

# 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24年度研究成果報告会

日時：平成25年3月4日（月）

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

## ご挨拶

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いるこのプロジェクトも 2 年目が終わりました。23(初)年度に引き続き、24 年度も同じようなペースで研究が進められていますが、質的には進展がみられたと考えております。例えば、高いインパクトファクターのジャーナルへの掲載が数件ありましたし、プレスリリースに関しても、より多くの実績を挙げております。シンポジウムを開催できたことも進展の一つではないかと考えます。しかし、このプロジェクトも 3 年目の中間地点を通過することになりますので、より基軸をしっかりとさせたプロジェクト運営が求められてくると思います。これからの 3 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重要です。これから 3 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 25 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

## 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

研究機関・研究室名：農学研究科・バイオサイエンス専攻・分子細胞工学研究室

担当者職名・氏名：教授・川崎 努

研究協力者：山口公志、石川和也、吉村智美、山田健太、吉村悠矢

**【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(PAMPs)として認識し、迅速な抵抗性反応を誘導する。しかし、その分子機構に関しては、あまり理解されていない。昨年度の研究により、イネの免疫応答を阻害する白葉枯病菌のエフェクターXoo1488とXoo3222を利用して、新奇な植物免疫因子としてOsRLCK185とOsPUB44を同定した。そこで、今年度は、これらの遺伝子の機能を明らかにすることで、受容体による病原菌認識から抵抗性発現に至る分子機構を解明することを目的とした。

**【方法】**昨年度の解析により、OsRLCK185が、キチンやペプチドグリカン(PGN)の認識に関わる受容体OsCERK1と相互作用することを明らかにした。そこで、OsRLCK185を標的とするXoo1488を発現するイネ培養細胞を用いて、Xoo1488がキチンやPGNに応答した反応に与える影響を詳細に解析する。さらに、OsRLCK185発現抑制体を用いて、キチンとPGNに応答した免疫反応を解析する。さらに、OsCERK1やOsRLCK185のタンパク質を調製し、OsCERK1によるOsRLCK185のリン酸化を介した情報伝達について生化学的に解析する。また、Xoo1488によるOsCERK1-OsRLCK185の信号伝達経路の阻害機構について解析を行う。

**【結果】**Xoo1488発現細胞を用いて免疫応答を解析したところ、Xoo1488がキチンやPGNによって誘導される防御遺伝子の発現を抑制することが明らかになった。さらに、OsRLCK185発現抑制体を用いて、同様な解析を行ったところ、OsRLCK185発現抑制体においても、キチンやPGNによる免疫応答が抑制されていることが明らかになり、Xoo1488がOsRLCK185の機能を阻害することでOsCERK1を介した免疫応答を阻害していることが推定された。そこで、OsCERK1とOsRLCK185のタンパク質を用いて*in vitro*キナーゼ活性解析を行ったところ、OsCERK1がOsRLCK185を直接リン酸化することが明らかになった。さらに、OsRLCK185の変異タンパク質を用いた解析により、OsRLCK185の活性化ループにある重要なアミノ酸残基をリン酸化することがわかった。また、Xoo1488の存在下で同様な解析を行ったところ、Xoo1488は、OsCERK1によるOsRLCK185のリン酸化を阻害した。一方、OsCERK1を介したキチン応答では、MAPキナーゼが活性化されることが知られている。そこで、OsRLCK185発現抑制体を用いて、キチンに応答したMAPキナーゼの活性化を解析したところ、OsMPK3とOsMPK6の活性化はOsRLCK185発現抑制体で抑制されるが、OsMPK4は抑制されないことがわかった。さらにXoo1488発現細胞を用いて同様な解析を行ったところ、OsRLCK185発現抑制細胞と同様な結果が得られた。このことから、OsMPK3とOsMPK6はOsRLCK185の下流で活性化されると考えられる。また、この結果は、OsMPK3/OsMPK6がOsMPK4と異なる信号伝達系で活性化されるという、これまでの報告と一致する。以上の結果から、キチンを認識して活性化したOsCERK1はOsRLCK185を直接リン酸化することによって情報を伝え、その下流でMAPキナーゼが活性化されることが明らかになった(Yamaguchi et al. Cell Host Microbe 2013)。

## 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：環境ストレス応答機構および炭素代謝制御機構の解明

研究機関・研究室名：農学研究科・バイオサイエンス専攻・植物分子生理学研究室

担当者職名・氏名：重岡 成

研究協力者：田茂井政宏、Daniel Padilla-Chacón、野志昌弘、田中裕之、野坂亮太、尾形知哉、奥田雅宣、丸山俊樹、辻村昌希、宮崎 望、小林宏太、岩井佑真、吉田幸史、問田英里、三根彩佳

【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。本年度は、次の三つのテーマについて報告する。(1)葉緑体 ROS シグナリングによるストレス防御、(2) グルタチオンペルオキシダーゼの二機能性、(3)NADPH ステータスを介したレドックス制御。

### 【方法および結果】

(1)葉緑体由来の  $H_2O_2$  を介したストレス応答機構の解明を目的として、シロイヌナズナ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) の誘導抑制系を用いたマイクロアレイ解析より、葉緑体由来の  $H_2O_2$  に特異的に応答する候補遺伝子群 (Responsive to tAPX Silencing; RTS) を約 800 個同定した。316 種の RTS 遺伝子変異株ラインを対象としたパラコートによる光酸化的ストレス感受性試験より、11 種の高感受性変異株 (*pss1-11*) および 9 種の非感受性変異株 (*psi1-9*) が得られた。なかでも *PSS7* は植物特有の転写因子である homeodomain-leucine zipper protein classII の HAT1 をコードしていた。HAT1 欠損株はサリチル酸およびエリシター処理に高感受性を示したが、その優性抑制株は同処理に対して非感受性を示した。さらに HAT1 欠損株を用いたマイクロアレイ解析の結果、HAT1 の標的遺伝子にはアブシジン酸 (ABA) 生合成の鍵因子が含まれる可能性が示された。したがって、HAT1 は ABA 生合成に負の制御因子として機能しており、ストレス応答時には葉緑体由来の  $H_2O_2$  により発現抑制され、ABA シグナリングを促進することが示唆された。

(2)グルタチオンペルオキシダーゼ 8 (GPX8) は細胞質と核の両方に局在し、チオレドキシンを電子供与体として  $H_2O_2$  や脂質過酸化物を消去することで、酸化的ストレス下でのゲノム DNA の保護に不可欠である。一方で、酵母 two-hybrid 法により、GPX8 は細胞質型グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPC2) と相互作用することが明らかとなった。GAPC2 欠損株は酸化ストレスに対して高感受性を示すだけでなく、GPX8 の酸化ストレスに対する発現応答性が抑制された。さらに、GPX8、GAPC2 いずれの欠損株も、ABA に対して高感受性を示した。したがって、GPX8 は抗酸化酵素としてだけでなく、GAPC2 との相互作用を介して酸化的ストレスおよび ABA 応答にも関与することが示唆された。(3)葉緑体型 NADPH 加水分解酵素 (AtNUDX19) の欠損は NADPH レベルの増加、光合成および抗酸化系の活性化を引き起こし、光酸化的ストレス耐性能の向上につながる。これらのことは、AtNUDX19 が NADPH レベルおよびレドックス状態の制御因子として、ストレス応答に関与することを示唆していた。通常光、強光照射下の野生株および AtNUDX19 欠損株 (KO-*nudx19*) を用いてマイクロアレイ解析を行った結果、KO-*nudx19* 株では 1700 以上の遺伝子群の発現が変化しており、NADPH ステータス変化と耐病性ホルモンであるサリチル酸 (SA) の合成・応答との関連が示唆された。また、KO-*nudx19* 株は ABA およびジャスモン酸 (JA) メチル処理に対して非感受性を、傷害や浸透圧ストレスに対して高感受性を示した。以上より、AtNUDX19 は NADPH ステータス制御による SA 応答の制御を介して、JA および ABA 応答を正に調節していることが示唆された。

【参考論文】Yabuta et al. *Transgenic Res.* in press; Maruta et al. *BBB* 77, 422 (2013); Ito et al. *BBB* 76, 2236 (2012); Maruta et al. *BBA* 1820, 1901 (2012); Mori et al. *BBB* 76, 2075 (2012); Gaber et al. *PCP* 53, 1596 (2012); Noshi et al. *Plant Signal. Behav.* 7, 944 (2012); Maruta et al. *PCP* 53, 1106 (2012); Maruta et al. *JBC* 287, 11717 (2012); Ito et al. *BBB* 76, 139 (2012)

## 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

研究機関・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

担当者職名・氏名：教授・内海龍太郎

研究協力者：加藤明宣、江口陽子、石井英治、木野弘量、植田健陽、吉岡誠訓、深見知可、  
犬飼洋一、吉谷亘平、東尾美佳、中北歌織、宮下太希、井戸千晶 田内佑樹

【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(two-component signal transduction:2成分情報伝達)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 の作用機構と新規コネクターの探索

PhoQ/PhoPTCS は多くのヒト・植物病原菌から見つかっており、それらの病原性遺伝子の発現制御に関与している。本研究では、コネクター SafA (65 aa)が、PhoQ/PhoPTCS をどのように制御するかを明らかにするために、*in vitro* 細胞膜構成系を構築して、SafAによるPhoQ・PhoPのリン酸化反応に及ぼす効果を測定した。SafAによるPhoQの自己リン酸化反応を活性化によって、細胞内リン酸化PhoP濃度を増加させることによって、情報伝達系の活性化が生じていることが判明した。これらの結果は、Phos-tag SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて、実際に細菌細胞内においても、確認された。また、新規コネクター因子の探索がサルモネラ菌と大腸菌において、実施され、サルモネラ菌において、CpxA/CpxRに作用するCacA、大腸菌において、EnvZ/OmpR系に作用するYigFが見出された。

#### 2) イネ苗立枯細菌病菌(*Burkholderia plantarii*)の病原性因子トロポロンの産生制御機構

昨年度の研究成果で、トロポロン産生に関与するTCSとして、RR1, HK3, RR2が見出された。本研究では、さらに、これらの遺伝子の発現制御機構とトロポロン産生についての、分子遺伝学的研究を行った。その結果トロポロン産生はトロポロン添加によって、誘導産生される。トロポロン産生に直接関与するのはRR2で、その発現はトロポロンによって、負に制御されている。これらのことは、トロポロン産生と細胞密度の関与を示唆するもので、トロポロン関与の受容体の存在が示唆された。

#### 3) 白菜軟腐病菌の病原性(ペクチナーゼ生産)を制御するTCS, PehS/PehRの機能解析と阻害剤の探索

*peh1*(エンドポリガラクトクロナーゼ)-GFPレポーター株を新たに作成して、*peh1*の遺伝子発現がPehS/PehR制御下にあることを明らかにした。また、抗Peh1抗体を用いて、実際にPeh1蛋白質の生産制御が確認された。さらに、Mg<sup>2+</sup>によっても、*peh1*の遺伝子発現抑制が確認された。このように、今回作成した*peh1*-GFPレポーター株を用いて、PehS/PehR情報伝達阻害剤の探索が可能になった。本研究室にある、シグナマイシン誘導体ライブラリーを用いた、スクリーニング結果も報告する。

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、近藤香織、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、竹中祥子

【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層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、真菌類表層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、次の四つのテーマについて研究を行った。1) ライムギ種子由来 Family GH19 キチナーゼ(RSC-c)の結晶構造および機能、2) タバコ由来 Family GH18 キチナーゼ(NtChiV)の基質結合に関わるアミノ酸残基について、3) シロイヌナズナ由来 Family GH18 キチナーゼ(AtChiC)の糖転移反応活性の増強、そして4) コケ由来キチナーゼ(BcChiA)のオリゴ糖合成酵素への変換。

【方法】大腸菌によって発現させた RSC-c 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決定した。また、大腸菌の発現系によって安定同位体ラベルを行い、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC シグナルの帰属および基質添加に伴うシグナルの変化を追跡し、基質結合様式を調べた。NtChiV, AtChiC, BcChiA については、標的アミノ酸残基に変異を導入した後、HPLC あるいは TLC によってオリゴ糖加水分解反応の追跡を行った。

【結果】RSC-c とキチン 4 糖, (GlcNAc)<sub>4</sub>, との複合体の結晶構造を決定した。この結晶構造において、(GlcNAc)<sub>4</sub> は RSC-c の活性中心より還元末端側の +1, +2, +3, +4 サブサイトに結合していた。この結合様式において最も注目すべき点は、Trp72 のインドール環と +4 サブサイトに位置する基質のピラノース環とのスタッキング相互作用である。この相互作用があるために、(GlcNAc)<sub>4</sub> は活性中心を跨ぐことなしに非分解性複合体を形成しているものと思われた。また、NMR 法によって化学シフト摂動に基づく結合様式の推定を行ったところ、結晶構造で得られた(GlcNAc)<sub>4</sub> の結合位置とよく一致していた。以上より、結晶構造で得られた(GlcNAc)<sub>4</sub> の結合様式は、溶液中においても実現しているものと思われた。

NtChiV の基質結合部位に位置するトリプトファン残基に変異を導入したところ、基質結合力の低下によって酵素活性が減少したが、活性の減少とともにアノマー型を識別する特異性もなくなり、キチナーゼのトリプトファン残基がアノマー特異性を支配していることがわかった。

AtChiC の活性中心近傍のグリシンをトリプトファンに変異させると、糖転移反応活性が飛躍的に増大することがわかり、糖転移活性を増強させるための新たな戦略を見出すことができた。また、BcChiA の活性中心で加水分解に関与する水分子を保持するセリン残基を、アラニンやグリシンに変異させると、加水分解活性が消失し、それとともにフッ化糖をドナー基質としたグリコシド結合の合成反応が起こった。このような方策は、有用糖質を合成するための新たな戦略として注目に値する。

## 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、古谷章悟、阪森宏治、山田現、光森智紀、原直樹、山口武則、西村健太郎、竹内孝幸、山口夕紀、中谷有里、三浦由夏

**【目的】** 昆虫やハダニは脱皮ホルモン、エクジソンを自身で生合成することができないため、植物を食べ、原料となるステロイドを得る。しかしその代償として昆虫は植物が抵抗性因子としてつくる二次代謝産物に被爆する。このトレードオフのメカニズムを解き明かし、環境に優しい昆虫制御技術の基盤を構築することを目的とする。今回、ピレスリンをはじめとする植物のテルペン類がターゲットとする昆虫の神経イオンチャンネルの制御に焦点を絞り紹介する。

昆虫の抑制性神経伝達機構は、主に  $\gamma$ -アミノ酪酸作動性塩素チャンネル(GABA<sub>A</sub>Cl)とグルタミン酸作動性塩素チャンネル(GluCl)によって制御されており、いくつかのテルペンタイプの植物二次代謝産物はどちらのイオンチャンネルにも作用する。GABA<sub>A</sub>Cl はヒトにも存在するため、遺伝子発現からタンパク質に至るまでの制御について膨大な知見が得られているのに対して、後者は研究が遅れている。今回、ゲノム情報基盤が整備されたカイコガを用いて GluCl の機能的発現量を制御する構造基盤に知見を得た。

**【方法】** カイコガの脳と胸部第3神経節から全長の *gluc1* 遺伝子をそれぞれ多数単離し、その塩基配列を解析するとともに、発現量を real-time PCR により定量した。GluCl はアフリカツメガエル卵母細胞あるいはアフリカミドリザル COS-1 細胞で発現させ、そのリガンド作動性イオンチャンネルとしての機能を、二電極膜電位固定法を用いた電気生理学的手法および放射性イベルメクチンを用いたバインディングアッセイにより解析した。さらに膜画分の GluCl の量をウエスタン法により定量した。

**【結果】** 複数の cDNA 配列を解析した結果、主に *gluc1* 遺伝子は複数の箇所での選択的スプライシングにより多数のバリエーションを生じることがわかった。それぞれのバリエーションの遺伝子発現は変態ステージとともに変動し、バリエーション間で発現のレベルに大きな差が見られた。それぞれのバリエーションの特性を解明するため、それらをアフリカツメガエル卵母細胞と COS-1 細胞に発現させ、グルタミン酸とイベルメクチン (IVM) に対する応答を電気生理学的に測定した。バリエーション間でグルタミン酸と IVM の親和性には有意な差は見られなかったが、これらのリガンドが誘起する最大の応答のサイズに有意な差が見られた。その原因を解明するため、放射性 IVM を用いた結合実験を行った結果、バリエーション間のリガンド応答の差は膜に集積された受容体量の差が原因となって生じることが明らかとなった。バリエーション間での特性の違いをもたらす構造基盤を解明するため、キメラを種々作成したところ、特定の配列領域内での違いがバリエーション間の性質の差をもたらす原因としてはたらいっていることが示唆された。そこで、当該領域においてバリエーション間で異なるアミノ酸に焦点を絞り、網羅的に置換したところ、バリエーション間で膜移行性の違いをもたらすアミノ酸を特定した。さらに、複数のバリエーションをモデリングして比較した結果、当該アミノ酸は GluCl を構成するサブユニットのインターフェースに位置し、集合状態を調節することで、神経膜への移行量を決定することが示唆された。



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

研究機関・研究室名：農学研究科・応用生命化学専攻・応用細胞生物学研究室

担当者職名・氏名：准教授・森山達哉、

研究協力者：河村幸雄、財満信宏、吉村征浩、鶴澤有希、矢野えりか、末森祐輔、  
崎川貴文、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、植物タンパク質等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、植物間で保存性が高く、花粉症や食物アレルギーの共通抗原となりうる各種汎アレルゲンに関して発現・精製を行い、幅広い農作物における当該アレルゲンを検出可能な抗体を作製し、変動解析に有効なツールのカタログ化を行った。特に大豆汎アレルゲン Glym4 について重点的に解析した。②有益な細胞機能性の探索では昨年引き続き植物成分エラグ酸の生理機能性の解明を行った。

**【方法】** 植物界で保存性の高い代表的な汎アレルゲン分子群を大腸菌にて発現させた。また、存在量の多い汎アレルゲンに関しては植物体から精製を行った。発現・精製分子を動物に免疫し、抗体を得た。得られた抗体の汎用性を確認しカタログ化を行った。特に、大豆 Glym4 については大豆種子より native 分子を精製し、その特性解析を行うとともにモノクローナル抗体やファージ抗体の作製を試みた。エラグ酸の細胞機能性評価では、肥満・糖尿病モデルマウス KK-A<sup>y</sup> への経口投与にて生理機能性を解析した。また生理機能性発揮に関与しうるエラグ酸結合タンパク質の探索も試みた。

**【結果】** ①汎アレルゲンのカタログ化に関しては、Betv1 ホモログ、Betv2 ホモログ（プロフィリン）、ソーマチンライクプロテイン、LTP、パタチンなどについて、発現・精製し、抗体を作製した。得られた抗体は多くの植物間で汎用的に使用できることが判明した。大豆の Betv1 ホモログである Glym4 に関しては、大豆種子より精製に成功した。その特性解析から、本分子は RNase 活性を有することを確認した。さらに Glym4 に対するモノクローナル抗体の作製を行い、2つのクローンを得た。これらの汎アレルゲンに対する抗体を用いて、アレルゲンの変動解析や *in vitro* 消化系によるアレルゲン性評価方法の改良などを行った。②有益な細胞機能性の探索では、昨年明らかにしたエラグ酸の脂肪細胞からのレジスチン分泌抑制効果の他にも、肝細胞からのアポリポプロテイン B 分泌抑制効果等を見出した。またエラグ酸を投与した KK-A<sup>y</sup> マウスにおいてもレジスチンの有意な低下を確認するとともに、肝臓における中性脂質蓄積抑制効果や肝臓脂質代謝関連遺伝子の発現制御などの好ましい効果を認めた。これらの結果から、ザクロやイチゴ等に含まれるエラグ酸は、有益な植物由来の機能性食品素材となりうる可能性が示唆された。