

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26年度研究成果報告会

日時：平成27年3月3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」

13:10-13:40 深溝 慶

13:40-14:10 松田 一彦

14:10-14:40 森山 達哉

*** 休憩 ***

テーマ1 「植物保全技術の革新を通じた共生環境の構築」

15:00-15:30 重岡 成

15:30-16:00 内海龍太郎

16:00-16:30 川崎 努

16:30 おわりに 深溝 慶

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、有村和紘、尾井宏美、梅本尚之、新家粧子、北奥喜仁、西平知世

【目的】我々は、植物と微生物間相互作用を明らかにするために、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を目的として研究を行っている。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、病原性真菌類表層の多糖キチンとの相互作用機構を構造生物学的に明らかにするために、**1)** キチンナノファイバーを用いた新規キチナーゼ活性測定法の開発、**2)** コケ由来ファミリーGH19 キチナーゼ(BcChiA)の新規阻害剤の開発、および**3)** ソテツ由来ファミリーGH18 キチナーゼ(CrChiA)の結晶構造と糖転移活性、以上3つのテーマについて研究を行ったので、その結果を報告する。

【方法および結果】

1) イカ軟骨より調製したキチンナノファイバーを用いて、濁度 ($OD_{540\text{ nm}}$) 測定によるキチナーゼ活性測定法の開発を行った。その結果、プロセッシブのキチナーゼの活性測定は可能であるが、ノンプロセッシブのキチナーゼについては高感度の測定は困難であることがわかった。しかし、天然基質に対して化学的な変換を施すことなく、濁度法という簡便な方法を用いてキチナーゼ分解反応を観測することができ、プロセッシブのキチナーゼの活性を測定する限りにおいて、有用な方法であることは間違いない。今後、この方法はプロセッシブなキチナーゼの研究において応用されていくものと思われる。

2) キトビオシルモラノリン、 $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ を用いて、大腸菌によって発現させたコケ由来ファミリーGH19 キチナーゼ(BcChiA)に対する結合性、阻害活性を調べた。熱変性実験およびNMRやITCによる滴定実験より、 $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ は天然のキトオリゴ糖に比べBcChiAにより強く結合することがわかった。キトオリゴ糖分解速度に基づいてBcChiAに対する $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ の阻害活性を調べたところ、50%阻害濃度 IC_{50} は $(\text{GlcNAc})_4$ に対する反応で $130\ \mu\text{M}$ 、また $(\text{GlcNAc})_6$ に対する反応で $620\ \mu\text{M}$ という値が得られた。今後、得られた阻害剤を構造生物学的あるいは植物生理学的研究に活用することを考えるならば、その阻害力はまだ不十分であり、より精密な分子設計に基づく新たな阻害剤の開発が望まれる。

3) ソテツ由来クラスVキチナーゼ(CrChiA)の糖転移反応触媒の高効率性に注目し、結晶構造に基づいてその構造的要因を明らかにすることを試みた。CrChiAの結晶構造とタバコ由来クラスVキチナーゼ(NtChiV)、シロイヌナズナ由来クラスVキチナーゼ(AtChiC)の結晶構造とを比較することによって、糖転移活性を支配する因子として、①アクセプター分子の結合力が高いこと、②活性中心において水分子の攻撃が抑制されていること、これら二つの構造的要因を特定することができた。また、アクセプター結合部位の基質親和性を変動させることによって、糖転移活性の調節も可能となった。今後、このような構造要因を考慮に入れることによって、さらに効率の良い糖転移酵素の創製が可能になるとと思われる。

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、伊原誠、古谷章悟、阪森宏治、竹内孝幸、中谷有里、
宇都宮麻衣、安達元希、立木貴明

【目的】昆虫をはじめとする植食者に対して直接的手段と間接的手段によって防御する。これらの手段を駆動する化学シグナル分子を解明し、その標的をも探り当てることが本研究の目的である。具体的には除虫菊が生合成する天然殺虫剤ピレスリンの生合成のメカニズムを解明し、それを調節する化学生物学的機構を明らかにする。また、ストレス誘導的に植物から放出される揮発性物質(VOCs)を介した植物どうし、植物と微生物あるいは植物と昆虫間のシグナル伝達機構について明らかにする。さらに植食者による食害によって誘導される植物 VOCs の生合成調のメカニズムを解明し、新たな植物保護の概念を創出する。

【方法】昨年に引き続き、除虫菊の omics 解析を進展させた。具体的には傷害誘導的に生じる VOCs 処理、脱分化と再分化条件で RNAseq を繰り返し行った。一方、糖類を除き植物成分だけを含む培地で糸状菌を培養することで生産される殺虫あるいは瘰癧誘発物質の作用機構を電気生理学的手法である patch clamp 法を適用して解析した。さらに標的候補タンパク質の発現調節機構も合わせて解析した。

【結果】除虫菊の部位別に加えて、傷害誘導的に生合成される GLV とセスキテルペン物資の混合気体の処理2条件および除虫菊の脱分化と再分化による遺伝子発現変化を RNAseq で解析した。その結果、生合成に寄与する可能性がある遺伝子群を絞り込み、配列データベースを整備した。さらにピレスリンだけにとどまらず、キク科植物特有のユニークな生理活性物質の生合成とピレスリン生合成をジョイントした。

ピレスリン生合成の最終ステップはリパーゼの一種により触媒される。本リパーゼの結晶化を進めるとともに、catalytic triad を選択に阻害するケミカルプローブの合成法を改良し、数種の化合物を得た。これらの化合物は不可逆的に本酵素を阻害した。

植物成分を多量に含有する培地で糸状菌を培養すると高頻度で昆虫制御物質を生産する。これらの昆虫制御物質は発見されてから数十年経過しているにも関わらず標的タンパク質が不明であった。化合物は投与後比較的短時間で毒性を発揮することから神経系を狙っていると推察した。そこで昆虫の単一神経を流れるイオン電流を計測する技術 patch clamp 法を駆使して化合物の作用機構について検討した。一つの化合物はそれ自身で塩素イオン電流を誘起した。その原因を解明するため候補受容体遺伝子を単離してアフリカツメガエル卵母細胞で発現させ、化合物を処理することにより生じる卵母細胞のイオン電流の変化を解析した。その結果化合物が抑制性のリガンド作動性塩素チャネルの一つである抑制性グルタミン酸受容体を濃度依存的に活性化することを見出した。また、ヒトの塩素チャネルに対する本化合物の作用を調べたところ全く活性化あるいは阻害作用を示さなかったことから本化合物は極めて昆虫選択的に毒性を発揮することが初めて明らかとなった。この成果に加えて、最近別の糸状菌が生産する殺虫性物資の活性発現機構についても検討し、本化合物もまた極めて昆虫選択的に作用することを明らかにした。講演ではこれらの成果の一端を紹介する。

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：教授・森山達哉、

研究協力者：財満信宏、矢野えりか、藤井有希、末森祐輔、和田宏章、三口志穂、
下野香澄、橘 加織、矢野喜裕、

【目的】本課題では、植物と動物（ヒト）との調和的な相互作用や植物資源の有効利用をめざし、植物タンパク質等の植物含有成分のうち、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、昨年と引き続き各種汎アレルゲンに対する抗体を作製し、これらを用いた変動解析を行った。また、人工消化系と培養細胞を用いたアレルゲンの透過性実験を組合せ、より生理的条件に近いアレルゲン性評価方法を構築した。さらに植物タンパク質の経皮感作の可能性について、評価系確立や臨床例探索を行った。②有益な細胞機能性の探索ではエラグ酸やサポニン、アレルゲンタンパク質等の生理機能解析を行った。

【方法】植物汎アレルゲン PR-10 に属する大豆アレルゲン Gly m4 に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作成し反応性を評価した。農作物のカビ被害やガンマ線照射殺菌、EMS 処理品種、加工方法や調理方法等、種々の条件下での植物汎アレルゲンの変動を WB や ELISA、近赤外蛍光ドットブロット法などにて解析した。また人工消化系とヒト腸管培養細胞 Caco-2 のアレルゲン透過性実験系を組合せたアレルゲン性の評価方法を構築し、種々の植物性アレルゲンタンパク質の評価を行った。マウスを用いて植物タンパク質の経皮感作の評価系の構築やヒト臨床での症例解析を行い、植物性タンパク質の経皮感作の可能性を評価した。エラグ酸の細胞機能性評価では、脂肪細胞以外にもヒト肝細胞や小腸細胞へ添加し、リポタンパク質代謝への効果を検討した。アレルゲンタンパク質の生理機能性に関しては混餌にてマウスに投与し、血清や臓器を解析した。

【結果】①新たに Gly m4 に対するモノクローナル抗体を産生する5つのクローンを得た。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）では、カビ被害では PR-10 の増加、PR-5 も一部増加、プロフィリンは変動なかった。香辛料のガンマ線照射では汎アレルゲンの増加は確認されず、むしろ低減化された。新規な手法で作成された大豆ペーストや漬物加工はクラス2リスクは激減していた。人工消化系と培養細胞を組み合わせたアレルゲン性評価にて、PR-5 はクラス1抗原である可能性が示唆された。②有益な細胞機能性の探索では、エラグ酸やサポニン等がリポタンパク質分泌調節機能を有することが判明した。大豆 Gly m5 やトリプシンインヒビター等のアレルゲンタンパク質も脂質代謝適正化能を示しうる可能性が示唆された。低リスク化／高機能化による実用化が期待される。

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、中村朋美、畑中理佐、高田梨沙、
岡本 泰、戸田結奈、川端彬未、伊藤 茜

【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、(1)葉緑体 H₂O₂ 応答性 basic Helix-Loop-Helix 転写因子 (bHLH101) の機能解析および(2)クロロシス変異株の原因遺伝子の機能解明に加えて、(3)シロイヌナズナのアスコルビン酸再生系に関わる酵素群の包括的な解析について報告する。

【方法および結果】

(1) これまで葉緑体由来の H₂O₂ に応答する遺伝子群の発現変異株ラインを整備し、光酸化的ストレス感受性および非感受性変異株の解析を進めてきた。その中で、強光下で顕著なクロロシスを示す変異株の原因遺伝子は、塩基性ヘリックスループヘリックス転写因子 bHLH101 をコードしていた。bHLH101 は、植物特有の bHLH 1b クレードに属しており、その中でも 3 つの bHLH と機能相補的に鉄欠乏応答に重要な役割を担うことが報告されていたが、ストレス応答との関係は不明であった。bHLH101 優性抑制株 (DN-bHLH101) は、メチルビオロゲン添加培地あるいは強光下において、顕著な葉の退色に加えて、抗酸化酵素活性ならびに鉄含量の低下が認められた。興味深いことに、DN-bHLH101 の光酸化的ストレス高感受性は、生育環境中の鉄濃度の上昇に伴い緩和されたが完全には回復しなかった。さらに、DN-bHLH101 では短期的な強光ストレス下でも細胞死の増大が見られたが、このときの鉄含量には野生株との間に差はなかった。したがって、bHLH101 は鉄の恒常性よりも、光酸化的ストレス応答に優先的に関与しており、鉄含量の低下はクロロシスの結果として生じることが考えられた。

(2) 上述のストレス感受性変異株の選抜過程において、強光下のみならず通常条件での生育によっても著しいクロロシスが見られる変異株が DN-MVS11 として単離された。その原因遺伝子 (MVS11) の生理機能は一切が報告されていなかったが、異なる金属イオン濃度の培地で DN-MVS11 を生育させたところ、クロロシス様の表現型は鉄添加により激しく回復することが明らかとなった。また、鉄欠乏下における DN-MVS11 の葉では、鉄欠乏に起因するクロロシスのマーカー遺伝子の誘導が増大していた。このときの根では鉄還元酵素活性および鉄トランスポーターの発現が抑制されており、実際に DN-MVS11 の鉄含量は野生株の半分程度にまで減少していた。以上より、MVS11 は細胞内鉄ホメオスタシス制御の鍵因子である事が示された。また、鉄欠乏下の DN-MVS11 の表現型はサリチル酸処理により緩和される傾向が見られたことから、本転写因子と葉緑体 H₂O₂、鉄代謝およびサリチル酸の関係に興味を持っている。

(3) アスコルビン酸 (AsA) の作用の多くは還元力に依存しており、酸化型からの再還元系が機能維持に重要であると考えられる。そこで、シロイヌナズナに存在する 3 つのデヒドロアスコルビン酸還元酵素 (DHAR1~3) および 5 つのモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素 (MDAR1~5) の機能解析を行った。DHAR2 および 3 はそれぞれ細胞質、葉緑体に局在すると考えられている。今回、GFP 融合タンパク質を用いた解析により、DHAR1 の細胞質および核局在が示された。各 DHAR の欠損は、強光下での AsA レベルの上昇を阻害したが、AsA レドックス状態にはほとんど影響しなかった。一方で、GSH レベルは、DHAR1 欠損により減少、DHAR3 欠損により増大した。さらに、いずれの欠損株でも強光による GSH 酸化が著しく抑制された。また、DHAR1 および DHAR3 欠損は強光感受性を増大させた。したがって、DHAR1 ならびに DHAR3 の AsA 総量および GSH レドックスの制御を介した光酸化的ストレス防御への関与が示された。

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：江口陽子、犬飼洋一、清水莉子、植田修平、吉谷亘平、谷口勝英、三輪瞬平、羽田朋子、加藤明宣

【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と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) コネクタ分子 SafA による PhoQ、センサーキナーゼ活性化機構

PhoQ-SD (センサードメイン) の Asp179 は SafA の結合において、重要であることが示唆されている。本研究においては、SafA による PhoQ 活性化機構を構造生物学手法を用いて、明らかにするために、野生型 PhoQ と PhoQD179R 変異体の X 線結晶構造解析をおこなった。PhoQD179R 変異体において、Asp179-Lys186 間に形成される塩橋の形成に伴う SD ポケットが消失していた。SD ポケットは、SafA が PhoQSD 結合に必須な領域であることが明らかにされた。さらに、SD ポケット周辺の Gln81、Ser82、Asp179、Lys186、SD ポケットの形成に関与する Leu58、Leu62、Lys64 のそれぞれのアミノ酸変異体では、SafA による PhoQ 活性化が抑制された。これらの結果は SD ポケットに加え、その上部にも SafA が結合することが示唆された。さらに、部位特異的光架橋法によって、SafA 活性化によって、PhoQSD のダイマー境界面の α ヘリクス 1 内に存在する Lys46、Thr48、Phe49、Leu58、Leu52 において顕著な構造変化が生じていることが示唆された。このような SafA 発現による PhoQSD $\alpha 1$ の構造変化はそれにつながる PhoQ キナーゼドメインに伝達され、PhoQ の自己リン酸化活性を向上させるモデルを支持した。

2) Hbox 阻害剤、waldiomycin の HK に対する作用機構

新規ヒスチジンキナーゼ阻害剤、waldiomycin は PhoQ を含めて、様々な細菌 HK に共通に保存されている DHp ドメイン内の Hbox を標的にしていることを明らかにするために、本研究では、構造情報が明らかになっている大腸菌 EnvZDHp ドメインと Waldiomycin の相互作用を NMR を用いて、明らかにした。その結果、waldiomycin は EnvZ の DHp ドメインの Hbox ならびに X 領域に作用していることが判明した。waldiomycin の標的アミノ酸を特定するために、EnvZ の Hbox ならびに X 領域に存在する各アミノ酸変異体を作成し、waldiomycin による阻害活性を IC₅₀ 値で評価した。その結果、Hbox に共通して、保存されているアミノ酸残基の変異体、S242A、D244A、T247A、P248A 変異体に対する waldiomycin の IC₅₀ は野生型 EnvZ の IC₅₀ 値と比べて、10-100 倍、耐性を示した。さらに、これらの Hbox 変異体に対する waldiomycin の作用の消失は NMR を用いて、確認された。

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、早田奈央、白川友美、井上健人

【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。しかし、パターン認識受容体が検出した PAMPs 情報が、どのように細胞内に伝達されているかについては、あまりわかっていない。これまでに、イネのキチン受容体 OsCERK1 に相互作用する因子として、OsRLCK185 を同定した。OsRLCK185 は、OsCERK1 からリン酸化されることで、情報を受け取り、その情報を MAP キナーゼカスケードや活性酸素を生成する NADPH オキシダーゼに伝達する主要な因子であることがわかった。さらに、OsRLCK185 のシロイヌナズナホモログとして、PBL27 を同定した。そこで、PBL27 を介した免疫応答を解析することで、植物間の免疫応答の共通性について明らかにすることを目的とする。

【方法】PBL27 を介した免疫応答を解析するため、PBL27 の機能欠損変異体を単離し、キチンに応答した免疫応答を解析した。さらに、CERK1 による PBL27 の活性化機構を解析するため、*in vitro* リン酸化実験により解析した。また、PBL27 を介した MAPK カスケードの活性化機構を明らかにするために、PBL27 と相互作用する MAPKKK を同定した。さらに、MAPKKK 変異体を単離し、キチンに応答した MAPK の活性化を解析した。また、PBL27 による MAPKKK のリン酸化に関して解析を行った。

【結果】OsRLCK185 のホモログとしてシロイヌナズナの PBL27 を同定し、キチン受容体 CERK1 との相互作用解析を行ったところ、PBL27 は細胞膜上で、CERK1 の細胞内キナーゼドメインと相互作用することが明らかになった。そこで、PBL27 の T-DNA 挿入変異体を単離し、キチンに応答した免疫応答を解析したところ、*pbl27* 変異体ではキチンに応答した MAPK の活性化やカロースの生成、防御遺伝子の発現誘導が低下するが、活性酸素の生成には変化がないことがわかった。また、*pbl27* 変異体では、病原菌に対する抵抗性も顕著に減少していることが明らかになった。CERK1 と PBL27、べん毛タンパク質の受容体 FLS2/BAK1、FLS2 受容体に相互作用する BIK1 の組換えタンパク質を調製し、*in vitro* リン酸化実験を行ったところ、CERK1 は PBL27 をリン酸化するが、BIK1 をリン酸化しないこと、一方、BAK1 は BIK1 をリン酸化するが、PBL27 をリン酸化しないことがわかった。さらに、PBL27 はキチンに応答してリン酸化されることがわかった。このことから、キチン認識に伴って活性化された CERK1 により、PBL27 がリン酸化されることで、細胞内に情報が伝達されることが明らかになった。さらに、PBL27 による MAPK カスケードの活性化機構を明らかにするため、PBL27 と相互作用する MAPKKK を同定した。MAPKKK の変異体では、キチンに応答した MAPK の活性化が抑制され、PBL27 と MAPKKK が同じシグナル伝達系で働いていることが明らかになった。また、PBL27 が直接 MAPKKK をリン酸化することも明らかになった。