

# 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25年度研究成果報告会

日時：平成26年3月6日（木）

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 3 年目が終わりました。質の高い研究成果を収めることができた 24（昨）年度に比べますと、25 年度も論文や学会発表の件数、その他特許やプレスリリースに関して同じようなペースで研究が進められています。まだ審査結果は出ておりませんが、2013 年 10 月に提出しましたプロジェクトの中間報告も極めて高いレベルで報告できたと確信しております。しかし、25 年度に限って言えば、華々しかった昨年度に比べ、高いインパクトファクターのジャーナルへの掲載はいくらか減ったように感じます。3 年目が終わって『峠を越えてホッと一息つき後は下る一方、、、』というようにならないようにしなければなりません。これからの 2 年間、さらに高みをめざしてアグリバイオ技術革新に貢献していくように努力していきましょう。その面での、先生方、研究員、そして院生の皆様のご協力を心からお願いする次第です。

平成 26 年度も、どうぞよろしくお願いいたします。

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・植物分子遺伝学研究室

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、早田奈央、  
杉下亮丞

**【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XopP(Xoo3222)を利用して、新奇な植物免疫因子として OsPUB44 を同定した。OsPUB44 は、U-box ドメインと Armadillo (ARM)repeat ドメインをもち、PUB ファミリーに属するユビキチンリガーゼである。そこで、今年度は、OsPUB44 遺伝子の機能と XopP による免疫阻害機構を明らかにすることで、植物免疫と病原菌の感染戦略の分子機構を解明することを目的とした。

**【方法】**XopP によるイネ免疫応答の阻害機構を解析するために、XopP を発現するイネ培養細胞を作成し、キチンやペプチドグリカン(PGN)に対する応答を解析した。また、XopP の標的因子として単離した OsPUB44 の機能を解析するために、OsPUB44 の発現抑制体を作成し、免疫応答を解析するとともに、OsPUB44 のユビキチンリガーゼ活性を解析した。XopP による OsPUB44 の抑制機構を解明するために、XopP と OsPUB44 の相互作用を詳細に解析するとともに、XopP による相互作用が OsPUB44 の活性に及ぼす影響を解析した。

**【結果】**XopP 発現細胞を用いて免疫応答を解析したところ、XopP 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、OsPUB44 発現抑制体を用いて、同様な解析を行ったところ、OsPUB44 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、OsPUB44 が免疫応答のポジティブレギュレーターとして機能し、さらに XopP が OsPUB44 の機能を阻害することで免疫応答を阻害していることが推定された。そこで、XopP と OsPUB44 の相互作用を酵母 Two Hybrid 法を用いて解析したところ、XopP は OsPUB44 の U-box ドメインに結合することが分かった。一般に U-box ドメインは、ユビキチンリガーゼ活性の機能ドメインであることから、XopP が U-box に結合することで、OsPUB44 の活性を阻害していることが考えられる。実際、OsPUB44 の U-box ドメインはユビキチンリガーゼ活性をもち、その活性は顕著に XopP によって阻害されることがわかった。一方、イネには OsPUB44 と相同性の高い OsPUB45 と OsPUB46 が存在するが、XopP はそれらとは相互作用しないことが明らかになった。U-box の配列を比較したところ、OsPUB44 と OsPUB45 / OsPUB46 の間で8つのアミノ酸残基が異なり、そのうち、3つのアミノ酸残基が OsPUB44 と XopP の相互作用の特異性と、XopP による OsPUB44 の抑制の特異性を決定していることがわかった。これらのことから、XopP は、PUB ファミリーの中でも免疫応答のポジティブレギュレーターとして機能する OsPUB44 のみ抑制するように進化していることが示唆された。

## 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

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：教授・重岡 成

研究協力者：田茂井政宏、野志昌弘、田中裕之、野坂亮太、小林宏太、間田英里、中村朋美、畑中理佐、高田梨沙、岡本 泰

**【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  $H_2O_2$  シグナリングを介したストレス応答におけるフェルラ酸ヒドロキシラーゼの生理機能、(2) ホメオドメインロイシンジッパー転写因子 (HAT1) を介した酸化ストレス応答の分子機構、(3) 酸化ストレス条件下におけるシロイヌナズナ HsfA1d 活性化分子機構の解明

### 【方法および結果】

ROS シグナリングにおいて重要な遺伝子を探索するため、葉緑体由来の  $H_2O_2$  に応答する遺伝子群の破壊株ラインを整備し、それらの光酸化的ストレス感受性を評価した。その結果、光酸化的ストレス感受性および非感受性変異株（それぞれ *pss* および *psi*）が合計 17 株単離された。その中で、(1) *PSS8* はフェルラ酸ヒドロキシラーゼ (FAH1) をコードしていた。FAH1 はフェニルアラニン代謝系の下流でリグニンなどの合成に関与する酵素であり、アントシアニンの合成には直接関与しないにも関わらず、*pss8* では光酸化的ストレス下でのアントシアニンの蓄積が顕著に抑制されていた。光酸化的ストレス下において、アントシアニン合成に関与する遺伝子群の発現が *pss8* において抑制されていたことから、FAH1 の欠損により生じたフェニルアラニン代謝系異常に起因するフィードバック制御機構の存在が示唆された。また、FAH1 は葉緑体由来の  $H_2O_2$  および強光によって誘導されており、さらに tAPX の誘導抑制はアントシアニンレベルを増大させたことから、葉緑体由来の  $H_2O_2$  による FAH1 の誘導は光酸化的ストレス下におけるアントシアニン合成の促進に必須であると考えられる。(2) 一方、他の *pss* および *psi* の原因遺伝子の多くは転写因子をコードしており、*PSS7* はホメオドメインロイシンジッパー転写因子 (HAT1) であった。HAT1 の発現は葉緑体由来の  $H_2O_2$  によって顕著に抑制された。HAT1 の欠損株はパラコートに対して高感受性を示したが、優性抑制株は非感受性を示したことから、HAT1 は転写抑制因子であることが示唆された。マイクロアレイ解析の結果、HAT1 欠損株や優性抑制株では複数のストレス応答性遺伝子の発現が変化しており、これらの中に HAT1 の標的遺伝子が含まれると考えられた。これらのことから、HAT1 はリプレッサーとしてストレス応答を抑制しており、葉緑体の  $H_2O_2$  はその発現や核局在性を抑制することでストレス応答を開始すると考えられた。現在、HAT1 の下流候補遺伝子の確認および HAT1 変異株のストレス感受性などについて詳細な解析を進めている。(3) 最近、HsfA1d による標的遺伝子の誘導には分子内の 2 つの Cys 残基 (C153・C357) の酸化還元状態が重要であることが報告された。そこで、HsfA1d の HSE 認識機構を *in vitro* で解析した。N 末端に His x 6 配列を付加した HsfA1d、変異型 HsfA1d<sup>C153S, C357S</sup>、および HSP90.2 cDNA リコンビナントタンパク質を用いて、ゲルシフトアッセイを行った結果、HsfA1d の HSE への結合が認められ、この結合は HSP90.2 濃度依存的に阻害された。一方、変異型 HsfA1d<sup>C153S, C357S</sup> も HsfA1d と同様 HSE に *in vitro* で結合し、その結合は HSP90.2 濃度依存的に阻害された。この結果は、HsfA1d の HSE への結合が Cys 残基の酸化還元状態に依存していないことを示すものであり、HsfA1d による標的遺伝子の転写活性化機構には別の因子が必須であるかもしれないことを示唆する。

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、吉岡誠訓、深見知可、犬飼洋一、吉谷亘平、三輪瞬平、前垣知里、難波奈甫、中村淳、朝田有香

【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(ヒスチジンキナーゼ)、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) イネ苗立枯細菌病菌(*Burkholderia plantarii*)のトロポロン生産制御機構

植物毒素(ファイトトキシン)トロポロン生産には、RR1, HK3, RR2の3成分制御系とトロポロンがオートインデューサーとして、細胞密度依存的にトロポロンを生産する機構の存在が明らかにされた。3成分制御系によって制御される遺伝子群を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いたRNAseq解析法を用いた。その結果、次の10の遺伝子の発現が3成分制御系(RR1, HK3, RR2)によって制御されていると同時にトロポロン生産にも関与することが明らかになった。すなわち、a) トロポロン生合成に関与する遺伝子として、*aroG*, *aroK*, *paaD*, *paaI*, *paaK*, *caiA*、b) トロポロンのトランスポーター遺伝子 *cirA1*, *cirA2*、c) トロポロンの排出ポンプ遺伝子 *emrK*、d) 転写因子遺伝子 *lysR* である。またトロポロン依存的な細胞密度依存的生産機構には転写因子である *QS2* 遺伝子(*luxR*の相同遺伝子)が主要な働きをしていることが明らかにされた。

2) 白菜軟腐病菌のペクチナーゼ生産を制御する阻害剤のスクリーニング系の確立と評価  
軟腐病菌のペクチナーゼ遺伝子として、*peh1*(エンドポリガラクトナーゼ)と *pel3*(ペクチンリアーゼ)が知られている。本研究では、*peh1*-GFP, *pel3*-GFP レポーター株を用いて、化合物ライブラリー(ChemBridge Corporation)をスクリーニング(500検体)した結果、両GFPの発現を同時に抑制する3化合物が見出された。これらの化合物を添加した培養液中のPeh1の分泌量をウエスタンブロッティング法で評価した。その結果、本レポーター株を用いたスクリーニング法の有効性が示された。

3) コネクターSafAの機能解析

コネクターSafAとPhoQの相互作用解析のために、共結晶構造解析実験と光架橋反応実験を行った。その結果、PhoQのみの結晶構造解析結果は得られたが、共結晶構造解析結果は得られなかった。光架橋反応実験の有用性が示唆された。

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、有村和紘、梅本尚之、新家粧子、竹中祥子、北奥喜仁、西平知世

【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。本研究では、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、**1)** ライムギ種子由来ループ付加型 Family GH19 キチナーゼ (RSC-c)の結晶構造に基づく基質結合様式の推定、および**2)** コケ由来ループ欠失型 Family GH19 キチナーゼ(BcChi-A)の結晶構造およびNMR滴定実験に基づく基質結合様式の推定を行った。一方、土壌中の植物病原菌のアンタゴニストとして土壌細菌にも注目し、**3)** *Paenibacillus* 由来キトサナーゼに存在する糖質結合モジュール(DD1 および DD2)の機能解析も行った。以上3つの研究テーマについて、その結果を報告する。

【方法】大腸菌によって発現させた RSC-c あるいは BcChi-A のキチンオリゴ糖との混合物を、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、分子置換法あるいは SAD 法によって結晶構造を決定した。また BcChi-A や DD1 および DD2 は、大腸菌の発現系によって安定同位体ラベルを行い、NMR スペクトルを得た。<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC シグナルを帰属した後、リガンド添加に伴うシグナルの変化を追跡し、リガンドとの結合様式を調べた。また、DD1 および DD2 については等温滴定型熱量計(ITC)によってリガンド結合の定量的な解析を行った。

【結果】**1)** 昨年度は、野生型 RSC-c とキチン4糖, (GlcNAc)<sub>4</sub>, との複合体の結晶構造を得、(GlcNAc)<sub>4</sub>は RSC-c の活性中心より還元末端側の+1, +2, +3, +4 サブサイトに結合することを報告した。今回、基質結合クレフトの2個のアミノ酸残基に変異を入れた RSC-c E67Q/W72A を用いて(GlcNAc)<sub>4</sub> との複合体構造を調べたところ、2分子の(GlcNAc)<sub>4</sub> がクレフト全体を隙間なく覆った複合体構造を得ることができ、クレフト全体における相互作用機構を推定することができた。**2)** BcChi-A は、RSC-c の細長い基質結合クレフトの両端に存在するループ構造を欠失しており、分子量も比較的小さい。この酵素の不活性変異体(BcChi-A E61A)を用いて、(GlcNAc)<sub>4</sub> との複合体構造を調べたところ、(GlcNAc)<sub>4</sub> が活性中心を跨いだ複合体構造を得ることができた。触媒中心近傍のアミノ酸側鎖の配置に基づき、GH19 キチナーゼの触媒反応機構をより正確に推定することができた。**3)** *Paenibacillus* 由来キトサナーゼのC末端に存在する DD1 と DD2 は、両方ともにキトサンオリゴ糖を特異的に認識して結合した。しかし、DD1 は DD2 に比べると強くキトサンオリゴ糖を結合し、これらがタンデムに並ぶキトサナーゼ分子中において、DD1 がキトサン結合の中心的な役割を果たしていることがわかった。DD1 分子中の Glu36 がキトサンとの相互作用において重要であ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－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、竹内孝幸、中谷有里、  
宇都宮麻衣、安達元希、前坂佳宏

**【目的】**植物は、植食者に対して直接防衛と間接防衛によって種を維持する。その仕組みの中で、低分子生理活性物が関与する。本研究では天然殺虫剤ピレスリンを生合成する除虫菊を対象として、その生合成と調節機構を解明することで直接防衛機構の化学生物学的基盤を解明する。また、除虫菊からストレス誘導的に放出される揮発性物質(VOCs)により交わされる、空間を介したシグナル伝達機構について明らかにする。さらに植物を加害するナミハダニと天敵の行動を制御する VOCs の生合成調節機構を解明し、植物による昆虫制御の分子機構を理解する。これらの目標の達成に向けて基盤技術を構築したので報告する。

**【方法】**除虫菊の各部位で発現する遺伝子を RNA seq 解析し、当該部位で発現する遺伝子を網羅的に獲得することで、発現遺伝子のデータベースを構築した。また、除虫菊の遺伝子組換え技術の確立に向けて、無菌的栽培した幼苗切片を種々の濃度の植物ホルモンを含む培地で培養し、脱分化と再分化条件を探索した。さらに、ピレスリン生合成に関与する TcGLIP 遺伝子産物の機能を選択的に抑制するため、本産物の機能を阻害する遷移状態アナログ化合物を設計・合成した。

**【結果】**除虫菊の蕾や葉部等で発現する遺伝子を網羅的に解読し、BLAST 解析可能な情報基盤を構築した。また各発現遺伝子の配列検出頻度は RPKM 値化し、部位別の発現量に関する情報も獲得した。そして、ピレスリン生合成遺伝子と高い相関を示す遺伝子を統計解析し、相関係数が高い値を示すものを見出した。

除虫菊では、シロイヌナズナ、タバコ、イネなどとは異なり、遺伝子組換え技術が未確立である。そこで、アグロバクテリウム等を介した遺伝子導入に向けて、脱分化と再分化条件について検討し、特定の濃度のオーキシンとサイトカイニンを含む培地で除虫菊葉切片は効率良く脱分化し、カルスの断片を低ホルモン含有培地に移植することで、効率的に再分化も可能であることを見出した。

遺伝子導入技術ができたとしても、標的遺伝子にパラログが多く存在すると、その表現系を完全に抑制することは極めて難しい。そこで、既に獲得しているピレスリン生合成に関与する酵素 TcGLIP の選択的阻害剤の設計を試みた。即ち、本酵素が加水分解系酵素に類似することから遷移状態で基質が四面体中間体を取ると仮説をたて、遷移状態アナログ型のリン酸エステル化合物を設計した。トリフェニルフォスファイトを出発物質とし、最終段階で銅触媒存在下カルベンを発生させジエンに付加させることで、計5段階で目的化合物をトランス選択的に合成した。一方、発現マシナリーの変更と、精製時の条件を詳細に検討し、TcGLIP の機能的発現効率を飛躍的に高めた。また、本酵素は MBP 融合タンパク質として発現させるが、その酵素活性の触媒キネティクスパラメーターには MBP が影響しないことを確認した上で、酵素の触媒反応には当初予想されたアミノ酸が全て必要であることを明らかにした。そして、本酵素に対する阻害剤の効果を調べたところ、酵素活性を阻害することを見出した。

**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：財満信宏、矢野えりか、鶴澤有希、末森祐輔、崎川貴文、小林知世、  
和田宏章、三口志穂、

**【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、その検出定量法の整備、構造活性相関、変動解析、作用機構の解明、低リスク化／高機能化、体内動態解析等を行う。今回は、①アレルゲン性の解明に関しては、昨年と引き続き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対する抗体を作製し、変動解析に有効なツールのカタログ化を進め、これらを用いた変動解析を行った。また、培養細胞を用いたアレルゲンの透過性実験により抗アレルギー成分の探索を行った。②有益な細胞機能性の探索では植物成分エラグ酸やサポニンの生理機能性の解明、エラグ酸及びプエラリンの体内動態解析を行った。

**【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主要な農作物33種に対する反応性のカタログ化を行った。またこれらの抗体を用いて、種々の条件下でのアレルゲンの変動解析を行った。またヒト腸管培養細胞 Caco-2 のアレルゲン透過性実験系を構築し、その抑制成分を探索した。エラグ酸の細胞機能性評価では、ヒト肝細胞への効果を検討した。エラグ酸及びプエラリンの体内動態解析はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法イメージングマスマスペクトロメトリー（MALDI-IMS）によって行った。

**【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、キチナーゼに対する抗体を用いて、主要な農作物33種に対する反応性をウエスタンブロットティングや ELISA にて検証し、多くの植物間で汎用的に使用できることを明らかにした。これらの情報のカタログ化を進めている。ま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（加工法、ガンマ線処理、収穫後処理など）を行った。大豆のガンマ線照射ではアレルゲンの増加は確認されず、むしろ一部のアレルゲンに関しては低減化された。培養細胞を用いた抗アレルギー成分の探索では、増粘多糖類に抑制効果が確認された。②有益な細胞機能性の探索では、エラグ酸やサポニン等の新規機能を見出した。また、MALDI-IMS によって、マウスの臓器に分布するプエラリン及びエラグ酸由来成分を可視化することに成功した。植物由来低分子機能性成分の動物等での体内動態を解析する新たな手法としての活用が期待される。