

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850073

研究課題名(和文) ジャスモン酸/エチレン経路を活性化する植物免疫活性化剤の創製とその作用機構の解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of novel plant defense activators

研究代表者

北畑 信隆 (KITAHATA, NOBUTAKA)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：10435646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ジャスモン酸・エチレン経路に作用する新規の植物免疫活性化剤を選抜するため、活性酸素種生成を指標とした化合物スクリーニング系を構築した。構築した選抜系を用いて、市販の合成化合物を対象としてスクリーニングを行った結果、56の候補化合物を選抜した。化合物の活性酸素種の誘導機構について調べた結果、選抜した化合物の中に既存の植物免疫活性化剤とは異なる作用を示す化合物が含まれていた。

研究成果の概要(英文)：Priming plays an important role in plant defense. Priming state is induced by primary infection with pathogen and elicits strong resistance against secondary pathogen attack. Plant activator is chemical that induces the priming state in noninfected plants. Compared with bactericide and insecticide, plant activators have advantage of avoidance of drug-resistance pathogen and protection of microbes in the field.

We established a new high-throughput screening method to identify novel lead compounds for plant activator. From a total of 10,000 compounds screened, we selected 58 candidates for plant activator. The selected compounds enhanced the expression of defense-related genes in Arabidopsis. Furthermore, we examined the effects of the compounds on reactive oxygen species (ROS) production in SA biosynthesis or signal transduction mutants.

研究分野：生物有機化学

キーワード：植物免疫活性化剤

1. 研究開始当初の背景

(1) 病原菌や害虫から農作物を守るために、農薬は現代農業に欠かすことができない。農薬として主に殺菌剤、殺虫剤が使用されているが、これらの農薬の継続的な使用には、圃場の生物相の破壊や耐性菌の出現など克服すべき課題がある。植物免疫活性化剤は植物の免疫を亢進する作用を持つ薬剤である。既存農薬の問題点を克服可能な薬剤として注目されている。これまでにプロベナゾール、チアジニル、イソチアニルなど数種の植物免疫活性化剤がイネいもち病の防除剤として市販されている。植物の免疫経路にはイネいもち病などのバイオトロフ(生きた植物から栄養を奪う菌)に対する抵抗性を誘導するサリチル酸経路と灰色カビ病などのネクロトロフ(植物を殺して、死んだ細胞から栄養を奪う菌)に対する抵抗性を誘導するジャスモン酸・エチレン経路が知られている。既存の植物免疫活性化剤は、いずれもサリチル酸経路を亢進する作用を持つ薬剤であり、ジャスモン酸・エチレン経路を亢進する薬剤は未だ報告がない。

(2) 研究開始時点で、植物免疫活性化剤はすでに3剤が知られていたが、これらの植物免疫活性化剤は、いずれも化合物を前処理したときの、イネいもち病に対する抵抗性を指標として選抜されてきた。この方法は、イネに対して確実に効果ある化合物がとれる一方で、多種類の化合物を効率よく評価することはできない。また、選抜にイネいもち病菌を用いているため、バイオトロフに対して有効なサリチル酸経路を亢進する薬剤が優先的に選抜されてしまう。

(3) タバコ培養細胞 BY-2 とらん菌由来のタンパク質性エリシターであるクリプトゲインは植物免疫の優れたモデル系として、非常によく研究されている。タバコ培養細胞 BY-2 は、エリシターであるクリプトゲインを認識すると、一連の防御応答を誘導する。具体的には、数秒から数分で、カルシウムイオンや陰イオンの流入や一過的な活性酸素種の生成がおこる。数時間たつと、持続的な活性酸素種の生成や病害応答性遺伝子の発現誘導がおこり、1日後にはプログラム細胞死が起こる。実際の植物体では、このプログラム細胞死により、病原菌の感染が拡大することなく、局所に封じ込められる。持続的な ROS の生成量とその後続く防御応答遺伝子の発現やプログラム細胞死の誘導などの防御応答の強さには強い相関性があることが知られている。

2. 研究の目的

本研究は、これまでに報告のない新規の作用機構を持った植物免疫剤を化合物ライブラリーからスクリーニングすることを目的とし、まず植物免疫活性化剤のスクリーニング系の構築を行った。また、構築したスクリーニング系を用いて、化合物スクリーニングを

行った。さらに、選抜した化合物の作用機構を調べることを目的として、主要な植物免疫経路の欠損変異体へ化合物を処理し、既存の植物免疫活性化剤とその効果を比較した。

3. 研究の方法

研究背景に記載したように、これまでの植物免疫活性化剤のスクリーニング方法では、ジャスモン酸・エチレン経路を亢進する薬剤を選抜することが難しい。そこで、ジャスモン酸・エチレン経路を活性化する化合物を含めて広く植物免疫活性化剤をスクリーニングするために活性酸素を指標とした選抜系を構築した。次に、構築した選抜系を使って、市販のケミカルライブラリーから植物免疫活性化剤の候補化合物を選抜した。選抜した化合物は、サチリル酸経路やジャスモン酸経路が欠損した変異体に処理し、化合物がどちらの経路を亢進する物質であるか評価した。

4. 研究成果

(1) 新規の植物免疫活性化剤のスクリーニング系の構築を行った。化合物スクリーニング系には培養細胞を用いた。培養細胞は均一な細胞の集団であるため、化合物の活性を評価しやすい。タバコ培養細胞 BY-2 はらん菌由来のタンパク質性エリシターであるクリプトゲインを認識すると、非常に明瞭な一連の防御応答が観察されることから、タバコ培養細胞 BY-2 のクリプトゲインに対する応答を指標とすることとした。クリプトゲインにより誘導される一連の防御応答のうち、数時間で起こる持続的な活性酸素種生成は、定量が容易である。また、活性酸素種生成は、バイオトロフな病原菌とネクロトロフな病原菌両方の感染に共通する反応である。これらのことから、クリプトゲイン誘導性の活性酸素を指標した化合物スクリーニング系を構築した(図1)。

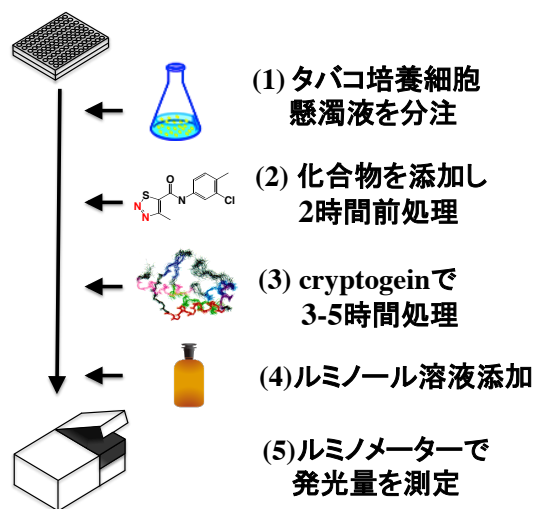


図1. スクリーニング系の構築

(2) この実験系では、処理するクリプトゲインの濃度が植物の防御応答を誘導する濃度より僅かに低く設定しており、化合物に活性

酸素種の亢進活性があれば、容易に選抜できるよう工夫した。同時に防御応答を十分に誘導できる濃度で、化合物により活性酸素種の生成量が増加するかを調べた。これらの工夫により、感受性と強度の両面からより広い範囲の化合物をスクリーニングすることができる。このスクリーニング系で、植物免疫活性化剤の候補化合物を選抜する事が可能か調べるために、既存の植物免疫活性化剤を用いてスクリーニング系の評価を行った。その結果、この手法で、すべての植物免疫活性化剤を選抜することができた。

(3) 構築したスクリーニング系を用いて、市販の 10,000 化合物の中から、植物免疫活性化剤候補化合物の選抜を行った。化合物単独で活性酸素種の生成量を増加しないこと、及びクリプトゲイン誘導性の持続的な活性酸素種生成を亢進するという 2 つの基準で、化合物を評価した結果、65 化合物を植物免疫活性化剤の候補化合物として同定した。65 の化合物には、既存の植物免疫活性化剤と共通する官能基を有しているものばかりでなく、構造的に全く異なる化合物も含まれていた。このことから、本研究で構築したスクリーニング系は目的通り、多様な作用機構を持つ化合物が選抜した可能性が高いと考えられた。

(4) モデル植物のシロイヌナズナで、化合物の効果を評価した。シロイヌナズナは病原体関連分子パターン の 1 種である f1g22 を認識し、一過的な活性酸素種の生成を誘導する。既存の植物免疫活性化剤であるプロベナゾールとベンゾチアジアゾールが、f1g22 誘導性の活性酸素種の生成を亢進するか調べたところ、どちらの化合物も活性酸素の生成量を有意に亢進した。この結果から、植物免疫活性化剤は f1g22 誘導性の活性酸素種生成も亢進することがわかった。そこで、選抜した化合物で、この活性酸素種の生成の対する化合物の効果を調べたところ、約半分の化合物で、活性酸素種の生成量が有意に亢進した。

(5) 次に、化合物の作用機構についての知見を得るために、植物病害応答の主要経路であるサリチル酸経路及びジャスモン酸・エチレン経路の変異体に対する化合物の効果を調べた。サリチル酸経路の変異体として、サリチル生合成変異体の *sid2*、サリチル酸代謝酵素 NarG の過剰発現変異体、サリチル酸シグナル伝達因子 *npr1* 変異体を用いた。また、ジャスモン酸・エチレン経路の変異体として、ジャスモン酸を活性本体であるジャスモン酸イソロイシンに変換する *jar1* の欠損変異体、及びジャスモン酸受容体 *coil* の変異体を用いた。既存の植物免疫活性化剤プロベナゾールとベンゾチアジアゾールはそれぞれ、サリチル酸生合成経路の SID2 の上流、サリチル酸シグナル伝達経路の NPR1 の上流に作用して植物の病害抵抗性を亢進することが知られている。初期の応答である活性酸素種の生成も、サリチル酸経路の活性を介しているのか確認するために、*sid2*、*npr1* の変異体

に化合物処理を行ったところ、プロベナゾール、ベンゾチアジアゾールともに *npr1* 変異体では活性酸素種の生成を亢進しなかった(図 2)。一方、選抜した化合物のうち、少なくとも 2 種の化合物では *npr1* においても活性酸素種の生成量が亢進した(図 3)。これらの結果は、化合物が既存の植物免疫活性化剤とは異なる作用機構を有する可能性を示している。

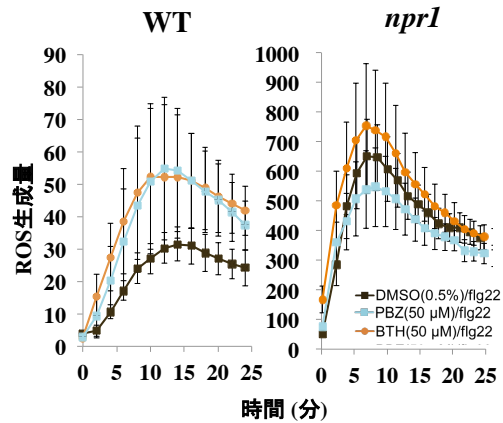


図2. 既知免疫活性化剤の効果

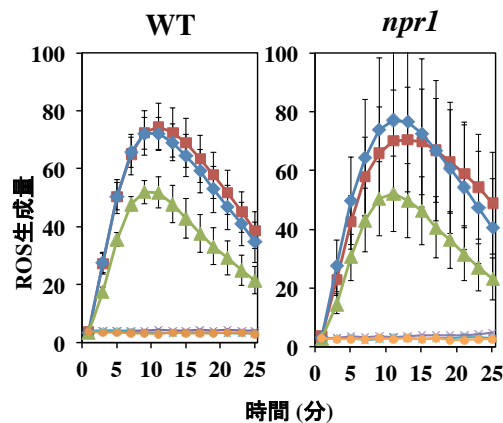


図3. 選抜した候補化合物の効果

## 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 1 件)

Kurusu T, Koyano T, Hanamata S, Kubo T, Noguchi Y, Yagi C, Nagata N, Yamamoto T, Ohnishi T, Okazaki Y, Kitahata N, Ando D, Ishikawa M, Wada S, Miyao A, Hirochika H, Shimada H, Makino A, Saito K, Ishida H, Kinoshita T, Kurata N, Kuchitsu K. "OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development." *Autophagy* 10, 878-888 (2014) doi: 10.4161/auto.28279 査読有

[学会発表] (計 8 件)

① 北畑信隆 他、「エチレン様活性物質の作

用機構の解析」日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27 日～3 月 30 日、札幌コンベンションセンター(北海道)

② 北畑信隆 他、「新規植物免疫活性化剤の作用機構の解析」日本農薬学会第 41 回大会、2016 年 3 月 17 日～3 月 19 日、島根大学(島根)

③ 北畑信隆 他、「活性酸素種の積極的生成を指標とした新規植物免疫制御剤の探索と作用機構の解析」日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 6 日～2015 年 9 月 8 日、新潟コンベンションセンター(新潟)

④ 北畑信隆 他、「植物免疫の化学制御」公開シンポジウム「アグリバイオへの理工学的なアプローチを目指して」、2015 年 7 月 17 日、東京理科大学(東京)

⑤ 北畑信隆 他、「新規植物免疫制御剤の作用機構の解析」、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月 29 日～3 月 31 日、明治大学(東京)

⑥ 北畑信隆 他、「新規植物免疫制御剤の作用機構の解析」、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 26 日～3 月 29 日、岡山大学(岡山)

⑦ 北畑信隆 他、「植物免疫活性化剤の探索と作用機構の解析」、日本農薬学会第 40 回大会、2015 年 3 月 18 日～3 月 20 日、玉川大学(東京)

⑧ 北畑信隆 他、「植物免疫制御剤の作用機構の解析」、植物化学調節学会第 49 回大会、2014 年 10 月 18 日～10 月 19 日、京都大学(京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北畑 信隆 (KITAHATA, Nobutaka)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：10435646