuki Mizumoto, Akinori Kiba, Naoto Yamaoka, Masamichi Nishiguchi, Yasufumi Hikichi and Kappei Kobayashi. Functional differentiation in the LRR domains of closely related plant virus resistance proteins that recognize common Avr proteins, Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012 25, 1219-1229. 査読有

Akinori Kiba, Takashi Nakatsuka, Saburo Yamamura, Masahiro Nishihara Gential lipid transfer protein homolog with antimicrobial properties confers resistance to *Botrytis cinerea* in transgenic tobacco. Plant Biotechnology, 2012, 95-101. 査読有

Meenu Gupta, Hirofumi Yoshioka, Kouhei Ohnishi, Hiroyuki Mizumoto, Yasufumi Hikichi, Akinori Kiba. A Translationally Controlled Tumor Protein Negatively Regulates the Hypersensitive Response in *Nicotiana benthamiana*. Plant Cell Physiol, 2012, 54: 1403-1414. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

Kiba A, Nakano M, Ohnishi K, Hikichi Y.

Phosphatidic acid participates in regulation of plant immune responses in *Nicotiana benthamiana*. 第3回日韓植物病理学会合同シンポジウム 2014, 10/23-24 釜山市、Pukyong National University、大韓民国

木場章範、中野真人、吉岡博文、大西浩平、曳地康史

DS1-フォスファチジン酸フォスファターゼ抑制植物における植物免疫活性化機構の解析 植物脂質シンポジウム 2014, 11/29-30 静岡市、静岡市産学交流センター

Phosphatidic acid participates in regulation of plant immune responses. 日本細菌学会 2014, 3/26-28 東京都、タワーホール船堀

木場章範、夏目瑞紀、與那原由貴、中野真人、吉岡博文、大西浩平、曳地康史 植物免疫応答におけるフォスファチジン酸生合成経路の役割 植物脂質シンポジウム 2013, 9/15-16 札幌市、北海道大学

Akinori Kiba Phosphatidic acid participates in regulation of plant immune responses. Asian Symposium of Plant Lipids 2013, 11/29-12/1, 光州市、金大中コンベンションセンター、大韓民国

木場章範、中野真人、吉岡博文、水本祐之、大西浩平、曳地康史 フォスファチジン酸を介した植物免疫応答 植物脂質シンポジウム 2012, 11/30-12/1 神戸市、甲南大学

Kiba, A., Ohnishi, K., Yoshioka, H., Hikichi, Y. A sec14P phospholipids transfer protein regulates plant immunity in *Nicotiana* plants. 2012 International Congress of Molecular Plant-Micorbe Interactions. 2012, 7/29-8/2 京都市、京都国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木場章範 (KIBA Akinori)

高知大学教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号: 50343314

### (2) 研究分担者

曳地康史 (HIKICHI Yasufumi)

高知大学教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号: 70291507

大西浩平 (OHNISHI Kouhei)

高知大学教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号: 50211800

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: