

# 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

## 「環境調和を志向した革新的植物アグリバイオ 技術の統合型研究拠点の形成」

### 平成23年度研究成果報告会

日時：平成24年3月6日（火）

13:00～17:00

場所：第一会議室

## プログラム

13:00 はじめに 深溝 慶

### テーマ1 「植物保全技術の革新を通じた共生環境の構築」

13:10-13:40 川崎 努

13:40-14:10 重岡 成

14:10-14:40 内海龍太郎

\*\*\* 休憩 \*\*\*

### テーマ2 「植物と他生物間相互作用の解析とそれらの調和をめざした技術革新」

15:00-15:30 深溝 慶

15:30-16:00 松田 一彦

16:00-16:30 森山 達哉

16:30 おわりに 深溝 慶

## テーマ1：植物保全技術の革新を通じた共生環境の構築

研究課題：植物の病原菌認識と免疫応答の分子機構の解明

担当者：川崎 努

【目的】植物は、病原菌が感染した際、それぞれの病原菌を構成する因子を、病原菌に特有な分子パターン(Pathogen-associated molecular pattern (PAMPs))として認識し、迅速な抵抗性反応を誘導する。このPAMPsの認識は、植物自身もつパターン認識受容体を介して行われる。受容体が認識した情報は速やかに伝達され、様々な防御応答を誘導する引き金となるが、受容体がどのようなタンパク質と相互作用し、どのように伝達しているか、その分子機構については殆ど理解されていない。本研究では、病原菌認識から抵抗性発現の過程で働く植物免疫因子を同定し、その機能を解明することで、植物免疫の分子機構を解明する。

【結果】イネの免疫応答を阻害する白葉枯病菌のエフェクターを利用して、新規な免疫因子として、Receptor-like cytoplasmic kinaseファミリーに属するOsRLCK2を単離した。OsRLCK2の過剰発現体では、キチンに応答した防御遺伝子の発現が上昇していることから、OsRLCK2はキチン認識受容体であるOsCERK1の下流で機能していると考えられる。そこで、OsRLCK2とOsCERK1の相互作用をBiFC法と免疫沈降法を用いて解析したところ、OsCERK1とOsRLCK2の複合体が細胞膜に存在していることが明らかになった。OsCERK1は、細胞内にリン酸化ドメインをもつ受容体型キナーゼであり、リン酸化により信号を下流に伝達していると考えられる。そこで、OsRLCK2の特異的抗体を作製し、キチンに応答したOsRLCK2のリン酸化修飾を解析したところ、キチン処理後5分で、OsRLCK2のリン酸化が検出され、OsCERK1がOsRLCK2をリン酸化している可能性が示唆された。また、OsRLCK2の過剰発現体では、キチンに応答したMAPキナーゼの活性化が上昇し、さらに、キチンに応答したOsRLCK2のリン酸化がMAPキナーゼの活性化に先立って起こることがわかった。このことはOsRLCK2がMAPキナーゼカスケードを活性化している可能性を示唆している。そこで、OsRLCK2に相互作用するMAPKKKを探索し、その候補となるMAPKKKを同定した。これまでに植物のMAPKKKの活性化機構は不明であり、MAPKKKの活性化機構解明のブレークスルーになる可能性がある。

また、植物免疫因子OsRac1を活性化するGEFの解析を行った<sup>1,2</sup>。

### 【参考論文】

1. Yamaguchi K, Imai K, Akamatsu A, Mihashi M, Hayashi N, Shimamoto K, and Kawasaki T. SWAP70 functions as a Rac/Rop guanine nucleotide-exchange factor in rice. *Plant J.*, in press
2. Yamaguchi K, and Kawasaki T. Function of Arabidopsis SWAP70 GEF in immune response. *Plant Signal. Behav.* in press

テーマ 1：植物保全技術の革新を通じた共生環境の構築

研究課題：植物の環境ストレス応答・耐性の分子機構解明

担当者：重岡 成、研究協力者：田茂井政宏、Daniel Padilla-Chacón、野志昌弘、池本圭輔、伊藤大輔、加藤貴大、田中裕之、西山和樹、野坂亮太、林 秀樹、松田峻、宮本翔太郎、尾形知哉、奥田雅宣、小池佳之、丸山俊樹、辻村昌希、宮崎 望

【目的】本プロジェクトでは、植物における環境ストレス応答機構を分子レベルで明らかにし、複合的な環境ストレスに耐性の獲得を目指す。また、ストレス応答と表裏一体にある光合成炭素代謝を制御する分子機構を明らかにし、関連する遺伝子を導入することにより、生育を向上、収穫量を増加させた作物の分子育種を試みる。(1)ROS シグナリングによる防御システムの解明、(2)熱ショック転写因子(Hsf)ネットワークによる包括的遺伝子発現制御システムの解明、(3)栄養バランスによる光合成炭素代謝制御機構の解明。

【方法および結果】

(1)これまでに葉緑体由来の $H_2O_2$ を介した酸化シグナリングの生理機能の解明を目的として、葉緑体チラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(tAPX)の一過的発現抑制系を用いたマイクロアレイ解析を行い、tAPXの誘導抑制に応答を示す遺伝子群(*Responsive to tAPX suppression: RTS*)を約800個同定してきた。これらには、サリチル酸、エチレン、ジャスモン酸などのストレスホルモンを介したシグナル伝達系に関与する遺伝子が多く含まれていた。そこで、RTS遺伝子群の欠損株269ラインより光酸化的ストレス感受性変異株(photooxidative stress sensitive: *pss*およびinsensitive: *psi*)を選抜したところ、8ラインの*pss*と7ラインの*psi*が得られた。それらの原因遺伝子である*PSS*や*PSI*は転写因子やタンパク質キナーゼをコードしており、それぞれ酸化シグナリングのポジティブおよびネガティブレギュレーターであることが示唆された。

(2)シロイヌナズナに21種類存在するHsfは複雑なネットワークを形成し、種々の環境ストレス応答に機能しているが、その詳細は不明である。まず、熱ストレス応答に重要なHsfを特定するために、全てのClass A HsfsのCRES-T株を用いて高温ストレス感受性試験を行った。その結果、HsfA1a、A1b、A1d、A1eおよびHsfA2のCRES-T株において顕著な感受性が認められ、これら5つのHsfが高温ストレス応答の中核を担うマスターレギュレーターであることが示唆された。さらに、1)HsfA2の発現制御因子の同定、2)同定した発現制御因子によるHsfA2の発現制御機構の解析により、HsfA1dおよびHsfA1eはHsfA2の発現のみならず、他のHsfsの発現をも制御するHsfを介したシグナルネットワークのキーレギュレーターであることが明らかとなった。

(3)植物における炭素・窒素代謝物の相対量比(C/Nバランス)の制御機構を目指して、FBP/SBPaseを葉緑体で発現させたシロイヌナズナ(ApFS)における窒素代謝系への影響を検討した。2週齢のApFS株では光合成産物量の増加、種々のアミノ酸量の減少が見られたが、種々の炭素・窒素代謝関連遺伝子発現量に有意な増減は見られなかったが、5週齢のApFS株では光合成産物量の増加、カルビン回路関連遺伝子発現量の減少や窒素代謝関連遺伝子発現量の増加が見られた。これらの結果より、生育初期では光合成能上昇に起因して一時的に窒素が不足することによるC/Nアンバランスが引き金となり、炭素・窒素代謝関連遺伝子の発現を抑制・誘導することによって、最終的にC/Nバランスを維持していると考えられる。また、細胞質および葉緑体内におけるショ糖/ヘキソースバランスは、光合成・窒素代謝関連遺伝子発現および形態形成の制御に重要であることが示唆された。

【参考論文】Maruta et al. *JBC*, in press; Ito et al. *BBB* 76, 139(2012); Matsumura et al. *Structure* 19, 1846(2011); Yoshimura et al. *PCP*, 52, 1786(2011); Yabuta et al. *Plant Sci.* 181, 421(2011); Nishizawa et al. *PCP*, 52, 933(2011); Tamoi et al. *Photosynth. Res.* 108, 15(2011); Maruta et al. *Plant Sci.* 180, 655(2011); Foyer & Shigeoka *Plant Physiol.* 155, 93(2011)

## テーマ 1：植物保全技術の革新を通じた共生環境の構築

研究課題：植物病原菌の情報伝達機構とその阻害剤の開発

研究室名：農学研究科・バイオサイエンス専攻・分子生物学研究室

担当者：内海龍太郎 研究協力者：加藤明宣、江口陽子、石井英治、紀平絵里、平井有紀、木野弘量、植田健陽、吉岡誠訓、深見知可

【目的】植物病原菌における、病原性遺伝子発現制御のネットワークの分子機構を解明し、それらの TCS ネットワークを構成する HK（ヒスチジinkinナーゼ）、RR(レスポンスレギュレーター)、コネクターの機能解析とそれらの分子を標的にした阻害剤の作用機構解明と病原性発現抑制効果ならびに植物病害防除効果を検証する。

### 【方法と結果】

#### 1) コネクターSafA の作用機構

PhoQ/PhoP TCS は多くの植物病原菌から見つかっており、病原性との関連が指摘されている。大腸菌の TCS である EvgS/EvgA 系と PhoQ/PhoP 系をつなぐコネクター SafA が、センサー PhoQ をどのように制御するかを検討した。SafA を 3 つのドメインに分け、PhoQ/PhoP 系の活性化能を検討したところ、C 末端側のペリプラズム領域のみで PhoQ/PhoP 系が活性化した。さらに、NMR を用いて、SafA のペリプラズム領域が PhoQ のペリプラズム領域に直接結合するかを検討したところ、Mg<sup>2+</sup> とは異なる領域に直接結合することが示唆された。

#### 2) 白菜軟腐病菌(*Erwinia carotovora*)の病原性発現制御剤、シグナマイシン B の作用機構

シグナマイシン B は土壌微生物、放線菌から単離された、新規な HK 阻害剤として、軟腐病菌の病原性発現抑制作用を示す。本研究では、Biacore X-100 を用いて、シグナマイシン B の HK の 2 量体化ドメインと ATP 結合ドメインに対する結合性を測定した。その結果、シグナマイシンは、HK の二量体化ドメインに特異的に結合するが、ATP 結合ドメインには結合性を示さなかった。一方コントロールで、用いた ATP は ATP 結合ドメインに特異的な結合するが、二量体化ドメインには結合性を示さなかった。さらに、シグナマイシン B の HK の二量体形成ドメインに対する、グルタルアルデヒド(GA)の効果調べた結果、シグナマイシン B は HK に共通に存在する二量体ドメインに作用して、その二量体形成を阻害し、HK の自己リン酸化反応を阻害していることを示した。

#### 3) イネ苗立枯細菌病菌(*Burkholderia plantarii*)のトロポロン生産制御に関与する TCS の同定

*B. plantarii* の全ゲノム解析情報をもとに、ヒスチジinkinナーゼ (HK)遺伝子群 (55 個)とレスポンスレギュレーター (RR)遺伝子群 (75 個)を同定した。これらの遺伝子破壊株を作成し、病原因子トロポロン生産に関与する TCS を探索した。その結果、染色体 1 に存在する HK3 遺伝子と、HK3 遺伝子と隣接する 2 つのレスポンスレギュレーター遺伝子 (RR1 と RR2)の破壊株において、トロポロン産生の抑制が確認された。これらの結果は、イネ苗立枯細菌病菌において、HK3、RR1、RR2 によって構成される TCS により、トロポロン産生に関与する遺伝子の発現が制御される情報伝達経路が存在していることが示唆され、HK3 阻害剤のトロポロン産生抑制効果が期待された。

テーマ2：植物と他生物間相互作用の解析とそれらの調和をめざした技術革新  
研究課題：植物酵素による病原菌および共生菌認識機構の解明

研究機関・研究室名：農学研究科・バイオサイエンス専攻・バイオ分子化学研究室  
担当者職名・氏名：教授・深溝 慶

研究協力者：大沼貴之、梅本尚之、新家粧子、浦崎 惇、岡崎蓉子、神田有華、道善 聡、永田琢也

【目的】植物と微生物間相互作用を明らかにするためには、植物に病原微生物が接触した際に、インターフェースに発現されるタンパク質と微生物表面分子との相互作用を構造生物学的に理解することが必要である。本研究は、そのような植物タンパク質の中でキチナーゼに注目し、真菌類表面多糖キチンとの相互作用を構造生物学的に明らかにするために、次の三つのテーマについて研究を行った。1) タバコ、シロイヌナズナ由来 Family GH18 キチナーゼの結晶構造および機能、2) コケ由来 Family GH19 キチナーゼのNMRによる解析、および3) コケ由来 Family GH19 キチナーゼの等温滴定型熱量計 (ITC) による解析。

【方法】大腸菌によって発現させたタバコ由来 Family GH18 キチナーゼ(NtChiV)およびシロイヌナズナ由来 Family GH18 キチナーゼ(AtChiC)を、蒸気拡散法によって結晶化させ、つくば市高エネルギー加速器研究機構の BL-17A ビームラインを用いてX線回折データを収集し、分子置換法によって結晶構造を解いた。また、これら組換え酵素を用いて *Trichoderma viride* に対する生育阻害活性を調べた。一方、ナガハツリガネゴケ由来 Family GH19 キチナーゼ(BcChiA)については、大腸菌の発現系によって安定同位体ラベルを行い、基質添加に伴う  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC シグナルの変化を追跡し、基質結合様式を調べた。ラベルされていない BcChiA 組換え酵素を用いて ITC による基質結合解析を行い、NMR の結果と比較した。

【結果】NtChiV と AtChiC の結晶構造を調べたところ、両者は極めてよく一致していることが明らかとなった。またキチンオリゴ糖に対する作用様式も一致しており、一見両者には、機能的にも違いがないものと思われた。しかし、NtChiV と AtChiC の *Trichoderma viride* に対する生育阻害を調べたところ、明らかに NtChiV の方が AtChiC に比べ、生育阻害活性が高かった。それに反して、キチンオリゴ糖に対する加水分解の非活性は、NtChiV よりもむしろ AtChiC の方が高かった。これらの結果は、植物キチナーゼに頻繁にみられる真菌類の阻害活性は単純にキチナーゼがもつキチン加水分解活性によって引き起こされるものではないことを意味している。

BcChiA について、Bruker AV500 を用いて、 $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -HSQC スペクトルの測定を行ったところ、良好なシグナルの分離がみられた。3次元の HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCA, HNCACO, HNCO, および HNCOCA 測定を行い、全アミノ酸残基の主鎖シグナルのうち92%を帰属することができた。キトビオースを用いて滴定を行うと、いくらかのシグナルは連続的にシフトし、帰属結果に基づいて、キトビオースは活性中心近傍に結合し、結合部位周辺の主鎖構造をいくらか変化させていることがわかった。一方、BcChiA の ITC 測定を行い、 $\Delta H$  と  $T\Delta S$  の値を比較すると、 $\Delta H$  の寄与が  $T\Delta S$  に比べはるかに大きく、本酵素とキチンオリゴ糖との相互作用は、エンタルピー駆動型であることがわかった。 $\Delta G$  の値を比較すると、基質の重合度が大きくなるにつれて、負の  $\Delta G$  の値が大きくなり、親和性が高くなることがわかった。

テーマ2：植物と他生物間相互作用の解析とそれらの調和をめざした技術革新

研究課題：植物－昆虫間相互作用の化学生物学的解析

研究機関・研究室名：農学研究科・応用生命化学専攻・生物制御化学研究室

担当者職名・氏名：教授・松田一彦

研究協力者：森本正則、菊田幸雄、植田浩一、光森智紀、山田現、古谷章悟、武田健吾、  
阪森宏治、原直樹、西村健太郎

【目的】植物は、昆虫を代表とする植食者から攻撃を受けても身動きがとれないことから、二次代謝物質を使い分けて多重の防御態勢を構築している。こうした防御機構の一つとして植食者の食害を抑制する、あるいは植食者を致死させる物質がある。このような一次の防御態勢は、食害ストレスのみならず、食害誘導的につくられる揮発性のシグナル分子を受容したときにも間接的に強化される。本研究では、天然殺虫剤ピレトリンを材料として、その生合成に対する間接誘導防御機構の支配を解明するとともに、化合物が生まれてきた起源を探る。植物から揮発するシグナル分子は天敵も受容して、被害植物に誘引される。本研究では、このような植物－天敵を結ぶ糸に対する調節因子も併せて解明する。

【方法】除虫菊幼苗から傷害誘導的に生じる分子を GCMS で分析し、主要な誘導性揮発分子を同定した。そして、それぞれの分子はガスとして幼苗に処理し、幼苗でのピレトリン含量と生合成遺伝子の変化を定量した。また、ピレトリンのエステル結合の形成に寄与する酵素を除虫菊から生成し、アミノ酸配列情報をもとに遺伝子を単離した。さらに、植物を課外するナミハダニを抗生物質等で処理し、通常飼育したナミハダニと、食害時における植物の応答と、天敵誘引活性を比較した。

【結果】除虫菊幼苗から傷害誘導的に生じる揮発性分子を同定した結果、脂質起源の GLV とセスキテルペンの一種が主成分であることが明らかとなった。これらは、隣接する植物が受容する濃度でブレンドしたときにだけ、ピレトリンの生合成を促進した。

ピレトリンのエステル結合の形成に関わる酵素の遺伝子を除虫菊から単離し、酵素の特性を調べたところ、酵素はピレトリンの全ての絶対立体配置を厳密に認識することが明らかとなった。また、酵素遺伝子の発現はピレトリン生合成量と良く一致した。

これらの研究とは別に、ナミハダニを無菌飼育し、通常飼育したナミハダニとの間で、揮発性分子の生合成誘導、天敵誘引能等の指標の違いを調査した。その結果、無菌飼育したナミハダニと通常飼育したナミハダニの間では、当該指標の数値に違いが見られた。すなわち、無菌飼育したナミハダニの天敵誘引活性は通常飼育したナミハダニに比べて天敵誘引活性が劣ることが見出された。

## テーマ2：植物と他生物間相互作用の解析とそれらの調和をめざした技術革新

研究課題：植物タンパク質のアレルゲン性と細胞機能性の解明

担当者：森山達哉、研究協力者：河村幸雄、財満信宏、鷗澤有希、矢野えりか、若木泰子、末森祐輔、崎川貴文、鮫島有美、小林知世、

【目的】本課題では、植物と動物（ヒト）との調和的な相互作用をめざし、植物タンパク質などの植物含有成分のうち、動物（ヒト）に対して①アレルゲン性や②有益な細胞機能性を示す成分を探索し、その構造活性相関や変動解析、作用機構の解明、低リスク化／高機能化を行う。今回は、①アレルゲン性の解明に関しては、新規な大豆アレルゲンの探索やアレルゲン性評価法の検討を行った。②有益な細胞機能性の探索ではインスリン抵抗性に対して改善効果を有する成分の探索・作用機構の解明を行った。

【方法】IgE 結合性を指標にして 2D-Immunoblotting により大豆中のアレルゲン候補分子を探索し、LC-MS/MS にてタンパク質の帰属を行った。同定したアレルゲン候補分子の cDNA を PCR クローニングにより得、大腸菌にて発現させた。発現分子をモルモットに免疫し、特異抗体を得た。抗体を用いて本アレルゲン候補分子の変動解析を行った。アレルゲン性評価法として、マウスを用いた経口感作評価法の検討及び血中移行性の評価系を検討した。細胞機能性評価では、3T3-L1 脂肪細胞からのインスリン抵抗性惹起因子であるレジスチンの分泌抑制成分の探索を行い、その有効性を高レジスチンモデルである OVX マウスにて検証した。

【結果】①アレルゲンの探索では、大豆から3つのアレルゲン候補分子を同定した。そのうち新規候補として PM30 及びオレオシンを同定した。これらの分子に対する抗体を作製し、種々の大豆品種や豆乳、豆腐、味噌などの各種大豆加工食品における存在レベルを調べた。PM30 は花粉症に関連するクラス2食物アレルゲンとしての特性を有していた。一方、オレオシンはクラス1食物アレルゲンとしての特性を有していた。アレルゲン性評価方法の検討では、経口感作能を指標にした場合、C57BL マウスを用いることによって微弱ながら経口感作により IgE の産生を認めた。血中移行性評価では、大豆のクラス1アレルゲンであるトリプシンインヒビターのインタクトな血中移行が確認され、この評価系の妥当性が示された。ドットブロット法と近赤外多重蛍光検出を組み合わせることにより時間依存的な血中移行を半定量できることが示された。②有益な細胞機能性の探索では、ザクロ中のエラグ酸に脂肪細胞からのレジスチン分泌抑制効果を見出した。その作用機構はユニークで、転写レベルでの抑制ではなく、細胞内でのレジスチン分子の分解促進と考えられた。ザクロエキスを投与した高レジスチンモデルである OVX マウスにおいてもレジスチンの有意な低下を確認し、*in vivo* においても効果を認めた<sup>1)</sup>。

【発表論文】1. Makino-Wakagi Y *et al.*, (2012) *Biochem Biophys Res Commun.* 417(2), 880-885.

ご挨拶

平成 23 年度より私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「環境調和を志向した革新的植物アグリバイオ技術の統合型研究拠点の形成」（平成 23 年度～27 年度）というタイトルのもと、文部科学省より研究支援を受けております。この事業の目的は『私立大学が、各大学の経営戦略に基づいて行う研究基盤の形成を支援するため、研究プロジェクトに対して重点的かつ総合的に補助を行う事業であり、もってわが国の科学技術の進展に寄与するものである。』となっております。初年度は DNA シーケンサー、等温滴定型熱量計、AKTA などの大型機器を整備するとともに、その他の研究経費を用いて要旨にあるような研究成果を挙げることができ、“わが国の科学技術の進展に” いささかでも寄与することができたのではないかと考えております。しかし、このプロジェクトも 2 年目に入り、これからの 4 年間でどのように展開していくかを真剣に考え、そして実践していくことが要求されてくると思います。これから 4 年間、先生方、研究員、そして院生の皆様のご協力を得ながら、このプロジェクトを成功に導きたいと考えております。皆様の各方面でのご活躍とともに、学内に向けてのアピールも心から期待する次第です。

平成 24 年度も、どうぞよろしく願いいたします。

プロジェクト代表

深溝 慶

fukamizo@nara.kindai.ac.jp