

平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな		どうけ のりゆき			所属研究機関・部局・職		名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授	
研究代表者氏名		道家 紀志						
研究課題名	和文	植物のオキシダティブバーストと生体防御ネットワークの分子生理学的解明と応用						
	英文	Molecular and physiological studies on oxidative burst and bio-defense networks in plants and its application for disease tolerance						
研究経費	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計		
16年度以降は内約額 金額単位：千円	42,100	19,100	8,000	9,000	0	78,200		
研究組織（研究代表者及び研究分担者）								
氏名	所属研究機関・部局・職		現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
道家 紀志	名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授		植物病理学	局部および全身的オキシダティブバーストの誘導とシグナル伝達の分子生理機構および植物免疫誘導機構の解明と耐病性化への応用並びに研究総括				
川北 一人	名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教授		植物感染生化学	防御応答におけるNOの生成機構と機能に関する生化学・分子生物学的解明				
吉岡 博文	名古屋大学・大学院生命農学研究科・助手		分子植物病理学	オキシダティブバースト系のNADPH酸化酵素系の分子基盤とその発現調節機構の解明ならびに耐病性植物の作出				
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）								
<p>病原菌に対する植物の動的な防御応答の始動と統御において重要な意味をもつ緊急シグナル反応として提唱してきた「オキシダティブバースト（OXB）」を中心に、その分子基盤と活性制御機構ならびに防御応答への統御機構を解明し、植物の動的な生体防御機構の本筋を理解するとともに、OXB系の発現制御に係わる情報伝達系を制御し耐病性作物を作出することを目的とした。具体的には次のことを解明し実施することを目的とした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 植物における動的防御応答の流れにおいて、異物認識と情報伝達機構、その制御下で誘導されるOXB反応系（O_2生成NADPH酸化酵素系）およびNO生成酵素系（亜硝酸酸化酵素）の分子基盤と発現制御機構、およびそれらの酵素活性を制御する情報伝達機構を解明する。 2) 感染や異物応答で生じる局部および全身的OXBで生産される活性酸素種の防御関連遺伝子の発現（転写）、酵素の生産（翻訳）および酵素の活性制御（機能化）に係わる役割を分析し、細胞内、細胞間、組織間および器官間における生理機能を時間と組織空間的関数を組み込んで解析し、局部的過敏防御応答から個体レベルにおける全身的獲得抵抗性誘導までの相互関連を解析し、植物の動的な生体防御の全体像におけるOXBの機能を明らかにする。 3) OXBの発生と関連し、転写や翻訳レベルで機能し、新規に作りだされる防御関連の制御因子、抗菌因子、耐病組織の構築の実態などを細胞および組織レベルで明らかにするとともに、OXBの発生がない親和性レースの感染時に誘導される遺伝子の動向も明らかにする。 4) OXBが防御応答ネットワークを形成する重要な反応であることを活用し、親和性菌の感染により発現する遺伝子のプロモーターをOXBの発現を制御する情報伝達系に連結し非親和性化する。また、全身的獲得抵抗性を誘導する誘導刺激因子を利用して耐病性誘導を図る。 <p>本研究は、世界で先導的に展開してきた植物の生体防御機構における「OXB」の機構と機能を解明しこれが決定的に重要な反応であることを明らかにし、それが防御ネットワークを統御する機能をもつことを利用し、OXB発生の情報伝達系を制御し耐病性植物を作出することを目指す独創的な研究である。研究対象を主要食用作物であるジャガイモの難防除病害であるジャガイモ疫病に焦点をあて耐病性を強化する具体的な実用的課題を含み、この成功は、今日問題となっている環境保全と持続的農業を保証する次世代型の植物病害防除技術の確立に貢献しようとして計画したものである。</p>								

特記事項(これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1) 植物の防御応答の発現における OXB の決定的重要性を証明した。

感染に対する植物の動的防御応答の研究で、発現する防御関連遺伝子に関して多くの研究があるが、その発現の統御機構の解明は遅れている。研究代表者らは、それらを統御する反応として OXB を発見して以来、その機構と機能の解明にこだわってきた。感染防御応答では 2 相の OXB が発生することを明らかにしてきたが、それぞれを担う酵素遺伝子を単離し、それぞれを VIGS によりサイレンシングすることにより、OXB 発生がなくなり、防御応答が起こらなくなることを証明した。親和性菌ではいずれの OXB も発生しないことから、OXB がその下流で発現する各種の防御応答を統御する鍵反応になっていることを明らかにした。これは、病気を起こす親和性レースの感染で OXB が誘導されるように制御できれば、耐病性を強化できるという可能性を示したものである。

2) 親和性レースの感染でも多くの防御関連遺伝子が発現し、転写後の制御が特異性を決めることを示した。

植物の誘導性防御応答反応で重要な機能を果たす、抗菌性物質であるファイトアレキシン生合成酵素の遺伝子 (*HMG* や *VPS*) は、防御応答が起こらない親和性レースの感染でも発現誘導されることを過去の研究で明らかにしてきた。本研究でも、防御応答を制御する第 2 相の OXB を担う *StrbohB* が親和性レースの感染で発現し酵素まで生成されることを明らかにした。これらの常識からはずれていた発見は、感染し発病させる親和性レースの感染でも誘導発現する遺伝子があり、そのプロモーターを防御応答を制御する情報伝達系に組み込めば、非親和性菌感染に類似した防御応答が誘導でき、耐病性作物の作出が可能であるという構想を生んだ。

3) 第 2 相の OXB 発生は上流の MAPK カスケードにより制御されていることを証明した。

第 2 相の OXB を担う *rbobB* の発現は MAP キナーゼカスケードにより制御されることを明らかにし、関与する遺伝子解析した。MAPKK (*StMEK1*) をアミノ酸置換し常時発現型にしたものを強制発現させて結果を見たところ、その下流では MAPK、SHIPK、WIPK などのキナーゼが誘導され、*StrbohB* の発現、*StrbohB* の蓄積が起こり、第 2 相の OXB が自動的に発生し HR 型の防御応答が誘導されることが明らかとなった。このことから、親和性レースの感染により、*StMEK1* を強制発現すれば耐病性強化も可能であるという重要なヒントが得られた。

4) 理論にもとづく遺伝子操作による耐病性ジャガイモの作出に世界で初めて成功した。

親和性レースの感染で発現が誘導されるセスキテルペノイドファイトアレキシンの生合成酵素の遺伝子のうち、ベスピラジエンシクラーゼ (*VPS*) に焦点をあて 4 種のオルソログの内、葉でも強く発現することを明らかにしていた *PVS3* のプロモーターを常時活性型にアミノ酸置換した *StMEK1^{DD}* に連結し *VPS3* のプロモーターを利用した。このプロモーターに *GUS* 遺伝子を結合させたキメラ遺伝子で形質転換したジャガイモを作出し、感染やその他のストレスに対する発現応答を *GUS* 染色で調べた結果、感染特異的に発現することが明らかとなった。そこで *PVS3* のプロモーターを *StMEK1^{DD}* に連結したキメラ遺伝子を構築し、これを *Agrobacterium* の感染を介して形質導入し、形質転換ジャガイモを作出した。その結果、この転換ジャガイモは理論通り、親和性レースの感染により、非親和性レースの感染応答と類似した OXB と HR 型防御応答を示し、抵抗性を示した。これは同一植物内の遺伝子を操作することで耐病性化することを世界で初めて証明した例となった(論文公表準備中)。この理屈は、他の作物で十分適応できるものと考えており、その応用性に広がり期待するものである。

5) 全身的 OXB の誘導現象から全身的植物免疫誘導技術への応用への期待がうまれた。

局所的な OXB の発生が刺激となり全身的 OXB が発生し、全身的獲得抵抗性が現象され、免疫性が高まることを発見したことも研究代表者らの成果であり、従来、SAR 誘導に密接に関係してきたサリチル酸以外に、新規な全身シグナル伝達機構があることを示唆してきた。本研究では、その機構の解明とともに、全身的 OXB を発生させる内生的シグナル因子の存在を示唆する結果を得ており、その因子を単離中である。この因子の詳細が明らかになれば、植物の全身的免疫反応の誘導機構の新たな側面と植物を耐病性にする戦略因子として活用できるものと考えている。



図 2. 病原性感染病苗レースの感染時に OXB の誘導がみられるように内部遺伝子を操作して作出した世界最初の耐病性ジャガイモ

研究成果の発表状況(この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

原著論文

Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D.G. and Doke, N. *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15: 706-718. (2003)

Yamamoto, A., Katou, S., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K. Involvement of nitric oxide generation in hypersensitive cell death induced by elicitor in tobacco cell suspension culture. *J. Gen. Plant Pathol.* (in press)

Nakane, E., Kawakita, K., Doke, N. and Yoshioka, H. Elicitation of primary and secondary metabolism during defense in the potato. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 378-384. (2003)

Yamamoto, A., Katou, S., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K. Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 218-229. (2003)

Takemoto, D., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K. Disease stress-inducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization. *Physiol. Plant.* 118: 545-553. (2003)

Katou, S., Yamamoto, A., Yoshioka, H., Kawakita, K. and Doke, N. Functional analysis of potato mitogen-activated protein kinase kinase, StMEK1. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 161-168. (2003)

著書・総説

Doke, N., Yoshioka, H., Sugie, K., Numata, N., Nakajima, K., Park, H.-J. Sunazaki, K., Yamashita, M., Kawakita, K., and Katou, S. The superoxide generating NADPH oxidase in plants: its molecular basis and role in induction of local and systemic induced resistance against pathogens. In Tsuyumu, S. et al. (eds) *Genomics and Genetic Analysis of Plant Parasitism and Defense*. APS Press (in press) (2004)

Doke, N., Yoshioka, H., Kawakita, K., Sugie, K., Sunazaki, K. and Park, H.-J. Mechanism of local and systemic oxidative bursts induced by infection or elicitor in potato. In *Biology of Plant-Microbe Interactions*, Vol. 3, Leong, S.A., Allen, C. and Triplett, E.W., IS-MPMI Press, St. Paul, MN, 113-117. (2002)

道家紀志、植物の菌類病研究の現状と将来展望 - 感染生理学を中心として - 植物 - 微生物相互作用研究の現状と将来展望 . 尾谷 浩・児玉基一郎 編、日本植物病理学会、東京、38:77-88.(2002).

吉岡博文(2003)植物免疫としてのオキシダティブーストを探る . - MAPK カスケードが活性酸素の生成と細胞死を制御する . . 化学と生物, 41: 639-641.

吉岡博文・口村和男・山溝千尋・池田直希・加藤新平・川北一人・小林晃・道家紀志 宿主植物の抵抗性制御と糸状菌病に対する耐病性強化の展望 . 作物の耐病性強化戦略と植物-病原体相互作用の分子機構研究 . 道家紀志・川北一人・吉岡博文 編、日本植物病理学会、東京、39:101-110.(2003)

吉岡博文・川北一人・道家紀志 植物の生体防御 . 島本 功、渡辺雄一郎、柘植尚志 監修、分子レベルからみた植物の耐病性 . 秀潤社、東京 . pp.103-110.(2003)

国際学会等招待講演

Yoshioka, H., Doke, N. Molecular mechanism of oxidative burst, a possible role in plant immunity. NIAS-COE/PROBRAIN/TOKOTEI Joint International symposium "Plant Immunity" Signaling to acquired resistance. Tsukuba, Japan, March 4-5 (2004).

Doke, N., Yoshioka, H., Sugie, K., Numata, N., Nakajima, K., Park, H.-J. Sunazaki, K., Yamashita, M., Kawakita, K., and Katou, S. The superoxide generating NADPH oxidase in plants: its molecular basis and role in induction of local and systemic induced resistance against pathogens. US-Japan Seminar on Genomics and Genetic Analysis of Plant Parasitism and Defense. Shizuoka, Japan, November 3-7, (2003).

Yoshioka, H., Numata, N., Ikeda N., Yamamizo, C., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D.G. and Doke, N. MAPK cascade regulates gene for plant gp91 phox homologs in *Nicotiana benthamiana*. 6th conference of Plant Stress, Reactive Oxygen and Antioxidants. Freising-Weihenstephan, Germany. September 9-11, (2003)

Doke, N., Yoshioka, H., Kawakita, K., Sugie, K., Sunazaki, K., Park, H.-J. Mechanism of local and systemic oxidative bursts induced by infection or elicitor in potato. Symposium in 10th Congress on Molecular-Microbe Interaction, Wisconsin, July (2002)

国内シンポジウム等招待講演

道家紀志 . オキシダティブーストへのシグナル伝達系制御による作物の耐病性化 : 疫病耐性ジャガイモの作出 . 科学研究費特定研究「植物-病原微生物」シンポジウム「転写制御と耐病性」、東京、11月28日、(2003) .

吉岡博文・口村和男・山溝千尋・池田直希・加藤新平・川北一人・小林晃・道家紀志 宿主植物の抵抗性制御と糸状菌病に対する耐病性強化の展望、平成15年度日本植物病理学会植物感染生理談話会(第39回)“作物の耐病性強化戦略と植物-病原体相互作用の分子機構研究”、愛知、犬山、8月21-23日、(2003) .

道家紀志 . 科学の目でみたジャガイモ疫病菌とジャガイモ植物の不思議な関係 - ジャガイモ植物に耐病性をつける知恵を求めて - . 平成15年度農林業先端技術バイテクセミナー、長崎、10月28日(2003) .

道家紀志 . 植物の感染防御応答におけるオキシダティブースト . - その分子機構と機能および耐病性強化への応用 - . 岩手大学植物科学シンポジウム“高等植物におけるシグナル伝達の現状と展望”、盛岡、11月22日(2003) .

道家紀志 . 作物の耐病性強化戦略下における宿主 - 寄生菌相互作用の研究 - オキシダティブーストの機構と機能および耐病性強化への活用 . 名古屋大学COEセミナー、名古屋、11月19日、(2003) .

道家紀志・吉岡博文 . 病原糸状菌-植物相互作用における宿主オキシダティブースト系を巡る攻防. 第2回糸状菌分子生物学コンファレンス、名古屋、11月11-12日、(2002) .

道家紀志 . 感染に対するオキシダティブースト現象について . 日本植物病理学会関西支部会、奈良、9月28-29日 (2002) .

道家紀志 . 植物の菌類病研究の現状と将来展望 - 感染生理学を中心として - 平成 14 年度日本植物病理学会植物感染生理談話会(第38回) 鳥取、大山、8月7-8日(2002)

吉岡博文 . Perception of pathogen signals and molecular mechanisms for the oxidative burst. 植物生理学会 “Plant Factors Regulating Infection by Pathogens”, 岡山、3月28日、(2002)

吉岡博文・口村和男・加藤新平・川北一人・豊田和弘・白石友紀・道家紀志 . 植物のオキシダティブースト系制御による耐病性強化戦略、平成14年度科学研究費特定領域研究(A)成果公開シンポジウム“見えてきた耐病性植物の作出の戦略”、神戸、12月6日、(2002)