

令和6年度 育英費受給者の研究報告概要

榎本 菜穂子（鳥取大学大学院持続可能性社会創生科学研究科博士前期課程

指導教員：上中 弘典）

『有益糸状菌トリコデルマによる植物の全身誘導抵抗性の発現メカニズムの解明』

佐伯 靖将（東京農業大学大学院生命科学研究科博士後期課程 指導教員：矢嶋 俊介）

『ダイズシストセンチュウ防除に向けた宿主認識攪乱物質の探索』

猪嶋 健悟（福井県立大学大学院生物資源研究科博士前期課程 指導教員：仲下 英雄）

『ストリゴラクトンシグナルによる植物免疫プライミングのメカニズムの解析』

伊藤 稜（近畿大学大学院農学研究科博士前期課程 指導教員：松田 一彦）

『昆虫ニコチン性アセチルコリン受容体に対するネオニコチノイドの選択的作用の分子機構』

阪田 さわ子（法政大学大学院理工学研究科博士前期課程 指導教員：大島 研郎）

『アジサイ葉化病ファイトプラズマの分泌タンパク質 HYDE5 の機能解析』

有益糸状菌トリコデルマによる植物の全身誘導抵抗性の発現メカニズムの解明

鳥取大学 大学院持続可能性社会創生科学研究科
農学専攻 博士前期課程1年
榎本 菜穂子

有益糸状菌であるトリコデルマは土壌に施用することで植物の生育が促進されること、および地上部においてネクロトロフ(殺生菌)の病原菌に対する病害抵抗性を誘導することが知られています。この全身的に誘導される病害抵抗性は **Induced Systemic Resistance(ISR)**と呼ばれており、ジャスモン酸(JA)依存的に誘導することで知られています。しかし、有益糸状菌による **ISR** の誘導に関する知見が乏しいのが現状です。そこで私は、有益糸状菌トリコデルマによる **ISR** の発現メカニズムの解明を目標として研究に取り組みました。これまでの研究により、トリコデルマによる **ISR** には **JA** だけでなくサリチル酸(SA)の関与が示唆されました。そこで本年度は、**SA** 依存的に誘導される全身的な病害抵抗性 **Systemic Acquired Resistance(SAR)**を根から誘導する実験系をモデル植物であるシロイヌナズナにおいて新たに構築し、これら実験系を用いて病害抵抗性と **SA** に関する比較を行うことで **ISR** の発現メカニズムに関する新たな知見を得ることを目的としました。**ISR** の誘導には *Trichoderma atroviride* を、**SAR** の誘導にはピペコリン酸(Pip)をシロイヌナズナの野生型に接種/処理しました。HPLCを用いて地上部における内生 **SA** 量を測定した結果、*T. atroviride* 処理において有意な増加が認められました。また、ネクロトロフであるアブラナ科黒すす病菌に対する病害抵抗性を **SA** 生合成変異体(*sid2-2*)において調査した結果、*T. atroviride* 接種において葉での病斑形成が促進されました。そのため、有益糸状菌であるトリコデルマ属菌の根への感染により誘導される **ISR** には **SA** が必要であることが新たに明らかとなりました。今後は **ISR** と **SAR** の比較トランスクリプトーム比較トランスクリプトームによる全遺伝子の発現解析や植物ホルモン分析により、**ISR** の発現メカニズムに関わる遺伝子やその機能の解明に資する知見を得ていきたいと考えております。

ダイズシストセンチュウ防除に向けた宿主認識攪乱物質の探索

東京農業大学大学院 生命科学研究科 バイオサイエンス専攻
博士後期課程1年 佐伯靖将

ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) はダイズやアズキなどのマメ科作物に寄生し、収量を大幅に低下させる重要な害虫である。シストセンチュウ被害額は世界中で年間数百億円に達すると推定されており、これまで殺線虫剤の使用や抵抗性品種の育種によって防除が試みられてきた。しかし近年、薬剤抵抗性を持つ系統の出現や抵抗性品種を打破する新たな個体群が複数確認されており、新たな防除法が求められている。

私はダイズシストセンチュウが宿主植物を特異的に認識する機構に着目し、宿主認識受容体候補として受容体型グアニル酸シクラーゼ (rGCY-1a) を発見した。さらに、この受容体の機能を化学的に制御するため、約1700化合物を対象にリガンドスクリーニングを行った。その結果、rGCY-1a を特異的に活性化する化合物 YS-1 を見出した。YS-1 はヒト rGCY には作用せず、rGCY-1a に対してのみ特異的に作用した。実際にシストセンチュウ二期幼虫を用いて試験を行ったところ、YS-1 の曝露によって二期幼虫の宿主認識が特異的に攪乱され、宿主根への誘引や寄生が正常に行えなくなることを確認した。このような宿主認識攪乱活性を持つ物質はこれまで報告がなく、本研究が世界初の成果である。

今後は YS-1 の活性や特異性をさらに高めるための構造活性相関研究や、土壌中での効果検証を進め、実用化を目指す。本研究成果は、従来の防除技術を補完し、環境負荷が少なく持続可能な新規防除体系の確立に貢献するものである。

報告書

研究内容 ストリゴラクトンシグナルによる植物免疫プライミングのメカニズムの解析

猪嶋健悟

要約

ストリゴラクトン (SL) シグナルは植物にプライミングの誘導を行い、biotroph 病原菌である *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* にはサリチル酸シグナルの強度を調節して病害抵抗性を増強する。一方、necrotroph 病原糸状菌である灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* にはエチレンシグナルの強度を調節して病害抵抗性を増強することが明らかになっている。本研究では、プライミングのメカニズムを明らかにすることを目的として、シロイヌナズナを用いて、灰色かび病抵抗性におけるカマレキシン生合成の制御について解析した。結果、SL シグナルによるプライミングが誘導され、カマレキシンの蓄積量が増加し、灰色かび病抵抗性が増強されることが判明した。また、エチレン生合成遺伝子の誘導もプライミングによって促進され、さらにカマレキシン生合成遺伝子の誘導もエチレン生合成遺伝子の発現に依存して促進されていた。代謝物レベルの解析を行った結果、カマレキシン生合成の出発物質であるトリプトファンは、灰色かび病菌接種前には生合成に十分な量が蓄積していたが、接種後はさらに蓄積量が増加することが明らかになった。しかし、トリプトファン蓄積量の増加にプライミングの有無による差は認められなかった。そのため、カマレキシン蓄積量の促進には、生合成酵素の発現による制御が寄与している可能性が示唆された。

昆虫ニコチン性アセチルコリン受容体に対するネオニコチノイドの選択的作用の分子機構

近畿大学大学院農学研究科博士前期課程 伊藤稜

ネオニコチノイド系殺虫剤は、高い殺虫活性を有する合成殺虫剤であり、昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に高い選択性を示す。植物における良好な浸透移行性を有することから、種子処理剤としても利用され、農業生産における小労力化に貢献している一方で、花粉にも移行するため、受粉媒介昆虫などの本来は殺虫が望ましくない非標的生物に対して危険な存在となる。また、新規薬剤開発や薬剤抵抗性機構の予測精度を高めるために、ネオニコチノイドと nAChR 間の相互作用の詳細な分子メカニズムを調査する必要がある。これまで、ネオニコチノイドの選択作用メカニズムは nAChR のサロゲートや昆虫と脊椎動物のハイブリッド nAChR を用いて、リガンド結合領域の loop C、loop D 及び loop G が主に寄与していることが示唆されてきた。しかし、昆虫 nAChR を用いた研究は行われていなかった。また、新たに nAChR のシャペロンタンパク質として同定された NACHO が昆虫ヘテロペンタマー nAChR に及ぼす影響は未だ調査されていない。

本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞で異種発現させたショウジョウバエ Dm α 1/Dm β 1 ヘテロペンタマー nAChR を用い、アセチルコリン(ACh)およびネオニコチノイドのアゴニスト活性に対する loop C、loop D、loop G の部位特異的変異の影響、ならびに ACh による電流応答に対する NACHO を共発現させた影響について二電極膜電位固定法を用いて調査した。

各 loop に挿入されたアミノ酸変異を有する Dm α 1/Dm β 1 nAChR に対して、ネオニコチノイドのアゴニスト活性を測定したところ、loop D および loop G との相互作用が loop C との相互作用よりもネオニコチノイドの選択毒性に深く関与していることが示唆された。

続いて、NACHO を共発現させたところ、ACh に対する電流応答の増加が観察された。これにより、様々な nAChR サブタイプにおける小さな電流応答を示すパーシャルアゴニストの詳細な薬理学的特性の評価が可能になったと考えられる。

アジサイ葉化病ファイトプラズマの分泌タンパク質 HYDE5 の機能解析

法政大学大学院理工学研究科修士課程 1 年 阪田 さわ子

アジサイ葉化病ファイトプラズマ (*Candidatus Phytoplasma japonicum* JHP strain) はアジサイに感染し、がくや花弁に葉化などの症状を引き起こす師部局在性の病原細菌であり、タンパク質分泌システムの 1 つである Sec システムを利用して分泌タンパク質 HYDE5 を分泌し、植物に花器の異常を引き起こすことが知られている。卒業研究において、HYDE5 は植物の GATA 転写因子をプロテアソームを介して、ユビキチン非依存的に分解することが明らかとなっていた。HYDE5 のホモログである AY-WB ファイトプラズマの分泌タンパク質 SAP05 も同様の機能を持っていることが知られている。さらに、HYDE5 は分解する宿主因子が限定的であるのに対して、SAP05 は幅広く相互作用、分解するという特徴を持つ。HYDE5 と SAP05 はそれぞれ、異なるファイトプラズマによって分泌されるエフェクターであるが、類似した機能を持つという点から発想を得て、HYDE5 と SAP05 の違い、つまり HYDE5 の存在意義を調べることを目的として、実験を進めることとした。

まず、先行研究において HYDE5 との相互作用を調べていた、GATA8, 18, 19, 20, 21, 24, 27 を用いて、SAP05 との相互作用を調べたところ、すべての GATA 転写因子と相互作用した。この結果を踏まえて、HYDE5 と SAP05 の相互作用の強さが、植物の形態の変化に及ぼす影響を調べるため、ウイルスベクターに HYDE5 および SAP05 を導入したプラスミドを作製した。それらを *N. benthamiana* にインフィルトレーションし、生育させた。その結果、SAP05 では激しく枝分かれが増加した一方、HYDE5 では SAP05 よりも弱い枝分かれの増加が確認された。このことから、相互作用する GATA 転写因子の多さが、枝分かれの増加の原因である可能性が示唆された。今後、*N. benthamiana* での反復回数を増やし、枝分かれの程度を調べるとともに、シロイヌナズナで同様の実験を実施し、形質転換植物との比較も行っていきたい。