

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07665

研究課題名(和文)ペルオキシソームの酸化系を介したサリチル酸合成経路の構成因子とその転写制御機構

研究課題名(英文) Genes and their transcriptional regulation in salicylic acid biosynthesis mediated by peroxisomal beta-oxidation

研究代表者

加藤 新平 (Katou, Shinpei)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：10533614

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)：サリチル酸(SA)は植物の病害抵抗性において重要な役割を果たす情報伝達物質である。本研究では、タバコおよびベンサミアナタバコを実験材料に用いて、主に以下の2点を明らかにした。(1) 過敏感反応時に発現が誘導される2種類の酵素の遺伝子やペルオキシソームの酸化を触媒する酵素の遺伝子が、病原体シグナルに応答したSA合成に必要なことを明らかにした。(2) 2種類のCBP60型の転写因子が、(1)で同定したSA合成関連遺伝子の病原体シグナルに応答した発現に必要なことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、安全で耐性菌の出現しにくい次世代型の農薬として、植物の病害抵抗反応を誘導することにより病害を予防する“プラントアクティベーター農薬”が注目されている。しかしながら、プラントアクティベーター農薬の開発は難易度が高く、実際に登録されている化合物は数種類に過ぎない。本研究で同定されたSA合成に必要な酵素の基質(SAの前駆化合物)等が明らかになれば、プラントアクティベーター農薬の開発に利用可能であると期待される。

研究成果の概要(英文)：Salicylic acid (SA) plays an important role in plant resistance to pathogens. In this study, using tobacco and *Nicotiana benthamiana* as experimental materials, we had two main findings described below. (1) Two enzyme genes induced during hypersensitive responses and genes encoding peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes are required for SA production induced by a pathogen-derived signal. (2) Two CBP60-type transcription factors are required for expression of genes described in (1) induced by a pathogen-derived signal.

研究分野：植物病理学

キーワード：病害抵抗性 サリチル酸 生合成 ペルオキシソーム 酸化

## 1. 研究開始当初の背景

サリチル酸 (SA) は病原体ストレスにより誘導される植物の情報伝達物質であり、病害抵抗性において不可欠な役割を果たす。SA の合成経路には不明な点が多いが、コリスミ酸を出発点とし、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) を介する経路とイソコリスミ酸合成酵素 (ICS) を介する経路が提唱されていた (図 1A)。タバコやイネ等においては、SA は PAL を介した経路で合成されると考えられてきた (引用文献 等)。一方、シロイヌナズナにおいては、ICS をコードする *AtICS1* の発現量が SA の蓄積と相関すること、および *AtICS1* を欠損する変異体の SA 蓄積量が減少することから (引用文献 )、SA は ICS を介して合成されると考えられてきた。しかしながら、PAL の多重変異体においても SA 蓄積量が減少することが明らかになり (引用文献 )、両方の経路で SA が合成される可能性も示唆されていた。また、いずれの植物種においても、PAL により合成されたケイ皮酸あるいは ICS により合成されたイソコリスミ酸が SA に変換される機構は不明であった。

病傷害応答性 MAP キナーゼである WIPK と SIPK の発現を抑制したタバコ (WIPK/SIPK 抑制体) においては、SA の合成が傷害により誘導される (引用文献 )。申請者らは、WIPK/SIPK 抑制体における傷害誘導性の SA 合成を、薬剤を用いて同調的かつ強力に誘導できる系を開発した (図 1B、引用文献 )。本系を用いて、SA の合成に先行し WIPK/SIPK 抑制体で特異的に誘導される遺伝子をマイクロアレイ解析により網羅的に同定した。同定した遺伝子群から、過剰発現により SA の合成が誘導される遺伝子を探索したところ、CBP60 型の転写因子 (*NtCBP60*) が同定された (図 1B)。シロイヌナズナにおいては、2 種類の CBP60 型転写因子が *AtICS1* の転写を活性化することにより SA の合成に寄与する (引用文献 等)。一方、タバコにおいては、ICS の発現が病原体を接種した野生型植物 (引用文献 ) および傷害を与えた WIPK/SIPK 抑制体 (図 1B) のいずれにおいても誘導されないのに対し、*NtCBP60* の発現はどちらの場合においても SA の蓄積に先行して誘導された。従って、*NtCBP60* は ICS 以外の SA 合成酵素遺伝子の転写を活性化することにより SA の合成を誘導すると考えられた。

*NtCBP60* が誘導する SA 合成遺伝子を同定するため、*NtCBP60* の発現よりも遅く、SA の合成よりも早く、WIPK/SIPK 抑制体で特異的に傷害により誘導され、二次代謝に関与すると予想される酵素遺伝子をマイクロアレイ解析により探索した所、約 44,000 プローブ中 30 プローブ (22 遺伝子) が該当した。該当した遺伝子には、花卉の揮発性ベンゼン化合物の合成に関与する、ケイ皮酸-補酵素 A (CoA) を安息香酸-CoA に変換するペルオキシソームの酸化酵素 (*CL*, *CHD* および *KAT*; 引用文献 等) のホモログや、ケイ皮酸-CoA あるいは安息香酸-CoA を誘導体に変換する酵素 (*HCT* および *HSR201*) が含まれていた。また、その基質は不明であるが、20GD 型の酸化酵素 (*20GD*) および抵抗反応時に誘導される加水分解酵素 (*HSR203J*) も条件に該当した。当時、SA の 3 位を水酸化する酵素ならびにフェルラ酸 (ケイ皮酸の誘導体) の 2 位を水酸化する酵素がいずれも 20GD 型の酸化酵素であることが明らかになっていた (引用文献 等)。一方、*HSR203J* を抑制すると SA 応答のマーカー遺伝子である *PR1a* の病原体に応答した発現が消失することが報告されていた (引用文献 )。

これら 7 種の酵素遺伝子の発現は、病原体を接種した野生型タバコ葉においても SA の合成に相関して誘導された。また、レポーター遺伝子および蛍光タンパク質を用いた解析から、少なくとも *CL*, *KAT*, *20GD*, *HSR201* および *HSR203J* のプロモーターが *NtCBP60* により活性化されること、および *CL*, *CHD*, *KAT* および *HSR201* がペルオキシソームに局在することが明らかになっていた。さらに、*CL* の一過的な過剰発現は低レベルながら単独で SA の蓄積を誘導すると共に、病原体ストレス誘導性の SA 蓄積量を劇的に増加させた。これらの結果は、タバコにおいて SA がケイ皮酸からペルオキシソームの酸化系を介して合成されることを示唆していた。

*NtCBP60* を過剰発現させると SA の蓄積が誘導されることから、*NtCBP60* は上記のペルオキシソームの酸化系を介した SA 合成経路の遺伝子あるいは未知の SA 合成経路の遺伝子の転写を活性化すると考えられた。*NtCBP60* が活性化することが明らかになっていた *CL*, *KAT*, *20GD*, *HSR201* および *HSR203J* のプロモーターには既知の CBP60 型転写因子の認識配列 (GAAATTTTC 等) が存在せず、*NtCBP60* は別の *cis* 配列を認識すると考えられた。これらの知見を基に、本研究では以下の 2 点を明らかにすることを目的とした。

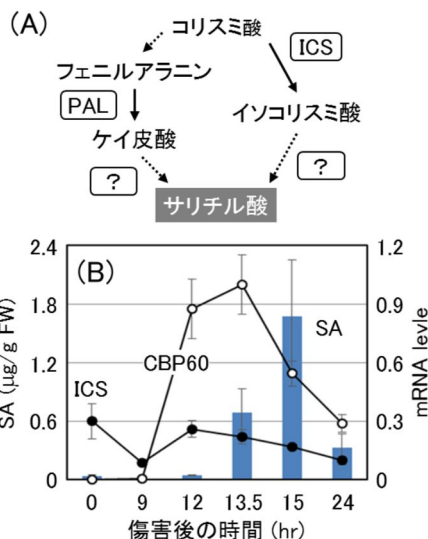


図 1 (A) SA の推定合成経路. (B) WIPK/SIPK 抑制体における SA の蓄積と SA 合成関連遺伝子の発現パターン.

## 2. 研究の目的

### (1) ペルオキシソームの酸化系を介した SA 合成経路の構成因子

本課題では、ペルオキシソームの酸化系の酵素遺伝子を初めとした候補遺伝子が、病原体ストレスに応答した SA の合成に必要なかどうか明らかにするため、ベンサミアナタバコホモログ遺伝子の発現を virus-induced gene silencing (VIGS) により抑制し、SA 合成への影響を調べた。

### (2) NtCBP60 による SA 合成の制御機構

本課題では、NtCBP60 が候補遺伝子プロモーターのどの領域を認識するか同定すると共に、NtCBP60 が同定した領域に結合するかどうか調べた。また、VIGS によるベンサミアナタバコ NtCBP60 ホモログの発現抑制が、病原体ストレスにより誘導される SA 合成や候補遺伝子ホモログの発現を抑制するか調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) ペルオキシソームの酸化系を介した SA 合成経路の構成因子

ベンサミアナタバコホモログ遺伝子の同定および VIGS に用いる領域の選定

各候補遺伝子の塩基配列を用いた BLASTX 解析により、ベンサミアナタバコホモログ遺伝子を Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>) のデータベースから同定した。同定したホモログ遺伝子の塩基配列より、標的遺伝子に特異的だと考えられる領域を Sol Genomics Network の SGN VIGS Tool を用いて選定した。

#### ベンサミアナタバコホモログの発現解析

で同定したホモログ遺伝子が SA の合成と相関して発現することを確認するため、ベンサミアナタバコ葉にジャガイモ疫病菌由来のエリシターである INF1 を処理し、継時的に SA 量と各ホモログ遺伝子の発現量を測定した。SA 量と遺伝子の発現量の測定には、蛍光検出器を備えた HPLC と逆転写-定量的 PCR をそれぞれ用いた。

#### VIGS による発現抑制が SA 合成におよぼす影響

VIGS には最もよく使用されている tobacco rattle virus を使用した (引用文献)。で選定した領域を、で抽出した RNA を鋳型とした逆転写 PCR で増幅した。得られた増幅産物を、ウイルスベクター pTV00 に In-Fusion 法でアンチセンス方向に導入した。作製したウイルスベクターを持つアグロバクテリウムを、pBINTRA6 を持つアグロバクテリウムと混合した後、播種後 3 週間程度のベンサミアナタバコ葉に注入した。注入 2 週間後の上位葉に INF1 を処理し、誘導された SA 量と標的遺伝子の発現量を対照の空ベクターと比較した。

### (2) NtCBP60 による SA 合成の制御機構

NtCBP60 が認識する *HSR203J* プロモーター上の領域の同定

*HSR203J* プロモーターを 5' 側から欠失させた様々な長さの DNA 断片を PCR で調製し、レポーター遺伝子である *GUS* と連結させた。作製した *GUS* レポーター遺伝子を持つアグロバクテリウムを、*NtCBP60* を持つアグロバクテリウムあるいは対照の空ベクターを持つアグロバクテリウムと混合した後、播種後 4~5 週間のベンサミアナタバコ葉に注入した。注入 2 日後の葉よりタンパク質を抽出し、人工基質である 4-MUG を用いて *GUS* 活性を測定した。検量線の作製には濃度既知の 4-MU を、タンパク質濃度の測定には Bradford 法をそれぞれ用いた。

#### NtCBP60 と DNA の結合解析

NtCBP60 の組換えタンパク質を、His タグ融合タンパク質およびタグ無しタンパク質として大腸菌に発現させた。大腸菌より抽出した粗タンパク質画分および粗タンパク質画分より部分精製した組換えタンパク質を、LightShift Chemiluminescent EMSA Kit を用いた Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) に供した。

#### VIGS による発現抑制が SA 合成および候補遺伝子ホモログの発現におよぼす影響

(1)の ~ と同様の手順でベンサミアナタバコの NtCBP60 ホモログの発現を VIGS で抑制し、INF1 処理により誘導される SA 量、標的遺伝子の発現量ならびに候補遺伝子ホモログの発現量が減少するか調べた。

## 4. 研究成果

### (1) ペルオキシソームの酸化系を介した SA 合成経路の構成因子

ベンサミアナタバコホモログ遺伝子の同定および VIGS に用いる領域の選定

候補遺伝子の塩基配列を用いて、ベンサミアナタバコホモログ遺伝子をゲノムデータベースより探索したところ、ほとんどの遺伝子において、2つのホモログ遺伝子が見つかった。これはベンサミアナタバコが異質四倍体であることが原因であり、2つのホモログ遺伝子はそれぞれ

相互に非常によく似ていた。両方の遺伝子が抑制されると予想される領域を選定し、VIGS に用いた。

#### ベンサミアナタバコホモログの発現解析

ベンサミアナタバコ葉にジャガイモ疫病菌由来のエリシターである INF1 を処理した後、継時的に SA の蓄積量とホモログ遺伝子の発現量を測定したところ、HCT のホモログを除く全てのホモログ遺伝子の発現が SA の蓄積に先行して誘導されることが明らかになった。

#### VIGS による発現抑制が SA 合成におよぼす影響

各候補遺伝子ホモログの DNA 断片を持つウイルスをそれぞれベンサミアナタバコに感染させたところ、標的遺伝子の発現が抑制された。また、CHD を抑制した植物および KAT を抑制した植物の大きさが、対照の空ベクターを持つウイルスを接種した植物より小さくなった。CHD と KAT はペルオキシソームの酸化の中心酵素であり、様々な化合物の酸化を介した合成に参与している。CHD および KAT の抑制により植物の成長に必要な化合物の合成が阻害されたと考えられた。それ以外の遺伝子の抑制は植物の形態に明確な影響を及ぼさなかった。

VIGS により標的遺伝子の発現を抑制した植物に INF1 を処理して SA の合成を誘導したところ、CL、CHD、KAT、HSR201 および HSR203J の抑制により、対照の空ベクターより SA の蓄積量が減少した（一例を図 2 に示す）。これらの結果は、ペルオキシソームの酸化系を介して SA が合成されるという仮説を支持した。

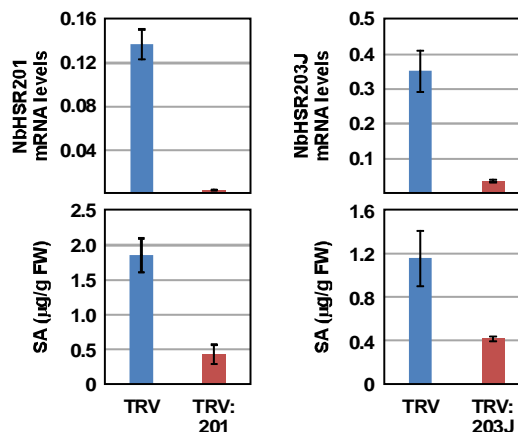


図2 HSR201ホモログ (左) および HSR203Jホモログ (右) の発現抑制は SA 量を減少させる。

#### (2) NtCBP60 による SA 合成の制御機構

##### NtCBP60 が認識する HSR203J プロモーター上の領域の同定

HSR203J プロモーターを 5' 側から欠失させていったところ、NtCBP60 との共発現により、開始コドンより上流 173 塩基を持つコンストラクトの GUS 活性は上昇したが、148 塩基を持つコンストラクトの GUS 活性は上昇しなかった。そのため、NtCBP60 は HSR203J プロモーターの開始コドンより上流 173 番目 ~ 149 番目の 25 塩基を認識すると考えられた。本領域には既知のストレス応答に係る cis 配列は認められなかった。

##### NtCBP60 と DNA の結合解析

で同定した HSR203J プロモーター中の 25 塩基に NtCBP60 が結合するかどうか調べるため、25 塩基を含むオリゴ DNA と NtCBP60 の組換えタンパク質を用いて EMSA 解析を行ったが、オリゴ DNA の長さを変えたり、NtCBP60 の組換えタンパク質を部分精製したりしても両者の結合は確認できなかった。

#### VIGS による発現抑制が SA 合成および候補遺伝子ホモログの発現におよぼす影響

ベンサミアナタバコ葉に INF1 を処理した後、継時的に NtCBP60 のホモログ遺伝子の発現量を測定したところ、2 種類ホモログ遺伝子が SA 合成と相関して誘導されることが明らかになった。INF1 により誘導される SA 量は、VIGS により 2 種類ホモログ遺伝子のどちらか片方を抑制しても減少しなかったが、両方を同時に抑制すると顕著に減少し、両遺伝子は重複的に機能すると考えられた。また、両方の遺伝子を抑制すると、NbHSR201 を初めとした候補遺伝子ホモログの発現量も低下することが明らかになった。

#### < 引用文献 >

- Leon, J., et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10413-10417
- Wildermuth, M., et al. (2001) Nature 414: 562-565
- Huang, J., et al. (2010) Plant Physiol 153: 1526-1538
- Seo, S., et al. (2007) Plant J. 49: 899-909
- Katou, S., et al. (2013) Plant Cell Physiol. 54: 1005-1015
- Zhang, Y., et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 18220-18225
- Ogawa, D., et al. (2006) Plant Biotechnol. 23: 395-398
- Qualley, A.V., et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 16383-16388
- Zhang, K., et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110: 14807-14812
- Tronchet, M., et al. (2001) Plant J. 27: 115-127
- Ratcliff, F., et al. (2001) Plant J. 25: 237-245

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kojima Tomoya, Asakura Nobuhide, Hasegawa Shiori, Hirasawa Taishi, Mizuno Yuri, Takemoto Daigo, Katou Shinpei	4. 巻 19
2. 論文標題 Transcriptional induction of capsidiol synthesis genes by wounding can promote pathogen signal-induced capsidiol synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Plant Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12870-019-2204-1	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 -
1. 著者名 Matsui Hidenori, Iwakawa Hidekazu, Hyon Gang-Su, Yotsui Izumi, Katou Shinpei, Monte Isabel, Nishihama Ryuichi, Franzen Rainer, Solano Roberto, Nakagami Hirofumi	4. 巻 61
2. 論文標題 Isolation of Natural Fungal Pathogens from Marchantia polymorpha Reveals Antagonism between Salicylic Acid and Jasmonate during Liverwort-Fungus Interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 265 ~ 275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcz187	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 Yokoo Shohei, Inoue Seiya, Suzuki Nana, Amakawa Naho, Matsui Hidenori, Nakagami Hirofumi, Takahashi Akira, Arai Ryoichi, Katou Shinpei	4. 巻 38
2. 論文標題 Comparative analysis of plant isochorismate synthases reveals structural mechanisms underlying their distinct biochemical properties	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BSR20171457	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
1. 著者名 Betsuyaku Shigeyuki, Katou Shinpei, Takebayashi Yumiko, Sakakibara Hitoshi, Nomura Nobuhiko, Fukuda Hiroo	4. 巻 59
2. 論文標題 Salicylic Acid and Jasmonic Acid Pathways are Activated in Spatially Different Domains Around the Infection Site During Effector-Triggered Immunity in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 8 ~ 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcx181	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 -

1. 著者名 Rin Soriya, Mizuno Yuri, Shibata Yusuke, Fushimi Mayuka, Katou Shinpei, Sato Ikuo, Chiba Sotaro, Kawakita Kazuhito, Takemoto Daigo	4. 巻 12
2. 論文標題 EIN2-mediated signaling is involved in pre-invasion defense in <i>Nicotiana benthamiana</i> against potato late blight pathogen, <i>Phytophthora infestans</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2017.1300733	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田崎光佑、小守啓友、今野沙弥香、加藤新平
2. 発表標題 サリチル酸合成関連遺伝子の細胞内局在解析および機能解析
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nguyen Thi Tuyet Nhung、高木公美子、加藤新平
2. 発表標題 タバコのCBP60型転写因子により制御される遺伝子の同定
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川詩織、平沢大志、小島知弥、朝倉信英、水野邑里、竹本大吾、加藤新平
2. 発表標題 傷害によるカプシジオール合成遺伝子群の転写誘導は病原体シグナルによるカプシジオール合成を増強する
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小守啓友、今野沙弥香、加藤新平
2. 発表標題 サリチル酸の合成経路の候補遺伝子の過剰発現および細胞内局在解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tuyet Nhung Nguyen Thi、高木公美子、加藤新平
2. 発表標題 タバコのCBP60 型転写因子であるNtCBP60gとNtSARD1 により制御される遺伝子の同定
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小守啓友、今野沙弥香、加藤新平
2. 発表標題 タバコのサリチル酸合成に相関して発現する遺伝子の機能解析
3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidekazu Iwakawa, Izumi Yotsui, Hidenori Matsui, Yuko Nomura, Katharina Kramer, Anne Harzen, Takehiko Kanazawa, Ryuichi Nishihama, Shinpei Katou, Takashi Ueda, Takayuki Kohchi, Hirofumi Nakagami
2. 発表標題 Establishment of the plant-microbe interaction research in Marchantia polymorpha
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidekazu Iwakawa, Izumi Yotsui, Hidenori Matsui, Yuko Nomura, Katharina Kramer, Anne Harzen, Takehiko Kanazawa, Ryuichi Nishihama, Shinpei Katou, Takashi Ueda, Takayuki Kohchi, Hirofumi Nakagami
2. 発表標題 Establishment of the plant-microbe interaction research in Marchantia polymorpha
3. 学会等名 The 65th NIBB Conference Renaissance of Marchantia polymorpha the genome and beyond (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>信州大学学術情報オンラインシステムSOAR 研究者総覧  <a href="http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.HmAejFkV.html">http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.HmAejFkV.html</a></p> <p>信州大学農学部 植物病理学研究室ホームページ  <a href="https://shinpei93.wixsite.com/plantpathology">https://shinpei93.wixsite.com/plantpathology</a></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

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