

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 (S1101035)

平成 23 年度～平成 27 年度
私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果報告書

平成 28 年 4 月

学校法人名 近畿大学

大 学 名 近畿大学

研究組織名 近畿大学大学院農学研究科

研究代表者 深溝 慶

(近畿大学農学部)

は し が き

私ども、近畿大学大学院農学研究科の研究グループは、文部科学省からの支援を受け、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」というプロジェクトを、平成23年度より5年間にわたって進めてまいりました。これまで、このプロジェクトにおいて研究を進めていただいた皆さん、また計画調書の作成から予算執行に関わる事務手続き等において懇切丁寧にご教えていただき、ご協力いただきました大勢の皆さん方にも心から感謝申し上げます。この5年間のすべての研究成果をこの冊子にまとめてみましたが、論文（原著論文と総説あわせて）208件、学会発表は招待講演なども含めると705件に及んでおり、それらすべてをこの冊子に網羅できたかどうか少し不安ではあります。しかし、このような多くの研究成果を挙げられたのは、なによりも個々のプロジェクトメンバーの研究に対する意識の高さゆえであり、研究代表者にとっては嬉しい悲鳴ともいえるべきものでございます。このような学術的な活動のみならず、一般社会に対するアピールも10件の特許および15件のプレスリリースを通して行われました。このことは、このプロジェクトの研究成果が社会に対して大きく発信されたことを裏付けるものです。このようなプロジェクトの研究成果が、さらに次のステップの、より大きな近畿大学のプロジェクトにつながることを心から祈念する次第です。

最後に、先生方、若手研究者、院生諸君、そしてこれらの研究に関わったすべての皆さん、今後のご活躍を心からお祈りいたします。ご協力、どうもありがとうございました。

研究代表者
深溝 慶

目 次

研究報告書概要	1
研究の概要	2
研究発表の状況	6
その他の研究成果等	17
留意事項及び対応	20
テーマ 1 : 植物保全技術の革新を通じた共生環境の構築	21
植物の病原菌認識と免疫応答の分子機構の解明 (川崎)	21
植物の環境ストレス応答・耐性の分子機構解明 (重岡)	39
植物病原菌の情報伝達機構とその阻害剤の開発 (内海)	59
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	75
植物酵素による病原菌および共生菌認識機構の解明 (深溝)	75
植物－昆虫間相互作用の化学生物学的解析 (松田)	95
植物タンパク質のアレルゲン性と細胞機能性の解明 (森山)	113

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

平成 23 年度～平成 27 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」 研究成果報告書概要

1 学校法人名 近畿大学 2 大学名 近畿大学

3 研究組織名 近畿大学大学院農学研究科

4 プロジェクト所在地 奈良市中町 3327-204

5 研究プロジェクト名 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

6 研究観点 研究拠点を形成する研究

7 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
深溝 慶	農学研究科バイオサイエンス専攻	教授

8 プロジェクト参加研究者数 6 名

9 該当審査区分 理工・情報 生物・医歯 人文・社会

10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

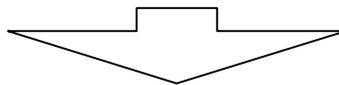
研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
川崎 努	農学研究科・教授	植物の病原菌認識と免疫応答の分子機構の解明	植物免疫の誘導機構を解明し、それを利用した環境保全型耐病性植物の開発に取り組む。
重岡 成	農学研究科・教授	植物の環境ストレス応答・耐性の分子機構解明	環境ストレス耐性の分子機構を知ることにより植物生産性の増大を試みる。
内海龍太郎	農学研究科・教授	植物病原菌の情報伝達機構とその阻害剤の開発	植物病原菌の病原性遺伝子の発現抑制による新規植物防除剤の開発を行う。
深溝 慶	農学研究科・教授	植物酵素による病原菌および共生菌認識機構の解明	植物酵素によっていかに病原菌や共生菌が認識されるのかを分子レベル明らかにする。
松田一彦	農学研究科・教授	植物の対昆虫防衛戦略に関する研究	植物が昆虫による食害に対してとる防御システムを体系的に解明することで、環境保全型の害虫防除法を開発する。
森山達哉	農学研究科・准教授	植物タンパク質のアレルゲン性と細胞機能性の解明	感染特異的タンパク質などの植物タンパク質が有する食物アレルゲンリスクの解明及び細胞機能への有益な作用を見出す

<研究者の変更状況(研究代表者を含む)>

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

(変更の時期:平成 年 月 日)



新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

11 研究の概要(※ 項目全体を10枚以内で作成)

(1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

これまでに、当研究科においては、植物、昆虫、および微生物を材料とした分子細胞生物学的手法を用いて、環境調和を志向したアグリバイオ技術の確立をめざして研究を行い、国際的に注目される研究成果を挙げてきた。これらの研究成果をさらに発展させ、実際の植物生産現場で最大限に活用していくためには、植物系、微生物系、昆虫系を統合させた研究環境を確立し、有機的な連携を模索しながら研究を展開していく必要である。本計画は、21世紀において、このような諸分野のバイオテクノロジー技術を統合し、失われつつある植物を中心とした環境を修復し調和をもたらすような、新たな技術を開発していくことを目的とする。

植物自体の保全をめざすグループ(3名)、植物と他生物間相互作用の適正化を図るグループ(3名)の二つのグループを形成し、グループ内あるいはグループ間で情報交換を行いながら、アグリバイオ技術の統合を図る。まず、植物免疫および環境ストレス耐性に関与する遺伝子や病害シグナル分子を生成する酵素遺伝子、また昆虫食害に対する抵抗性遺伝子を単離する。また、病原微生物から増殖に関わる遺伝子を、さらにアレルゲン性植物蛋白質をコードする遺伝子を単離する。次に、単離されたそれぞれの遺伝子産物であるタンパク質の構造と機能およびアレルゲン性を構造生物学的手法で評価し、得られた遺伝子を導入した組換え体植物、さらに低アレルゲン性組換え作物も作出する。最終的には、作出された遺伝子組換え植物の密閉栽培施設での評価を行う。

(2) 研究組織

上記の目的を達成するために二つのテーマ、(1)植物保全技術の革新を通じた共生環境の構築、(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、を設定し、それぞれのテーマにおいて優れた研究実績をもつ研究者を3名ずつ配した。テーマ(1)においては、川崎努教授(植物免疫を担当)、重岡成教授(植物の環境ストレス耐性を担当)、および内海龍太郎教授(植物病原菌の病原性遺伝子を担当)の3名が担当し、テーマ(2)には深溝慶教授(植物-微生物相互作用を担当)、松田一彦教授(植物-昆虫相互作用を担当)、および森山達哉准教授(植物タンパク質のアレルゲン性を担当)の3名が担当した。研究代表者、深溝はこれら二つのテーマの研究の進行を統括した。

このプロジェクトに関わった人員の5年間のべ人数は、以下のとおりである。

テーマ(1)の川崎教授には定時職員1名と実験補助(院生)9名、重岡教授には RA3名、定時職員2名、および実験補助(院生)25名、そして内海教授には RA1名と実験補助(院生)11名がプロジェクトに関わった。

テーマ(2)の深溝教授には RA3名、定時職員3名、および実験補助(院生)9名、松田教授には RA2名と実験補助(院生)4名、そして森山准教授には定時職員1名と実験補助(院生)9名がプロジェクトに関わった。

一方、これらの研究組織内で、以下のような研究代表者を中心とした連携研究を構築した。キチンオリゴ糖を効率的に生産し(深溝)、植物細胞に対するエリシターとして作用させる(川崎)。(2)植物病原菌シグナル伝達系のタンパク質を発現させ(内海)、NMRによってリガンドとの相互作用を解析する(深溝)。(3)花粉症アレルゲンであるキチナーゼの発現と構造解析(深溝)を行い、アレルゲン活性との関連を探る(森山)。(4)塩ストレス応答性グルカナーゼの発現を行い(重岡)、その構造をX線結晶構造解析によって調べる(深溝)。

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

(3) 研究施設・設備等

研究設備として、平成 23 年度に次の3件の機器の購入を計画した。①DNAシーケンサー（アグリバイオ有用遺伝子のDNA配列を決定するためのもの）、②等温滴定型熱量計（MicroCal iTC200、生体分子間相互作用を定量的に解析するためのもの）、③生体分子精製システム（AKTA Purifier、アグリバイオ有用物質の単離精製を行うためのもの）。それぞれの機器は、現在、農学部第一共同利用棟の2階に集中させて設置されており、アグリバイオ技術開発研究拠点として各研究グループ間の有機的な連携を図りながら、利用されている。①のDNAシーケンサーののべ使用回数は1010回/年、使用時間は7375時間/年であった。②の等温滴定型熱量計は、のべ使用回数59回/年、使用時間は352時間/年であった。③の生体分子精製システムは、のべ使用回数16回/年、使用時間は131時間/年であった。このプロジェクトの遂行のために効果的に運用されてきた。

(4) 研究成果の概要 ※下記、13及び14に対応する成果には下線及び*を付すこと。

川崎：植物免疫応答に関わる宿主因子を探索し、新規な植物免疫因子としてイネ OsRLCK185^{*1}、OsPUB44^{*2}、シロイヌナズナ PBL27 を同定した。さらに個々の植物免疫因子を分子生物学的手法を用いて解析し、キチン信号伝達における役割を明らかにした。**重岡**：植物の環境ストレス応答機構として、葉緑体の活性酸素種による発現制御^{*3}、アスコルビン酸再生系に関わる酵素群^{*4}、熱ショック転写因子による発現制御^{*5}、グルタチオンペルオキシダーゼ8 (Gpx8) および NUDX を介したシグナル伝達機構^{*6} に関して、計画通り成果を得ることができた。**内海**：植物病原菌情報伝達機構に関与するヒスチジンキナーゼ (HK1)、レスポンスレギュレーター、コネクター分子の機能が明らかになり^{*7}、また、HK1 阻害剤として Waldiomycin^{*8} が単離され、さらにその阻害機構を NMR 法によって解明した。

深溝：植物キチナーゼの二つのファミリー、GH18^{*9} と GH19^{*10}、の酵素それぞれについて、X線結晶構造解析を行い、新規に基質との複合体構造を得た。また、部位特異的変異による機能変換^{*11} にも成功した。さらにキトサン結合モジュールの構造およびキトサン認識機構が明らかになった^{*12}。**松田**：傷害に応じて生成する揮発性分子が除虫菊のピレスリン生合成を調節する^{*13} ことを明らかにし、ピレスリンのエステル結合の形成に関与するリパーゼ TcGLIP を同定した^{*14}。また、RNASeq によりピレスリン生合成を制御する遺伝子を数種同定した。**森山**：植物汎アレルゲンに対する抗体群を作製し、主要な農作物の汎アレルゲンの変動解析に有効な研究ツールを得た。また、植物タンパク質の多面的なアレルゲン性評価系を構築した^{*15}。さらに、ニコチンやエラグ酸など植物由来の有用成分の生体に対する影響を明らかにした^{*16}。

全体的な達成度については、各担当者とも中間報告までに、計画していた遺伝子の単離およびその遺伝子産物の同定をほぼ終え、その後の2年余りの期間で、それら遺伝子産物を発現させて、その機能を調べ植物体内で働かせるという段階にまで到達することができた。しかし、作出された遺伝子組換え植物の密閉栽培施設での評価は不十分であり、全体としての達成度は90%であると判断した。

<優れた成果が上がった点>

川崎：新規に発見された植物免疫因子、イネの OsRLCK185 は、細胞膜受容体からの情報を細胞内の MAP キナーゼカスケードに伝達する初めての因子であった。この成果は科学誌 Cell Host & Microbe^{*1} に掲載され、各種新聞報道でも取り上げられた。また、白葉枯病菌エフェクター XopP は、OsPUB44 の U-box ドメインに結合し、OsPUB44 の酵素活性を阻害し、イ

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

ネの免疫応答を阻害していることが分かった。この研究成果は *Nature Communications*^{*2} に掲載され、新聞報道でも取り挙げられた。**重岡**：葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (tAPX) の一過的発現抑制株を用いたトランスクリプトーム解析により、葉緑体で発生する ROS により制御を受ける新規の遺伝子群を明らかにした^{*3}。**内海**：イネ苗立枯細菌病菌 (*B.plantarii*) の病原因子トロポロンの生産が 3 成分 HK1, RR1, RR2 によって制御されていて、トロポロン生産の制御ネットワークの存在を明らかにした。コネクター SafA によるヒスチジンキナーゼ PhoQ の相互作用部位が NMR 解析によって、明らかにされた^{*7}。

深溝：これまでに得られていなかった GH19 キチナーゼとキチンオリゴ糖との複合体構造を明らかにすることができた^{*10}。キトサン結合モジュールの立体構造が X 線結晶構造解析および NMR 法によって明らかにされ、このタンパク質がどのようにキトサンを認識するのかが明らかになった^{*12}。**松田**：傷害ストレスによって植物から生じる揮発性分子がブレンドとして増強作用を発揮することが明らかとなった^{*13}。また、ピレスリンのエステル結合の形成はリパーゼの一種により触媒されることがわかった^{*14}。**森山**：重要な食糧資源である大豆の新規アレルゲンを同定した^{*15}。また加工食品や、ガンマ線照射での変動など、種々の要因でのアレルゲンの変動を明らかにした。植物機能性成分であるエラグ酸が新規なメカニズムで糖尿病や脂肪肝予防に有益である可能性を示した^{*16}。

<課題となった点>

川崎：植物免疫の研究を行う上で、多くの技術的な問題が発生した。特にエリシターであるキチンの取得が課題となったが、プロジェクト内の共同研究あるいは情報を共有することにより、この問題を克服することができた。**重岡**：環境ストレスを受けてから遺伝子発現を制御するまでの情報伝達機構は非常に複雑かつ巧妙であり、従来の手法では明らかにするのが難しく課題となっていた。そのため、関連する遺伝子群の KO(KD)株、CRES-T ライン、一過的抑制株などを組み合わせて種々のオミクス解析を駆使することによって、様々な視点から解析が可能となった。**内海**：*B.plantarii* のトロポロン生産制御の情報伝達ネットワークは極めて複雑であったため、その分子機構の解明が課題となったが、次世代シーケンサーを用いることにより解決できた。また、RNAseq 解析も行って、HK1, RR1, RR2 によって制御される遺伝子群を明らかにできた。また、SafA の PhoQ 結合部位の決定が課題となり、X 線による共結晶構造や高解像度 NMR を用いる共同研究によって、結合部位の解明を試みている。

深溝：植物キチナーゼが植物体内あるいは体外で機能する場合、そのターゲットはキチンオリゴ糖であるとは限らず、まだ不明のままである。今後、糖鎖アレイ解析などの手法を用いて、キチンオリゴ糖以外のキチナーゼの内在性基質の探索を進めなければならない。**松田**：遺伝学的方法等によって、植物から生成する揮発性分子によって未被害植物の防衛機能が調節される分子機構を解明する必要がある。また、ピレスリンのエステル結合の形成を触媒する酵素の基質認識機構を X 線結晶構造解析等によって解明することが必要であり、ピレスリン生合成の構造生物学の根幹に関わる課題である。**森山**：アレルゲンの種類によっては、通常の方法では反応性の良い抗体を得ることが難しい。そこで、一般的なポリクローナル抗体に加えてモノクローナル抗体やファージ抗体などの多様な抗体作製技術を駆使して、この課題を克服していく。また、エラグ酸などの有用化合物の分布や局在性について、さらに動物での摂取後の動態解析なども進めていくことが必要である。

<自己評価の実施結果と対応状況>

プロジェクトメンバーが相互に進捗状況を評価しあうために、平成 24 年 3 月 6 日(火)、平成 25 年 3 月 4 日(月)、平成 26 年 3 月 6 日(木)、平成 27 年 3 月 3 日(火)、そして最終回と

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

して平成 28 年 3 月 2 日(水)に 13:00-17:00、近畿大学農学部第一会議室にて研究成果報告会を開催した。このような報告会の後、プロジェクトメンバーでの会議が開催され、プロジェクト代表(深溝)の主導のもと、次年度におけるプロジェクト活動の在り方について討議し、個々のメンバーがどのように研究を展開していくかを相互に確認してきた。また、プロジェクト代表は、この報告会における各プロジェクトメンバーの進捗状況に基づいて、次年度の研究費配分にその研究成果を反映させるように考慮した。

<外部(第三者)評価の実施結果と対応状況>

宮崎大学理事・副学長の水光正仁教授および岡山大学農学部の木村吉伸教授に、本プロジェクトの研究成果について外部からの評価を依頼し、別添のような評価を得ている(添付書類1、添付書類2)。

<研究期間終了後の展望>

川崎: これまでに同定した個々の植物免疫因子の機能を解明していくことによって、植物の免疫応答におけるタンパク質間ネットワークを包括的に理解することが可能となる。さらに、それを基盤情報として革新的な耐病性植物の開発も可能となると思われる。**重岡**: tAPX の誘導抑制に応答を示す遺伝子群の破壊株ラインの解析を進めると共に、熱ショック転写因子を介したシグナル伝達機構の詳細(メッセンジャーの同定、翻訳後修飾など)を明らかにする。また、Gpx8 を介した細胞質-核間の情報伝達機構(局在化、酸化還元制御)、NUDX によるヌクレオシドニリン酸類縁体代謝を介した酸化的ストレス応答の制御機構を明らかにする。これらの情報を統合的に理解することにより、次世代型のストレス耐性植物の創製をめざす。**内海**: コネクター分子の機能解析と新規コネクターの探索と解明を行い、また、*B.plantarii* のトロポロン生産制御機構とそのネットワークの分子機構解明を行い、トロポロン生産抑制剤の開発をめざす。一方、白菜軟腐病菌の病原因子ペクチナーゼ遺伝子については、発現抑制剤のスクリーニングを行い、新規の病原性抑制剤の開発をめざす。

深溝: 植物キチナーゼを用いた新たな変異戦略によって、新規のオリゴ糖合成の可能性が示唆されたので、植物酵素の工業的利用として新規オリゴ糖の量産化をめざす。また、糖質結合モジュールの変異によって特異性変換の可能性も示唆された。新規特異性をもつ糖結合モジュールの開発を通して、新規の糖質加水分解酵素の創製をめざす。**松田**: 植物から生成する揮発性分子によって、未被害植物の防衛機能がどのように調節されるのかを遺伝学的手法を用いて解明することが可能になる。また、ピレスリンのエステル結合の形成を触媒する酵素 TcGLIP の基質認識機構を X 線結晶構造を解明し、自殺的阻害剤を設計開発することは決して困難ではなく、将来の課題として挑まなければならない。**森山**: 多様な植物汎アレルゲンに対する抗体群を整備しカタログ化する。それらを用いて、様々な条件でのアレルゲンの変動要因を解明する。アレルゲン性評価方法の確立や、植物成分の有益な細胞機能性についても解明し、植物とヒトとの友好的な相互作用構築を目指す。

<研究成果の副次的効果>

川崎: 本プロジェクトによって得られた植物免疫因子を利用することにより、植物が本来もつ免疫能を増強させた新規な耐病性植物を開発することが可能になる。**重岡**: 植物に導入することにより、環境ストレス耐性能を有意に向上させうる遺伝子に関しては、特許の申請を視野に入れて研究を進める。**内海**: 本研究で、明らかにされた阻害剤は新規な環境調和型

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

病害防除剤として、特許申請予定である。

深溝: 新規に考案されたキチナーゼの合成酵素への変換および糖質結合モジュールの特異性変換について、今後、変異戦略を最適化しながら、特許の申請を視野に入れて研究を進める。**松田:** 植物-昆虫相互作用から微生物(糸状菌)-昆虫相互作用へと展開することができ、これら三者による相互作用は、新たなケミカルバイオロジーへと導くものと思われる。**森山:** 植物性加工食品のアレルゲンを評価するような企業からの依頼(技術指導等)が増加し、さらに低アレルゲン化戦略についても検証していく。またアレルゲンの同定の相談を医療機関から受けている。エラグ酸に関しては機能性食品素材としての実用化を検討している。

12 キーワード(当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載してください。)

- | | | |
|----------------------|---------------------|--------------------|
| (1) <u>環境調和</u> | (2) <u>アグリバイオ技術</u> | (3) <u>植物免疫</u> |
| (4) <u>環境ストレス</u> | (5) <u>情報伝達阻害</u> | (6) <u>植物キチナーゼ</u> |
| (7) <u>植物-昆虫相互作用</u> | (8) <u>植物アレルゲン</u> | |

13 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)

上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには*を付すこと。

<雑誌論文>

川崎:

- ^{*2}Ishikawa K, Yamaguchi K, Sakamoto K, Yoshimura S, Inoue K, Tsuge S, Kojima C, and Kawasaki T. Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice. *Nat. Commun.* 2014, 5:5430.
- Shinya T, Yamaguchi K, Desaki Y, Yamada K, Narisawa T, Kobayashi Y, Maeda K, Suzuki M, Tanimoto T, Takeda J, Nakashima M, Funama R, Narusaka M, Narusaka Y, Kaku H, *Kawasaki T, and *Shibuya N. Selective regulation of chitin-induced defense response by the Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinase PBL27. *Plant J.* 2014, 79:56-66. *Co-corresponding authors.
- Kosami KI, Ohki I, Nagano M, Furutani K, Sugiki T, Kawano Y, Kawasaki T, Fujiwara T, Nakagawa A, Shimamoto K, and Kojima C. The crystal structure of the plant small GTPase OsRac1 reveals its mode of binding to NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 2014, 289:28569-28578.
- Kosami KI, Ohki I, Hayashi K, Tabata R, Usugi S, Kawasaki T, Fujiwara T, Nakagawa A, Shimamoto K, and Kojima C. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a rice Rac/Rop GTPase, OsRac1. *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* 2014, 70:113-115.
- Kosami KI, Ohki I, Hayashi K, Tabata R, Usugi S, Kawasaki T, Fujiwara T, Nakagawa A, Shimamoto K, and Kojima C. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a rice Rac/Rop GTPase, OsRac1. *Acta Crystallographica Section F.* 2014, 70:113-115.
- Yamaguchi K, Yamada K, and Kawasaki T. Receptor-like cytoplasmic kinases are pivotal components in pattern recognition receptor-mediated signaling in plant immunity. *Plant Signal Behav.* 2013, 8:e25662.
- Akamatsu A, Wong HL, Fujiwara M, Okuda J, Nishide K, Uno K, Imai K, Umemura K, Kawasaki T, Kawano Y, and Shimamoto K. An OsCEBiP / OsCERK1 - OsRacGEF - OsRac1 module is an essential early component of chitin-induced rice immunity. *Cell Host Microbe.* 2013, 13:465-476.
- Yamaguchi K, Nakamura Y, Ishikawa K, Yoshimura Y, Tsuge S, and Kawasaki T. Suppression of rice immunity by the *Xanthomonas oryzae* type III effector Xoo2875. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 2013, 77:796-801.
- ^{*1}Yamaguchi K, Yamada K, Ishikawa K, Yoshimura S, Hayashi N, Uchihashi K, Ishihama N, Kishi-Kaboshi M, Takahashi A, Tsuge S, Ochiai H, Tada Y, Shimamoto K, Yoshioka H, and Kawasaki T. A receptor-like cytoplasmic kinase targeted by a plant pathogen effector is directly phosphorylated by the chitin receptor and mediates rice immunity. *Cell Host Microbe.* 2013, 13:347-357.
- Yamaguchi K, Nakamura Y, Ishikawa K, Yoshimura Y, Tsuge S, and Kawasaki T. Suppression of rice immunity by the *Xanthomonas oryzae* type III effector Xoo2875. *Biosci. Biotechnol.*

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

- Biochem. 2013, 77:796–801.
11. Wamaita MJ, Yamamoto R, Wong HL, Kawasaki T, Kawano Y, and Shimamoto K. OsRap2.6 transcription factor contributes to rice innate immunity through its interaction with Receptor for Activated Kinase-C 1 (RACK1). *Rice*. 2012, 5:35.
 12. Kim SH, Oikawa T, Kyojuka J, Wong HL, Umemura K, Kishi-Kaboshi M, Takahashi A, Kawano Y, Kawasaki T, and Shimamoto K. The bHLH Rac immunity1 (RAI1) is activated by OsRac1 via OsMAPK3 and OsMAPK6 in rice Immunity. *Plant Cell. Physiol.* 2012, 53:740–754.
 13. Kawasaki T, Yamaguchi K, Ishikawa K, Yoshimura S, Yamada K, and Yoshimura Y. Rice PAMPs-triggered immunity targeted by pathogen effectors. *Proceeding of 47th PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium*. 2012, 47:23–32.
 14. 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.* 2012, 70:389–397.
 15. Yamaguchi K, and Kawasaki T. Function of Arabidopsis SWAP70 GEF in immune response. *Plant Signal. Behav.* 2012, 7:465–468.

重岡:

1. ^{*6}Corpas F. J., Aguayo-Trinidad S., Ogawa T., Yoshimura K, and Shigeoka S. (2016) Activation of NADPH-recycling systems in leaves and roots of Arabidopsis thaliana under arsenic-induced stress conditions is accelerated by knock-out of Nudix hydrolase 19 (AtNUDX19) gene. *J. Plant Physiol.* in press
2. Ogawa T., Tamoi M., Kimura A., Mine A., Sakuyama H., Yoshida E., Maruta T., Suzuki K., Ishikawa T. and Shigeoka S. (2015) Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by expression of cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to increases in biomass and wax ester production. *Biotechnol. Biofuels*, 8: 80
3. ^{*6}Tanaka H., Maruta T., Ogawa T., Tanabe N., Tamoi M., Yoshimura K. and Shigeoka S. (2015) Identification and characterization of the first member of an Arabidopsis GDP-D-mannose pyrophosphohydrolase, AtNUDX9: its involvement in the regulation of GDP-D-mannose metabolism. *J. Exp. Bot.*, 66, 5797–5808
4. Tanabe N., Tamoi M. and Shigeoka S. (2015) The sweet potato *RbcS* gene (*IbRbcS1*) promoter confers high-level and green tissue-specific expression of the *GUS* reporter gene in transgenic Arabidopsis. *Gene* 567, 244–250
5. Maruta T., Miyazaki N., Nosaka R., Tanaka H., Padilla-Chacon D., Otori K., Kimura A., Tanabe N., Yoshimura K., Tamoi M. and Shigeoka S. (2015) A gain-of-function mutation of plastidic invertase alters nuclear gene expression with sucrose treatment partially via GENOMES UNCOUPLED1-mediated signaling. *New Phytologist* 206, 1013–1023
6. Kamachi S., Hirabayashi K., Tamoi M., Shigeoka S., Tada T. and Wada K. (2015) Crystal structure of the catalase-peroxidase KatG W78F mutant from *Synechococcus elongatus* PCC7942 in complex with the antitubercular pro-drug isoniazid. *FEBS Lett.* 589, 131–137
7. Kamachi S., Hirabayashi K., Tamoi M., Shigeoka S., Tada T. and Wada K. (2015) The crystal structure of isoniazid-bound KatG catalase-peroxidase from *Synechococcus elongatus* PCC7942. *FEBS J.* 282, 54–46
8. Kamachi, S., Wada, K., Tamoi, M., Shigeoka, S. and Tada, T. (2014) The 2.2 Å crystal structure of catalase-peroxidase, KatG, from *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Acta Cryst. F.* 70, 288–293
9. Maruta, T., Noshi, M., Nakamura, M., Matsuda S., Tamoi, M., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2014) Ferulic acid 5-hydroxylase 1 is essential for expression of anthocyanin biosynthesis-associated genes and anthocyanin accumulation under photooxidative stress in Arabidopsis. *Plant Sci.* 219–220, 61–68
10. ^{*4}Maruta, T., Inoue, T., Noshi, M., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2012) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 protects organelles against oxidative stress by wounding- and jasmonate-induced H₂O₂ in Arabidopsis plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1901–1907
11. ^{*3}Noshi, M., Maruta, T., and Shigeoka, S. (2012) Relationship between chloroplastic H₂O₂ and the salicylic acid response. *Plant Signal. Behav.* 7, 944–946
12. ^{*6}Maruta, T., Yoshimoto, T., Ito, D., Ogawa, T., Tamoi, M., Yoshimura, K., and Shigeoka, S. (2012) An Arabidopsis FAD pyrophosphohydrolase, AtNUDX23, is involved in the flavin homeostasis. *Plant Cell Physiol.* 53, 1106–1116
13. ^{*3}Maruta, T., Noshi, M., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., and Shigeoka, S. (2012) H₂O₂-triggered retrograde signaling from chloroplasts to nucleus plays a

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

- specific role in the response to stress. J. Biol. Chem. 287, 11717–11729
14. Ito, D., Yoshimura, K., Ishikawa, K., Ogawa, T., Maruta, T. and Shigeoka, S. (2012) Comparative analysis of molecular characteristics of Arabidopsis CoA pyrophosphohydrolases, AtNUDX11, 15, and 15a. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 139–147
 15. Matsumura, H., Kai, A., Maeda, T., Tamoi, M., Satoh, A., Tamura, H., Hirose M., Ogawa T., Kizu N., Wadano, A., Inoue T. and Shigeoka S. (2011) Structure basis for the regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity via the intrinsically disordered protein CP12. *Structure* 19, 1846–1854
 16. ^{*5}Nishizawa-Yokoi, A., Nosaka, R., Hayashi, H., Tainaka, H., Maruta, T., Tamoi, M., Ikeda, M., Ohme-Takagi, M., Yoshimura, K., Yabuta, Y. and Shigeoka, S. (2011) HsfA1d and HsfA1e involved in the transcriptional regulation of HsfA2 function as key regulators for Hsf signaling network in response to environmental stress. *Plant Cell Physiol.* 52, 933–945
 17. Tamoi, M., Hiramatsu, Y., Nedachi, S., Otori, K., Tanabe, N., Maruta, T. and Shigeoka, S. (2011) Increase in the activity of fructose-1,6-bisphosphatase in cytosol affects sugar partitioning and increases the lateral shoots in tobacco plants at elevated CO₂ levels. *Photosynth. Res.* 108, 15–23
 18. Foyer, CH. and Shigeoka, S. (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions in order to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* 155, 93–100

他 19 報

内海:

1. ^{*8}Fakhruzzaman MD, Inukai Y, Yanagida Y, Kino H, Igarashi M, Eguchi Y, Utsumi R. Study on in vivo effects of bacterial histidine kinase inhibitor, Waldiomycin, in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *J Gen Appl Microbiol.* 2015, 61(5):177–184.
2. Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Eguchi Y, Yanagihara S, Eda Hiro K, Inoue Y, Taniguchi M, Yoshida M, Yamamoto K, Takahashi H, Sawasaki T, Utsumi R, Koike T. Functional characterization of the receiver domain for phosphorelay control in hybrid sensor kinases. *PLoS One.* 2015, 10(7):e0132598.doi:10.1371/journal.pone.0132598
3. Eguchi Y, Utsumi R. Alkali Metals in addition to acidic pH activate the EvgS histidine kinase sensor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2014, 196(17):3140–3149.
4. ^{*7}Ishii E, Eguchi Y, Utsumi R. The activation mechanism of PhoQ/PhoP system by SafA, an auxiliary protein of histidine kinase in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013, 77(4):814–819.
5. ^{*8}Igarashi M, Watanabe T, Hashida T, Umekita M, Hatano M, Yanagita Y, Kino H, Kimura T, Kinoshita N, Inouye K, Sawa R, Nishimura Y, Utsumi R, Nomoto A. Waldiomycin, a novel WalK-histidine kinase inhibitor from *Streptomyces* sp. MK844-mF10. *J Antibiot.* 2013, 66(8):459–464
6. Kato A, Hayashi H, Nomura W, Emori H, Hagihara K, Utsumi R. A connector-like factor, CacA, links RssB/RpoS and the CpxR/CpxA two-component system in *Salmonella*. *BMC Microbiol.* 2012, 12: 224–235.
7. Watanabe T, Igarashi M, Okajima T, Ishii E, Kino H, Hatano, M, Sawa R, Umekita M, Kimura T, Okamoto S, Eguchi Y, Akamatsu Y, Utsumi R. Isolation and characterization of signermycin B, an antibiotic that targets the dimerization domain of histidine kinase WalK. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012, 56(11):3657–3663.
8. ^{*7}Eguchi, Y., Ishii, E., Yamane, M., Utsumi, R. The connector SafA interacts with the multi-sensing domain of PhoQ in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2012, 85(2): 299–313.
9. Kato A, Chen HD, Latifi T, Groisman EA. Reciprocal control between a bacterium's regulatory system and the modification status of its lipopolysaccharide. *Molecular Cell.* 2012, 45(9):897–908.
10. Yeo WS, Zwir I, Huang HV, Shin D, Kato A, Groisman EA. Intrinsic negative feedback governs activation surge in two-component regulatory systems. *Molecular Cell.* 2012, 45(2):409–421.
11. Okamoto S, Yu F, Harada H, Okajima T, Misawa N, Utsumi R. A short-chain dehydrogenase involved in terpene metabolism from *Zingiber zerumbet*. *FEBS J.* 2011, 278(16):2892–2900.
12. Yu F, Okamoto S, Harada H, Yamasaki K, Misawa N, Utsumi R. Zingiber zerumbet CYP71BA1 catalyzes the conversion of alpha-humulene to 8-hydroxy-alpha-humulene in zerumbone biosynthesis. *Cell Mol Life Sci.* 2011, 68:1033–1040.
13. Harada H, Shindo K, Iki K, Teraoka A, Okamoto S, Yu F, Hattan J, Utsumi R, Misawa N. Efficient functional analysis system for cyanobacterial or plant cytochromes P450 involved in sesquiterpene biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011, 90(2):467–476.
14. Eguchi Y, Kubo N, Matsunaga H, Igarashi M, Utsumi R. Development of an Antivirulence Drug

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

against *Streptococcus mutans*: Repression of Biofilm Formation, Acid Tolerance, and Competence by a Histidine Kinase Inhibitor, Walkmycin C. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(14):1475–1484.

15. Eguchi Y, Ishii E, Hata K, Utsumi R. Regulation of acid resistance by connectors of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2011, 193(5):1222–1228.

深溝:

1. ^{*12}Shinya S, Nishimura S, Kitaoku Y, Numata T, Kimoto H, Kusaoke H, Ohnuma T, Fukamizo T. Manuscript title: Mechanism of chitosan recognition by CBM32 carbohydrate-binding modules from a *Paenibacillus* sp. IK-5 chitosanase/glucanase *Biochem. J.* 2016 in press
2. ^{*11}Ohnuma T, Dozen S, Honda Y, Kitaoka M, Fukamizo T. A glycosynthase derived from an inverting chitinase with an extended binding cleft. *J. Biochem.* 2016 in press
3. Umemoto N, Ohnuma T, Osawa T, Numata T, Fukamizo T. Modulation of the transglycosylation activity of plant family GH18 chitinase by removing or introducing a tryptophan side chain. *FEBS Lett.* 2015, 589(18):2327–2333.
4. Kitaoku Y, Umemoto N, Ohnuma T, Numata T, Taira T, Sakuda S, Fukamizo T. A class III chitinase without disulfide bonds from the fern, *Pteris ryukyuensis*: crystal structure and ligand-binding studies. *Planta.* 2015, 242(4):895–907.
5. ^{*9}Umemoto N, Kanda Y, Ohnuma T, Osawa T, Numata T, Sakuda S, Taira T, Fukamizo T. Crystal structures and inhibitor binding properties of plant class V chitinases: the cycad enzyme exhibits unique structural and functional features. *Plant J.* 2015, 82(1):54–66.
6. Shinya S, Urasaki A, Ohnuma T, Taira T, Suzuki A, Ogata M, Usui T, Lampela O, Juffer AH, Fukamizo T. Interaction of di-N-acetylchitobiosyl moranoline with a family GH19 chitinase from moss, *Bryum coronatum*. *Glycobiology.* 2014, 24(10):945–955.
7. ^{*10}Ohnuma T, Umemoto N, Nagata T, Shinya S, Numata T, Taira T, Fukamizo T. Crystal structure of a “loopless” GH19 chitinase in complex with chitin tetrasaccharide spanning the catalytic center, *Biochim. Biophys. Acta,* 2014, 1844(4):793–802.
8. Ohnuma T, Umemoto N, Taira T, Fukamizo T, Numata T. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an active-site mutant of ‘loopless’ family GH19 chitinase from *Bryum coronatum* in a complex with chitotetraose. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2013; 69(12):1360–1362.
9. ^{*12}Shinya S, Ohnuma T, Yamashiro R, Kimoto H, Kusaoke H, Anbazhagan P, Juffer AH, Fukamizo T. The first identification of carbohydrate binding modules specific to chitosan. *J Biol Chem.* 2013, 288(42):30042–30053.
10. ^{*10}Ohnuma T, Umemoto N, Kondo K, Numata T, Fukamizo T. Complete subsite mapping of a “loopful” GH19 chitinase from rye seeds based on its crystal structure. *FEBS Lett.* 2013, 587(16): 2691–2697.
11. Arimori T, Kawamoto N, Shinya S, Okazaki N, Nakazawa M, Miyatake K, Fukamizo T, Ueda M, Tamada T. Crystal structures of the catalytic domain of a novel glycohydrolase family 23 chitinase from *Ralstonia* sp. A-471 reveals a unique arrangement of the catalytic residues for inverting chitin hydrolysis. *J Biol Chem.* 2013, 288(26):18696–18706.
12. Ogata M, Umemoto N, Ohnuma T, Numata T, Suzuki A, Usui T, Fukamizo T. A novel transition-state analogue for lysozyme, 4-O-β-tri-N-acetylchitotriosyl moranoline, provided evidence supporting the covalent glycosyl-enzyme intermediate. *J Biol Chem.* 2013, 288(9):6072–6082.
13. ^{*11}Ohnuma T, Fukuda T, Dozen S, Honda Y, Kitaoka M, Fukamizo T. A glycosynthase derived from an inverting GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum*. *Biochem J.* 2012, 444(3):437–443.
14. Shinya S, Nagata T, Ohnuma T, Taira T, Nishimura S, Fukamizo T. Backbone chemical shifts assignments, secondary structure, and ligand binding of a family GH-19 chitinase from moss, *Bryum coronatum*. *Biomol NMR Assign.* 2012, 6(2):157–161.
15. Ohnuma T, Sørlie M, Fukuda T, Kawamoto N, Taira T, Fukamizo T. Chitin oligosaccharide binding to a family GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum*. *FEBS J.* 2011, 278(21):3991–4001.
16. Taira T, Mahoe Y, Kawamoto N, Onaga S, Iwasaki H, Ohnuma T, Fukamizo T. Cloning and characterization of a small family 19 chitinase from moss (*Bryum coronatum*). *Glycobiology.* 2011, 21(5):644–654.
17. ^{*9}Ohnuma T, Numata T, Osawa T, Mizuhara M, Vårum KM, Fukamizo T. Crystal structure and mode of action of a class V chitinase from *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol.* 2011, 75(3):291–304.

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

他 14 報

松田:

1. Nakatani Y, Furutani S, Ihara M, Matsuda K, Ivermectin modulation of pH-sensitive chloride channels in the silkworm larvae of *Bombyx mori*, Pestic. Biochem. Physiol., in press.
2. Fuse T, Ikeda I, Kita T, Furutani S, Nakajima H, Matsuda K, Ozoe F., Ozoe Y., Synthesis of photoreactive ivermectin B_{1a} derivatives and their actions on *Haemonchus* and *Bombyx glutamate-gated chloride channels*. 2015, Pestic. Biochem. Physiol. 120, 82–90.
3. Kikuta Y, Nakayama K, Katsuda Y, Hatanaka A, Yamada G, Mitsumori T, Matsuda K, Variations of the *Tanacetum cinerariifolium* lipase influence its acyltransferase activity for pyrethrin synthesis. 2015, Acta Hort. 1073, 153–156.
4. Xu Y, Furutani S, Ihara M, Ling Y, Yang X, Kai K, Hayashi H, Matsuda K, Meroterpenoid chrodrimanins are selective and potent blockers of insect GABA-gated chloride channels. 2015, PLoS One 10, e0122629.
5. Ihara M, Okajima T, Yamashita A, Oda T, Asano T, Matsui M, Sattelle DB, Matsuda K., Studies on an acetylcholine binding protein identify a basic residue in loop G on the β 1 strand as a new structural determinant of neonicotinoid actions. 2014, Mol. Pharmacol. 86,736–746 (2014).
6. Furutani S, Nakatani Y, Miura Y, Ihara M, Kai K, Hayashi H, Matsuda K, GluCl a target of indole alkaloid okaramines: a 25 year enigma solved. 2014, *Sci. Rep.* 4, 6190.
7. Furutani S, Ihara M, Nishino Y, Akamatsu M, Jones AK, Sattelle DB, Matsuda K, Exon 3 splicing and mutagenesis identify residues influencing cell surface density of heterologously-expressed silkworm (*Bombyx mori*) glutamate-gated chloride channels. 2014, Mol. Pharmacol. 86, 686–895.
8. Ihara M, Shimadzu N, Utsunomiya M, Akamatsu M, Sattelle DB, Matsuda K, A single amino acid polymorphism in the *Drosophila melanogaster* D α 1 (ALS) subunit enhances neonicotinoid efficacy at D α 1–chicken β 2 hybrid nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. 2014, Biosci. Biotechnol. Biochem. 78, 543–549.
9. ^{*14}Kikuta Y, Yamada G, Mitsumori T, Takeuchi T, Nakayama K, Katsuda Y, Hatanaka A, Matsuda K, Catalytic-triad and related amino acids are required for acyltransferase activity of the *Tanacetum cinerariifolium* GDSL lipase/esterase-like enzyme TcGLIP for ester-bond formation in pyrethrin biosynthesis. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2013, 77, 1822–1825.
10. Akiyoshi Y, Ju X.-L, Furutani S, Matsuda K, Ozoe Y, Electrophysiological evidence for 4-isobutyl-3-isopropylbicyclophosphorothionate as a selective blocker of insect GABA-gated chloride channels. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013, 23, 3373–3376.
11. ^{*14}Kikuta Y, Ueda H, Takahashi M, Mitsumori T, Yamada G, Sakamori K, Takeda K, Furutani S, Nakayama K, Katsuda Y, Hatanaka A, Matsuda K, Identification and characterization of a GDSL-lipase like protein that catalyzes the ester forming reaction for pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifolium* – a new target for plant protection. 2012, Plant J. 71, 183–193.
12. Yamaguchi M, Sawa Y, Matsuda K, Ozoe F, Ozoe Y, Amino acid residues of both the extracellular and transmembrane domains influence binding of the antiparasitic agent milbemycin A₄ to *Haemonchus contortus* AVR-14B glutamate-gated chloride channels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012, 419, 562–526.
13. Hiragaki S, Kobayashi T, Ochiai N, Toshima K, Dekeyser MA, Matsuda K and Takeda M, A novel action of highly specific miticide, bifenazate as a synergist for a GABA-gated chloride channel of *Tetranychus urticae* [Acari: Tetranychidae]. 2012, *Neurotoxicology* 33, 307–313.
14. Hirata K Kataoka S, Furutani S, Hayashi H, Matsuda K, A fungal metabolite asperparaline A strongly and selectively blocks insect nicotinic acetylcholine receptors: The first report on the mode of action. 2011, PLoS One 6, e18354.
15. ^{*13}Kikuta Y, Ueda H, Nakayama K, Katsuda Y, Ozawa R, Takabayashi J, Hatanaka A, Matsuda K, Specific regulation of pyrethrin biosynthesis in *Chrysanthemum cinerariaefolium* by a blend of volatiles emitted from artificially damaged conspecific plant. 2011, Plant Cell Physiol. 52, 588–596.
16. Ueda H. and Matsuda K., VOC-mediated within-plant communications and nonvolatile systemic signals upregulate pyrethrin biosynthesis in wounded seedlings of *Chrysanthemum cinerariaefolium*, J. Plant Interact., 6, 89–91 (2011).
17. Kataoka S, Furutani S, Hirata K, Hayashi H, Matsuda K, Three austin family compounds from *Penicillium brasilianum* exhibit selective blocking action on cockroach nicotinic acetylcholine receptors. 2011, Neurotoxicology 32, 123–129.

他 3 報

森山:

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

1. 山本美里、何 陽、財満信宏、森山達哉、炎症・アレルギーに関わるレジスチンの変動解析、アレルギーの臨床、2015, 35(14), 58-61.
2. 三口志穂、矢野えりか、末森祐輔、財満信宏、森山達哉、カビ被害による農作物汎アレルギー(PR-10, PR-5, プロフィリン)の変動解析、アレルギーの臨床、2015, 35 (9), 64-67.
3. Yagami A, Suzuki K, Sano A, Iwata Y, Arima M, Moriyama T, Matsunaga K, Immediate allergy due to raw garlic (*Allium sativum*L.) The Journal of Dermatology, 2015, 42(10), 1026-1027.
4. ^{*15}nomata N, Okazaki F, Moriyama T, Nomura Y, Yamaguchi Y, Honjoh T, Kawamura Y, Narita H, Aihara M, Identification of peamaclein as a marker allergen related to systemic reactions in peach allergy, Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2014,112, 175-177.
5. ^{*15}Iijima S, Tsunoda T, Moriyama T, Three Cases of oral allergy syndrome due to walnut: detection of IgE-binding walnut proteins. J. Envir. Derma. Cut. Allergol. 2014, 8(2), 95-102.
6. Zaima N, Yoshimura Y, Kawamura Y, Moriyama T. Distribution of lyso- phosphatidylcholine in endosperm of *Oryza sativa* rice. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2014, 28,1515-1520.
7. Moriyama T, Yanagihara M, Yano E, Kimura G, Seishima M, Tani H, Kanno T, Nakamura-Hirota T, Hashimoto K, Tatefuji T, Ogawa T, Kawamura Y. Hypoallergenicity and immunological characterization of the enzyme-treated royal jelly from *Apis mellifera*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2013, 77: 789-795.
8. ^{*16}Yoshimura Y, Nishii S, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-A^y mice. Biochem Biophys Res Commun. 2013, 434, 486-491.
9. Moriyama T, Yano E, Suemori Y, Nakano K, Zaima N, and Kawamura Y. Evaluation of Hypoallergenicity of Various Miso Pastes Manufactured in Japan. J. Nutr. Sci.Vitaminol. 2013, 59:462-469.
10. Moriyama T, Yano E, Kitta K, Kawamoto S-I, KawamuraY, Todoriki S. Effect of Gamma-Irradiation on Soybean Allergen Levels. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2013, 77:2371-2377.
11. 舟木聡子、加藤敦子、森山達哉、染毛剤ヘナによる職業性接触蕁麻疹発症後、多種の野菜による即時型アレルギーを併発した1例、皮膚科の臨床、2013, 55,(11):1401-1404.
12. Chikako Sugiura, Shiho Nishimatsu, Tatsuya Moriyama, Sayaka Ozasa, Teruo Kawada, and Kazutoshi Sayama, Catechins and Caffeine Inhibit Fat Accumulation in Mice through the Improvement of Hepatic Lipid Metabolism, J. Obesity, Volume 2012 ,2012, Article ID 520510, 10 pages.
13. ^{*16}Makino-Wakagi, Y., Yoshimura, Y., Uzawa, Y., Zaima, N., Moriyama, T., Kawamura, Ellagic acid in pomegranate suppresses resistin secretion by a novel regulatory mechanism involving the degradation of intracellular resistin protein in adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2012, 417: 880-885.
14. Yoshimura Y, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Different localization patterns of anthocyanin species in the pericarp of black rice revealed by imaging mass spectrometry. PLoSOne.2012, 7(2):e31285.
15. Mizutani Y, Shibuya Y, Takahashi T, Tsunoda T, Moriyama T, Seishima M. "Major royal jelly protein 3 as a possible allergen in royal jelly-induced anaphylaxis." J Dermatol. 2011, 38(11):1079-1081.
16. 飯島茂子、森山達哉、クラス 1 およびクラス 2 の両方が関与したと考えた豆乳によるアナフィラキシーの1例、J. Envir. Derma. Cut. Allergol. 2011, 5(5): 439-449.
17. 原田 晋、田中 功、有津 崇、田中 昭、森山達哉、ピーナッツアレルギー:果物類のOASおよび豆乳アレルギーとの合併例、皮膚病診療、2011, 33(5):479-482.

他 7 報

<図書>

1. バイオテクノロジーの現状と課題、重岡 成、田茂井政宏、光合成生物の生命科学、培風館、140-160(2014)
2. "Marine Medical Glycomics", Umemoto N, Ohnuma T, **Fukamizo T**. Enzymatic synthesis of chitin oligosaccharides with longer chains, ed. by Pomin VH, Nova Science Publishers, Inc. in press (2013)
3. "Lysozymes: Sources, Functions and Role in Disease", Shinya S, Ohnuma T, Brzezinski R, Scheerle RK, Grassmann J, Letzel T, and **Fukamizo T**. Lysozyme Superfamily: Progress in Functional Analysis using ESI-MS and NMR Spectroscopy, ed. by Maang XG, Cheung WF, Nova

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

Science Publishers, Inc. pp. 127-153 (2013)

4. "Molecular mechanism of bacterial two-component signal transduction networks via connectors" In "Two-component systems in bacteria" ed. by R. Gross and D.Beier, Horizon Scientific Press.: chapter 8:149-162: (2012)
5. 森山達哉、小川 正、食品工業 NEO「アレルギーと食品－食品開発のためのアレルギー制御・検査技術－」(食品工業編集部 編)光琳「8章、大豆アレルギーの多様性とそのリスク低減化戦略～低アレルゲン大豆加工食品の開発と流通システムの構築の試み～」(2012)
6. 硫黄同化、重岡 成、田茂井政宏、藻類ハンドブック、株式会社エヌ・ティー・エス、171-173 (2012)
7. "Protein and Peptide Analysis by LC-MS: Experimental Strategies" Ohnuma T, **Fukamizo T** Expression and Purification of Bioactive Proteins/Peptides with Conventional Liquid Chromatography. in (RSC Chromatography Monographs) (ed. by Letzel T), RSC, Publishing pp.26-37(2011)

<学会発表>

川崎:

1. 川崎 努、山口公志、石川和也、山田健太、吉村悠矢、「エフェクターによるイネ免疫信号伝達系の抑制機構」、日本植物生理学会・シンポジウム、岩手、2016年3月18-20日
2. 山口公志、山田健太、白川友美、川崎 努、「エフェクターの宿主標的因子を利用した植物免疫シグナル伝達経路の解析」、平成27年度植物感染生理談話会、愛媛、2015年8月24-26日。
3. 吉村智美、「稲と白葉枯病菌の戦い」、第15回けいはんな地区植物科学懇談会/第40回植物バイテクシンポジウム、京都、2015年10月30日。
4. 山口公志、「植物免疫シグナル伝達経路の解明と 耐病性植物の開発への展望」、第14回けいはんな地区植物科学懇談会、京都、2014年11月11日。
5. 山口公志、「植物免疫におけるMAPキナーゼカスケードの活性化メカニズムの解析」、日本植物病理学会関西西部会若手の会、富山、2014年9月26日。
6. 川崎 努、「Xanthomonas エフェクターによる宿主のユビキチン修飾系の制御」、植物細菌病談話、岡山、2014年10月9-10日。
7. Kawasaki, T. "Biological function of *Xanthomonas* effectors in suppression of plant immunity". The 13th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Shanghai, China Jun 8-14, 2014
8. 川崎 努:「植物の病原菌認識受容体における免疫反応の誘導機構」、日本生体防御学会シンポジウム「動物・植物・微生物の生体防御と、そのマスター分子活性酸素」、熊本、2013年7月9-12日。
9. 川崎 努: "Suppression of pattern recognition receptor-mediated plant immunity by bacterial effector", 日本細菌学会ワークショップ「植物と動物の自然免疫に関する類似と相違」、東京都、2014年3月26-28日。
10. 川崎 努、山口公志、石川和也、吉村智美、山田健太、吉村悠矢、「イネにおける PAMPs 誘導抵抗性の情報伝達機構と病原菌の感染戦略」、平成24年度植物感染生理談話会、滋賀、2012年8月30日-9月1日。
11. 川崎 努、「植物の免疫と病原菌の感染戦略」、平成24年度近畿植物学会講演会、奈良、2012年11月10日。
12. 川崎 努、「植物と病原菌の分子レベルの戦い」、第12回けいはんな地区植物科学懇談会、奈良、2012年11月29日。
13. 川崎 努、「病原菌の感染から身を守る植物の免疫機構」、私立大学戦略的基盤形成支援事業アグリバイオシンポジウム2012、奈良、2012年12月8日。
14. 川崎 努、山口公志、石川和也、山田健太、吉村悠矢、「エフェクターによるイネ免疫信号伝達系の抑制機構」、日本植物生理学会・シンポジウム、岡山、2013年3月21-23日。(オーガナイザー)
15. 川崎 努、「病原菌エフェクターが標的とする植物免疫因子の機能解明」、第3回高知大学植物健康基礎医学シンポジウム、高知、2011年8月7-8日。

他、一般講演等 76 件

重岡:

1. 田茂井政宏、重岡 成: 栄養シグナルによる植物の代謝・形態形成制御機構 アグリバイオシンポジウム2014 2014年11月29日(近畿大学)
2. Masahiro Tamoi: "Effects of improvement of photosynthetic carbon metabolism on plant productivity" Institute for Protein Research (IPR) International Seminar "Regulation and Environmental Adaptation of Photosynthesis: An Important Theme for Structural Life Science 2014年10月24日(大阪大学)
3. Shigeru Shigeoka: "Improving growth and environmental stress tolerance of plants by molecular engineering" NC-CARP and JST CREST/PRESTO International Symposium, Toward the use of atmospheric CO₂-from photosynthesis to biorefinery 2013年11月8日(Yayoi Auditorium,

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

- Ichijo Hall, The University of Tokyo)
4. 重岡 成:「光合成生物の環境ストレス応答・耐性の分子機構に関する研究」日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本ビタミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区 2013 年度合同広島大会 “特別講演”2013 年度日本農芸化学会受賞講演 2013 年 9 月 5 日(県立広島大学)
 5. 重岡 成:「畑でつくるサプリメント」日本農芸化学会 北海道支部 夏期シンポジウム 2013 年 8 月 10 日(旭川国際会議場)
 6. 重岡 成:「藻の仲間で未来を拓く!最新の栄養学とバイオ燃料への活用 “元気で長生きの秘訣!”」石垣市公開市民講座 2013 年 6 月 3 日(石垣市健康福祉センター)
 7. 田茂井政宏、鈴木健吾、石川孝博、重岡 成:「ユーグレナによるバイオ燃料生産基盤技術の開発」第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会 2013 年 6 月 1 日(沖縄県市町村自治会館)
 8. 重岡 成:「光合成生物の環境ストレス応答・耐性の分子機構に関する研究」日本農芸化学会 2013 年度大会 学会賞受賞講演 2013 年 3 月 24 日(電力ホール:宮城)
 9. 丸田隆典、重岡 成、高等植物における活性酸素種代謝とレドックスシグナリング 第 54 回植物生理学会年会 2013 年 3 月 21 日(岡山大学)
 10. 吉村和也、丸田隆典、重岡 成、FAD加水分解酵素による植物フラビン代謝の制御機構第 54 回植物生理学会年会 2013 年 3 月 21 日(岡山大学)
 11. 重岡 成:「畑でつくるサプリメント」平成 24 年度「ビタミンの日」記念講演「現代社会におけるビタミンとバイオファクター」2012 年 12 月 8 日(奈良女子大学)
 12. 重岡 成:「レドックス制御を介した環境ストレス応答と分子育種」第 30 回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム:植物のストレス耐性の基礎研究から応用への展開 2012 年 8 月 3 日(奈良先端科学技術大学院大学)
 13. 重岡 成:「環境変化に対する光合成生物の生存戦略~ビタミンによるレドックス制御を介した細胞応答~」日本ビタミン学会 第 64 回大会 2012 年 6 月 22 日(長良川国際会議場)
 14. Msahiro Tamoi: “Improvement of plant growth and productivity by molecular engineering” 2012 年 4 月 28 日(Shanghai, P.R.China)
 15. Shigeru Shigeoka: “Molecular Engineering of Environmental Stress Tolerance and High Yield in Plants” Annual Meeting and Symposium of Korean Society of Applied Biological Chemistry 2011 年 10 月 20 日(Jeju, Korea)
 16. Shigeru Shigeoka: “Improving environmental stress tolerance and growth of plants by molecular engineering” 2011 international symposium on plant Metabolism 2011 年 10 月 19 日(Kyung Hee University: Korea)
 17. Shigeru Shigeoka: “The crop improvement of tolerance to oxidative stresses” The 7th ACSA Conference (Asian Crop Science Association) 2011 年 9 月 27-29 日(IPB International Convention Center: Bogor, Indonesia)
 18. 重岡 成:「植物バイオで拓く未来—ここまで来た遺伝子組換え作物—」バイオ部会平成 23 年度第 1 回例会 2011 年 7 月 1 日(松谷化学工業株式会社)
 19. 重岡 成:「身体のサビを取る抗酸化ビタミン A,C,E(エース)」近畿大学農学部公開講座 メインテーマ「元気で長生きの秘訣!」2011 年 5 月 21 日(奈良県文化会館)
- 他、一般講演等 250 件

内海:

1. Ryutaro Utsumi: “Isolation and characterization of waldiomycin as a new antibiotic targeting bacterial histidine kinases”, Antibiotic alternatives for the New Millennium, London, UK, 5-7 Nov, 2014.
2. 内海龍太郎、「細菌情報伝達阻害型薬剤の開発と応用」、第 25 回新薬創製談話会、京都 嵐山、2014 年 9 月 9 日。
3. 内海龍太郎、「細菌分子標的剤開発に向けた微生物代謝工学」、日本農芸化学会平成 26 年度大会シンポジウム「ゲノムからアプローチした微生物代謝工学」、明治大学、2014 年 3 月 30 日。
4. 内海龍太郎、「細菌情報伝達阻害型薬剤の開発」、日本農芸化学会平成 25 年度大会シンポジウム「薬剤耐性とその克服へのアプローチ」、東北大学、2013 年 3 月 27 日。
5. 内海龍太郎、「細菌情報伝達機構と新規抗菌剤の開発」、日本細菌学会平成 24 年度大会シンポジウム、長崎新聞文化ホール、2012 年 3 月 23 日。
6. 内海龍太郎、「新しい環境調和型抗菌剤の開発と応用」、日本農芸化学会平成 24 年度大会シンポジウム 京都女子大学、2012 年 3 月 25 日。
7. Ryutaro Utsumi: “Antibacterial and antivirulent drugs targeting bacterial signal transduction”, The Commemorative International Conference for the 20th Anniversary of Korea Society of Life Science, Bexico, Busan, Korea, 27-28 Oct, 2011.
8. Ryutaro Utsumi: “Antibacterial and antivirulent drugs targeting bacterial histidine kinases”, BIT’ s 1st Annual World Congress and Microbes-2011, Beijing International Convention Center, Beijing, China, 30 July-1 Aug, 2011.

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

他、一般講演等 60 件

深溝:

1. Tamo Fukamizo and Shoko Shinya: Binding Mode of Chitosan Oligosaccharides to Novel Chitosan-Specific Carbohydrate-Binding Modules (CBM32) of a Chitosanase from *Paenibacillus* sp. IK-5, Keynote Lecture of Biological Materials Workshop at 8th KIFEE International Symposium on Environment, Energy and Materials, Trondheim, Norway, Sept. 20-23th, 2015
2. 大沼貴之、日本応用糖質科学会奨励賞受賞講演、「キチン質分解酵素の構造と機能および利用に関する研究」、奈良県春日野国際フォーラム、2015年9月17日。
3. 新家粧子、西村重徳、北奥喜仁、木元久、草桶秀夫、沼田倫征、大沼貴之、深溝慶、「溶液 NMR 法と X 線結晶解析によるキトサン結合モジュールとキトサンの相互作用解析、応用糖質科学シンポジウム、2015年9月18日、東大寺総合文化センター・金鐘ホール。
4. 大沼貴之:キチンオリゴ糖の酵素合成を目指した植物キチナーゼのエンジニアリング、第 43 回 GRL 静岡セミナー、静岡大学、2014年9月18日。
5. Tamo Fukamizo: Keynote Lecture “Crystal structures of family GH19 chitinases complexed with chitooligomers revealed the difference in the substrate-binding mode between loopful and loopless enzymes”, 10th Conference of Insect Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, China, Jun. 15-19, 2013.
6. Tamo Fukamizo: Keynote Lecture “The Mode of Action of Chitinolytic Enzymes: Production of Bioactive Oligosaccharides as Animal Nutrients”, 3rd AINI International Seminar “The role of Nutrition and Feed in Supporting Self Sufficient in Animal Products, Food Safety and Human Welfare”, Andalas University, Padang, Indonesia, 24-25 September, 2013.
7. Tamo Fukamizo: “Crystal structures and engineering of plant family GH18 chitinases”, Biochemistry Special Lecture for Graduate Students, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, Jun. 15-19, 2013.
8. 大沼貴之、深溝慶、Family GH-19 キチナーゼに関する新しい知見、日本応用糖質科学会平成 23 年度大会特別シンポジウム「応用糖質科学研究の新時代を拓く」、北大学術交流会館、2011年9月29日。
9. Tamo Fukamizo: an Invited Lecture “Plant Chitinases: New Insights from Crystallography, Substrate Binding, and Engineering Studies”, 9th Asian Pacific Chitin/Chitosan Symposium, Yasaka Saigon Hotel, Nha Trang, Vietnam, Aug. 3-6, 2011.

他、一般講演等 104 件

松田:

1. Kazuhiko Matsuda: Deciphering biosynthesis of natural insecticides pyrethrins, Phytochemicals for crop protection: Discovery to Molecular Target, Pacificchem 2015, 2015, Honolulu, Hawaii, USA, Dec 15.
2. 松田 一彦: 昆虫制御のケミカルバイオロジー 糸状菌が産生する昆虫制御物質の標的解明とその意味、新農薬を志向したケミカルバイオロジー、日本生化学会ワークショップ、2015年12月3日
3. Kazuhiko Matsuda: Structural, functional and mutagenesis studies identify components of neonicotinoid binding to nicotinic receptors and facilitate prediction of resistance, Resistance 2015, Rothamsted Research, Harpenden, UK, Sep 14.
4. Kazuhiko Matsuda: Molecular mechanisms for diverse actions and selectivity of neonicotinoids, 2015, 250th ACS National Meeting, Boston, Massachusetts, USA, Aug 16.
5. 松田 一彦: 温故知新:ピレスリンから学ぶ昆虫制御の原理、第 17 回中四国支部若手シンポジウム(第 6 回農芸化学の未来開拓セミナー)、岡山大学、2014年5月16日。
6. 松田 一彦: ケミカルセンシングによる生命恒常性の維持と昆虫制御、日本学術振興会「日本におけるケミカルバイオロジー研究の新展開」、東京大学、2014年6月14日。
7. Kazuhiko Matsuda: Structural determinants of selective and diverse target site actions of neonicotinoids, 2014 Nicotinic Acetylcholine Receptor, University of Cambridge, UK, July 24.
8. Kazuhiko Matsuda K: Probing insect LGICs using selective ligands, 13th International Congress of Pesticide Chemistry, 2014, San Francisco, USA, August 13.
9. Kazuhiko Matsuda: Unraveling the mechanism of pyrethrin biosynthesis”, Studies on ecological interaction networks that promote biodiversity-From gene to ecosystem-, 2012, The Max Planck Institute for Chemical Ecology, Yena, Germany. Oct. 15.
10. Kazuhiko Matsuda: Predicting the hot spot for neonicotinoid resistance in nature, NARO International Symposium 2012, New insight into insecticide resistance of rice planthoppers and the insect-borne viruses, 2012, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan, Dec. 7.
11. 松田 一彦、昆虫制御のケミカルバイオロジー、ケミカルバイオロジー勉強会、理化学研究所、和光、埼玉、2012年2月21日

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

12. Kazuhiko Matsuda: Toward mechanism of selectivity and resistance management of neonicotinoids (Plenary Lecture), 2nd International Conference on Agrochemicals Protecting Crops, Health and Natural Environment – Role of Chemistry for Sustainable Agriculture, 2012, Delhi, India, Feb 15.
13. Kazuhiko Matsuda: VOC-mediated communications in *Chrysanthemum cinerariaefolium*, Studies on ecological interaction networks that promote biodiversity–From gene to ecosystem–, 2011, Neuchatel, Switzerland, Sep. 9.
14. Kazuhiko Matsuda: Structural insights into the mode of actions of and resistance to neonicotinoids, 5th Pan Pacific Conference on Pesticide Science, 2012, Beijing, China, Sep 17.
15. Kazuhiko Matsuda: “Viewing natural pyrethrins from a modern angle”, International Pyrethrum Symposium, 2011, Launceston, Tasmania, Australia, Nov. 2–4.

他、一般講演等 81 件

森山:

1. 森山達哉:食物アレルギーの多様性とリスク変動解析、兵庫県立大学環境人間学部専門教育講演会、兵庫県立大学環境人間学部姫路新在家キャンパス、2015年11月19日。
2. Tatsuya Moriyama : Diversity of food allergy, (Organizer and speaker) ACN2015 Symposium 32、(How can we fight against food allergy?), 12th Asian Congress of Nutrition, May 16, 2015 (PACIFICO Yokohama, Kanagawa, Japan).
3. 森山達哉:花粉症に関連する新しいタイプの食物アレルギー、市民公開講座「第7回ひと・健康・未来シンポジウム 2015 福岡「食物アレルギーの最新情報」ホテルニューオータニ博多、2015年7月4日。
4. 森山達哉:食物アレルギーの原因抗原解析とリスク変動解析、第10回 東京皮膚疾患フォーラム、ザ・ランドマークスクエア TOKYO、2015年7月16日。
5. 森山達哉:食物アレルギーの多様性とリスク変動解析、日本食品科学工学会シンポジウム、京都大学本部キャンパス、2015年8月28日。
6. 森山達哉:花粉症に関連する新しいタイプの食物アレルギー、市民公開講座 第5回ひと・健康・未来シンポジウム 2015 名古屋「食物アレルギーの最新情報」メルパルク名古屋、2015年2月28日。
7. 森山達哉:農作物の健康機能性とアレルギー性、京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻特別セミナー、京都大学宇治キャンパス、2014年11月27日。
8. 森山達哉:大豆・豆乳のタンパク質栄養価に関する研究、日本豆乳協会講演(東京)2014年8月8日。
9. 森山達哉:食物アレルギーの現状と学校現場での対応について、近畿大学教員免許更新講習、近畿大学東大阪キャンパス、2014年8月7日。
10. 森山達哉:穀類による食物アレルギー:大豆アレルギーを中心に、第29回ゴマ科学会大会招待講演、近畿大学東大阪キャンパス、2014年10月4日。
11. 森山達哉:花粉症に関連する新しい食物アレルギーとその発症リスク変動、NPO 食の安全と安心を科学する会(SFSS)食の安全と安心フォーラムⅧ、グランフロント大阪、2014年11月28日。
12. 財満信宏、森山達哉:イメージングマスペクトロメトリーによる食品機能研究、第59回食品新素材研究会特別講演、京都テルサ、2014年9月4日。
13. 森山達哉:クラス2食物アレルギーの現状とそのリスク変動解析、日本食品免疫学会(JAFI)第7回シンポジウム(東京)招待講演、東京大学、2014年6月30日。
14. 森山達哉:野菜と豆で健康に、京丹波町健康講座、京丹波町瑞穂保健福祉センター、2014年2月26日。
15. 森山達哉:新しいタイプの食物アレルギーとその発症リスク変動:(抗原解析の立場から)、NPO 食の安全と安心を科学する会(SFSS)食の安全と安心フォーラムⅧ「我が国における食物アレルギーのリスク管理と低減化策」東京大学、2014年2月2日。
16. 森山達哉:日本食の中心素材:大豆と味噌の健康機能性、関西味噌生販協議会総会 特別講演、ホテルグランヴィア大阪、2013年10月22日。
17. 森山達哉:知ってナットク!日本食素材の健康機能、農学部公開講座(名古屋)近畿大学農学部公開講座「食べ物と健康」、名古屋マリオットアソシアホテル、2013年10月19日。
18. 森山達哉:食物アレルギーの多様性:花粉症関連の食物アレルギーを中心に、第60回日本栄養改善学会学術総会 研究自由集会(栄養士食物アレルギー研究会)招待講演、神戸ポートピアホテル、2013年9月12日。
19. 森山達哉:大人でも要注意!新しい食物アレルギーのお話、近畿大学農学部 公開講座(奈良)、東大寺総合文化センター・金鐘ホール、2012年4月28日。
20. 森山達哉:リコンビナント・アレルゲン及び抗アレルゲン抗体を用いた抗原解析、第24回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム、大阪国際会議場、2012年5月12日。
21. 森山達哉:肥満関連分子の分泌制御をターゲットにした抗メタボ食品因子の探索、岡山バイオア

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

- クティブ研究会招待講演、岡山大学、2012年6月8日。
22. 飯島茂子, 森山達哉: クラス 1 およびクラス 2 の両方が関与したと考えた豆乳によるアナフィラキシーの 1 例、日本皮膚アレルギー学会受賞講演、仙台、2012年7月14日。
 23. 森山達哉: 食品素材の新規アレルギーリスクについて、第 55 回食品新素材研究会 特別講演、京都テルサ、2012年7月17日。
 24. 森山達哉: スパイスのアレルゲン性と健康機能性、第 15 回スパイス・ハーブ研究成果セミナー、東京、2012年7月4日。
 25. 森山達哉: 免疫と栄養、奈良県栄養士会主催 栄養士生涯学習研修会、帝塚山大学、2011年7月9日。
 26. 森山達哉: 醸造食品の低アレルギー性の検証(穀物アレルギーの最近の話題も含めて)、日本醸造協会主催 醸造調味食品研究会、王子、2011年7月13日。
- 他、一般講演等 42 件

<研究成果の公開状況>(上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等
<既に実施しているもの>

●アグリバイオシンポジウム2012

「未来を切り開くアグリバイオ技術: 植物機能の基盤解明と人類へのアウトプット」

日時:2012年12月8日(土)13:00-17:30

場所:近畿大学農学部新教室棟 311 教室

シンポジスト:

- ①田中 寛(東京工大) 葉緑体シグナルが植物の細胞周期を制御する
- ②川崎努(近畿大院・農) 病原菌の感染から身を守る植物の免疫機構
- ③芦苅基行(名大・生物機能開発利用研究センター) ゲノム情報を利用したイネの分子育種
- ④高林純示(京大・生態学研究センター) 植物揮発性物質が駆動する生物間情報・相互作用ネットワーク
- ⑤河田照雄(京大院・農) 植物の代謝物と食品機能
- ⑥田中良和(サントリー(株)植物科学研) バイオテクノロジーによる青い花の開発と実用化

●アグリバイオシンポジウム2013

「構造生物学が推進するアグリバイオ技術革新」

日時:2013年11月30日(土)13:00-17:30

場所:近畿大学農学部新教室棟 311 教室

シンポジスト:

- ①松村浩由(大阪大・院・工学研究科)カルビン回路調節システムの構造基盤」
- ②児嶋長次郎(大阪大・蛋白研)花咲か爺さんの灰を求めて—構造生命科学からのアプローチ
- ③城 宜嗣(理研・播磨)一酸化窒素還元酵素:呼吸酵素の分子進化と環境保全」
- ④伊原 誠(近畿大・院・農学研究科)真菌 TRP チャネルの機能制御の分子基盤」
- ⑤三上文三(京都大・院・農学研究科)結晶構造から探る食品関連酵素の機能」
- ⑥角田佳充(九州大・院・農学研究院)グリコサミノグリカン糖鎖合成酵素の結晶構造解析

●アグリバイオシンポジウム2014

「生物学的および非生物的環境との調和を志向した植物アグリバイオ技術革新」

日時:2014年11月29日(土)13:00-17:30

場所:近畿大学農学部新教室棟 311 教室

- ①川口正代司(基生研・共生システム) CLE ペプチドとサイトカイニンを介した根粒形成の長距離制御
- ②阪井康能(京大・院農・応用生命) C1 微生物-植物系による炭素固定:共役代謝・葉面環境と共生
- ③西澤洋子(農業生物資源研・耐病性作物開発ユニット) 病原菌の感染戦略から考える植物免疫力の強化」
- ④田茂井政宏(近畿大・農・バイオ)栄養シグナルによる植物の代謝・形態形成制御機構
- ⑤村田芳行(岡山大・院・環境生命)孔辺細胞における植物ホルモン信号伝達

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

⑥羽鹿牧太(農研機構・作物研)ゲノム情報を活用した大豆育種のイノベーションと課題: 低アレルギー化等の付加価値賦与を目指して」

●アグリバイオシンポジウム2015

「植物・微生物科学研究の次世代を担う若手研究者」

日時:2015年11月28日(土)13:00-17:30

場所:近畿大学農学部新教室棟 211 教室

- ①山田健太(バイオサイエンス専攻 D2年)植物免疫における MAPK カスケードの活性化機構の解明
- ②野志昌弘(バイオサイエンス専攻研究員)葉緑体 H₂O₂ に由来する酸化シグナリングの生理機能および分子機構の解明
- ③三輪瞬平(バイオサイエンス専攻 M2年)イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* における三成分制御系 TroK,TroR1,TroR2 によるトロポロン合成制御システム
- ④清水莉子(バイオサイエンス専攻 M2年)細菌ヒスチジキナーゼの H-box を標的とする抗生物質、Waldiomycin
- ⑤羽田朋子(バイオサイエンス専攻 M2年)Bacterial Two-Hybrid 法による二成分制御系のヒスチジキナーゼ間の相互作用の探索
- ⑥高島智也(バイオサイエンス専攻 M1年)アレルギー活性をもつスギ花粉キチナーゼ CJP-4 の構造と機能
- ⑦河本大毅(バイオサイエンス専攻 M1年)GH19 キチナーゼとしては異常に高い分子量をもつ *Aeromonas* キチナーゼの構造と機能
- ⑧阪森宏治(応用生命化学専攻 D3年)除虫菊のピレスリン生合成に関するオミクス研究
- ⑨宇都宮麻衣(応用生命化学専攻 M2年)ピレスリン生合成酵素の触媒機構に関する研究
- ⑩久後裕菜(応用生命化学専攻 M2年)ニコチン投与がラット腹部大動脈血管壁に及ぼす影響
- ⑪村上浩規(応用生命化学専攻 B4年)経皮感作し得る大豆タンパク質の同定

<これから実施する予定のもの>

該当なし

初年度において、<http://nara-kindai.univ.jp/02gakka/mext-project/index.html> を開設し、この中で、プロジェクトの内容、メンバー、業績、各年度の事業報告、またセミナーあるいはシンポジウムの開催案内などを取り扱っている。

14 その他の研究成果等

学会賞の受賞等:

1. 大沼貴之:2015年度日本応用糖質科学会奨励賞受賞
2. 重岡 成:2013年度日本農芸化学会賞受賞
3. 森山達哉:2012年度 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会誌年間最優秀論文賞受賞
4. 田茂井政宏:2011年度日本農芸化学会農芸化学奨励賞受賞

発表賞の受賞等:

1. 白川友美:第5回近畿大学院生サミット、優秀ポスター賞:植物免疫における MAP キナーゼカスケードの活性化機構の解析、2015年9月13-15日
2. 白川友美:新学術領域「細胞壁」若手ワークショップ、優秀口頭発表賞:キチン信号伝達経路における MAP キナーゼの活性化機構の解析、2015年7月11日
3. 白川友美:日本植物病理学会本大会、学生優秀発表賞:キチン信号伝達系における MAPKKK 活性化の遺伝学的解析、明治大学、2015年3月28-31日
4. 井上健人:日本植物病理学会本大会、学生優秀発表賞:イネの免疫応答における OsPUB44 interactor1 (PBI1)の機能解析、明治大学、2015年3月28-31日
5. 三輪瞬平:21世紀大腸菌研究会 ポスター発表賞:イネ苗立枯細菌病菌のトロポロン生産制御機構、大津、2015年6月5日
6. 清水莉子:第62回日本生化学会近畿支部例会 発表優秀賞:細菌ヒスチジキナーゼの Hbox

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

- を標的とする新規抗生物質 waldiomycin、立命館大学、2015 年 5 月 16 日。
7. 平井有紀:第 84 回日本生化学会大会 鈴木紘一メモリアル賞:増殖に必須な転写因子 WalR タンパク質標的にした新規抗菌剤の作用部位の解析、京都、2011 年 9 月 24 日。
 8. 松永弘子:2011 年度日本農芸化学会大会トピックス賞:う蝕菌バイオフィルム形成に関するアロマデンドレン類縁化合物の阻害機構、京都、2011 年 3 月 28 日。
 9. 北奥喜仁:日本農芸化学会関西支部例会(第 487 回講演会)支部賛助企業特別賞:LysMドメインの構造と機能:Receptor 型 LysM と Carbohydrate-Binding Module 型 LysM との比較、神戸大学、2014 年 12 月 6 日。
 10. Yoshihito Kitaoku: Excellent Poster Award at the Mie Bioforum 2014 Lignocellulose Degradation and Biorefinery, "Characterization of a GH18 chitinase containing a family 50 carbohydrate-binding module from a horsetail, *Equisetum arvense*" Poster presentation Mie, Japan, 18-21st Nov. 2014
 11. 北奥喜仁:第 28 回キチン・キトサンシンポジウム、ポスター賞:植物由来ファミリーGH18 キチナーゼがもつ LysMドメインの構造と機能、順天堂大学(東京)、2014 年 8 月 7 日。
 12. 新家粧子:第 15 回関西グライコサイエンスフォーラム口頭発表奨励賞:*Paenibacillus* sp. IK-5 キトサナーゼの CBM32 キトサン結合モジュール-リガンド結合に関与するアミノ酸残基-、大阪市立大学、2014 年 5 月 24 日。
 13. Shoko Shinya: Young Author's Award at the 7th KIFEE International Symposium on Environment, Energy and Materials: Binding Mode of Chitosan Oligosaccharides to Novel Chitosan-Specific Carbohydrate-Binding Modules (CBM32) of a Chitosanase from *Paenibacillus* sp. IK-5, Kyoto, Japan, 16-19th Mar. 2014.
 14. 新家粧子:第 10 回アジア・太平洋キチン・キトサン国際シンポジウム・ポスター賞"Binding mode of chitosan oligosaccharides to novel chitosan-specific carbohydrate-binding module (CBM32) of a chitosanase from *Paenibacillus* sp. IK-5"米子、ビッグシップ、2013 年 10 月 4 日~8 日。
 15. 竹中祥子:第 10 回アジア・太平洋キチン・キトサン国際シンポジウム()ポスター賞「Interaction of partially-N-acetylated chitooligosaccharides with a family GH19 chitinase from moss *Bryum coronatum*」米子、ビッグシップ、2013 年 10 月 4 日~8 日。
 16. 梅本尚之:第 14 回関西グライコサイエンスフォーラム最優秀講演賞、「新規糖誘導体 N-アセチルキトオリゴシルモラノリンの阻害特性:GH22 リゾチームと Family GH19 キチナーゼの阻害」大阪大学、2013 年 5 月 25 日。
 17. 梅本尚之:日本農芸化学会関西支部第 477 回講演会・若手優秀発表賞「新規リゾチーム阻害剤、N-アセチルキトオリゴシルモラノリン (GN_n-M):リゾチームおよび Family GH19 キチナーゼに対する阻害機構」神戸大学、2012 年 12 月 1 日。
 18. 新家粧子:第 26 回キチン・キトサンシンポジウム・ポスター賞「*Paenibacillus* sp. IK-5 Family GH-8 キトサナーゼに存在する新規のキトサン特異的糖質結合モジュール」北海道大学、2012 年 7 月 12 日(木)~13 日
 19. 新家粧子:日本農芸化学会関西支部第 472 回講演会若手優秀発表賞「リゾチームスーパーファミリーに属する酵素の基質結合様式に関する研究:NMR による解析」神戸大学、2011 年 12 月 10 日。

プレスリリース等:

1. 川崎努:Ishikawa et al.の Nature Communications 誌への掲載に関する記事。紙面上、読売新聞、日刊工業新聞、奈良新聞、日本農業新聞、商経アドバイス、財経新聞; Web 上、産経写真ニュース、産経新聞コラム、東京新聞、京都新聞、神戸新聞、東北新聞、北海道新聞、静岡新聞、中日新聞、西日本新聞、山陽新聞(2014 年 11 月 13 日)
2. 川崎努:Yamaguchi et al.の Cell Host Microbe 誌への掲載に関する記事。読売新聞(2013 年 3 月 14 日)、朝日新聞 DIGITAL(2013 年 3 月 16 日)、官庁通信(2013 年 3 月 21 日)、商経アドバイス(2013 年 4 月 15 日)
3. 重岡 成:中日新聞「こどもウィークリー」"珍しい生物ミドリムシ"掲載 2014 年 12 月 13 日
4. 重岡 成:朝日放送「キャスト」"ミドリムシの可能性"解説 2014 年 12 月 2 日放送。
5. 重岡 成:NHK「NEWS WEB」出演 2014.10.17 放送。
6. 重岡 成:NHK 総合(香川県域)「ゆう6かがわ」解説 2014 年 10 月 3 日放送。
7. 重岡 成:産経新聞 WEB ニュース「デイリーコラム・坂口至徳の化学の現場を歩く」,"悪環境で高収量...ストレス強い植物、分子レベル解明 重岡・近大教授に最高賞"2013 年 3 月 1 日
8. 内海龍太郎:日本経済新聞:院内感染、多剤耐性細菌の効果の高い抗生物質、2012 年 7 月 18 日。
9. 深溝 慶:キトサン結合タンパク質を発見。奈良新聞(2013 年 9 月 5 日)、福井新聞(2013 年 9 月 5 日)、化学工業日報(2013 年 9 月 6 日)、日経産業新聞(2013 年 9 月 6 日)、毎日新聞(2013 年 9 月 8 日)、読売新聞(2013 年 9 月 30 日)
10. 森山達哉:「凍り豆腐は大豆クラス 2 食物アレルギーのリスクが低減された大豆食品 - 近大」と

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

してマイナビニュース(テクノロジー)に掲載。http://news.mynavi.jp/news/2013 /10/25/041/ 、2013年10月25日。

11. 森山達哉:独立行政法人 国民生活センター 2013年12月5日発表情報(注意喚起)「豆乳等によるアレルギーについてー花粉症(カバノキ科花粉症)の方はご注意をー」の報告書(http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20131205_1.pdf)において、これまでの大豆アレルギーに関する発表論文・総説が引用使用。2013年12月5日。
12. 森山達哉:近畿大学プレスリリース「ザクロ果汁成分「エラグ酸」に「レジスチン」分泌抑制作用 近畿大学農学部グループが発見、糖尿病予防に役立つ可能性」2012年7月9日。
13. 森山達哉:朝日新聞デジタル「ザクロ果汁成分「エラグ酸」に「レジスチン」分泌抑制作用 近畿大学農学部グループが発見、糖尿病予防に役立つ可能性」2012年7月9日。
14. 森山達哉: NHK 奈良放送局 テレビ放映「ザクロに糖尿病予防成分発見」2012年7月11日。
15. 森山達哉:マイナビニュース(WEBニュース)「ザクロ」の果汁は2型糖尿病の改善に持ってこい! - 近畿大が発見」2012年7月11日。

特許:

1. 横田明穂、蘆田弘樹、明石欣也、牛山敬一、重岡成:“塊茎生産能または葡萄枝形成能が野生株に比して向上している葡萄枝形成植物の作製方法、当該方法によって作製された葡萄枝形成植物、出願番号:特願 2012-534947、出願日:2011年4月11日。
2. 重岡成、田茂井政宏、鈴木健吾、吉田絵梨子:“ユーグレナへの遺伝子導入方法” 出願番号:特願 2014- 037394、出願日:2014年2月27日。
3. 重岡成、田茂井政宏、鈴木健吾、吉田絵梨子:“ユーグレナの形質転換体”、出願番号:特願 2014-037395、出願日:2014年2月27日。
4. 内海龍太郎、五十嵐雅之 “新規化合物 MK844-mF10 物質、その製造法及びその用途”:特許第 5686981 号 登録日:平成 27 年 1 月 30 日
5. 内海龍太郎 五十嵐雅之 “新規化合物ウオークマイシン、その製造法及びその用途”:特許第 5636179 号 登録日:平成 26 年 10 月 24 日
6. 内海龍太郎、余豊年、三沢典彦、岡本尚、原田尚志 “セスキテルペン変換酵素遺伝子及びそれを利用した酸化セスキテルペンの製造方法”:特許第 5526381 号 登録日:平成 26 年 4 月 25 日
7. 内海龍太郎、原田尚志、三沢典彦 “組換え大腸菌を用いたイソプレノイドの製造方法”:特許第 5405030 号、登録日:平成 25 年 11 月 8 日
8. 内海龍太郎、五十嵐雅之、波多野和樹、渡邊崇史 “植物病害防除剤”:特許第 5254097 号、登録日:平成 25 年 4 月 26 日
9. 内海龍太郎、五十嵐雅之 “新規化合物シグナマイシン、その製造方法、及びその用途”: 特許 5220862 号 登録日:平成 25 年 3 月 15 日
10. 内海龍太郎 “セスキテルペンシスターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸”:特許第 5219025、登録日:平成 25 年 3 月 15 日

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1101035

15 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

<「選定時」に付された留意事項>

スケールの大きな視点で実行されたい。

<「選定時」に付された留意事項への対応>

スケールの大きな視点から、アグリバイオ技術の技術革新を進めるために、プロジェクトメンバー間のコミュニケーションを奨励し、自分自身で得た研究成果を多角的に自己評価できるようにした。また、メンバー間の共同研究を奨励し、機能的な相関関係を保ちながら研究が進められるようにした。実際、深溝グループと内海グループは蛋白質NMR解析で、深溝グループと川崎グループはキトオリゴ糖の効率的生産で、さらに深溝グループと川崎グループおよび重岡グループはX線結晶構造解析において共同研究を展開し、現在、その研究成果の学会発表を準備中である。

これまで得られてきた研究成果はどちらかと言えば、実験室レベルでの成果であり、ここで得られた情報がそのままスケールの大きな実験系で適用できるかどうかはこれからの課題である。今後、この点を意識した実験系の設定が望まれる。

<「中間評価時」に付された留意事項>

該当なし

<「中間評価時」に付された留意事項への対応>

該当なし

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～平成 27 年度)
研究成果最終報告書

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・教授・川崎 努

研究協力者：助教：山口公志

定時職員：川崎 智美

実験補助：山田健太、吉村悠矢、早田奈央、白川友美、井上健人、大内俊和、亀井美里、田中幹人、目崎博久

1. 研究の目的

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。一方、病原菌は、受容体によって誘導される防御反応を阻害するため、植物細胞内に分泌タンパク質（以下、エフェクター）を送り込む。エフェクターは、植物免疫誘導の主要ステップで働く植物免疫因子を阻害することで、植物免疫反応を効率よく抑制すると考えられる。このことは、エフェクターがターゲットとしている植物因子を同定することで、受容体による病原菌認識から抵抗性発現に至る過程で機能している主要な植物免疫因子を同定できることを意味している。本研究課題では、エフェクターが標的とする植物免疫因子を同定し、その機能を解析することで、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する。

2. 研究内容

1) 白葉枯病菌エフェクターを利用した新奇な植物免疫因子の探索

植物は、病原菌を構成する成分(PAMPs)を認識して、様々な防御反応を誘導する。一方、病原菌は、TypeIII 分泌システム等を利用して、自身のタンパク質（エフェクター）を植物の細胞内に送り込み、植物の防御応答を抑制することが知られている。そのことから、病原菌のエフェクターは、植物の感染認識から抵抗性発現に至る過程の鍵となるステップで働いている植物免疫因子の機能を阻害していると考えられる。そこで、本研究では、イネの最重要病害の一つである白葉枯病菌の 10 種類のエフェクターを利用して、新規な植物免疫因子の探索を試みた。まず、植物の免疫応答を強く阻害するエフェクターを同定するため、10 種類の各々のエフェクターを発現する形質転換イネを作成し、TypeIII 分泌システムの欠損変異体である *Xoo hrpX* 株を用いた接種実験を行い、病斑長および菌の増殖量を解析した(図 1)。そ

の結果、3種類のエフェクター(XopY、XopAA、XopP)が、*Xoo hrpX*株によって誘導されるPAMPs誘導抵抗性を強く阻害することが明らかになった。

XopAA発現植物体は、矮性の表現型を示し、その表現型はブラシノステロイドの受容体BRI1の変異体に非常によく似ていた(図2A-C)。BRI1やPAMPs受容体であるFLS2の機能発現には、受容体型キナーゼであるBAK1が必要である。Two Hybrid法を用いて、XopAAとBAK1の相互作用を調べたところ、両者が相互作用していることが明らかとなった(図2D)。このことから、XopAAがイネのBAK1をターゲットしてPAMPs抵抗性を阻害していると考えられる。

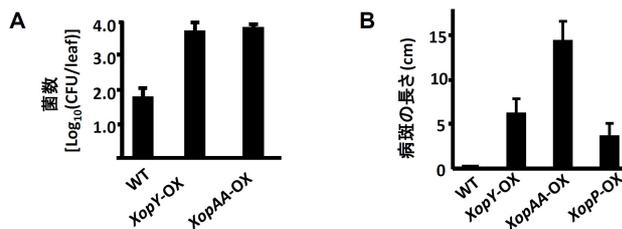


図1 白葉枯病菌エフェクター発現イネへの*XooHrp*株の接種実験

A:病斑の長さ、B:菌の増殖量

本結果は、Yamaguchi et al. Biosci. Biotechnol Biochem, 2013, 77:796-801より転載

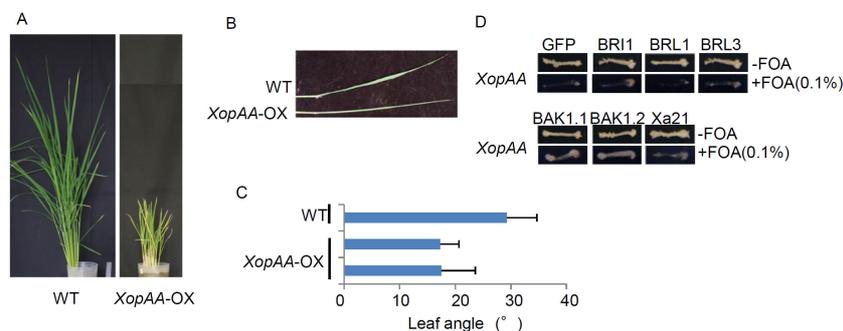


図2 XopAA過剰発現体の表現型とXopAAとBAK1の相互作用

A-C: XopAA過剰発現体は、ブラシノステロイド(BR)非感受性変異体の表現型(矮性と直立葉)と似ている。したがって、XopAAはBRの受容体であるBRI1か、その機能発現に必要なBAK1に相互作用していると考えられる。

D: 酵母Two Hybrid法によるXopAAとBAK1の相互作用。イネには2種類のBAK1が存在し、XopAAはそれらと相互作用する。しかし、XopAAはBRI1ホモログであるイネBRI1、BRL1、BRK3および白葉枯病抵抗性タンパク質Xa21とは、相互作用しない。

本結果は、Yamaguchi et al. Biosci. Biotechnol Biochem, 2013, 77:796-801より転載。

XopYやXopPによる植物の免疫応答の抑制効果を詳細に調べるため、XopYやXopPがキチンに応答した遺伝子の発現に及ぼす影響をマイクロアレイ法を用いて解析した。その結果、キチンに応答して発現量が増減する遺伝子の半数が、XopYやXopPによって影響を受けることが明らかになった。このことから、XopYやXopPが、キチン信号伝達系の上流域で働いている多くの植物免疫因子に影響を及ぼしていると考えられる。

上記の結果より、XopYとXopPが免疫応答において重要な因子を阻害していることが明らかになった。そこで、酵母Two Hybrid法を用いて、XopYとXopPの相互作用因子の探索を行った。その結果、XopYの相互作用因子として、2種のRLCK(Receptor-like cytoplasmic kinase)を得た。また、XopPの標的因子として、E3ユビキチンリガーゼをコードするOsPUB44を得た。

2) XopYの標的として単離されたOsRLCKの局在解析

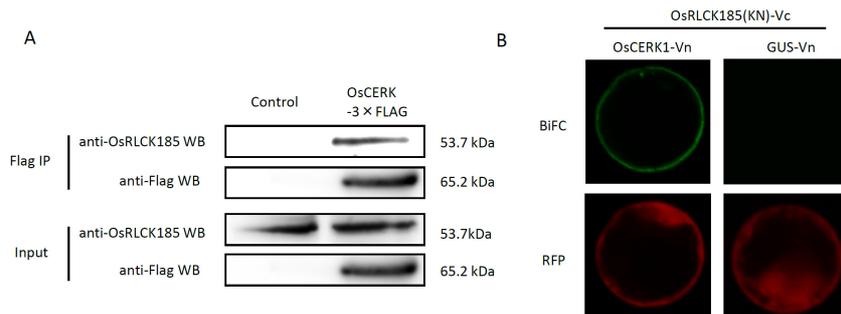
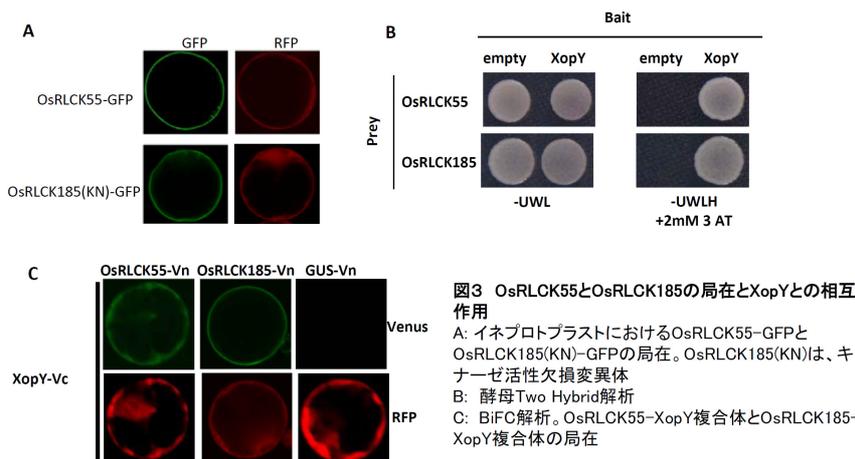
XopYの標的として同定されたRLCKはイネにおいて379個の遺伝子から成る大きなファミリーを形成するが、OsRLCK55とOsRLCK185は、その中で小さなクラスターを形成する非常に相同性の高いタンパク質であり、OsRLCK55とOsRLCK185は細胞膜に局在することがわかった(図3A)。酵母Two Hybrid法により、OsRLCK55とOsRLCK185が、同程度の強さでXopYと相互作用することが明らかになった(図3B)。そこで、細胞内におけるOsRLCK55とXopYの複

合体の局在を BiFC 法を用いて解析した。その結果、OsRLCK55 が単独では細胞膜に存在するのに対し、OsRLCK55 と XopY の複合体は細胞質に多く検出された (図 3C)。上記のように XopY 単独では細胞質に存在することから、XopY は OsRLCK55 と相互作用することにより、

OsRLCK55 の細胞膜局在を阻害し、OsRLCK55 の機能を抑制している可能性が示唆された。一方、OsRLCK185 と XopY の複合体は、細胞膜上で検出された。しかし、リン酸化活性をもつ OsRLCK185-GFP では細胞内でシグナルが検出できないが、XopY と OsRLCK185 との相互作用により BiFC のシグナルが検出されることから、XopY が OsRLCK185 に相互作用することで、OsRLCK185 の機能を阻害していると考えられる。

OsRLCK55 と OsRLCK185 の機能を明らかにするために、過剰発現体を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、キチン応答で発現が上昇する遺伝子のうち、794 遺伝子の発現量が OsRLCK185 の過剰発現体で増加し、キチン応答で発現が減少する遺伝子のうち 899 遺伝子が OsRLCK185 の過剰発現により影響を受けていることがわかった。このことから、OsRLCK185 がキチン受容体 OsCERK1 からの信号伝達に強く関わっていることが示唆された。そこで、細胞内における OsCERK1 と OsRLCK185 の相互作用を、免疫沈降により解析した。OsCERK1-Flag を発現するイネ培養細胞を用いて免疫沈降実験を行ったところ、OsCERK1 と OsRLCK185 は共沈降することが明らかになり (図 4A)、両タンパク質は細胞内で相互作用していることが示された。さらに、BiFC 法を用いて、OsRLCK185-OsCERK1 複合体が、細胞膜上に局在することが明らかになった (図 4B)。さらに、OsRLCK55 と OsRLCK185 が、他の PAMPs 認識受容体とも相互作用することが明らかになり、OsRLCK55 と OsRLCK185 は、複数の PAMPs 受容体からの情報を下流に伝達している可能性が考えられる。

キチンを受容した OsCERK1 の下流で、MAP キナーゼカスケードが活性化されることが知られている。そこで、OsRLCK185 が OsCERK1 からの情報を MAP キナーゼへと情報を伝達してい



るのではないかという仮説を立てた。OsRLCK185 をタバコで一過的に発現させ、タバコの MAP キナーゼの活性化を調べたところ、OsRLCK185 の過剰発現により MAP キナーゼが活性化することが示唆されるデータが得られた。そこで、OsRLCK185 過剰発現培養細胞にキチンを処理し、MAP キナーゼの活性化を調べたところ、OsRLCK185 では顕著に MAP キナーゼの活性が上昇していることが明らかになった。このことから、OsRLCK185 が OsCERK1 から受けた信号を MAP キナーゼに伝達していることが明らかになった。

3) XopY による PAMPs 応答の抑制

すでに述べたように、白葉枯病菌のエフェクターを発現させたイネでは、白葉枯病菌に応答した抵抗性が抑制されていることが明らかになった。そこで、XopY による免疫応答の抑制機構をさらに詳細に解析するために、XopY を発現するイネ培養細胞を作成した。XopY 発現細胞に、細菌の PAMPs

であるペプチドグリカン (PGN) を処理し、防御遺伝子の発現を解析したところ、PGN に応答した防御遺伝子の発現が抑制されていることがわかった (図 5)。同様に、真菌の PAMP であるキチンを処理して解析したところ、キチンに応答した防御遺伝子の発現も抑制されていることがわかった。これまでの報告により、キチンは細胞膜に存在する CEBiP と OsCERK1 複合体によって検出され、PGN は LYP4/LYP6 と OsCERK1 複合体が検出すると考えられている。OsCERK1 は、細胞内にプロテインキナーゼドメインをもつ受容体型キナーゼであり、いずれの場合も、複合体が検出した PAMPs 情報を OsCERK1 が細胞内に伝達していると考えられる。上記のように、XopY 発現細胞において、キチンと PGN に応答した免疫応答が阻害されていることから、XopY が OsCERK1 を介した免疫応答を阻害していることが強く示唆された。

4) OsRLCK185 を介した免疫応答

OsRLCK185 が、OsCERK1 の細胞内ドメインと相互作用することが見出された。このことは、OsCERK1 からの信号が OsRLCK185 に伝達されていることを強く示唆している。そこで、OsRLCK185 の発現抑制体を作成し、キチンと PGN に応答した免疫応答を解析した。その結果、OsRLCK185 の発現を抑制した培養細胞では、キチンと PGN に応答した防御遺

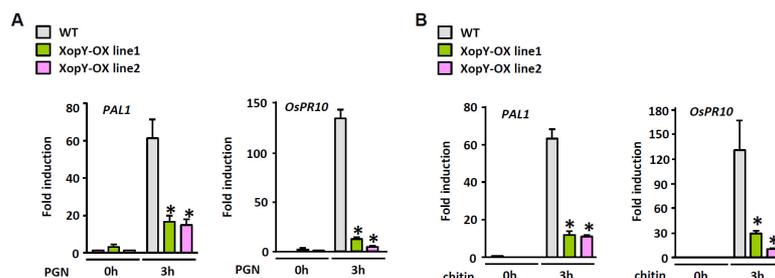


図5 XopY発現体における、キチンとペプチドグリカンに応答した防御遺伝子の発現

A: ペプチドグリカン(PGN)に応答した防御遺伝子の発現

B: キチンに応答した防御遺伝子の発現

本結果は、Yamaguchi et al. Cell Host Microbe, 2013, 13:347-357.より転載

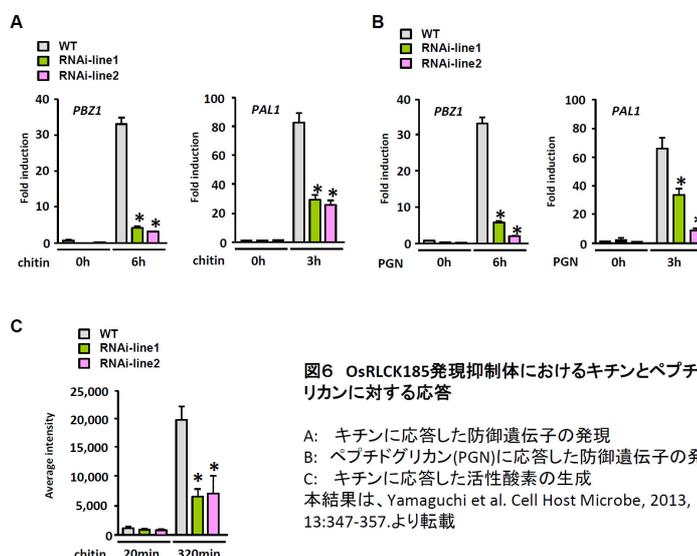


図6 OsRLCK185発現抑制体におけるキチンとペプチドグリカンに対する応答

A: キチンに応答した防御遺伝子の発現

B: ペプチドグリカン(PGN)に応答した防御遺伝子の発現

C: キチンに応答した活性酸素の生成

本結果は、Yamaguchi et al. Cell Host Microbe, 2013, 13:347-357.より転載

伝子の発現が顕著に抑制されていた (図 6)。このことは、OsRLCK185 が OsCERK1 の下流で機能していることを強く示唆している。さらに、活性酸素の生成を解析したところ、OsRLCK185 発現抑制体では、キチンに応答した活性酸素の生成が阻害されていることが明らかになった。

5) OsCERK1 から OsRLCK185 への情報伝達

OsRLCK185 は OsCERK1 の細胞質ドメインに結合する。OsCERK1 の細胞質ドメインは、プロテインキナーゼドメインであることから、OsCERK1 が OsRLCK185 をリン酸化することで、信号を伝達していることが示唆される。そこで、まず、キチンに応答して OsRLCK185 がリン酸化修飾を受けるかどうかを調べた。イネ培養細胞にキチンを処理し、免疫沈降により OsRLCK185 を回収した後、ウェスタン法を用いて解析した。その結果、キチン処理後 5 分で、シフトしたバンドが検出された (図 7)。このシフトしたバンドは、プロテインフォスファターゼ処理により消失することから、シフトしたバンドはリン酸化修飾を受けた OsRLCK185 に対応することがわかった。この結果から、OsRLCK185 は、キチン処理後、すぐにリン酸化されることが明らかになった。

次に、OsCERK1 が直接的に OsRLCK185 をリン酸化しているかどうかを調べるために、*in vitro* キナーゼ活性測定系を用いて解析した。OsCERK1 の細胞質ドメインおよび OsRLCK185 のキナーゼ活性欠損変異体 OsRLCK185^{K108E} のタンパク質を大腸菌でのタンパク質発現系を用いて調製し解析したところ、OsCERK1 は OsRLCK185^{K108E} をリン酸化することが明らかになった。また、RLCK ファミリーの活性化に関わることが示唆されている活性化ループに存在する 3 つのセリンとスレオニンをアラニンに置換し (OsRLCK185^{K108E, S240A, T241A, T246A})、リン酸化を調べたところ、OsCERK1 は OsRLCK185^{K108E, S240A, T241A, T246A} をリン酸化しないことが明らかになった。このことから、OsCERK1 は OsRLCK185 の活性化ループをリン酸化することで、信号を伝達しているものと考えられた。

6) OsRLCK185 による MAP キナーゼの活性化の制御

キチンに応答した信号伝達系において、MAP キナーゼである OsMPK3、OsMPK4、OsMPK6 が活性化され、さらに、OsMPK3/OsMPK6 は、OsMPK4 と異なる伝達系で活性化されることが報告されている。そこで、OsRLCK185 過剰発現細胞を用いて、キチンに応答した MAP キナーゼの活性化を調べた。その結果、OsMPK3、OsMPK4、OsMPK6 の全ての MAP キナーゼの活性が、野生型に比べ、OsRLCK185 過剰発現体で上昇していることが明らかになった。さらに、OsRLCK185 の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調べたところ、OsMPK3 と OsMPK6 の活性化は OsRLCK185 発現抑制体で抑制されているが、OsMPK4 の活性化は野生型と同じであることがわかった (図 8)。さらに、XopY 発現体を用いて、同様な解析を行ったところ、OsRLCK185 発現抑制体と同じ結果が得られた。このことから、OsMPK3 と OsMPK6 は OsRLCK185

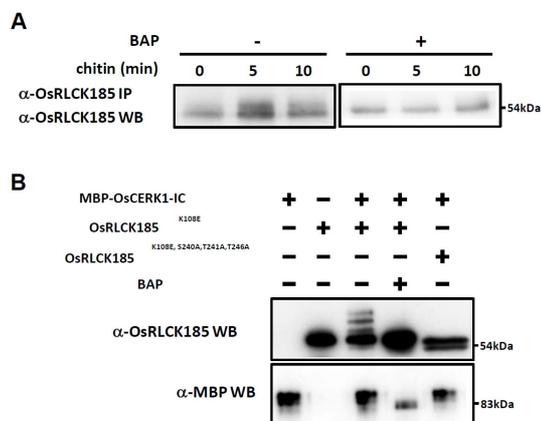


図7 OsCERK1を介したOsRLCK185のリン酸化修飾

- A: キチンに応答したOsRLCK185のリン酸化
キチン処理した培養細胞を用いてOsRLCK185のリン酸化を解析した。
- B: OsCERK1によるOsRLCK185のリン酸化
*in vitro*キナーゼ活性測定系を用いて、OsCERK1によるOsRLCK185のリン酸化を解析した。
- 本結果は、Yamaguchi et al. Cell Host Microbe, 2013, 13:347-357.より転載

の下流に存在するが、OsMPK4 は OsRLCK185 とは別の伝達系で制御されていると考えられる。また、OsRLCK185 過剰発現体において、OsMPK4 の活性上昇が観察されたが、これは OsRLCK185 の過剰発現が他の RLCK の機能を相補したためであると考えられる。これまでにフラジェリンの受容体である FLS2 に相互作用する RLCK である BIK1 が、FLS2 からの信号を伝達していることが報告されているが、*bik1* 変異体でもフラジェリンに反応した MAP キナーゼの活性化には変化が見られず、これまで、受容体と MAP キナーゼを繋ぐ分子は見つかっていなかった。今回の結果により、OsRLCK185 が OsCERK1 からの情報を MAP キナーゼカスケードに伝達することが明らかとなり、OsRLCK185 は、受容体と MAP キナーゼを繋ぐ初めての分子である。

7) XopY による免疫信号伝達の障害機構

XopY 発現培養細胞では、上記のようにキチンや PGN に反応した免疫反応が抑制され、さらに XopY が OsRLCK185 に相互作用することから、XopY が OsCERK1 による OsRLCK185 のリン酸化、あるいは OsRLCK185 による下流の免疫応答の活性化を阻害している可能性が考えられる。XopY 発現培養細胞を用いて、キチンに反応した OsRLCK185 のリン酸化を解析したところ、XopY 発現培養細胞では OsRLCK185 のリン酸化が抑制されていた (図9)。このことから、XopY が OsCERK1 による OsRLCK185 のリン酸化を抑制していることが示唆された。そこで、*in vitro* キナーゼ活性測定系を用いて解析を行ったところ、XopY の存在下では、OsCERK1 による OsRLCK185 のリン酸化が阻害されることが明らかになった。XopY は、相互作用によって OsRLCK185 の活性化ループドメインを隠すことで、OsCERK1 による OsRLCK185 のリン酸化を阻害しているのではないかと推定された。

さらに、XopY が、OsCERK1 や OsRLCK185 の自己リン酸化活性に影響を及ぼすかについて解析したが、OsCERK1 や OsRLCK185 の自己リン酸化は XopY によって影響を受けないことがわかった。また、*in vitro* 系を用いて、OsCERK1 によってリン酸化された OsRLCK185 を、XopY が脱リン酸化するかどうかを解析したが、XopY には脱リン酸化活性がないことがわかった。興味深いことに、これらの解析の過程で、OsRLCK185 が XopY をリ

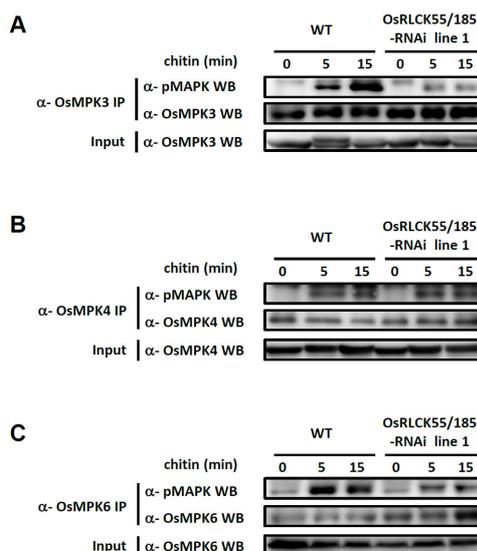


図8 OsRLCK185発現抑制体におけるキチンに反応したMAPキナーゼの活性化

A: OsMPK3の活性化、B: OsMPK4の活性化、C: OsMPK6の活性化
それぞれのMAPKの抗体で免疫沈降をした後、MAPKのリン酸化特異的抗体で解析した。
本結果は、Yamaguchi et al. Cell Host Microbe, 2013, 13:347-357より転載

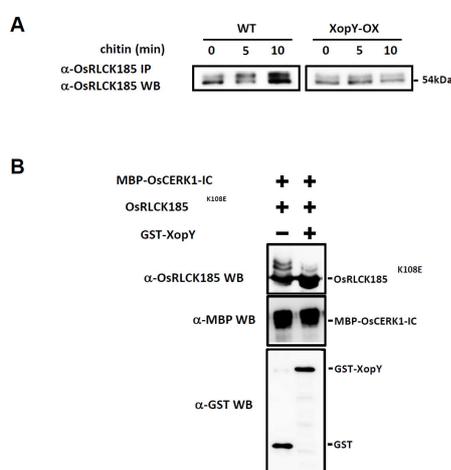


図9 XopYによるOsCERK1を介したOsRLCK185のリン酸化修飾

A: XopY発現体におけるキチンに反応したOsRLCK185のリン酸化
キチン処理をした培養細胞を用いてOsRLCK185のリン酸化を解析した。
B: XopYによるOsRLCK185のリン酸化修飾の阻害
*in vitro*キナーゼ活性測定系を用いて、XopY存在下でのOsCERK1によるOsRLCK185のリン酸化修飾を解析した。
本結果は、Yamaguchi et al. Cell Host Microbe, 2013, 13:347-357より転載

ン酸化していることが明らかになり、XopY のリン酸化が、XopY を介した病原性に関与している可能性が示唆された。

8) XopP による PAMPs 応答の抑制

これまでの解析により白葉枯病菌のエフェクターXopPを発現させたイネでは、白葉枯病菌に応答した抵抗性が抑制されていることが明らかになった。そこで、XopPによる免疫応答の抑制機構をさらに詳細に解析するために、XopPを発現するイネ培養細胞を作成した。XopP発現細胞に、細菌のPAMPsであるペプチドグリカン(PGN)を処理し、防御遺伝子の発現を解析したところ、PGNに反応した防御遺伝子の発現が抑制されていることがわかった(図10)。同様に、真菌のPAMPであるキチンを処理して解析したところ、キチンに反応した防御遺伝子の発現も抑制されていることがわかった。これらの結果から、XopPはイネの免疫応答に関わる因子を阻害していることが示唆された。

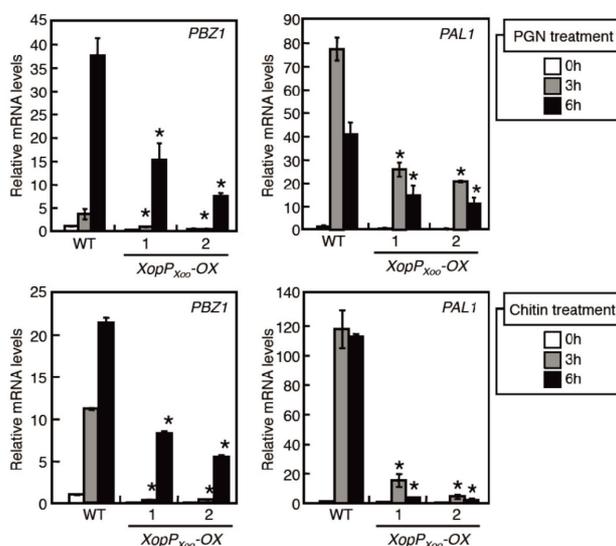


図10 XopP発現体におけるペプチドグリカンとキチンに反応した防御遺伝子の発現本結果は、Ishikawa et al Nat. Commun, 2014, 5:5430より転載。

9) OsPUB44 を介した免疫応答

酵母Two Hybrid法を用いたXopPの標的因子の探索により、U-boxとArmadillo (ARM) repeatドメインをもつOsPUB44が同定された(図11A)。OsPUB44は、その構造からE3ユビキチンリガーゼであると考えられた。OsPUB44のmRNA量およびタンパク量は、PGNやキチンに反応して上昇することが明らかになった(図11B)。また、GFP融合タンパク質を用いた実験により、OsPUB44とXopPはイネの細胞質に局在し、BiFC実験により両タンパク質が細胞質で相互作用していることが明らかになった(図11C)。

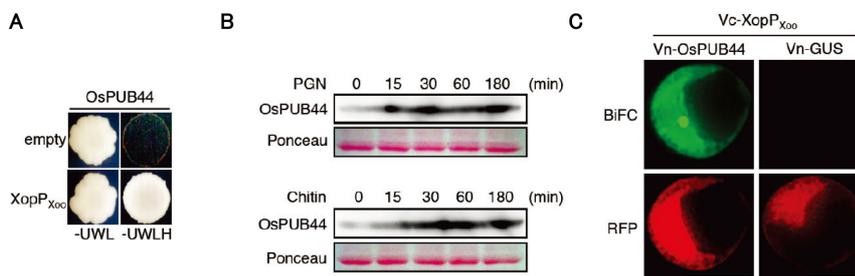


図11 OsPUB44の発現と局在

A 酵母Two Hybrid法によるOsPUB44とXopPの相互作用解析

B PGNとキチンに反応したOsPUB44タンパク質の蓄積の誘導

C BiFC法を用いたOsPUB44とXopPの相互作用解析

本結果は、Ishikawa et al Nat. Commun, 2014, 5:5430より転載。

植物免疫におけるOsPUB44の機能を明らかにするため、RNAi法を用いてOsPUB44の発現抑制体を作成した。OsPUB44発現抑制体では、mRNAとタンパク質の両方が顕著に減少していることが明らかになった。この発現抑制体を用いて、PGNとキチンに反応する免疫反応を解析

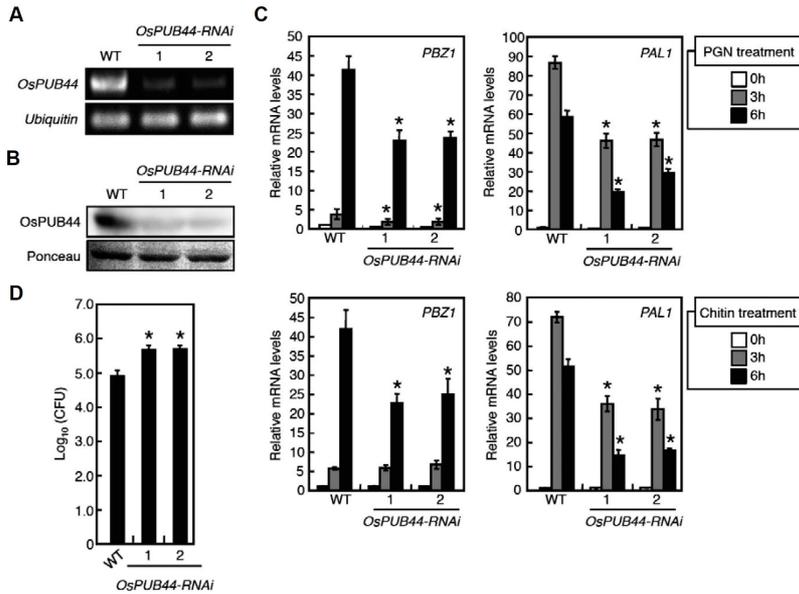


図12 OsPUB44発現抑制体の解析
 A OsPUB44発現抑制体のmRNA量
 B OsPUB44発現抑制体のタンパク質量
 C OsPUB44発現抑制体における防御遺伝子の発現誘導
 D OsPUB44発現抑制体の白葉枯病抵抗性。接種後、5日目の菌数を計測した。
 本結果は、Ishikawa et al Nat. Commun, 2014, 5:5430より転載。

したところ、発現抑制体では、防御遺伝子の発現が減少していることが明らかになった（図12）。さらに、OsPUB44 発現抑制体に白葉枯病菌を感染させたところ、野生型に比べ、白葉枯病菌の菌量が増加していることが明らかとなり、抵抗性が抑制されていることが明らかになった。これらのことから、OsPUB44 は植物免疫応答のポジティブレギュレーターとして機能していることがわかった。

10) XopP による OsPUB44 の抑制機構

XopP が OsPUB44 のどのドメインと相互作用するかを酵母 Two Hybrid 法を用いて解析した。OsPUB44 を3つの領域にわけ、解析を行ったところ、XopP は OsPUB44 の U-box ドメインと結合することが明らかになった（図13A）。さらに、U-box ドメインを含むタンパク質を大腸菌のタンパク質発現系を用いて調整し、in vitro でユビキチンリガーゼ活性を解析したところ、OsPUB44 の U-box ドメインが、ユビキチンリガーゼ活性をもつこと

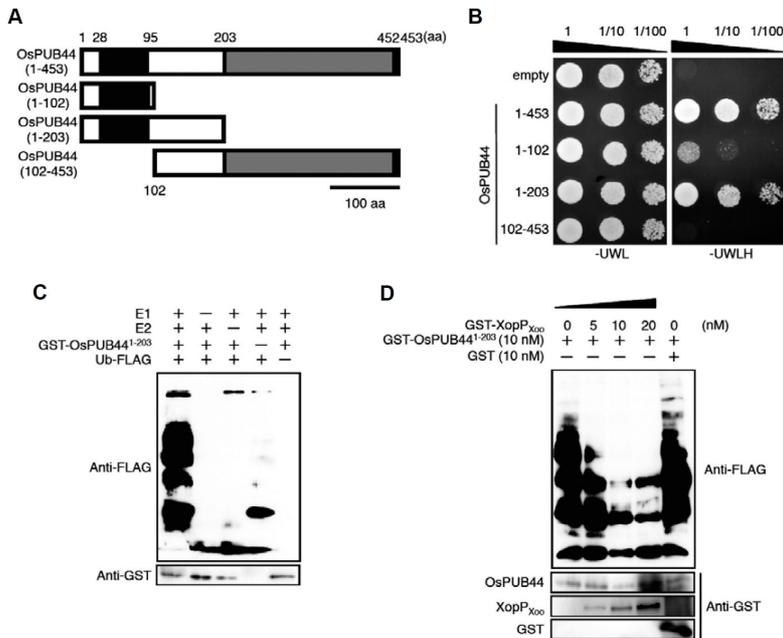


図13 OsPUB44とXopPの相互作用
 A OsPUB44の構造
 B 酵母Two Hybrid法を用いたOsPUB44とXopPの相互作用
 C OsPUB44のユビキチンリガーゼ活性
 D XopPによるOsPUB44のユビキチンリガーゼ活性の抑制
 本結果は、Ishikawa et al Nat. Commun, 2014, 5:5430より転載。

が示された(図 13B)。また、XopP は、OsPUB44 の U-box ドメインに結合するため、OsPUB44 のユビキチンリガーゼ活性が XopP により抑制される可能性が示唆される。In vitro 実験系を用いて解析したところ、XopP は OsPUB44 のユビキチンリガーゼ活性を顕著に抑制することが明らかになった。このことから、XopP が OsPUB44 の活性を阻害することで、免疫応答の誘導を抑制していると考えられた。

一方、これまでの研究から、活性を失った U-box 型ユビキチンリガーゼは、安定化し蓄積することが知られている。そこで、XopP を発現する培養細胞に、キチンあるいは PGN を処理し、OsPUB44 のタンパク質量を解析した。その結果、XopP を発現する培養では、野生型の 10 倍以上の OsPUB44 が蓄積していることが明らかになった(図 14)。このことは、XopP が細胞内で OsPUB44 と相互作用し、OsPUB44 の活性を阻害していることを示している。

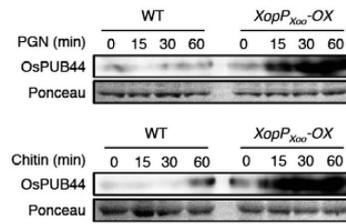


図 14 XopP発現細胞におけるOsPUB44の蓄積
本結果は、Ishikawa et al Nat. Commun, 2014, 5:5430より転載。

1 1) XopP と OsPUB44 の相互作用の特異性

イネには OsPUB44 と相同性が高い OsPUB45 と OsPUB46 が存在する。そこで、XopP が OsPUB45 と OsPUB46 とともに相互作用するかどうかを酵母 Two Hybrid 法を用いて解析した。しかし、OsPUB44 との高い相同性にも関わらず、OsPUB45 と OsPUB46 は XopP と相互作用しないことが明らかになった(図 15A)。OsPUB44 と OsPUB45、OsPUB46 間で U-box のアミノ酸配列を比較したところ、8 つのアミノ酸残基が異なることが分かった(図 15B)。これらのうち、どのアミノ酸残基が、OsPUB44 と XopP の相互作用に関与しているかを明らかにするため、8 つのアミノ酸残基を、それぞれ対応する OsPUB45 のアミノ酸残基に置換し、酵母 Two Hybrid 法を用いて相互作用を解析したところ、48 番目のプロリン、86 番目のロイシン、94 番目のヒスチジンが、OsPUB44 と XopP の相互作用に重要であることがわかった(図 15C)。さらに、OsPUB45 をこの 3 つのアミノ酸残基に変更したところ、XopP と相互作用することがわかった。このように、XopP は、OsPUB44 に特異的なアミノ酸残基を認識して相互作用していることが明らかになった(図 15D)。

XopP は、OsPUB45 の U-box ドメインに相互作用できないので、活性も阻害できないと考えられる。実際、in vitro 系を用いて解析したところ、XopP は OsPUB45 のユビキチンリガーゼ活性を阻害できないことがわかった。また、OsPUB44 に、XopP が相互作用できなくなる L86T と H94W の変異を加え、解析を行ったところ、XopP は OsPUB44^{L86T, H94W} のユビキチンリガーゼ活

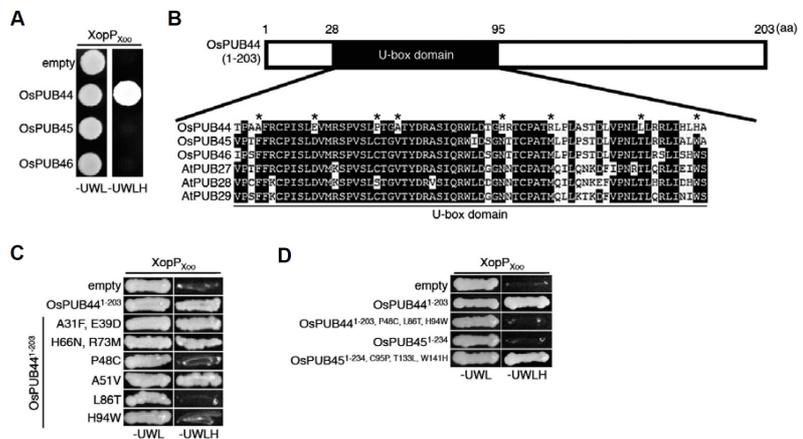


図 15 OsPUB44とXopPの相互作用の特異性
A XopPとOsPUB45、OsPUB46との相互作用
B OsPUB44のU-boxに特異的なアミノ酸残基
C OsPUB44のアミノ酸置換変異体とXopPの相互作用
D 相互作用の特異性を決める3つのアミノ酸残基の解析
本結果は、Ishikawa et al Nat. Commun, 2014, 5:5430より転載。

性を抑制できないことが明らかになった(図16)。

近年、植物免疫において、多くの U-box 型ユビキチンリガーゼが重要な働きをしていることが明らかになっている。また、これらの多くは、免疫応答を負に制御している。したがって、もし XopP の特異性が低く、こ

これらの U-box 型ユビキチンリガーゼに相互作用すれば、病原菌にとっては不利となる免疫応答が活性化される結果になると考えられる。そのため、XopP は、ポジティブレギュレーターとして機能する OsPUB44 に特異的に相互作用するように進化したのかもしれない。

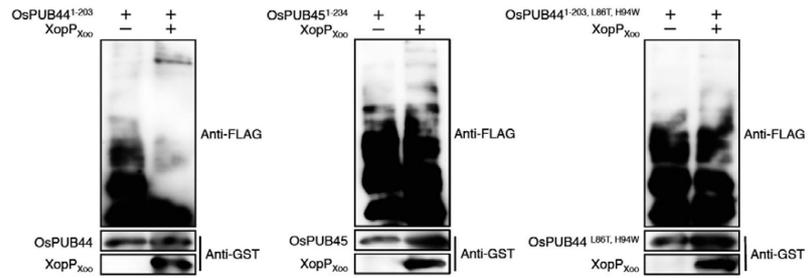


図16 相互作用とユビキチンリガーゼ活性の抑制との相関性
本結果は、Ishikawa et al Nat. Commun, 2014, 5:5430より転載。

1 2) シロイヌナズナのキチン受容体 CERK1 と PBL27 の相互作用

イネのキチン応答の信号伝達因子として働く OsRLCK 185 は、イネの 379 個の遺伝子から成る RLCK ファミリーの中で、RLCK VI ファミリーに属する。OsRLCK185 の配列を、シロイヌナズナの RLCK VI ファミリーのタンパク質と比較したところ、PBL27 と最も高い相同性を示すことが明らかになった。PBL27 の細胞内局在を、GFP 融合タンパク質を用いて解析したところ、OsRLCK185 と同様に細胞膜上に存在していることがわかった(図17A)。

PBL27 と CERK1 の相互作用を解析するため、PBL27 と CERK1 をタバコで一過的に発現させ、免疫沈降法を用いて解析したところ、PBL27 と CERK1 が共沈することがわかった(図17B)。さらに、BiFC法を用いた解析により、PBL27 が細胞膜上で CERK1 と相互作用していることが明らかになった(図17C)。酵母 Two Hybrid法を用いた解析により、PBL27 が CERK1 の細胞内キナーゼドメインに結合することがわかった(図17D)。このように、PBL27 は、イネの OsRLCK185 と同様にキチン受容体に相互作用していることが明らかになった。

1 3) PBL27 変異体を用いた免疫応答の解析

PBL27 の機能を解析するために、2 種類の T-DNA 挿入変異体を単離した (*pb127-1* と *pb127-2*)。

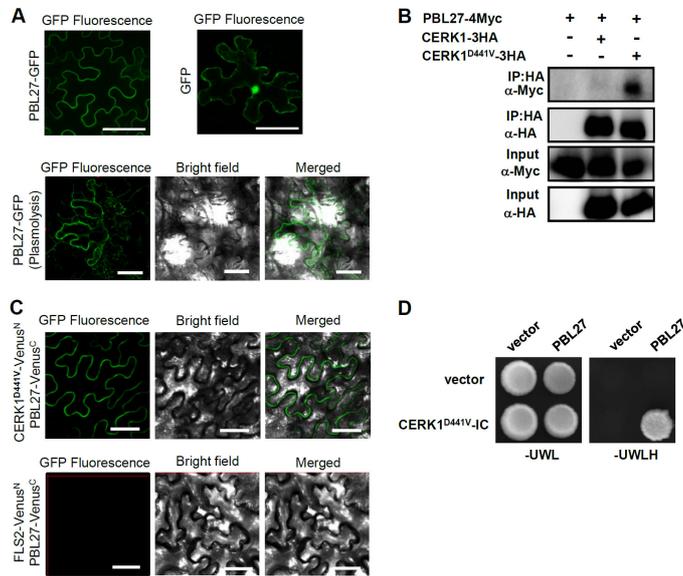


図17 CERK1とPBL27の相互作用

A PBL27の細胞内局在。PBL27-GFPをタバコで一過的に発現させ、GFP蛍光を解析した。

B 免疫沈降法を用いたPBL27とCERK1の相互作用解析。PBL27とCERK1をタバコで一過的に発現させ、免疫沈降法を用いて、PBL27とCERK1が同一複合体に含まれるかを解析した。

C BiFC法を用いたPBL27とCERK1の相互作用解析。VenusのN末端領域と融合させたCERK1とVenusのC末端領域を融合させたPBL27をタバコ細胞で発現させ、BiFC法により相互作用を解析した。

D 酵母Two Hybrid法を用いたPBL27とCERK1の相互作用解析

本結果は、Shinya et al. Plant J, 2014, 79:56-66より転載。

それらの変異体にキチンを処理し、免疫応答の一つであるカロース生成を解析した。その結果、*pbl27*変異体では、キチンに応答したカロースの生成が抑制されていることが明らかになった。一方、べん毛タンパク質由来のPAMPである *flg22* によるカロースの生成には変化がなかった (図 18A)。さらに、キチンに応答した MAPK の活性化を解析したところ、カロース生成と同様に、*pbl27*変異体では、キチンに応答した MAPK の活性化は抑制されているが、*flg22* に応答した MAPK の活性化は変化していないことが明らかになった (図 18B)。同様に、キチンと *flg22* に応答した防御遺伝子の発現を解析した。その結果、*Nit4* 遺伝子と *WRKY75* 遺伝子の発現は、キチン応答においては *pbl27* 変異体で抑制されているが、*flg22* 応答では変異体と野生型の間で差が見られないことがわかった (図 19A)。次に、主要な免疫応答の一つである活性酸素の生成を解析した。その結果、*pbl27* 変異体では、キチンと *flg22* に応答した活性酸素生成が野生型と同じであることがわかった (図 19B)。これらのことから、PBL27 は、キチン応答の信号伝達因子として働いていることは OsRLCK185 と同じであるが、OsRLCK185 が活性酸素と MAPK の活性化の両方を制御するのに対し、PBL27 は活性酸素生成には関与せず、MAPK の活性化を制御していることが明らかになった。

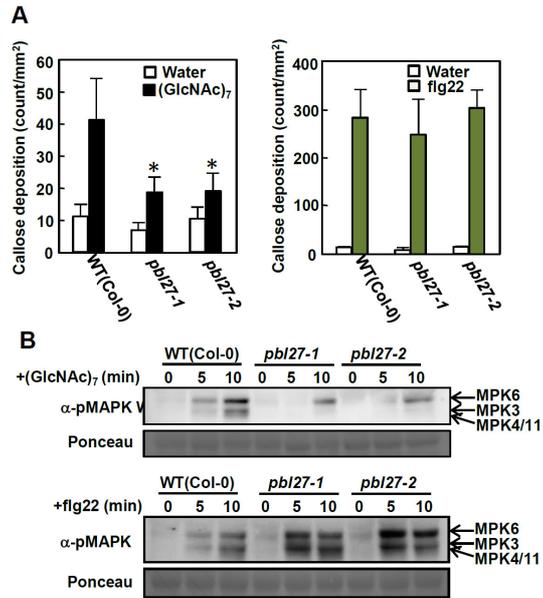


図 18 *pbl27*変異体におけるカロース生成と MAPK の活性化
A キチンに応答したカロース生成 (左) と *flg22* に応答したカロースの生成 (右)
B キチンと *flg22* に応答した MAPK の活性化
 本結果は、Shinya et al. Plant J, 2014, 79:56-66より転載。

図 19A の結果、*Nit4* 遺伝子と *WRKY75* 遺伝子の発現は、キチン応答においては *pbl27* 変異体で抑制されているが、*flg22* 応答では変異体と野生型の間で差が見られないことがわかった (図 19A)。次に、主要な免疫応答の一つである活性酸素の生成を解析した。その結果、*pbl27* 変異体では、キチンと *flg22* に応答した活性酸素生成が野生型と同じであることがわかった (図 19B)。これらのことから、PBL27 は、キチン応答の信号伝達因子として働いていることは OsRLCK185 と同じであるが、OsRLCK185 が活性酸素と MAPK の活性化の両方を制御するのに対し、PBL27 は活性酸素生成には関与せず、MAPK の活性化を制御していることが明らかになった。

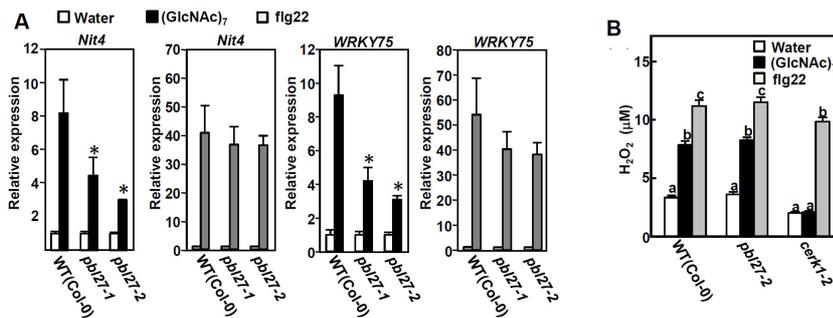


図 19 キチンと *flg22* に応答した防御遺伝子の発現と活性酸素生成
A *pbl27*変異体における防御遺伝子の発現の定量的解析。遺伝子発現は、リアルタイムPCR を用いて解析された。
B *pbl27*変異体におけるキチンと *flg22* に応答した活性酸素生成
 本結果は、Shinya et al. Plant J, 2014, 79:56-66より転載。

1 4) PBL27 の病害抵抗性反応の解析

上記の解析から、PBL27 が真菌由来のキチンに反応した免疫応答において重要な働きをしていることが明らかになった。そこで、*pbl27* に真菌である *Alternaria brassicicola* を感染し、病徴を解析した。その結果、*cerk1* 変異体と同様に、*pbl27* 変異体では、野生型に比べ病斑が大きくなることがわかった (図 20A)。さらに、CERK1 は、細菌由来の PAMP であるペプチドグリカンに反応した免疫応答にも関与していることが報告されているため、

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 *hrcC* を感染させ、細菌の増殖を解析した。その結果、*pbl27* 変異体では、野生型に比べ、顕著に細菌数が増加しており (図 20B)、PBL27 が真菌と細菌の両方に対する防御応答に関与していることが明らかになった。

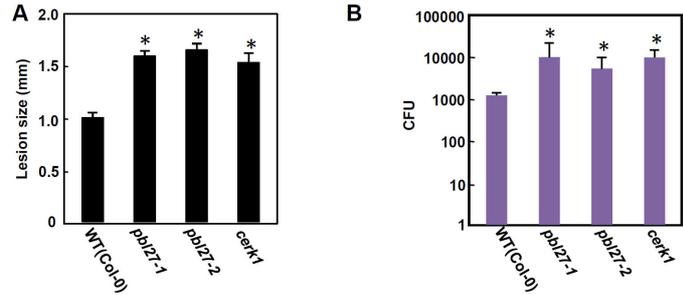


図 20 *pbl27* 変異体の病原菌耐性

A *pbl27* 変異体の *A. brassicicola* に対する耐性

B *pbl27* 変異体の *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 *hrcC* に対する耐性

本結果は、Shinya et al. Plant J, 2014, 79:56-66より転載。

1 5) CERK1 のよる PBL27 のリン酸化反応の解析

f1g22 の受容体である LRR 型受容体キナーゼ (LRR-RLK) である FLS2 は、f1g22 認識に伴って LRR-RLK である BAK1 と相互作用し、FLS2/BAK1 複合体が RLCK である BIK1 をリン酸化することで、細胞内に信号を伝達することが明らかになっている。上記の解析から、PBL27 はキチン応答には関与するが、f1g22 に対する応答には関与していないことがわかったため、その違いが受容体からのリン酸化修飾と関連しているかどうかを解析した。CERK1、FLS2、BAK1 の細胞内キナーゼドメインの組換えタンパク質を調製し、PBL27 と BIK1 を基質としたリン酸化解析を行った。その結果、

CERK1 は PBL27 を強くリン酸化するが、BIK1 をリン酸化しないことがわかった。逆に、BAK1 は BIK1 を強くリン酸化するが、PBL27 をリン酸化しないことがわかった (図 2 1 A, B)。FLS2 は、既知の報告通りに、非常にキナーゼ活性が弱く、リン酸化は解析できなかった (図 5c)。以上のリン酸化解析の結果から、CERK1-PBL27 と BAK1-BIK1 の信号伝達の関係は、リン酸化反応の強さにより説明できることが明らかになった。実際、細胞内における PBL27 のリン酸化は、キチン応答においては検出できるが、f1g22 応答では見られないことがわかった。

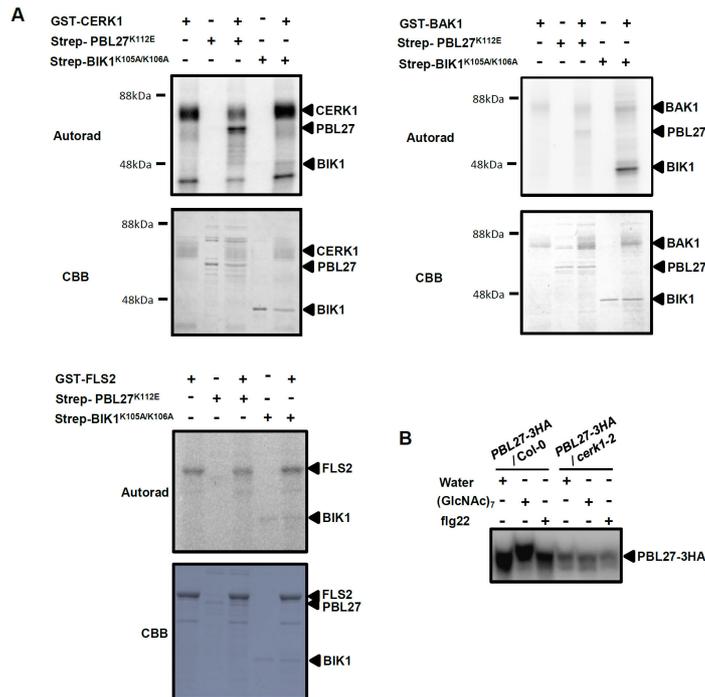


図 2 1 CERK1 による PBL27 のリン酸化修飾

A CERK1 と BAK1、FLS2 による PBL27 と BIK1 のリン酸化。In vitro のリン酸化反応系により解析した。

B キチンと f1g22 に応答した PBL27 のリン酸化。Phos-tag を含むゲルを用いてリン酸化を解析した。本結果は、Shinya et al. Plant J, 2014, 79:56-66より転載。

1 6) PBL27 を介したキチン応答のモデル

以上の解析結果より、PBL27 は、キチンを認識した CERK1 によりリン酸化され、その情報を MAPK カスケードに伝達していることが明らかになった (図 22)。一方、CERK1 の下流で、誘導される活性酸素の生成は、未同定の RLCK を介していることが示唆される。また、PBL27

はフラジェリン応答には関与してなく、flg22 を認識した FLS2 複合体は BIK1 をリン酸化することで、活性酸素生成を誘導していると考えられる。一方、BIK1 は、flg22 に応答した MAPK の活性化には関与していないことが明らかになっており、未同定の RLCK が FLS2 複合体と MAPK カスケードを結んでいると考えられる。

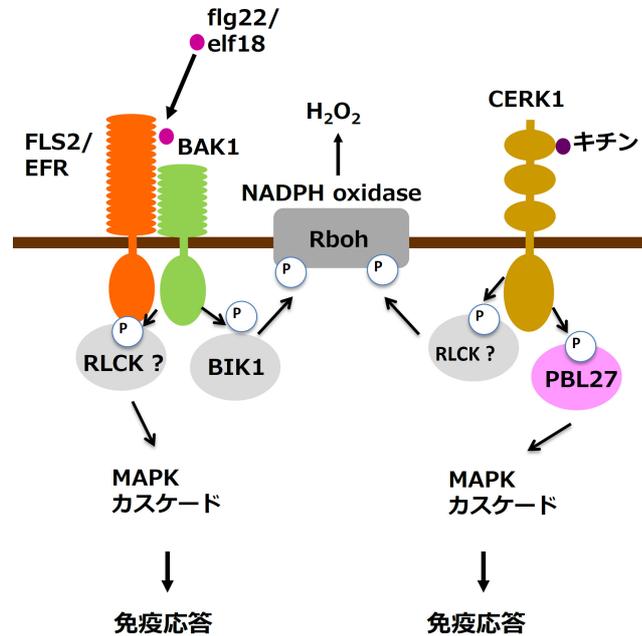


図 2 2 RLCKを介したPAMPs応答のモデル

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

現在、作物生産の約15%は、病虫害により失われていることが報告されている。そのため、安定的な食糧生産を実現する耐病性技術の開発が望まれている。これまでの耐病性研究では、主に遺伝学的手法を用いて、植物免疫に関わる遺伝子の単離が行われてきた。しかし、現在でも植物免疫の多くの部分は理解されずに残されたままであり、新たな手法による植物免疫因子の単離が必要とされていた。そこで、本研究課題において、我々は、病原菌が植物免疫を抑制させるために進化させてきたエフェクターを利用して、新規な免疫因子の単離を試みた。その結果、植物免疫を制御する RLCK ファミリー遺伝子と OsPUB44 遺伝子を単離することに成功した。

本研究により、RLCK ファミリーが細胞膜に存在する病原菌認識受容体からのシグナルを受け、細胞内の免疫応答を活性化させる主要因子であることがわかった。中でも、細胞内で活性化される MAPK カスケードと受容体を繋ぐ分子は不明であったが、OsRLCK185 と PBL27 が、その機能をもつ因子であることを世界に先駆けて証明することが出来たことは大きな成果であった。また、イネとシロイヌナズナを併用して解析したことにより、キチン信号伝達系が植物間で保存されていることも明らかにできた。今後、これらの RLCK ファミリーの解析を通じて、これまで不明であった受容体シグナルを介した MAPK カスケードの活性化機構が解明されることが期待される。その一方で、受容体は多様な免疫応答を誘導する起点でもあり、RLCK ファミリーを応用技術として利用することで、協調的な免疫応答を制御した新規な耐病性植物の開発へと繋がることを期待される。

また、本研究により、ユビキチンリガーゼをコードする OsPUB44 がイネの免疫応答を制御していることが明らかになった。これまで、動植物の病原菌が獲得した多くのエフェクターの研究が進められてきたが、病原菌のエフェクターが宿主のユビキチンリガーゼの活性を制御し、プロテアソームを介したタンパク質分解系を抑制するという報告はなく、非常に興味深い発見となっ

た。また、これまでに多くのユビキチンリガーゼが植物免疫に関わっていることが知られているが、多くのものはネガティブレギュレーターとして機能しており、ポジティブレギュレーターとして働く OsPUB44 の機能の解明が待たれる。今後、OsPUB44 を介した免疫応答を解析することで、新規な植物免疫反応を明らかにできると思われる。

今回の研究を通じて、病原菌のエフェクターが、新たな植物免疫因子を同定するためのツールとして非常に有効であることが示すことができた。同時に、病原菌のエフェクターが、病原性を誘導する主要因子であることも証明できた。今後、エフェクターを介した病原性の分子機構を明らかにすることで、それらを抑制する農薬の開発など、新たな耐病性技術の開発に繋がると期待される。

4. 研究成果

a. 原著論文

1. Ishikawa K, Yamaguchi K, Sakamoto K, Yoshimura S, Inoue K, Tsuge S, Kojima C, and Kawasaki T. Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice. *Nat. Commun.* 2014, 5:5430.
2. Shinya T, Yamaguchi K, Desaki Y, Yamada K, Narisawa T, Kobayashi Y, Maeda K, Suzuki M, Tanimoto T, Takeda J, Nakashima M, Funama R, Narusaka M, Narusaka Y, Kaku H, *Kawasaki T, and *Shibuya N. Selective regulation of chitin-induced defense response by the Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinase PBL27. *Plant J.* 2014, 79:56-66. *Co-corresponding authors.
3. Kosami KI, Ohki I, Nagano M, Furutani K, Sugiki T, Kawano Y, Kawasaki T, Fujiwara T, Nakagawa A, Shimamoto K, and Kojima C. The crystal structure of the plant small GTPase OsRac1 reveals its mode of binding to NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 2014, 289:28569-28578.
4. Kosami KI, Ohki I, Hayashi K, Tabata R, Usugi S, Kawasaki T, Fujiwara T, Nakagawa A, Shimamoto K, and Kojima C. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a rice Rac/Rop GTPase, OsRac1. *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* 2014, 70:113-115.
5. Kosami KI, Ohki I, Hayashi K, Tabata R, Usugi S, Kawasaki T, Fujiwara T, Nakagawa A, Shimamoto K, and Kojima C. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a rice Rac/Rop GTPase, OsRac1. *Acta Crystallographica Section F.* 2014, 70:113-115.
6. Yamaguchi K, Yamada K, and Kawasaki T. Receptor-like cytoplasmic kinases are pivotal components in pattern recognition receptor-mediated signaling in plant immunity. *Plant Signal Behav.* 2013, 8:e25662.
7. Akamatsu A, Wong HL, Fujiwara M, Okuda J, Nishide K, Uno K, Imai K, Umemura K, Kawasaki T, Kawano Y, and Shimamoto K. An OsCEBiP / OsCERK1 – OsRacGEF - OsRac1 module is an essential early component of chitin-induced rice immunity. *Cell Host Microbe.* 2013, 13:465-476.
8. Yamaguchi K, Nakamura Y, Ishikawa K, Yoshimura Y, Tsuge S, and Kawasaki T. Suppression of rice immunity by the *Xanthomonas oryzae* type III effector Xoo2875. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 2013, 77:796-801.
9. Yamaguchi K, Yamada K, Ishikawa K, Yoshimura S, Hayashi N, Uchihashi K, Ishihama N, Kishi-Kaboshi M, Takahashi A, Tsuge S, Ochiai H, Tada Y, Shimamoto K, Yoshioka H, and Kawasaki T. A receptor-like cytoplasmic kinase targeted by a plant pathogen effector is directly phosphorylated by the chitin receptor and mediates rice immunity. *Cell Host Microbe.* 2013, 13:347-357.

10. Yamaguchi K, Nakamura Y, Ishikawa K, Yoshimura Y, Tsuge S, and Kawasaki T. Suppression of rice immunity by the *Xanthomonas oryzae* type III effector Xoo2875. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013, 77:796-801.
11. Wamaitha MJ, Yamamoto R, Wong HL, Kawasaki T, Kawano Y, and Shimamoto K. OsRap2.6 transcription factor contributes to rice innate immunity through its interaction with Receptor for Activated Kinase-C 1 (RACK1). *Rice.* 2012, 5:35.
12. Kim SH, Oikawa T, Kyozuka J, Wong HL, Umemura K, Kishi-Kaboshi M, Takahashi A, Kawano Y, Kawasaki T, and Shimamoto K. The bHLH Rac immunity1 (RAI1) is activated by OsRac1 via OsMAPK3 and OsMAPK6 in rice Immunity. *Plant Cell. Physiol.* 2012, 53:740-754.
13. Kawasaki T, Yamaguchi K, Ishikawa K, Yoshimura S, Yamada K, and Yoshimura Y. Rice PAMPs-triggered immunity targeted by pathogen effectors. *Proceeding of 47th PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium.* 2012, 47:23-32.
14. 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.* 2012, 70:389-397.
15. Yamaguchi K, and Kawasaki T. Function of Arabidopsis SWAP70 GEF in immune response. *Plant Signal. Behav.* 2012, 7:465-468.

合計 15 件

b. 総説

1. 山口公志、山田健太、白川友美、川崎 努:エフェクターの宿主標的因子を利用した植物免疫シグナル伝達経路の解析、植物感染生理談話会論文集、2015, 50:63-72.
2. 山口公志、川崎 努: 耐病性を向上させた次世代イネの作出に向けて、バイオサイエンスとインダストリー、2015, 73(3):206-209.
3. 光増可奈子、川崎 努、澤 進一郎:外界との接点としての細胞壁、化学と生物、2015, 53(8):535-541.
4. 石川和也、井上健人、山口公志、川崎 努: *Xanthomonas* エフェクターによる宿主のユビキチン修飾系の制御、植物細菌病談話会論文集、2014, 26: 94 – 101.
5. 川崎 努、山口公志、石川和也、吉村智美、山田健太、吉村悠矢: 病原菌エフェクターによる PAMPs 誘導抵抗性の抑制機構、日本植物病理学会報、2013, 79:263-268.
6. 川崎 努: 植物における免疫誘導と病原微生物の感染戦略、ライフサイエンス領域融合レビュー、2013, 2:e008.

c. 招待講演、シンポジウムなど

1. 川崎 努、山口公志、石川和也、山田健太、吉村悠矢、「エフェクターによるイネ免疫信号伝達系の抑制機構」、日本植物生理学会・シンポジウム、岩手、2016年3月18-20日
2. 山口公志、山田健太、白川友美、川崎 努、「エフェクターの宿主標的因子を利用した植物免疫シグナル伝達経路の解析」、平成27年度植物感染生理談話会、愛媛、2015年8月24-26日.
3. 吉村智美、「稲と白葉枯病菌の戦い」、第15回けいはんな地区植物科学懇談会/第40回植物バイテクシンポジウム、京都、2015年10月30日.
4. 山口公志、「植物免疫シグナル伝達経路の解明と耐病性植物の開発への展望」、第14回けいはんな地区植物科学懇談会、京都、2014年11月11日.
5. 山口公志、「植物免疫におけるMAPキナーゼカスケードの活性化メカニズムの解析」、日本植物病理学会関西西部会若手の会、富山、2014年9月26日.
6. 川崎 努、「*Xanthomonas* エフェクターによる宿主のユビキチン修飾系の制御」、植物細菌病談話、岡山、2014年10月9-10日.

7. Kawasaki, T. "Biological function of *Xanthomonas* effectors in suppression of plant immunity". The 13th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Shanghai, China Jun 8-14, 2014
8. 川崎 努: "植物の病原菌認識受容体における免疫反応の誘導機構", 日本生体防御学会シンポジウム「動物・植物・微生物の生体防御と、そのマスター分子活性酸素」、熊本、2013年7月9-12日.
9. 川崎 努: "Suppression of pattern recognition receptor-mediated plant immunity by bacterial effector", 日本細菌学会ワークショップ「植物と動物の自然免疫に関する類似と相違」、東京都、2014年3月26-28日.
10. 川崎 努、山口公志、石川和也、吉村智美、山田健太、吉村悠矢、「イネにおける PAMPs 誘導抵抗性の情報伝達機構と病原菌の感染戦略」、平成 24 年度植物感染生理談話会、滋賀、2012 年 8 月 30 日-9 月 1 日.
11. 川崎 努、「植物の免疫と病原菌の感染戦略」、平成 24 年度近畿植物学会講演会、奈良、2012 年 11 月 10 日.
12. 川崎 努、「植物と病原菌の分子レベルの戦い」、第 12 回けいはんな地区植物科学懇談会、奈良、2012 年 11 月 29 日.
13. 川崎 努、「病原菌の感染から身を守る植物の免疫機構」、私立大学戦略的基盤形成支援事業 アグリバイオシンポジウム 2012、奈良、2012 年 12 月 8 日.
14. 川崎 努、山口公志、石川和也、山田健太、吉村悠矢、「エフェクターによるイネ免疫信号伝達系の抑制機構」、日本植物生理学会・シンポジウム、岡山、2013 年 3 月 21-23 日. (オーガナイザー)
15. 川崎 努、「病原菌エフェクターが標的とする植物免疫因子の機能解明」、第 3 回高知大学植物健康基礎医学シンポジウム、高知、2011 年 8 月 7-8 日.

d. 国際学会発表（一般講演のみ）

1. Yamaguchi K, Yamada K, Shirakawa T, Kobayashi Y, Kamei M, and Kawasaki T: PBL27 directly phosphorylates MAPKKK to activate chitin-induced MAPK cascade in Arabidopsis, Poster presentation at the 4th International Conference on Biotic Plant Interactions (ICBPI), Nanjing, China, 1-3rd Aug. 2015.
2. Ishikawa K, Inoue K, Yamaguchi K, Sakamoto K, Muraguchi Y, Kitano S, Ogawa M, Tsuge S, and Kawasaki T: XopP, a type III effector of *Xanthomonas oryzae*, suppressed plant immunity via modulation of OsPUB44 ubiquitin ligase activity, Poster presentation at the 4th International Conference on Biotic Plant Interactions (ICBPI), Nanjing, China, 1-3rd Aug. 2015.
3. Yamada K, Yamaguchi K, and Kawasaki T: Molecular basis of OsRLCK185-mediated activation of MAP kinase cascade in chitin signaling in rice, Poster presentation at the 4th International Conference on Biotic Plant Interactions (ICBPI), Nanjing, China, 1-3rd Aug. 2015.
4. Yamada K, Yamaguchi K, Shirakawa T, Ishikawa K, Narusaka M, Narusaka Y, Ichimura K, Fukamizo T, Sshibuya N, and Kawasaki T: PBL27, a member of RLCKs, directly transduces immune signal from chitin receptor to MAPK cascade in plant immunity, Oral presentation at the 26th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2015), Paris, France, 3-10th Jul. 2015.
5. Yamaguchi K, Yamada K, Shirakawa T, Kobayashi Y, Kamei M, and Kawasaki, T: Antagonistic regulation of MAP kinase cascades in PRRs-mediated immunity, Poster presentation at the 26th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2015), Paris, France, 3-10th Jul. 2015.
6. Kawasaki T, Yamada K, Shirakawa T, Yamauchi K, Ishikawa K, Narusaka M, Narusaka Y, Nomoto M, Ichimura K, Tada Y, Fukamizo T, Shibuya N, and Yamaguchi K: PBL27 functions as a MAPKKK kinase in chitin-induced immune signaling in Arabidopsis, Poster presentation at XVI International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, Rhodes, Greece, 6-10th Jul. 2014.
7. Yoshimura S, Hayata N, Ido Y, and Kawasaki T: Identification of immune factors interacted with xa1, the bacterial blight resistance NB-LRR protein in rice, Poster presentation at XVI

- International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, Rhodes, Greece, 6-10th Jul. 2014.
8. Ishikawa K, Inoue K, Yamaguchi K, Sakamoto K, Muraguchi Y, Kitano S, Ogawa M, Tsuge S, and Kawasaki T: XopP, a type III effector of *Xanthomonas oryzae*, suppresses plant immunity via modulation of host ubiquitin ligase activity, Poster presentation at XVI International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, Rhodes, Greece, 6-10th Jul. 2014.
 9. Ishikawa K, Yamaguchi K, Sakamoto K, Muraguchi Y, Tsuge S, Kojima C, and Kawasaki T: Xoo3222, type III effector, targets OsPUB44, a regulator of PAMPs-induced basal resistance, Poster presentation at Keystone symposia, Montana, USA, 7-12th Apr. 2013.
 10. Kawasaki T, Yamaguchi K, Yamada K, Ishikawa K, Tsuge S, Shimamoto K, Ichimura K, and Yoshioka H: OsRLCK185 targeted by *Xanthomonas* XopY effector regulates MAP kinase cascade activated by OsCERK1-mediated recognition of chitin in rice, Poster presentation at the Biology of Plant, 77th symposium of Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 30th May-4th Jun. 2012.
 11. Ishikawa K, Yamaguchi K, Sakamoto K, Muraguchi Y, Tsuge S, Shimamoto K, Kojima C and Kawasaki T: OsPUB44, a regulator of PAMPs-induced basal resistance, is targeted by *Xanthomonas* type III effector Xoo3222, Poster presentation at the Biology of Plant, 77th symposium of Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 30th May-4th Jun. 2012.
 12. Yamaguchi K, Yamada K, Ishikawa K, Tsuge S, Ichimura K, Yoshioka H, Shimamoto K, and Kawasaki T: OsRLCK185 targeted by *Xanthomonas* XopY effector regulates MAP kinase cascade activated by OsCERK1-mediated recognition of chitin in rice, Oral presentation at XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, Japan, 29th Jul-2nd Aug. 2012.
 13. Ishikawa K, Yamaguchi K, Sakamoto K, Muraguchi Y, Tsuge S, Shimamoto K, Kojima C, and Kawasaki T: OsPUB44, a regulator of PAMPs-induced basal resistance, is targeted by type III effector Xoo3222, Poster presentation at XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, Japan, 29th Jul-2nd Aug. 2012.
 14. Yamaguchi K, Masutani I, Ishikawa K, and Kawasaki T: OsBPC1 targeted by XopY effector regulates chitin induced immunity in rice, Poster presentation at XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, Japan, 29th Jul-2nd Aug. 2012.

e. 国内学会発表件数（一般講演のみ）

- 2016年 日本植物病理学会大会 5件、日本植物生理学会年会 2件
 2015年 新学術領域「植物細胞壁機能」若手ワークショップ 5件、
 第5回近畿大学院生サミット 1件、日本植物病理学会 4件、
 日本植物生理学会年会 4件、
 2014年 新学術領域 若手ワークショップ 1件、日本植物病理学会関西支部会 1件、
 農芸化学学会関西支部会 2件、日本植物病理学会大会 4件、日本植物生理学会 5件
 2013年 近畿植物学会 2件、新学術領域「植物細胞壁機能」若手ワークショップ 1件、
 日本植物病理学会関西支部会 1件、日本植物生理学会 2件、日本植物病理学会 3件
 2012年 植物感染生理談話会 2件、日本植物病理学会関西支部会 1件、
 イネ遺伝学・分子生学ワークショップ 2件、日本植物病理学会 2件、
 日本植物生理学会 2件
 2011年 植物病理学会関西支部会 2件、細菌学若手コロッセウム 2件、
 高知大学植物健康基礎医学シンポジウム 2件、日本植物病理学会 2件、
 日本植物生理学会 2件

合計 62件

f. 特許
なし

g. その他（学会賞、報道など）

1. 白川友美：第5回近畿大学院生サミット、優秀ポスター賞：植物免疫における MAP キナーゼカスケードの活性化機構の解析、2015年9月13-15日
2. 白川友美：新学術領域「細胞壁」若手ワークショップ、優秀口頭発表賞：キチン信号伝達経路における MAP キナーゼの活性化機構の解析、2015年7月11日
3. 白川友美：日本植物病理学会本大会、学生優秀発表賞：キチン信号伝達系における MAPKKK 活性化の遺伝学的解析、明治大学、2015年3月28-31日
4. 井上健人：日本植物病理学会本大会、学生優秀発表賞：イネの免疫応答における OsPUB44 interactor1 (PBI1)の機能解析、明治大学、2015年3月28-31日
5. Ishikawa et al.の Nature Communications 誌への掲載に関する記事
紙面上 読売新聞、日刊工業新聞、奈良新聞、日本農業新聞、商経アドバイス、
財経新聞
Web 上 産経写真ニュース、産経新聞コラム、東京新聞、京都新聞、神戸新聞、
東北新聞、北海道新聞、静岡新聞、中日新聞、西日本新聞、山陽新聞
6. Yamaguchi et al.の Cell Host Microbe 誌への掲載に関する記事
読売新聞（3月14日）、朝日新聞 DIGITAL（3月16日）、官庁通信（3月21日）、
商経アドバイス（4月15日）

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～平成 27 年度)
研究成果最終報告書

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、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、小林宏太、岩井佑真、吉田幸史、間田英里、三根彩佳、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、森 大輔、中川 奨也

1. 研究の目的

すべての好気性生物において、細胞内での活性酸素種 (ROS) の生成は避けられない。特に、酸素発生の光合成を行う植物や藻類などは、他生物に比べ細胞内酸素濃度が非常に高く (250 μM)、光合成電子伝達系などにより容易に ROS を生成する。さらに、強光、乾燥、塩、高/低温、SOx、NOx、酸素濃度、重金属など様々な環境ストレス条件下では、細胞の葉緑体、ミトコンドリア、ミクロボディなどのオルガネラでの ROS 生成量はさらに増大し、細胞や個体は最終的に酸化ストレスを被ることになる。よって、光合成生物にとって ROS による酸化ストレスからの回避は至上命題である。一方、近年 ROS と抗酸化物質とのクロストークによる細胞内のレドックス状態の変化はレドックスシグナルとして、ストレス応答時の防御系の発現制御をはじめ、細胞分化や伸張、細胞周期制御、プログラム細胞死およびホルモンシグナリングなどの種々の生理応答に関与していることが明らかになってきた。したがって、細胞内 ROS 量を抑制するだけでなく、常時厳密に量的/空間的な制御をする必要があるため、酸化的ストレス防御と細胞内レドックス制御は渾然一体の機構となる。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。

2. 研究内容

(1) ROS を介したレドックス制御の分子機構

1-1) tAPX の誘導抑制に応答を示す遺伝子群の破壊株ラインの解析

これまでに当研究室では葉緑体由来の H_2O_2 を介した酸化的シグナリングの生理機能の解明を目的として、主要な H_2O_2 消去酵素である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) の一過的な発現抑制系を構築してきた。その tAPX の誘導抑制系を用いたマイクロアレイ解析の結果、tAPX の誘導抑制に応答を示す遺伝子群 (**Responsive to tAPX suppression: RTS**) が約 800 個同定された (図 1)。これらには、サリチル酸 (SA)、エチレン、ジャスモン酸 (JA) 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。また、2 倍以上に誘導された遺伝子には耐病性に関与する遺伝子群が多く含まれていた。事実、これまでの当研究室の実験結果から、tAPX 発現を抑制させ

たシロイヌナズナでは、耐病性ホルモンである SA の蓄積が見られた。これらのことは、tAPX の誘導抑制により生じた H₂O₂ がシグナルとして機能し、生物学的および非生物学的ストレス応答に関与することを示唆していた。そこで、膨大な数の RTS 遺伝子群からストレス応答/防御に重要な遺伝子を特定するために、RTS 発現変異株からストレス感受性に異常を持つ個体の網羅的な選抜を試みた。

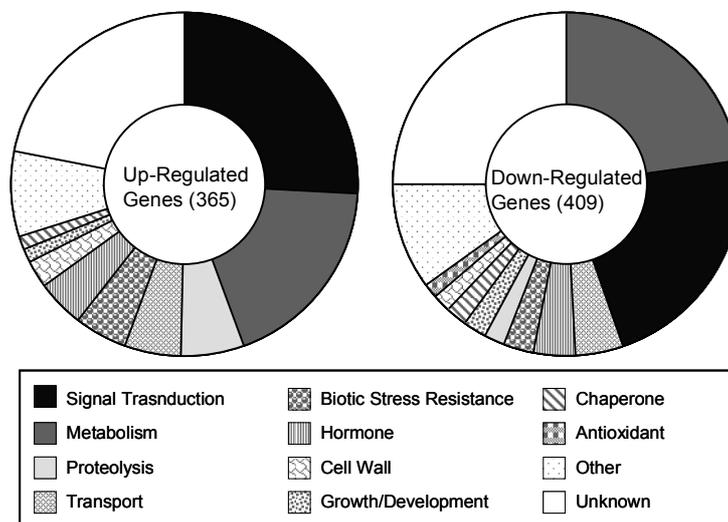


図1 tAPX誘導抑制に伴う遺伝子発現変化

Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) より RTS 遺伝子群の破壊株の種子を 269 系統 (152 遺伝子に対応) 入手した。次世代の植物体 (3 週齢) を用いて、ゲノミック PCR によりいずれの破壊株もホモ接合体であることが明らかになった。また、産業総合研究所の高木優氏より RTS 遺伝子の優性抑制株 (58 遺伝子に対応) の種子を分譲頂いた。これらは、優性抑制のためのキメラ遺伝子の高発現が確認された。

RTS 遺伝子発現変異株ラインから高照度光下あるいは 0.1 μM パラコート (MV) を含む 1/2 MS 培地 (1% ショ糖) での生育による光酸化的ストレスに対し、高感受性 (*pss*) および非感受性 (*psi*) を示す個体を選抜した。その結果、それぞれ 15 株の *pss* 変異株および 8 株の *psi* 変異株が得られた (表 1)。さらに、生物学的ストレスとしてのエリシター処理に対して高感受性を示す変異株 (*fs*) が 5 系統同定された (表 1)。

表 1 RTS 遺伝子の発現変異株より単離されたストレス感受性異常株の原因遺伝子

<i>PhotooxidativeStress-Sensitive (PSS)</i>		<i>PhotooxidativeStress-Insensitive (PSI)</i>	
<i>PSS1</i>	putative transcription factor	<i>PSI1</i>	Ring finger protein
<i>PSS2</i>	Acytransferase	<i>PSI2</i>	Glutamate Decarboxylase 1(GAD1)*2
<i>PSS5</i>	putative transcription factor	<i>PSI3</i>	BAB and TAZ DOMAIN PROTEIN
<i>PSS7</i>	Homeodomain-leucine zipper	<i>PSI4</i>	F-box family protein
<i>PSS8</i>	Ferulate 5-hydroxylase1 (FAH1)*1	<i>PSI5</i>	Protein disulfide isomerase
<i>PSS9</i>	Basic helix-loop-helix (bHLH101)	<i>PSI6</i>	Subtilase family protein
<i>PSS10</i>	myb domain protein	<i>PSI7</i>	cryptochrome signaling related
<i>PSS11</i>	putative transcription factor	<i>PSI9</i>	putative transcription factor
<i>PSS12</i>	putative transcription factor	<i>Flg22-Sensitive (FS)</i>	
<i>PSS13</i>	putative transcription factor	<i>FS1</i>	bZIP family
<i>PSS14</i>	putative transcription factor	<i>FS2</i>	MYB family transcription factor
<i>PSS15</i>	DNA binding protein, transcription factor	<i>FS3</i>	DNA binding protein, transcription factor
<i>PSS16</i>	AP2 domain containing transcription factor	<i>FS4</i>	putative transcription factor
<i>PSS17</i>	transcriptional activator	<i>FS5</i>	putative transcription factor
<i>PSS18</i>	putative transcription factor		

*1 Maruta and Noshi et al., Plant Sci. (2014)

*2 Maruta et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2013)

1-2) 葉緑体 H₂O₂ 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

RTS 遺伝子破壊株のうち、0.1 μ M MV 添加培地上でアントシアニンレベルの増大が見られない変異株として単離された *pss8* の原因遺伝子が *FAH1* であった。*FAH1* は、フェニルアラニンを初発物質とするリグニン合成系の中間に位置しており、コニフェラルデヒドの脱水反応を触媒していた (図 2)。*FAH1* 欠損株 (*fah1*) は、MV 処理下のみならず、通常条件下においてさえ野生株よりも僅かに矮性の表現型を示した (図 3)。しかし、MV 処理によるアントシアニン蓄積の抑制に加えて、クロロフィル量の減少および脂質酸化物 (マロンジアルデヒド: MDA) の蓄積が亢進されており、光酸化的ストレス高感受性株であると考えられた (図 4)。さらに、*fah1* のアリルおよび *FAH1* 下流でシナピン酸の合成に関与するアルデヒド脱水素酵素の点変異株 (*ref1-4*) においても、MV 処理下でのアントシアニン蓄積が同様に抑制されていた (図 5)。以上より、光酸化的ストレス防御におけるアントシアニン合成系への *FAH1* ならびにフェニルプロパノイド代謝系の関与が示された。

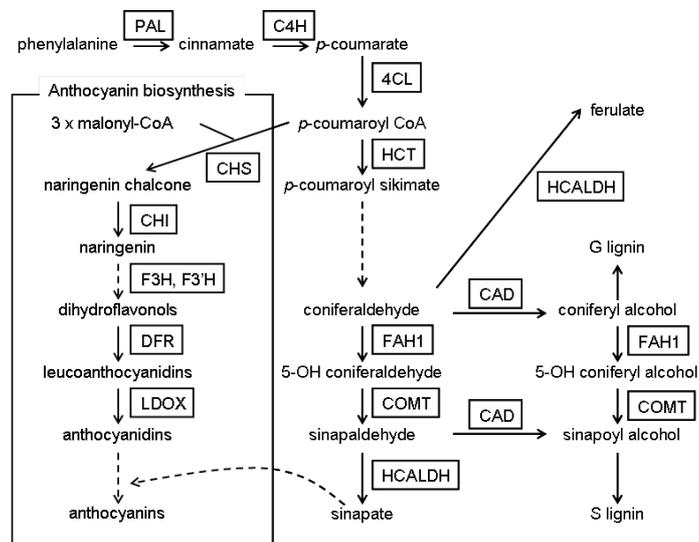


図 2 フェニルアラニンを初発物質とするアントシアニン代謝系

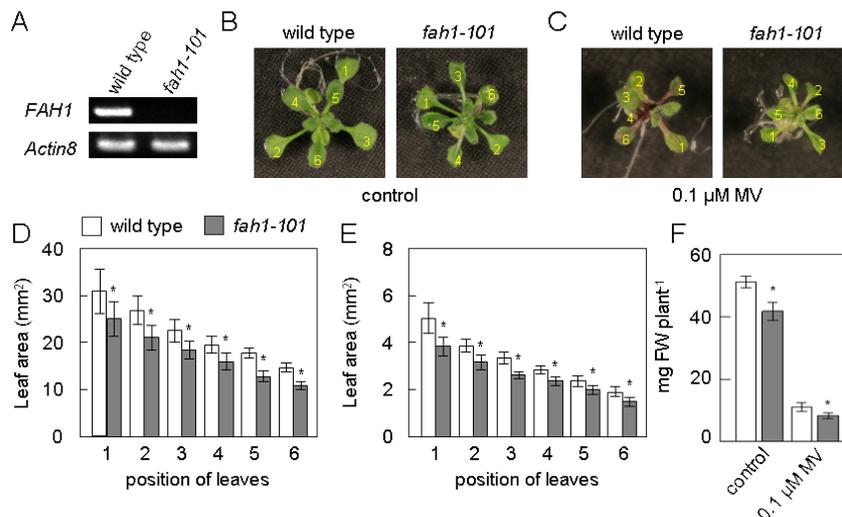


図 3 *FAH1* 欠損の光酸化的ストレス条件下での生育に及ぼす影響

野生株および *fah1* における *FAH1* の転写レベルを比較した (A)。両植物体を通常条件 (B) あるいは MV 処理下 (C) で 2 週間生育させた。このときの葉面積 (通常条件: D、MV 処理下: E) および新鮮重量 (F) を測定した。以降の図における*は全て有意水準 5%を示す (t 検定)。

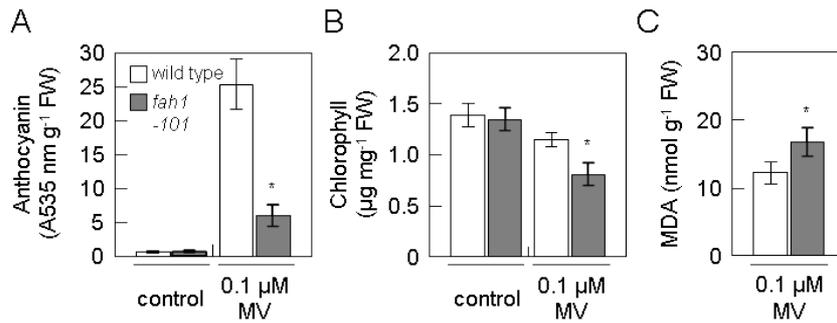


図 4 光酸化的ストレス感受性に及ぼす FAH1 欠損の影響

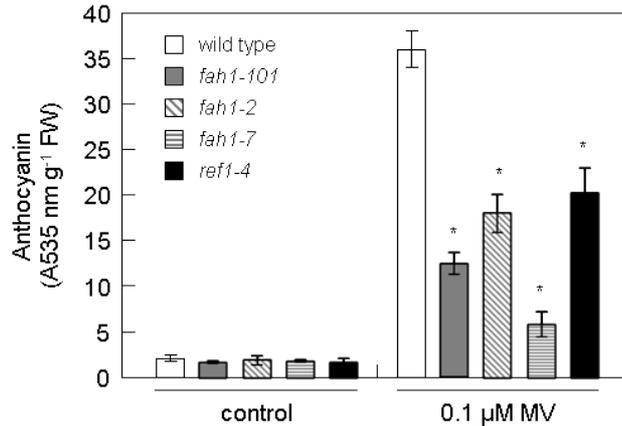


図 5 光酸化的ストレスによるアントシアニン合成に及ぼす FAH1 およびその下流の機能欠損の影響

光酸化的ストレス応答における FAH1 とアントシアニンの関係性の解明を目的に、恒明条件 (NL: 光照射: 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、温度: 25°C) の 0.1 μM MV 添加培地で 2 週間生育させたときの野生株および *fah1* における遺伝子発現レベルの変化を比較した。その結果、多くのフェニルアラニン代謝系およびアントシアニン合成関連遺伝子の光酸化的ストレスによる誘導が、FAH1 の欠損により抑制されていた (図 6、7 および 8)。したがって、FAH1 はアントシアニン合成に関与する遺伝子群の発現制御に必須の役割を持つ可能性が示唆された。

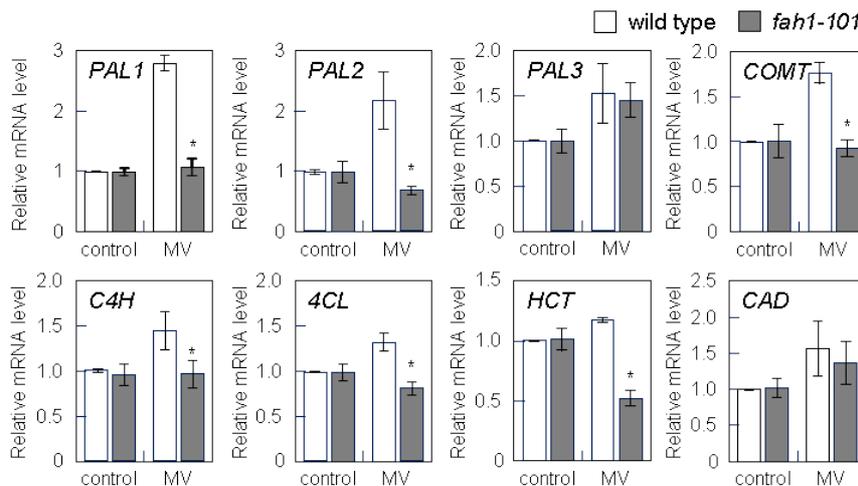


図 6 光酸化的ストレス下の *fah1* におけるフェニルプロパノイド経路関連遺伝子の発現

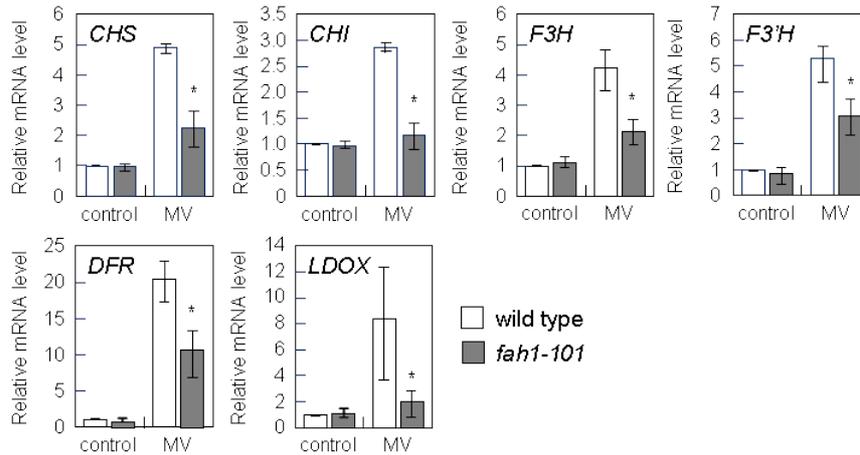


図 7 光酸化的ストレス下の *fah1* におけるアントシアニン合成関連遺伝子の発現

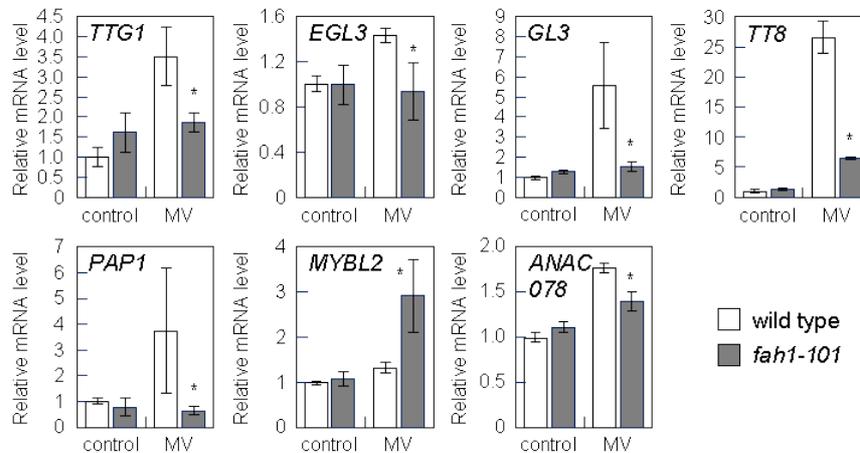


図 8 光酸化的ストレス下の *fah1* におけるアントシアニン合成に関する転写因子群の発現

葉緑体 H_2O_2 の光酸化的ストレス防御における生理機能について *FAH1* およびアントシアニン合成系への関与から解析した。葉緑体 H_2O_2 に対する *FAH1* の応答性の確認には、これまでに当研究室で作出してきた、エストロゲン誘導型 RNAi 法による tAPX 発現の誘導抑制植物 (IS-tAPX) およびそのコントロール株 (IS-GUS) を用いた。tAPX 抑制により *FAH1* の発現は誘導され、このときアントシアニンレベルの増大も見られた。また、*FAH1* の発現は MV および強光 (HL: $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) といった光酸化的ストレスにより誘導された (図 9)。さらに、tAPX 抑制はアントシアニン合成関連遺伝子の発現も誘導した (図 10)。以上より、光酸化的ストレス下の葉緑体膜で生成された H_2O_2 は、*FAH1* を介してアントシアニン合成関連遺伝子の誘導に機能することで、光酸化防御に作用していると推察される。

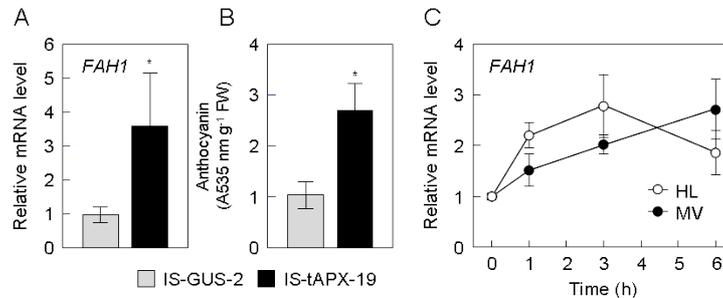


図 9 *FAH1* レベルおよびアントシアニン合成に及ぼす tAPX 誘導抑制の影響

17 日齢の IS-tAPX および IS-GUS にエストロゲンを処理し 48 時間後における *FAH1* の転写レベル (A) およびアントシアニン蓄積 (B) について解析した。14 日齢の野生株に $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の HL および $100 \mu\text{M}$ MV を処理し、*FAH1* の発現パターンを定量的 RT-PCR より解析した (C)。

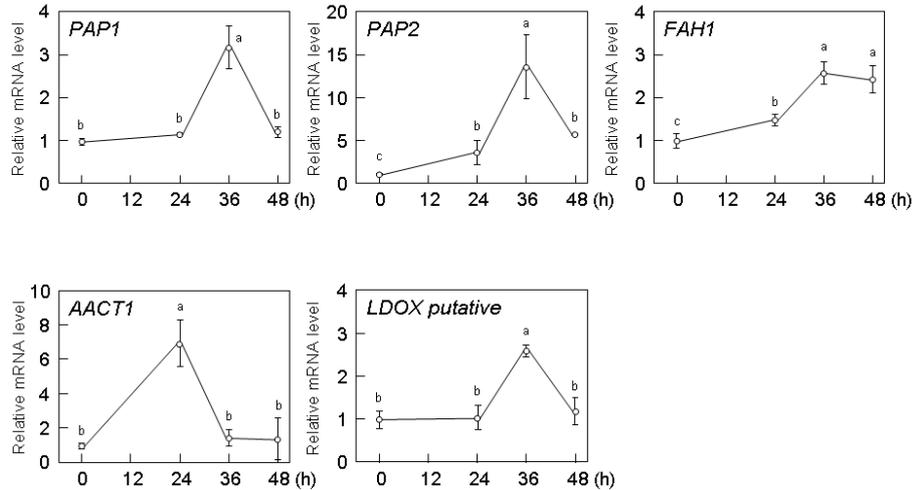


図 10 tAPX 誘導抑制に対するアミノ酸合成関連遺伝子の応答性

1-3) 葉緑体 H₂O₂ 応答性 basic Helix-Loop-Helix 転写因子: bHLH101 : PSS9 の機能解析

a. bHLH101 のストレス応答

単離された *pss* のなかでも、光酸化的ストレス付与によるクロロシスが顕著に見られた *pss9* の原因遺伝子は bHLH101 転写因子をコードしていた。bHLH101 は、植物特有の bHLH lb クレードに属しており、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、光酸化的ストレス応答との関係は不明であった。まず、bHLH101 の葉緑体 H₂O₂ シグナルへの関与を確認するため、NL 条件で生育させた 17 日齢の IS-tAPX-19 および IS-GUS-2 株にエストロゲン処理した。その結果、48 時間後において、tAPX の抑制に伴い、bHLH101 の転写レベルが抑制されていた (図 11a)。このとき、bHLH101 の機能相補因子である bHLH038、039、100 の発現に tAPX 抑制による影響は認められなかった。次に、光酸化的ストレスに対する bHLH101 の応答性について解析するため、NL 条件で生育させた 2 週齢の野生株に 100 μM MV を噴霧、または 1000 μmol photons m⁻² s⁻¹ の HL を照射し、6 時間までの bHLH101 の発現変化を継時的に確認したところ、その転写レベルは両処理により抑制されていた (図 11b)。

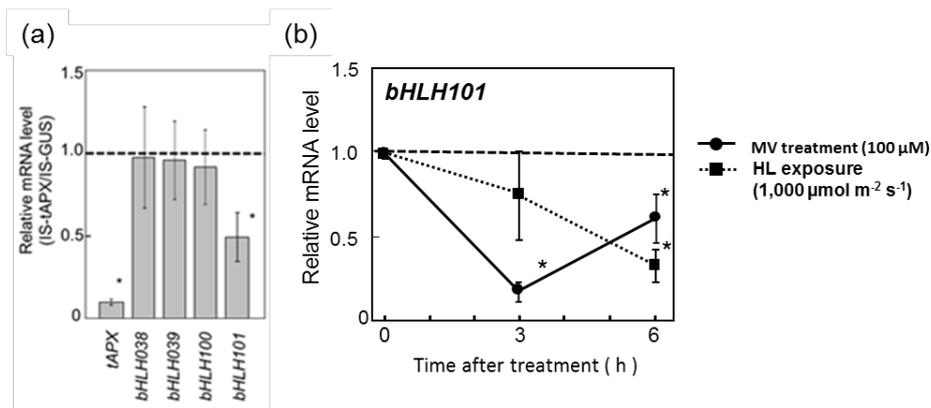


図 11 bHLH101 の tAPX 抑制および酸化的ストレスに対する応答性

(a) 17 日齢の IS-tAPX および IS-GUS 株にエストロゲン処理し、恒明条件に 48 時間静置したときの bHLH 038, 039, 100, 101 の転写レベルについて定量的 RT-PCR により解析した。(b) 恒明条件下で 2 週齢まで生育させた野生株に 100 μM MV を塗布あるいは HL 照射 (1000 μmol photons m⁻² s⁻¹) したときの転写レベルを定量的 RT-PCR により確認した (*: IS-tAPX/IS-GUS の値が 2.0 以上もしくは 0.5 未満のとき、5%水準で有意差あり (t 検定))。

b. bHLH101 優性抑制株の光酸化的ストレス感受性と鉄代謝の関係

DN-bHLH101 では、MV 処理 (30 nM)、中強度の光照射 (ML: 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) においても *bHLH101-SRDX* の発現量に依存的な葉の退色が見られ、クロロフィルレベルの減少およびアントシアニン蓄積に阻害が生じた (図 12)。しかし、このときの通常条件 (1/2MS、1%ショ糖、鉄濃度 50 μM) においてさえ、DN-bHLH101 のクロロフィルレベルはコントロール株よりも有意に減少していた。

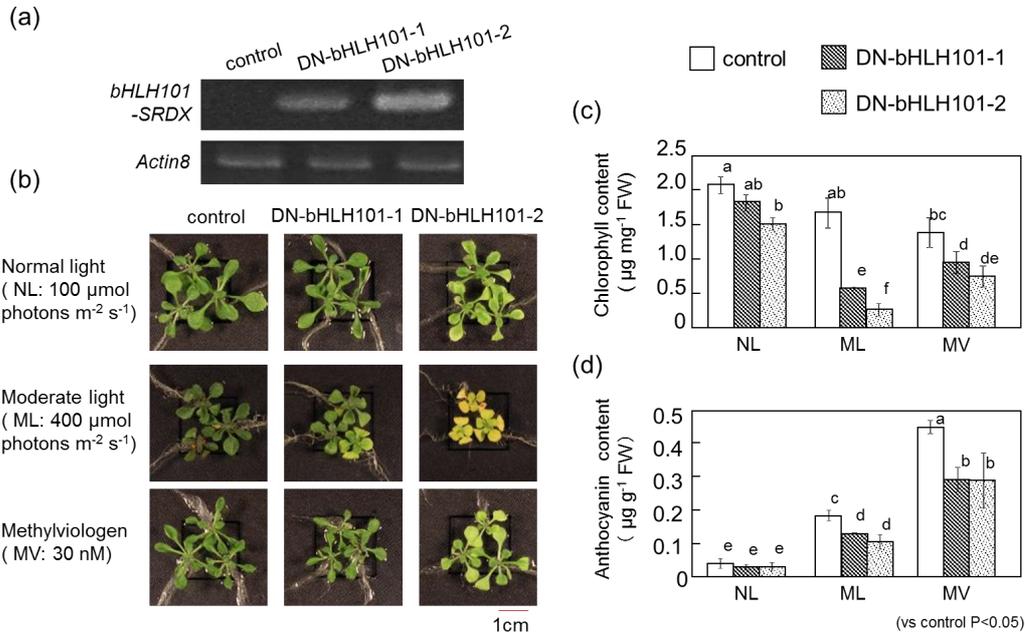


図 12 *bHLH101* の優性抑制株を用いた光酸化的ストレス感受性試験

(a) 優性抑制ドメイン連結型 *bHLH101-SRDX* の発現量を半定量的 RT-PCR により確認した。(b) コントロールおよび DN-bHLH101 株を 30 nM MV を含む 1/2MS 培地に直接播種または ML (400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の恒明条件下で 2 週齢まで生育させた。このときの (c) クロロフィルおよび (d) アントシアニンレベルを測定した (5%水準で有意差あり (t 検定))。

そこで、鉄濃度 100 μM あるいは 5 μM の 1/2MS 培地 (1%ショ糖) を鉄十分および欠乏条件と設定し、DN-bHLH101 の酸化的ストレス感受性に及ぼす生育環境中の鉄濃度の影響について解析した。鉄欠乏条件において DN-bHLH101 は顕著なクロロシスの表現型を示し、酸化的ストレスによりその形質は促進された (図 13a)。一方で、鉄十分条件においては、非ストレス下でのコントロールおよび DN-bHLH101 の表現型に違いは見られなかったが、光酸化的ストレス、特に ML 下の DN-bHLH101 では著しい葉の黄化が見られた。このときの各条件の植物体におけるクロロフィル量の変化には表現型との相関性が見られた (図 13b)。また、抗酸化酵素である APX 活性が、光酸化的ストレス付与あるいは低鉄条件の DN-bHLH101 では、野生株よりも減少していた (図 13c)。さらに、生育阻害の見られるタイミングにおける DN-bHLH101 では、鉄含量も著しく低下していた (図 13d)。

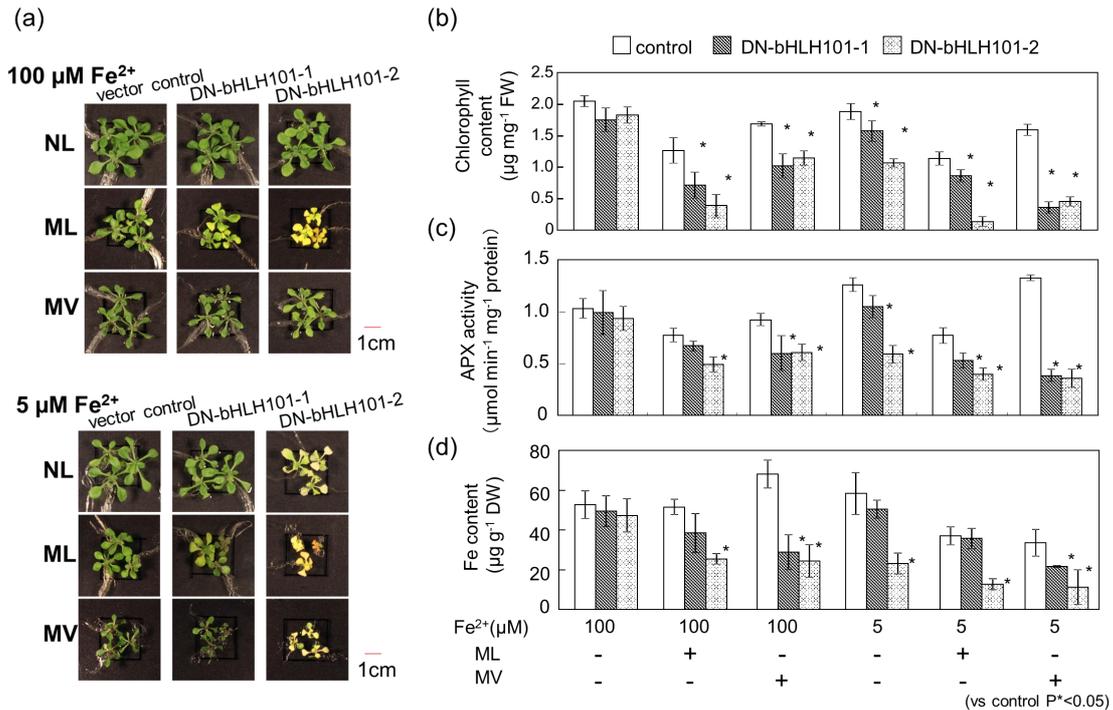


図 13 bHLH101 優性抑制株の酸化的ストレス感受性と鉄代謝の関係

(a) 鉄濃度 100 μM あるいは 5 μM の 1/2MS 培地 (1% ショ糖) に DN-bHLH101 およびコントロール株を播種し、通常条件あるいは酸化的ストレスとして 30 nM MV 添加培地あるいは ML 照射 (400 μmol photons m⁻² s⁻¹) 下で 2 週齢まで生育させた。このときの (b) クロロフィルレベル、(c) APX 活性および (d) 細胞内鉄含量を測定した (*: 各条件におけるコントロール株と比較して、5%水準で有意差あり (t 検定))。

そこで、鉄十分条件で 2 週齢まで生育させたコントロール株および DN-bHLH101 に HL 照射あるいは MV 処理 (100 μM) を行った。その結果、植物体間で細胞内鉄含量に差は認められなかった (図 14a)。しかしこのとき、HL 照射により DN-bHLH101 の電解質漏出量が増加した (図 14b)。

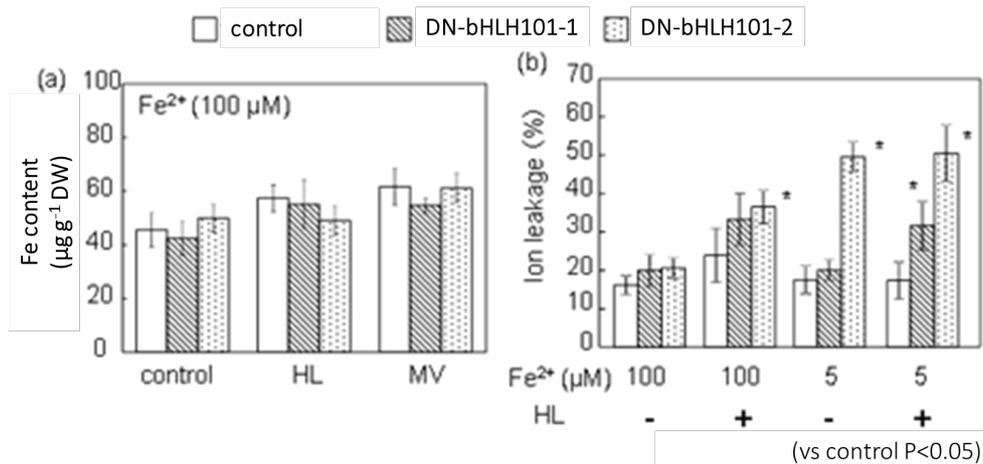


図 14 bHLH101 優性抑制株の光酸化的ストレス感受性と鉄の関係

1/2MS 培地 (1% ショ糖、鉄濃度 100 μM) に DN-bHLH101 およびコントロール株を播種し、2 週齢まで生育させた。そこに 6 時間の HL 照射 (1000 μmol photons m⁻² s⁻¹) あるいは MV 処理 (100 μM) を行い、(a) 細胞内鉄含量および (b) 電解質漏出量を測定した (*: 各条件におけるコントロール株と比較して、5%水準で有意差あり (t 検定))。

c. bHLH101 欠損株および過剰発現株のストレス感受性

ABRC より bHLH101 の T-DNA 挿入欠損株の種子を入手した。次世代の植物体の葉から抽出した cDNA を鋳型とした半定量的 RT-PCR により、完全な bHLH101 遺伝子欠損株 (KO-bHLH101) の単離が確認された。また、bHLH101 過剰発現株 (OX-bHLH101) を作出し、転写レベルで目的遺伝子の過剰発現が確認された (図 15a)。

野生株および bHLH101 の発現変異株を鉄十分あるいは低鉄濃度条件の ML 照射下で 2 週齢まで生育させたところ、いずれの条件においても植物間での生育に違いは見られず、DN-bHLH101 のような表現型は確認されなかった (図 15b)。また、鉄十分条件で 2 週齢まで生育させた植物体に HL 照射したところ、bHLH101 発現変異株のクロロフィル蛍光に野生株と差は見られなかった、しかし、このときの電解質漏出レベルが、KO-bHLH101 および OX-bHLH101 ではそれぞれ野生株より増加あるいは減少していた (図 15c,d)。

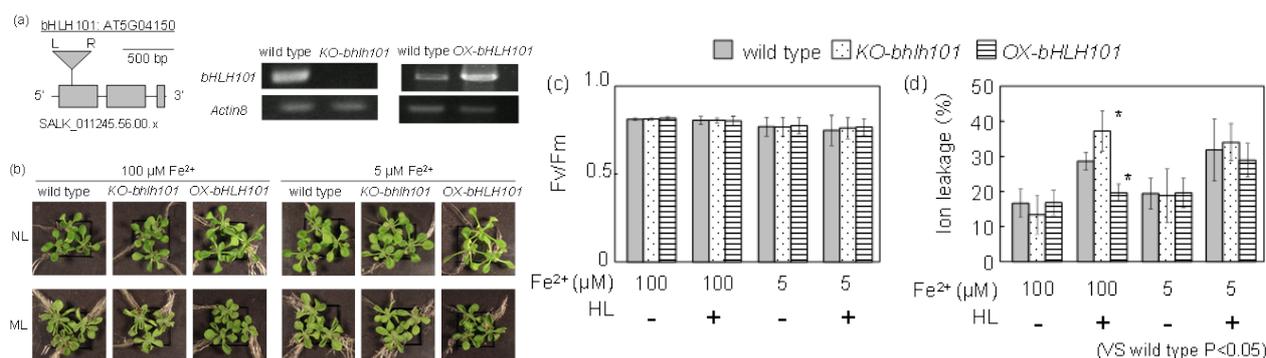


図 15 bHLH101 欠損株および過剰発現株のストレス感受性

(a) bHLH101 の転写レベルを半定量的 RT-PCR により確認した。PCR 条件は 95 °C 30 秒、57 °C 30 秒、72 °C 60 秒に設定し、KO-bHLH101 : 35 サイクル (左)、OX-bHLH101 : 28 サイクル (右) で行った。(b) 野生株、KO-bHLH101 および OX-bHLH101 を 1/2MS 培地 (1% ショ糖、鉄濃度 100 μM) に直接播種し、NL (100 μmol photons m⁻² s⁻¹) あるいは ML (400 μmol photons m⁻² s⁻¹) の恒常条件下で 2 週齢まで生育させた。また、NL で生育させた 2 週齢の植物体に HL (1000 μmol photons m⁻² s⁻¹) を照射し、6 時間後の (c) クロロフィル蛍光および (d) 電解質漏出量を測定した (*: 各条件で野生株と比較して、5% 水準で有意差あり (t 検定))。

d. bHLH101 下流遺伝子の推定

これまでに、bHLH101 を含む bHLH lbs の多重欠損株を用いたトランスクリプトミクスの結果がいくつか報告されており、bHLH101 を介したシグナルの下流候補因子が推定されている。なかでも、Slvitz ら (2012) は bHLH101 および bHLH100 の二重欠損株 (*bhlh100/bhlh101*) を用いて、同植物体の葉で激しいブリーチングが見られるような低鉄条件におけるアレイ解析を行っている。また、以前に我々が tAPX 抑制植物を用いたマイクロアレイにより同定した RTS 遺伝子群には、葉緑体 H₂O₂ シグナリングにおける bHLH101 の下流因子が含まれると考えられる。そこで、両アレイデータにおいて発現変化にオーバーラップが見られる遺伝子をピックアップしたところ、23 の下流候補因子が同定された。これらの遺伝子の発現パターンをジーンベスティゲーター (<https://genevestigator.com>) により解析したところ、その多くの病原菌に対する応答性に tAPX 抑制株や bHLH 二重欠損株における発現変化との相関性が見られた (図 16)。よって、bHLH101 は酸化的ストレスのみならず、生物学的ストレスに対しても機能を持っていることが示された。

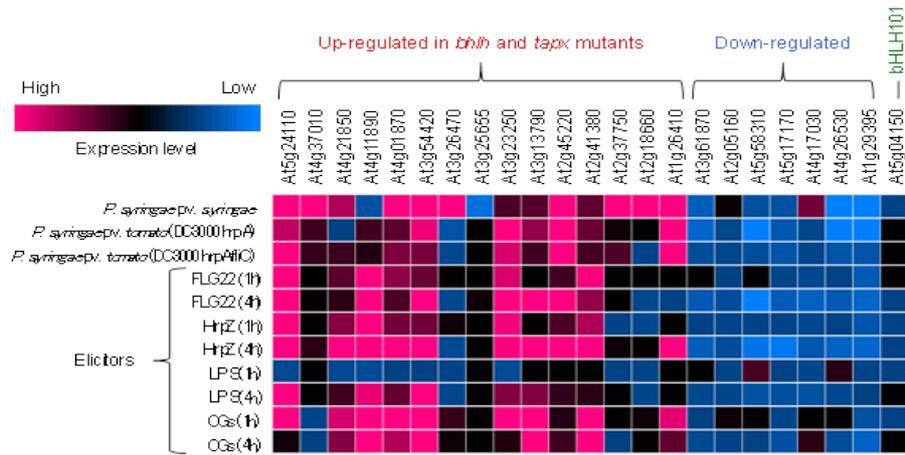


図 16 bHLH101 下流候補遺伝子の生物的ストレスに対する応答

鉄欠乏下における *bhlh100/101* のマイクロアレイデータ (Sivitz *et al.* 2012) と RTS 遺伝子群 (Maruta *et al.* 2013) から同定された bHLH101 下流候補遺伝子群の病原菌感染およびエリシター処理に対する応答性をジーンバステイゲーターを用いて解析した。

1-3) 葉緑体 H₂O₂ 応答性転写因子: PSS11 の機能解析

a. PSS11 の優性抑制は鉄欠乏感受性を増大させる

これまでに同定された変異株のなかでも、最も顕著な生育不全の表現型がみられたのは PSS11 転写因子の優性抑制株 (DN-PSS11) であった。PSS11 の機能については、分子遺伝学的な解析に基づく知見は報告されておらず、その一切が不明であった。DN-PSS11 を 1/2MS 培地 (50 μM Fe²⁺) で生育させたところ、葉に鉄欠乏様の生育障害が見られ、それは培地中の鉄濃度の増減に伴い回復あるいは促進された。そこで、生育不全が回復した鉄濃度 150 μM Fe²⁺ をコントロール条件とし、1 週齢の植物体を異なる鉄濃度条件へと移行させた。このときでも、DN-PSS11 では鉄欠乏状態での生育により葉のクロロシスが示された (図 17)。以上より、PSS11 は鉄欠乏応答の鍵因子である可能性が示された。

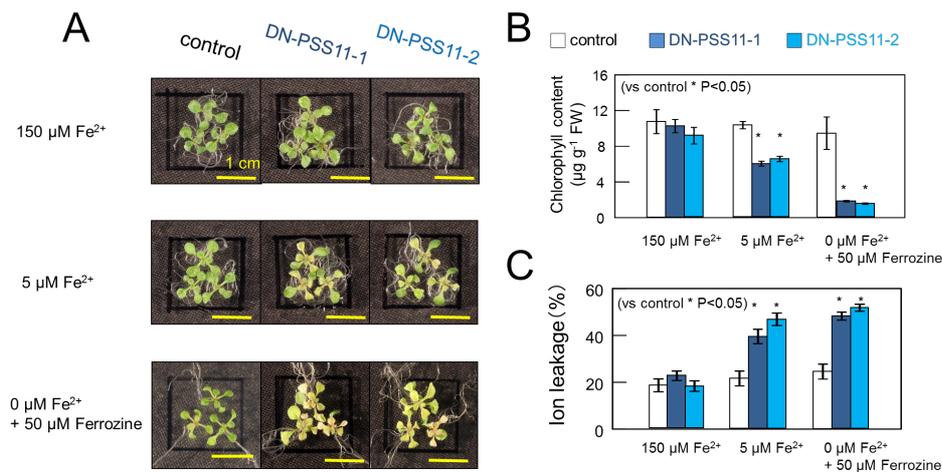


図 17 PSS11 優性抑制株の鉄欠乏ストレス感受性

150 μM Fe²⁺ の培地で 1 週間生育させたコントロール株および DN-PSS11 を異なる鉄濃度 (left: 150 μM Fe²⁺, center: 5 μM Fe²⁺, right: 0 μM Fe²⁺+50 μM Ferrozine) の培地に移し替えた。3 日後の各植物体の表現型を確認し (A)、このときのクロロフィル量 (B) および細胞崩壊度 (C) を測定した。

b. PSS11 の分子特性

PSS11 の開始コドンより約 2000 base 上流までの配列を pRI201-An-DNA vector のプロモーター領域と組み換え GUS をドライブさせた発現系 (pRI201-PSS11pro-GUS) を構築した。同コンストラクトを用いたプロモーター-GUS 解析により、10 日齢のシロイヌナズナにおいて、PSS11 は葉および根に発現する可能性が確認された (図 18A-C)。また、pGBKT7 vector (Clontech) を改変し、N 末端側に核移行シグナル、C 末端側に GAL4AD あるいは PSS11 全長配列を連結させた GAL4 BD 配列の発現系を酵母に形質転換させた (Y2HGOLD: pGBKT7: NLS: GAL4AD および Y2HGOLD: pGBKT7: NLS: PSS11, and Y2HGOLD: pGBKT7: NLS)。SD (-Trp, -His, -Ade) 培地では、Y2HGOLD: pGBKT7: NLS: GAL4AD のみコロニー形成が認められた (図 18D)。従って、PSS11 は転写抑制因子として機能する可能性が示された。

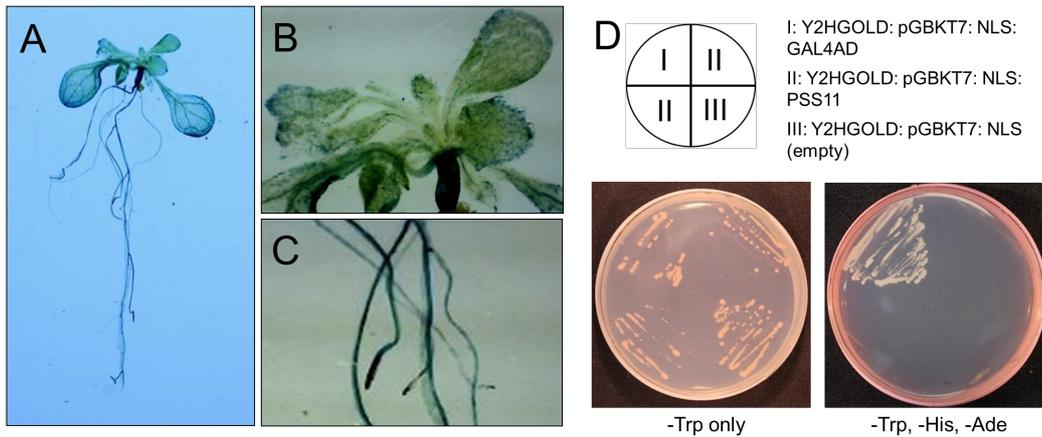


図 18 PSS11 の分子特性

(A-C) プロモーター-GUS による PSS11 の組織特異性の解析、(C) 植物全体、(D) 葉、(E) 根 (D) 形質転換酵母の SD (-Trp, -His, -Ade) 培地での生育

c. PSS11 遺伝子破壊の単離

PSS11 の T-DNA 挿入による遺伝子破壊株 (KO-PSS11) の種子を ABRC より入手した。ゲノム中の目的個所への T-DNA 挿入がホモ接合体の状態を確認された KO-PSS11 を土耕条件下で生育させたところ、ロゼッタが展開する (約 3 週齢) までの生育に野生株との違いは見られなかった (図 19A)。しかしそれ以降では、著しいシュートの発達障害が生じ、最終的には枯死に至る傾向が見られた (図 19B)。この表現型に、生育環境中の鉄濃度の増減は影響しなかった。

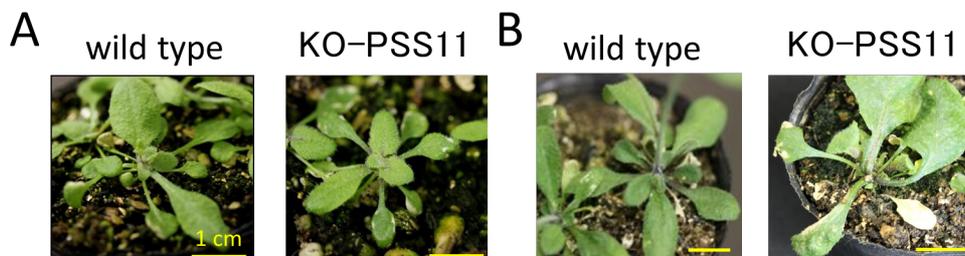


図 19 土耕条件下での PSS11 遺伝子破壊株の生育

植物体の生育は長日条件 (明期: $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 hour、暗期: $0 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 8 hour) で行った。1/2MS 培地で生育させた 2 週齢の野生株および KO-PSS11 を土耕条件へと移し替えた。移行後、1 週間 (3 週齢) (A) および 2 週間 (4 週齢) (B) での表現型を示した。

d. PSS11 は鉄取り込みのネガティブレギュレーターとして機能する

発現量の異なる 2 ラインの PSS11 過剰発現株 (OX-PSS11) を作出した。DN-PSS11 と同様に、OX-PSS11 も鉄欠乏に高感受性の表現型を示した。また、低鉄濃度条件下の両変異株では、鉄取り込み能の指標となる鉄還元酵素活性の誘導が見られず、実際に細胞内鉄濃度も減少していた (図 20)。以上より、PSS11 の鉄欠乏応答におけるネガティブレギュレーターとしての機能が示された。

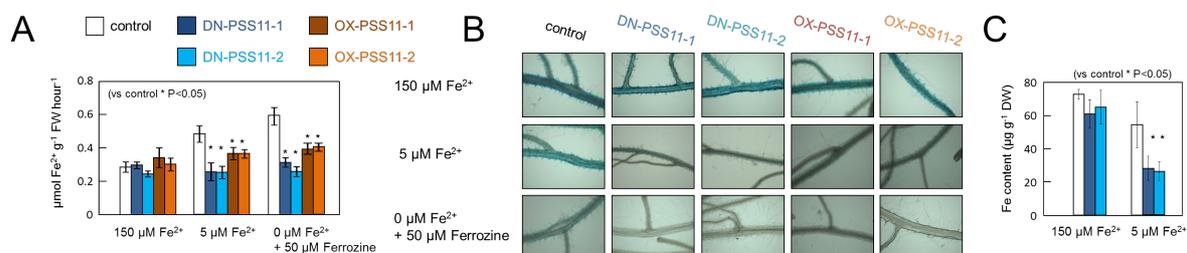


図 20 PSS11 発現変異株の鉄取り込み能の評価

(A-B) 150 µM Fe²⁺の培地で 1 週間生育させたコントロール株、DN-PSS11 および OX-PSS11 を異なる鉄濃度 (150, 5, or 0 µM Fe²⁺) *1 の培地に移し替えた。3 日後の各植物体の根における鉄還元酵素活性を測定した (A)。また、このときの根の鉄を Perls 染色により視覚化した (B)。

(C) 150 µM および 5 µM Fe²⁺の培地で 2 週間生育させたコントロール株および DN-PSS11 の葉における鉄含量を原子吸光計を用いて測定した*2。

*1 ただし、0 µM Fe²⁺の培地のみは 50 µM Ferrozine を添加した。

*2 大日本明治製糖株式会社 (敬称略: 大村昇、大伴謙司、大島健人、原田淳) の協力の下行った。

e. PSS11 を介した鉄欠乏応答とサリチル酸との関係

これまでに、鉄欠乏応答を促進させるシグナル因子として、サリチル酸 (SA) の存在が示唆されている。しかしながら、SA と鉄欠乏感受性の関係の実際は明らかでない。そこで、1 週齢の DN-PSS11 を低鉄濃度の SA 含有培地に移し替え生育させた。その結果、変異株で見られる葉のクロロシスは SA 添加により回復する傾向がみられた (図 21A)。そこで、DN-PSS11 および OX-PSS11 に鉄欠乏ストレスを付与したときの葉での SA レベルを測定した。興味深いことに、鉄欠乏下の野生株の葉では遊離 SA の増大が見られ、PSS11 発現変異株の葉では遊離および総 SA 量がそれより著しく増大していた (図 21B)。以上より、鉄欠乏下の PSS11 発現変異株では、根から伝達された過度の鉄欠乏シグナルにより SA が過剰生成され、結果としてクロロシスが生じている可能性を考えた。現在、コントロール株と PSS11 発現株との挿し木植物の鉄欠乏および SA 感受性を確認している。

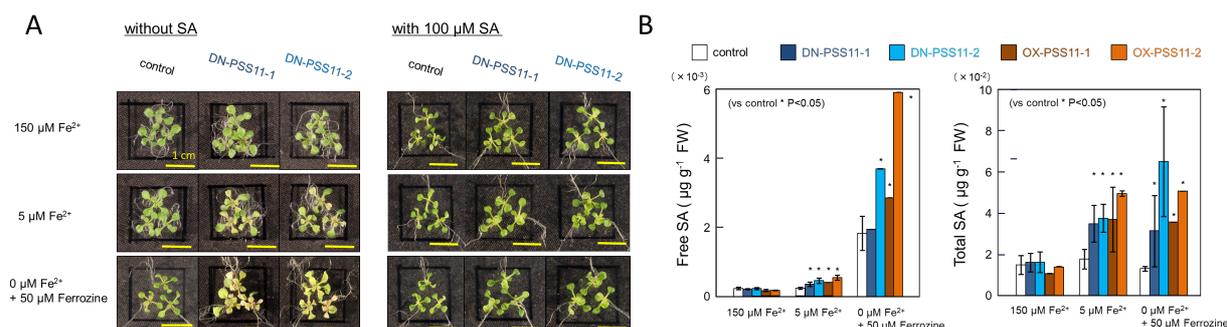


図 21 PSS11 発現変異株の鉄欠乏感受性と SA の関係

(A) 150 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ の培地で 1 週間生育させたコントロール株および DN-PSS11 を異なる鉄濃度 (upper: 150 $\mu\text{M Fe}^{2+}$, middle: 5 $\mu\text{M Fe}^{2+}$, lower: 0 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ +50 $\mu\text{M Ferrozine}$) の 100 $\mu\text{M SA}$ 含有 (right) / 非含有 (left) 培地に移し替えた。3 日後の各植物体の表現型を比較した。

(B) 150 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ の培地で 1 週間生育させたコントロール株、DN-PSS11 および OX-PSS11 を異なる鉄濃度 (150, 5, or 0 $\mu\text{M Fe}^{2+}$) * の培地に移し替えた。3 日後の各植物体の葉における SA レベルを HPLC により測定した。

* ただし、0 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ の培地のみは 50 $\mu\text{M Ferrozine}$ を添加した。

(2) シロイヌナズナ Nudix hydrolase によるヌクレオシドニリン酸類縁体代謝を介した酸化ストレス応答の制御

植物細胞における主要な還元力である NADPH は、葉緑体では光合成、クロロフィル合成、抗酸化系など光と関連性の深い代謝経路で重要な役割を担っている。さらに本分子のレドックス状態は環境ストレス下における ROS の生成/消去に大きく影響する。したがって、細胞内におけるピリジヌクレオチド量およびレドックス状態はオルガネラレベルで厳密に制御されなければならない。これまでに当研究室では、シロイヌナズナに存在する 28 種類の Nudix hydrolase (AtNUDX) ファミリーの酵素学的性質および生理機能を解析する過程で、葉緑体に局在する AtNUDX19 が NADPH 加水分解活性を有することを明らかにした。また、AtNUDX19 の欠損は細胞内 NADPH レベルの増加、光合成および抗酸化系の活性化、光酸化ストレス耐性能の向上をもたらすことが明らかになった。これらの事実は、AtNUDX19 が葉緑体内 NADPH レベルおよびレドックス状態 (NADPH ステータス) の制御を介して、ストレス応答の制御にネガティブレギュレーターとして機能することを示唆していた。しかし、ストレス応答をネガティブに制御する分子機構や生理的意義は不明である。そこで本研究では、AtNUDX19 欠損株 (KO-nudx19) のマイクロアレイ解析によるトランスクリプトームの結果から、葉緑体内 NADPH ステータスの変化が果たす役割を明らかにすることを試みた。

マイクロアレイ解析により、通常光 (100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) もしくは強光照射下 (1200 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) の野生株および KO-nudx19 間でのトランスクリプトームの変化を比較した。その結果、KO-nudx19 株ではストレス応答/耐性関連遺伝子に加え、多くのホルモン応答/生合成関連遺伝子の発現が変化していた。定量的 RT-PCR により遺伝子発現変化を詳細に解析した結果、KO-nudx19 株における 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) の生合成/応答との関連が示された (図 22)。事実、KO-nudx19 株では SA レベルが有意に増加しており、SA 処理に高感受性を示した (図 23)。また、SA 処理による病原菌感染応答関連遺伝子の発現上昇が亢進していた。したがって、AtNUDX19 は SA 応答のネガティブレギュレーターであることが示唆された。

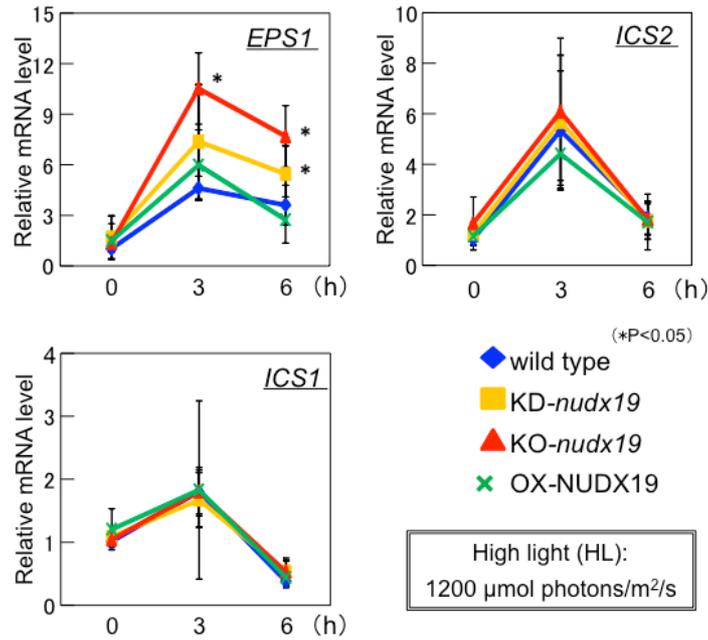


図 22 強光照射下における SA 合成酵素遺伝子発現量に及ぼす AtNUDX19 発現レベルの影響

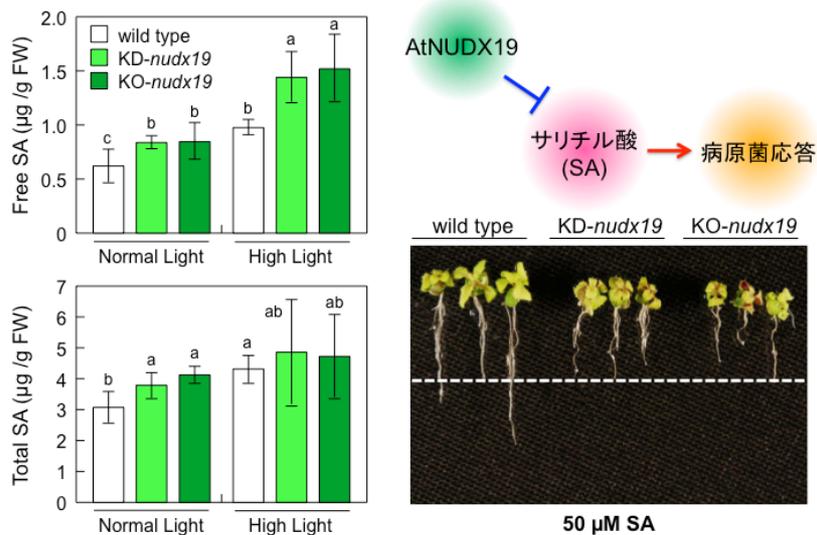


図 23 SA レベルおよび感受性に及ぼす AtNUDX19 欠損の影響

そこで次に、SA と拮抗的に作用し、浸透圧および傷害ストレス応答を制御するアブシジン酸 (ABA) および JA に対する応答への関与について解析した。その結果、*KO-nudx19* 株は JA メチルおよび ABA 処理に対して非感受性を、傷害や乾燥ストレスに対して高感受性を示した (図 24)。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 応答をポジティブに調節していること、すなわち、ストレス・ホルモン応答間のバランス制御に寄与していることが示唆された。

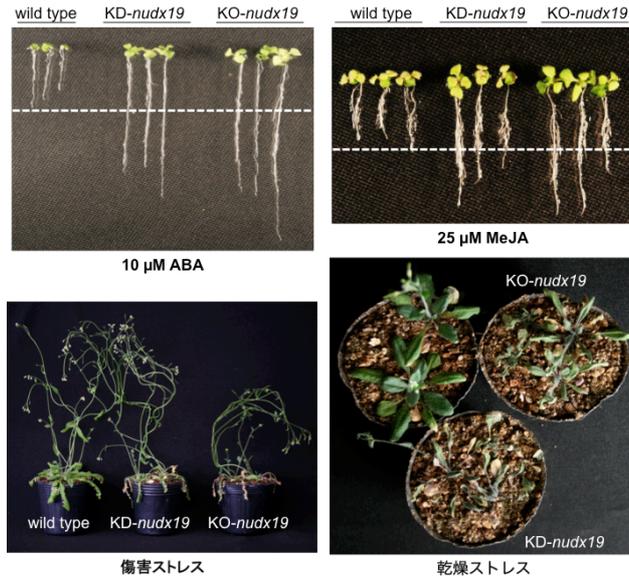


図 24 種々のホルモンおよびストレス処理に及ぼす AtNUDX19 欠損の影響

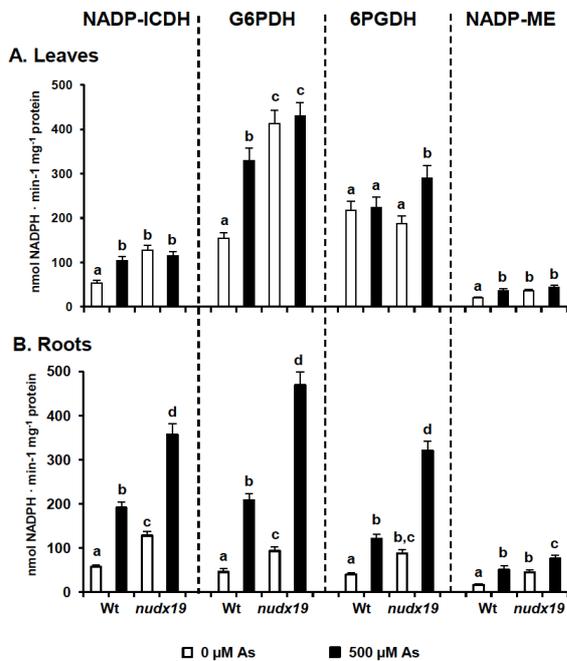


図 25 通常およびヒ素ストレス条件下における NADP-脱水素酵素群の活性に及ぼす AtNUDX19 欠損の影響

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

本プロジェクト研究において、葉緑体内の ROS を任意のタイミングで一過的に上昇させる形質転換体を作成し、葉緑体由来の ROS によって誘導される遺伝子群を網羅的に解析した。その中には、ROS 除去に関わる酵素群や転写因子だけではなく、アントシアニンなどの二次代謝の制御や鉄の恒常性維持に係わるものが存在しており、これらの事実はすでに明らかになっているシグナル伝達系が複雑に関わり合っていることを示唆するものである。今後も引き続き RTS 遺伝子の機能解析を進めていくが、ここから得られる知見は植物における新たなストレス防御機構の解明に加えて、既知のストレス防御系とオルガネラ特異的な ROS シグナリングのクロストーク機構を明らかにするうえで有効であると思われる。さらに、それら

の解析により得られた知見は、新たなストレス耐性植物の分子育種に結びつくと考えている。

一方、葉緑体におけるピリジンヌクレオチド代謝は、AtNUDX19による厳密なバランス制御によって多くの遺伝子発現の制御を行っており、光酸化的ストレス防御だけでなく、ホルモン合成・応答を介した病害応答や成長制御に大きく関与していることが明らかになった。今後は、他のNUDXを含めた解析により協調的なストレス応答機構の解明、さらにはAtNUDX19を介した葉緑体ピリジンヌクレオチド代謝の制御により、高生産植物の分子育種にも繋がることを期待される。

4. 研究成果

a. 原著論文

1. Corpas F. J., Aguayo-Trinidad S., Ogawa T., Yoshimura K., and Shigeoka S. (2016) Activation of NADPH-recycling systems in leaves and roots of *Arabidopsis thaliana* under arsenic-induced stress conditions is accelerated by knock-out of Nudix hydrolase 19 (AtNUDX19) gene. *J. Plant Physiol.* in press
2. Noshi M., Hatanaka R., Tanabe N., Terai Y., Maruta T., Shigeoka S. (2016) Redox regulation of ascorbate and glutathione by a chloroplastic dehydroascorbate reductase is required for high-light stress tolerance in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press
3. Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S., Ishikawa T. (2016) Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: more than just a classical antioxidant enzyme? *Plant Cell Physiol.* in press
4. Tanaka H., Yabuta Y., Tamoi M., Tanabe N., and Shigeoka S. (2015) Generation of transgenic tobacco plants with enhanced tocotrienol levels through the ectopic expression of rice homogentisate geranylgeranyl transferase. *Plant Biotechnol.* **32**, 233-238
5. Ogawa T., Kimura A., Sakuyama H., Tamoi M., Ishikawa T. and Shigeoka S. (2015) Identification and characterization of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in *Euglena gracilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 1957-1964
6. Ogawa T., Tamoi M., Kimura A., Mine A., Sakuyama H., Yoshida E., Maruta T., Suzuki K., Ishikawa T. and Shigeoka S. (2015) Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by expression of cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to increases in biomass and wax ester production. *Biotechnol. Biofuels*, **8**: 80
7. Tanaka H., Maruta T., Ogawa T., Tanabe N., Tamoi M., Yoshimura K. and Shigeoka S. (2015) Identification and characterization of the first member of an *Arabidopsis* GDP-D-mannose pyrophosphohydrolase, AtNUDX9: its involvement in the regulation of GDP-D-mannose metabolism. *J. Exp. Bot.*, **66**, 5797-5808
8. Tanabe N., Tamoi M. and Shigeoka S. (2015) The sweet potato *RbcS* gene (*IbRbcS1*) promoter confers high-level and green tissue-specific expression of the *GUS* reporter gene in transgenic *Arabidopsis*. *Gene* **567**, 244-250
9. Ogawa T., Kimura A., Sakuyama H., Tamoi M., Ishikawa T. and Shigeoka S. (2015) Characterization and physiological role of two types of chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatases in *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **575**, 61-68
10. Tamaki S., Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S. and Ishikawa T. (2015) Biochemical and physiological analyses of NADPH-dependent thioredoxin reductase isozymes in *Euglena gracilis*. *Plant Sci.* **236**, 29-36
11. Katoh K., Ashida H., Kasajima I., Shigeoka S. and Yokota A. (2015) Potato Yield Enhancement through Intensification of Sink and Source Performances. *Breeding Science* **65**, 77-84
12. Maruta T., Miyazaki N., Nosaka R., Tanaka H., Padilla-Chacon D., Otori K., Kimura A., Tanabe N., Yoshimura K., Tamoi M. and Shigeoka S. (2015) A gain-of-function mutation of plastidic invertase alters nuclear gene expression with sucrose treatment partially via GENOMES UNCOUPLED1-mediated signaling. *New Phytologist* **206**, 1013-1023
13. Kamachi S., Hirabayashi K., Tamoi M., Shigeoka S., Tada T. and Wada K. (2015) Crystal structure of the catalase-peroxidase KatG W78F mutant from *Synechococcus elongatus* PCC7942 in complex with the antitubercular pro-drug isoniazid. *FEBS Lett.* **589**, 131-137

14. Tanaka H., Maruta T., Tamoi M., Yabuta, Y., Yoshimura K., Ishikawa T., and Shigeoka S. (2015) Transcriptional control of Vitamin C defective 2 and Tocopherol cyclase genes by light and plastid-derived signals: the partial involvement of GENOMES UNCOUPLED 1. *Plant Sci.* **231**, 20-29
15. Kamachi S., Hirabayashi K., Tamoi M., Shigeoka S., Tada T. and Wada K. (2015) The crystal structure of isoniazid-bound KatG catalase-peroxidase from *Synechococcus elongatus* PCC7942. *FEBS J.* **282**, 54-46
16. Yoshimura K., Ogawa T., Tsujimura M., Ishikawa K. and Shigeoka S. (2014) Ectopic expression of the human MutT-type Nudix hydrolase, hMTH1, confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **55**, 1534-1543
17. Kamachi, S., Wada, K., Tamoi, M., Shigeoka, S. and Tada, T. (2014) The 2.2 Å crystal structure of catalase-peroxidase, KatG, from *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Acta Cryst. F.* **70**, 288-293
18. Maruta, T., Noshi, M., Nakamura, M., Matsuda S., Tamoi, M., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2014) Ferulic acid 5-hydroxylase 1 is essential for expression of anthocyanin biosynthesis-associated genes and anthocyanin accumulation under photooxidative stress in Arabidopsis. *Plant Sci.* **219-220**, 61-68
19. Tamaki S., Maruta, T., Sawa Y., Shigeoka, S and Ishikawa, T. (2014) Identification and functional analysis of peroxiredoxin isoforms in *Euglena gracilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 593-601
20. Yoshimura, K., Nakane, T., Kume, S., Shiomi, Y., Maruta, T., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2014) Transient expression analysis reveals importance of the VTC2 expression level in light/dark regulation of ascorbate biosynthesis in Arabidopsis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 60-66
21. Maruta, T., Ojiri, M., Noshi, M., Tamoi, M., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2013) Activation of γ -aminobutyrate production by chloroplastic H₂O₂ is associated with oxidative stress response. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 422-425
22. Yabuta, Y., Tanaka, H., Yoshimura, S., Suzuki, A., Tamoi, M., Maruta, T. and Shigeoka, S. (2013) Improvement of vitamin E quality and quantity in tobacco and lettuce by chloroplast genetic engineering. *Transgenic Res.* **22**, 391-402
23. Ito, D., Kato, T., Maruta, T., Tamoi, M., Yoshimura, K., and Shigeoka, S. (2012) Enzymatic and molecular characterization of Arabidopsis ppGpp pyrophosphohydrolase, AtNUDX26. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 2236-2241
24. Maruta, T., Inoue, T., Noshi, M., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2012) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 protects organelles against oxidative stress by wounding- and jasmonate-induced H₂O₂ in Arabidopsis plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 1901-1907
25. Mori, T., Yoshimura, K., Nosaka, R., Sakuyama, H., Koike, Y., Tanabe, N., Maruta, T., Tamoi, M. and Shigeoka, S. (2012) Subcellular and subnuclear distribution of high-light responsive serine/arginine-rich proteins, atSR45a and atSR30, in Arabidopsis thaliana. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 2075-2081
26. Gaber, A, Ogata, T., Maruta, T., Yoshimura, K., Tamoi, M., and Shigeoka S. (2012) The involvement of Arabidopsis glutathione peroxidase 8 in the suppression of oxidative damages in nucleus and cytosol. *Plant Cell Physiol.* **53**, 1596-1606
27. Noshi, M., Maruta, T., and Shigeoka, S. (2012) Relationship between chloroplastic H₂O₂ and the salicylic acid response. *Plant Signal. Behav.* **7**, 944-946
28. Maruta, T., Yoshimoto, T., Ito, D., Ogawa, T., Tamoi, M., Yoshimura, K., and Shigeoka, S. (2012) An Arabidopsis FAD pyrophosphohydrolase, AtNUDX23, is involved in the flavin homeostasis. *Plant Cell Physiol.* **53**, 1106-1116
29. Maruta, T., Noshi, M., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., and Shigeoka, S. (2012) H₂O₂-triggered retrograde signaling from chloroplasts to nucleus plays a specific role in the response to stress. *J. Biol. Chem.* **287**, 11717-11729
30. Ito, D., Yoshimura, K., Ishikawa, K., Ogawa, T., Maruta, T. and Shigeoka, S. (2012) Comparative analysis of molecular characteristics of Arabidopsis CoA pyrophosphohydrolases, AtNUDX11, 15,

- and 15a. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 139-147
31. Matsumura, H., Kai, A., Maeda, T., Tamoi, M., Satoh, A., Tamura, H., Hirose M., Ogawa T., Kizu N., Wadano, A., Inoue T. and Shigeoka S. (2011) Structure basis for the regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity via the intrinsically disordered protein CP12. *Structure* **19**, 1846-1854
 32. Yoshimura, K., Mori, T., Yokoyama, K., Koike, Y., Tanabe, Y., Sato, N., Takahashi, H., Maruta, T. and Shigeoka, S. (2011) Identification of alternative splicing events regulated by an Arabidopsis serine/arginine-like protein, atSR45a, in response to high-light stress using a tiling array. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1786-1805
 33. Yabuta, Y., Osada, R., Morishita, T., Nishizawa-Yokoi, A., Tamoi, M. Maruta, T. and Shigeoka, S. (2011) Involvement of Arabidopsis NAC transcription factor in the regulation of 20S and 26S proteasomes. *Plant Sci.* **181**, 421-427
 34. Nishizawa-Yokoi, A., Nosaka, R., Hayashi, H., Tainaka, H., Maruta, T., Tamoi, M., Ikeda, M., Ohme-Takagi, M., Yoshimura, K., Yabuta, Y. and Shigeoka, S. (2011) HsfA1d and HsfA1e involved in the transcriptional regulation of HsfA2 function as key regulators for Hsf signaling network in response to environmental stress. *Plant Cell Physiol.* **52**, 933-945
 35. Tamoi, M., Hiramatsu, Y., Nedachi, S., Otori, K., Tanabe, N., Maruta, T. and Shigeoka, S. (2011) Increase in the activity of fructose-1,6-bisphosphatase in cytosol affects sugar partitioning and increases the lateral shoots in tobacco plants at elevated CO₂ levels. *Photosynth. Res.* **108**, 15-23
 36. Maruta, T., Inoue, T., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2011) Arabidopsis NADPH oxidases, AtrbohD and AtrbohF, are essential for jasmonic acid-induced expression of genes regulated by MYC2 transcription factor. *Plant Sci.* **180**, 655-660
 37. Foyer, CH. and Shigeoka, S. (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions in order to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* **155**, 93-100

b. 総説

1. Tamoi M. and Shigeoka S. (Award review) (2015) Diversity of regulatory mechanisms of photosynthetic carbon metabolism in plants and algae. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 870-876
2. Yoshimura K. and Shigeoka S. (Award review) (2015) Versatile physiological functions of the Nudix hydrolase family in Arabidopsis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 354-366
3. Shigeoka, S. and Maruta, T. (Award review) (2014) Cellular redox regulation, signaling, and stress response in plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1457-1470
4. 田茂井政宏、重岡 成 (2014) 植物のゲノム科学とバイオテクノロジー：バイオテクノロジーの現状と課題 *光合成生物の進化と生命科学*, pp139-160
5. 重岡 成、横田明穂 (2014) シンク・ソース強化によるスーパー植物の開発 *BIO INDUSTRY (バイオインダストリー)* **31**, 20-29
6. Ahmed Gaber、尾形知哉、丸田隆典、吉村和也、田茂井政宏、重岡 成 (2013) シロイヌナズナグルタチオンペルオキシダーゼ 8 の核および細胞質での酸化傷害の抑制への関与 *ビタミン* **87**, 1-12
7. 吉村和也、伊藤大輔、丸田隆典、重岡成 (2013) Nudix hydrolase ファミリーによるビタミン補酵素型の代謝制御 *ビタミン* **87**, 1-12
8. 松村 浩由、田茂井 政宏、重岡 成 (2012) 天然変性タンパク質による光合成調節の新規分子メカニズム：複合体形成による CP12 立体構造の安定化. *化学と生物* **50 (11)**, 786-788
9. 石川孝博、重岡 成 (2012) ビタミン *藻類ハンドブック* 218-222
10. 重岡 成、田茂井政宏 (2012) 硫黄同化 *藻類ハンドブック* 171-173
11. 重岡 成、横田明穂 (2011) 葉緑体ゲノムへの遺伝子導入による有用物質高含有植物の作出 *BIO INDUSTRY (バイオインダストリー)* **28(8)**, 36-41
12. 重岡 成、田茂井政宏 (2011) 微細藻ユーグレナ (Euglena) が持つ可能性 *電気協会報* 2011. 5, 20-25

c. 招待講演、シンポジウムなど

1. 田茂井政宏、重岡 成：栄養シグナルによる植物の代謝・形態形成制御機構 アグリバイオシンポジウム 2014 2014年11月29日（近畿大学）
2. Masahiro Tamoi：“Effects of improvement of photosynthetic carbon metabolism on plant productivity” Institute for Protein Research (IPR) International Seminar “Regulation and Environmental Adaptation of Photosynthesis: An Important Theme for Structural Life Science 2014年10月24日（大阪大学）
3. Shigeru Shigeoka：“Improving growth and environmental stress tolerance of plants by molecular engineering” NC-CARP and JST CREST/PRESTO International Symposium, Toward the use of atmospheric CO₂-from photosynthesis to biorefinery 2013年11月8日（Yayoi Auditorium, Ichijo Hall, The University of Tokyo）
4. 重岡 成：「光合成生物の環境ストレス応答・耐性の分子機構に関する研究」日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本ビタミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区 2013年度合同広島大会 “特別講演” 2013年度日本農芸化学会受賞講演 2013年9月5日（県立広島大学）
5. 重岡 成：「畑でつくるサプリメント」日本農芸化学会 北海道支部 夏期シンポジウム 2013年8月10日（旭川国際会議場）
6. 重岡 成：「藻の仲間で未来を拓く！最新の栄養学とバイオ燃料への活用 “元気で長生きの秘訣！”」石垣市公開市民講座 2013年6月3日（石垣市健康福祉センター）
7. 田茂井政宏、鈴木健吾、石川孝博、重岡 成：「ユーグレナによるバイオ燃料生産基盤技術の開発」第15回マリンバイオテクノロジー学会大会 2013年6月1日（沖縄県市町村自治会館）
8. 重岡 成：「光合成生物の環境ストレス応答・耐性の分子機構に関する研究」日本農芸化学会 2013年度大会 学会賞受賞講演 2013年3月24日（電力ホール：宮城）
9. 丸田隆典、重岡 成、高等植物における活性酸素種代謝とレドックスシグナリング 第54回植物生理学会年会 2013年3月21日（岡山大学）
10. 吉村和也、丸田隆典、重岡 成、FAD加水分解酵素による植物フラビン代謝の制御機構 第54回植物生理学会年会 2013年3月21日（岡山大学）
11. 重岡 成：「畑でつくるサプリメント」平成24年度「ビタミンの日」記念講演「現代社会におけるビタミンとバイオファクター」 2012年12月8日（奈良女子大学）
12. 重岡 成：「レドックス制御を介した環境ストレス応答と分子育種」第30回日本植物細胞分子生物学会（生駒）大会・シンポジウム：植物のストレス耐性の基礎研究から応用への展開 2012年8月3日（奈良先端科学技術大学院大学）
13. 重岡 成：「環境変化に対する光合成生物の生存戦略～ビタミンによるレドックス制御を介した細胞応答～」日本ビタミン学会 第64回大会 2012年6月22日（長良川国際会議場）
14. Msahiro Tamoi：“Improvement of plant growth and productivity by molecular engineering” 2012年4月28日（Shanghai, P.R.China）
15. Shigeru Shigeoka：“Molecular Engineering of Environmental Stress Tolerance and High Yield in Plants” Annual Meeting and Symposium of Korean Society of Applied Biological Chemistry 2011年10月20日（Jeju, Korea）
16. Shigeru Shigeoka：“Improving environmental stress tolerance and growth of plants by molecular engineering” 2011 international symposium on plant Metabolism 2011年10月19日（Kyung Hee University : Korea）
17. Shigeru Shigeoka：“The crop improvement of tolerance to oxidative stresses” The 7th ACSA Conference (Asian Crop Science Association) 2011年9月27-29日（IPB International Convention Center : Bogor, Indonesia）
18. 重岡 成：「植物バイオで拓く未来-ここまでの遺伝子組換え作物-」バイオ部会平成23年度第1回例会 2011年7月1日（松谷化学工業株式会社）
19. 重岡 成：「身体のサビを取る抗酸化ビタミン A,C,E（エース）」近畿大学農学部公開講座 メインテーマ「元気で長生きの秘訣！」 2011年5月21日（奈良県文化会館）

d. 国際学会発表（一般講演のみ）

なし

e. 国内学会発表件数（一般講演のみ）

- 2016年 日本農芸化学会 8件、日本植物生理学会 6件
 2015年 日本農芸化学会 17件、日本植物生理学会 5件、日本分子生物学会 5件、日本ビタミン学会 8件、
 2014年 日本農芸化学会 16件、日本植物生理学会 11件、日本分子生物学会 5件、日本農芸化学会関西支部大会 3件、日本ビタミン学会 9件、光合成学会 5件、
 2013年 日本農芸化学会 18件、日本植物生理学会 7件、日本分子生物学会 6件、日本農芸化学会関西支部大会 2件、日本ビタミン学会 9件、日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部および日本ビタミン学会 7件、マリンバイオテクノロジー学会 2件、光合成学会 2件
 2012年 日本農芸化学会 19件、日本植物生理学会 11件、日本分子生物学会 12件、日本農芸化学会関西支部大会 2件、日本ビタミン学会 6件
 2011年 日本農芸化学会 17件、日本植物生理学会 11件、日本農芸化学会関西支部大会 1件、日本光合成学会 5件、日本ビタミン学会 8件、2011年度日本農芸化学会関西・中部支部合同大会 7件

合計 250件

d. 特許

1. 発明の名称：塊茎生産能または匍匐枝形成能が野生株に比して向上している匍匐枝形成植物の作製方法、当該方法によって作製された匍匐枝形成植物
 発明者：横田明穂、蘆田弘樹、明石欣也、牛山敬一、重岡成
 出願番号：特願 2012-534947
 出願日：2011.04.11
2. 発明の名称：ユーグレナへの遺伝子導入方法
 発明者：重岡成、田茂井政宏、鈴木健吾、吉田絵梨子
 出願番号：特願 2014-037394
 出願日：2014.2.27
3. 発明の名称：ユーグレナの形質転換体
 発明者：重岡成、田茂井政宏、鈴木健吾、吉田絵梨子
 出願番号：特願 2014-037395
 出願日：2014.2.27

e. その他（学会賞、報道など）

1. 2013年度日本農芸化学会賞（重岡 成）
2. 2011年度日本農芸化学会農芸化学奨励賞（田茂井政宏）
3. 中日新聞「こどもウィークリー」“珍しい生物ミドリムシ”掲載 2014.12.13（重岡 成）
4. 朝日放送「キャスト」“ミドリムシの可能性”解説 2014.12.2放送（重岡 成）
5. NHK「NEWS WEB」出演 2014.10.17放送（重岡 成）
6. NHK総合（香川県域）「ゆう6かがわ」解説 2014.10.3放送（重岡 成）
7. 産経新聞 WEB ニュース「デイリーコラム・坂口至徳の化学の現場を歩く」
 “悪環境で高収量・・・ストレス強い植物、分子レベル解明 重岡・近大教授に最高賞”
 “2013.3.1(重岡 成)

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～平成 27 年度)
研究成果最終報告書

テーマ 1：環境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・教授：内海龍太郎

研究協力者：講師：加藤明宣

博士研究員：江口陽子

実験補助：石井英治、紀平絵里、平井有紀、木野弘量、吉岡誠訓、深見知可、犬飼洋一、吉谷亘平、三輪瞬平、羽田朋子、Md. Fakhruzzaman

1. 研究の目的

細菌は動植物とは異なり、様々な環境変化に応答し、適応する情報伝達システム (two-component system、TCS) を有している。TCS は 2 種の蛋白質、ヒスチジンキナーゼ (HK) とレスポンスレギュレーター (RR) から構成されているが、近年、これらの各 TCS を連結させるコネクターが見出され、単純な 2 成分システムというよりは、高次の TCS ネットワークの存在が明らかにされてきている。つまり、細菌は様々な環境変化に迅速に対応し、生存するために、このような TCS ネットワークを発達させてきたと考えられる。植物病原菌における、病原性発現も、このような TCS ネットワークの分子機構によって、制御されていることが期待される。本研究では、1) TCS ネットワークを構成する HK, RR, コネクターの機能解析、2) 植物病原菌の病原性発現制御機構、3) ヒスチジンキナーゼ分子を標的にした阻害剤の作用機構の 3 テーマについて研究を行った。

2. 研究内容

1) コネクター分子 SafA による細菌情報伝達ネットワークの分子機構

大腸菌細胞は 29 対の TCSs が存在して、様々な外界要因に応答、適応する遺伝子発現制御システムを有している。大腸菌において、65 アミノ酸からなる細胞膜小タンパク質、SafA は、酸応答性 TCS として機能する大腸菌 EvgS (HK) / EvgA (RR) によって発現制御されているが、さらに、Mg²⁺イオン応答性 TCS である PhoQ (HK) / PhoP (RR) を制御することにより、EvgS/EvgA→SafA→PhoQ/PhoP を介する酸耐性遺伝子発現制御ネットワークを形成している。本研究では、コネクター分子 SafA を介する情報伝達ネットワークの制御機構の詳細を明らかにした。最初に、本ネットワークの最初の刺激である酸性状態を EvgS が実際にどのように認識して情報伝達を開始できるかについて詳細な刺激応答の分子機構研究を行った。次にコネクター SafA の PhoQ の活性化機構の解明を行った。最後に、ネットワークの新たな機構が存在するか、次世代シーケンサーを用いた RNAseq 解析を行った。

1-a) EvgS の pH 応答認識の分子機構

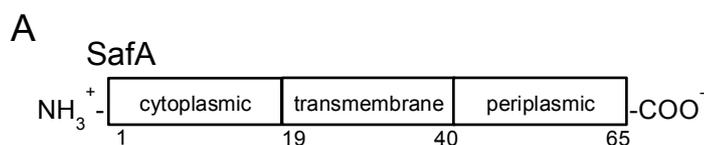
酸による EvgS 活性化機構において、真の活性化因子を決定するために、β-ガラクトシダーゼ活性を指標としたレポーターアッセイ法を用いた。EvgS を活性化するためには、酸性 pH5.5 に加えて、150 mM 以上のアルカリ金属イオン (Na^+ 、 K^+ 、 Li^+) 添加が必須であった。また、アルカリ金属イオンの認識にはセンサードメインが、pH にはセンサードメインとリンカー領域が必要であることが明らかになった。一方、EvgS の C 末端に GFP を融合させたカメラを発現する大腸菌を蛍光顕微鏡観察した結果、EvgS は細胞膜中にクラスタリング状態で局在していることが明らかになった。Sommer 等は大腸菌の 27 個のセンサーキナーゼについて局在性を調べた結果、特に 2 種のセンサーキナーゼ EvgS と TorS がクラスタリング構造をとることを報告している (PLOS one, **8**, e77708, 2013)。これらの結果は EvgS の pH、アルカリ金属イオンの認識と EvgS のクラスタリング構造の関連性を示しているかもしれない。

1-b) SafA による PhoQ (センサーキナーゼ) の活性化機構

1-b-1) PhoQ のペリプラズム領域における SafA 作用領域の解析

PhoQ/PhoP 系(TCS)とその相同遺伝子はグラム陰性細菌、特に、ヒトに感染するサルモネラ菌、緑膿菌、植物病原菌である軟腐病菌、大腸菌等に保存され、菌の病原性に深く関与している。本研究では、大腸菌の PhoQ/PhoP システムをモデルとして、PhoQ の活性制御機構を NMR 等の分析機器を用いて多角的に解析する。PhoQ/PhoP 系のセンサー PhoQ は、高濃度の Mg^{2+} や Ca^{2+} によって活性が抑制され、酸性 pH や陽イオン抗菌性ペプチドによって活性化される。異なる TCS である EvgS/EvgA 系の活性化により誘導される SafA は、細菌内膜上で PhoQ に直接作用して PhoQ/PhoP 系を活性化することでコネクターとして働く。本研究では、SafA による PhoQ の活性化機構を検討した。

SafA は全長 65 アミノ酸からなる小さなタンパク質で、N 末端側を細胞内に、C 末端側をペリプラズム領域に向けた一回貫通型の膜タンパク質である (図 1 A)。SafA を細胞質、膜貫通、ペリプラズムの 3 領域に分けて PhoQ の活性化能を検討したところ、ペリプラズム領域である 41-65 aa のみで PhoQ/PhoP 系が活性化することが認められた (図 1 B)。



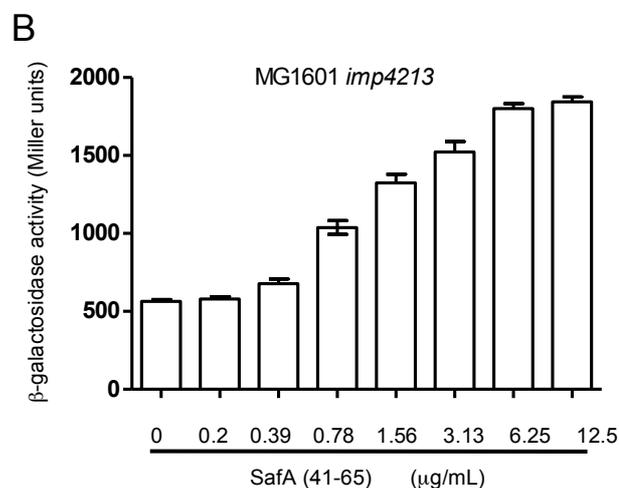


図1 SafA の ペリプラズム 領域が PhoQ を活性化する。

A: SafA の構造。 B:外膜透過性を高めた MG1601 株の培養液に SafA のペリプラズム領域に相当する SafA (41-65) 合成ペプチドを加えると PhoQ/PhoP 系が活性化した。

そこで、PhoQ のペリプラズム領域である PhoQ₄₃₋₁₉₀ を ¹⁵N で標識したものを調製し、SafA (41-65) が PhoQ₄₃₋₁₉₀ に結合するか否かを NMR 法によって解析した。その結果、PhoQ₄₃₋₁₉₀ に結合することがすでに報告されている Mg²⁺ 存在下でも SafA (41-65) を滴定することでクロスピークのシフトが認められた (図2)。これは、すでに Mg²⁺ が結合した PhoQ₄₃₋₁₉₀ にも SafA (41-65) が結合し、PhoQ₄₃₋₁₉₀ の構造を変えることを示している。次に、Mg²⁺ を加えない PhoQ₄₃₋₁₉₀ に SafA (41-65) を結合させてから、Mg²⁺ 添加による変化を測定した。その結果、Mg²⁺ 添加によって新しいクロスピークの出現 (図3、矢印) やクロスピークのシフトが認められた (図3)。従って、先に SafA (41-65) が結合した PhoQ₄₃₋₁₉₀ も Mg²⁺ の結合によって構造が変化することが明らかになった。

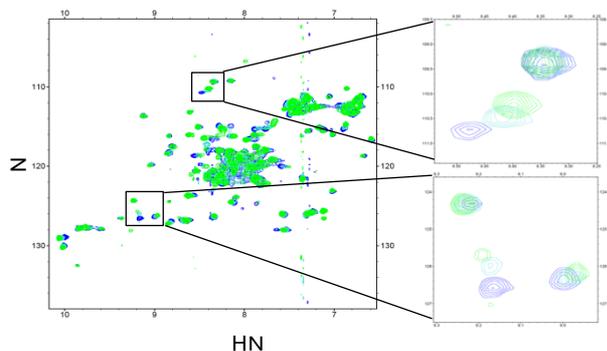


図2 SafA (41-65) は PhoQ₄₃₋₁₉₀ に結合する。20 mM MgCl₂ 存在下の 0.1 mM PhoQ₄₃₋₁₉₀ に 0 mM (blue), 0.6 mM (turquoise), 1.2 mM (green) の SafA (41-65) を滴定した。□: クロスピークのシフト

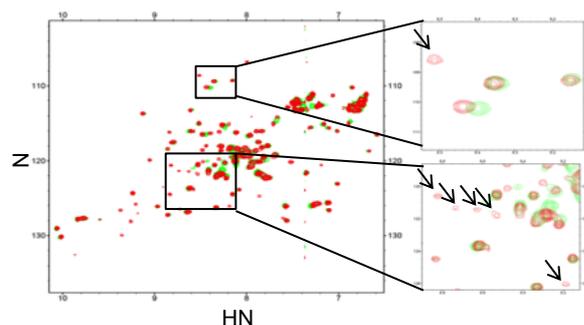


図3 SafA(41-65) が結合した PhoQ₄₃₋₁₉₀ も Mg²⁺ 添加によって変化する。1.2 mM SafA(41-65) 存在下の 0.1 mM PhoQ₄₃₋₁₉₀ (green) に 20 mM MgCl₂ を添加した (red)。

□ : クロスピークのシフト

以上の結果から、PhoQ がシグナルを感知する領域である PhoQ₄₃₋₁₉₀ に対して Mg²⁺ と SafA(41-65) が異なる領域に作用することが示唆された。この結果は、大腸菌を使ったレポーターアッセイから得られた結果と一致する。

PhoQ は SafA 以外に低 pH および陽イオン抗菌性ペプチドによって活性化し、Mg²⁺ 以外に MgrB という小さな膜タンパク質によって活性が抑制されることが報告されている。大腸菌を用いたレポーターアッセイから、SafA による PhoQ の活性化は、低 pH、陽イオン抗菌性ペプチド、MgrB のいずれとも競合しないことも本研究において明らかにした。SafA による PhoQ₄₃₋₁₉₀ の構造変化を明らかにすれば、センサー PhoQ の活性化機構の解明につながる。

1-b-2) コネクター SafA によるセンサーキナーゼ PhoQ のヒスチジンキナーゼ活性制御機構

SafA41-65aa が PhoQ のヒスチジンキナーゼ活性制御に及ぼす影響を明らかにするために、最初に、SafA と PhoQ が同時に共発現する大腸菌細胞膜を調整し (図 4)、自己リン酸化実験を実施した。その結果 SafA を共発現させた膜では、PhoQ のみ発現した膜よりも、PhoQ の自己リン酸化能は増加するが、リン酸化 PhoP の脱リン酸化能には影響されなかった (図 5)。

(a)

(b)



図4 PhoQ-SafA を共発現させた膜調製。PhoQ のみ、PhoQ-SafA を共発現させた大腸菌細胞膜を調整後、抗 PhoQ 抗体 (a)、抗 SafA 抗体 (b) を用いて、ウエスタンブロッティング法を用いて、検出した。

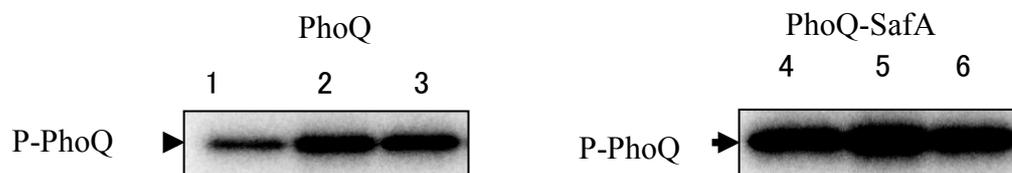


図5 調整された細胞膜を用いた自己リン酸化反応。図4で、調製した大腸菌膜 (PhoQ, PhoQ-SafA) と [γ-³²P]ATP 存在下で、自己リン酸化反応を1分 (レーン1、4)、5分 (レーン2、5)、10分 (レーン3、6) 後、SDS-PAGEを行い、FLA-7000 レーザースキャナー (Fuji Film) で、解析した。

次に、SafA によって、活性化された PhoQ によって、PhoQ/PhoP の情報伝達の反応過程において、どのような影響を及ぼすかを検討するために、図4で構築した細胞膜系に PhoP を添加して、リン酸化 PhoQ から PhoP へのリン酸基転移反応に対する SafA の効果を評価した (図

6)。その結果、実際、SafA-PhoQ 共発現膜では、リン酸化 PhoP 濃度が高く検出された。これらの結果は、SafA は PhoQ の自己リン酸化反応を活性化し、その結果、細胞内 PhoP へのリン酸基転移反応を向上させて、リン酸化 PhoP 濃度の上昇によって、標的遺伝子への情報伝達を制御していることが示唆された。

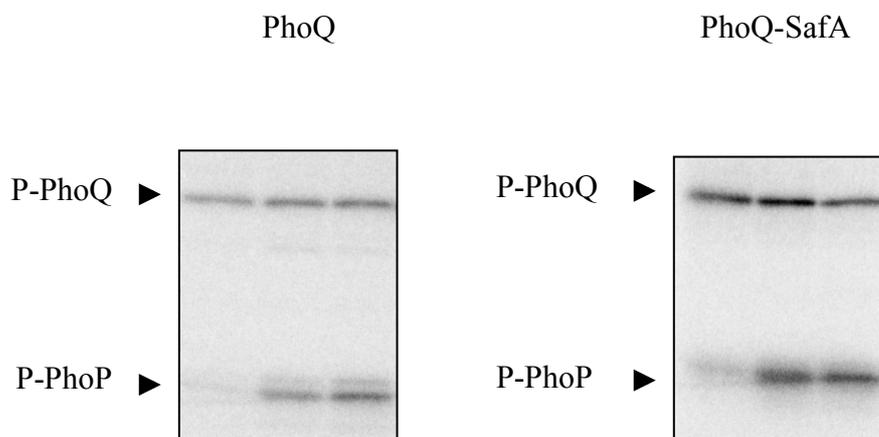


図6 調製された細胞膜を用いたリン酸化 PhoQ から PhoP へのリン酸基転移反応。調製した細菌細胞膜 (図4、PhoQ, PhoQ-SafA) に PhoP (2.5 μ M) を添加して、反応後、図2で、述べたように、FLA-7000 を用いて、解析した。

最後に、SafA のC末端 41-65 ペプチドを大腸菌に添加して、細胞内リン酸化 PhoP 量を Phos-tag アクリルアミドゲルを用いて、検出した。その結果、図4、5、6の実験で、期待されるように、実際に大腸菌細胞内において、SafA C末端 41-65 によって、PhoQ 活性化によって、リン酸化 PhoP 濃度が上昇し、その結果、PhoP レギュロンの遺伝子 (*mgtA* 遺伝子) 発現が制御されていることが明らかになった (図7、8)

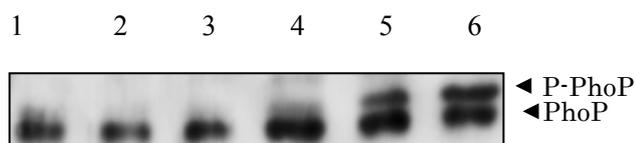


図7 Phos-tag アクリルアミドゲルを用いたリン酸化 PhoP の検出。SafA のC末端 41-65 ペプチドを大腸菌培養液に添加して、培養後、所定の時間 (レーン1、0分; レーン2、5分; レーン3、10分; レーン4、20分; レーン5、40分; レーン6、60分) にサンプリングして、Phos-tag アクリルアミドゲルを用いて、電気泳動後、抗 PhoP 抗体を用いて、検出した

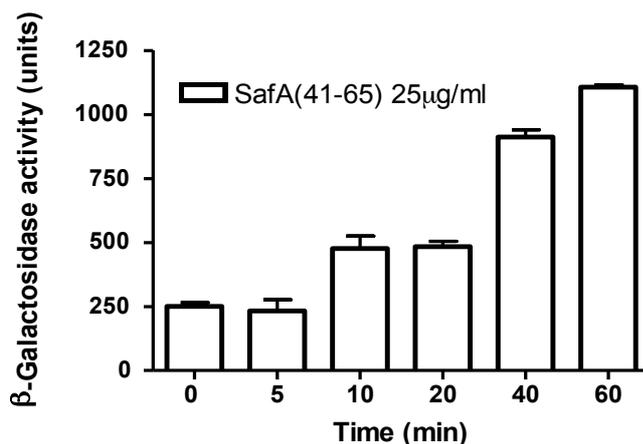


図8 *mgtA* 遺伝子発現に及ぼす SafA(41-65) ペプチドの効果。SafA(41-65) ペプチドを用いて図4と同じ培養条件で培養後、サンプリングして、β-ガラクトシダーゼ活性を測定して、PhoP 制御下の遺伝子 (*mgtA*) の発現量を評価した。

1-c) SafA 活性化による新たな制御ネットワーク

大腸菌の二成分制御系間をつなぐコネクター SafA について、既知のターゲット PhoQ 以外のターゲット探索を試みた。コントロールとして MG1655/pBAD18 株、SafA 過剰発現株として MG1655/pBADsafA 株を、*phoQ* 欠損株に関しても同様のペア (MG1655 *phoQ*/pBAD18, MG1655 *phoQ*/pBADsafA) を使用して RNAseq 解析を行った結果、SafA の過剰発現は PhoQ 非依存的に、嫌気状態で発現する複数の遺伝子の発現を誘導し、好気状態で発現する複数の遺伝子の発現を抑制した。この結果より、SafA のターゲットとして同じ内膜上に存在する嫌気センサーである ArcB が候補として考えられる。ArcB は EvgS と同じようにハイブリッド型のヒスチジンキナーゼセンサーである。SafA を介する情報伝達ネットワークの広がりを検討するために、ArcB と SafA の関連が強く示唆された。

2) 植物病原菌の病原性発現制御機構: イネ苗立枯細菌病菌 (*Burkholderia plantarii*) のトロポロン生産制御機構

2-a) トロポロン生産制御に関与する TCS 遺伝子の同定

B. plantarii の全ゲノム解析情報をもとに、ヒスチジンキナーゼ (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 (表 1)。これらの遺伝子破壊株を作製し、病原因子トロポロン生産に関与する TCS を探索した。遺伝子破壊方法としては、エレクトロポレーション法により *B. plantarii* に形質転換後、相同組換えにより HK、RR 遺伝子破壊株を作製し、それらの破壊株のトロポロン生産能を評価した。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*) (図 9) の破壊株において、トロポロン生産の抑制が確認された (表 2)。そこで、これらのトロポロン生産制御に関与する遺伝子、*RR1*、*HK3*、*RR2* を *troR1*、*troK*、*troR2* 遺伝子として、命名して、DDBJ に登録した (Accession number LC097192)。また、*troR1*(*RR1*)、*troK*(*HK3*)、*troR2*(*RR2*) 遺伝子が欠損したトロポロン生産抑制株をそれぞれ、KE1、KE2、KE3 株と命名した。

次に、野生型 *troR1*、*troK*、*troR2* 遺伝子がクローニングされた組換えプラスミドを KE1、KE2、KE3 株に形質転換して、トロポロンの生産が回復するかの相補実験を行った。その結果、KE1 株においては、作成した 7 種のプラスミドのうち、3 遺伝子 *troR1*⁺-*troK*⁺-*troR2*⁺ 遺伝

子を含むプラスミドのみがトロポロン生産を回復させた。この結果は、*troR1-troK-troR2* 遺伝子はオペロンを形成していて、その極性効果によることを示した。KE2 では、*troK⁺-troR2⁺*、*troR1⁺-troK⁺-troR2⁺*を含むプラスミドのみが回復させた。さらに、KE3 株では、*troR2⁺*、*troK⁺-troR2⁺*、*troR1⁺-troR2⁺*、*troR1⁺-troK⁺-troR2⁺*を含むプラスミドをそれぞれ含む場合、トロポロン生産が回復した。これらの相補実験の結果は、明らかに、*B. plantarii* のトロポロン生産制御に *troR1*、*troK*、*troR2* の3遺伝子から構成される新たな3成分制御システムが関与していることを示した。

表1 *B. plantarii* のゲノム情報から推定されるHK、RR 相同遺伝子数。

Replicon	Length (bp)	CDS	rRNA	tRNA	GC (%)	HK	RR
Chromosome I	4,144,299	3,610	3	59	68.3	29	38
Chromosome II	3,750,991	3,101	2	12	69.1	26	36
Plasmid	198,111	172	0	1	62.5	0	1
	8,093,401	6,883	5	72	68.5	55	75

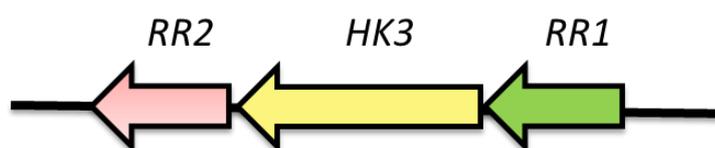


図9 Chromosome 1 上に位置する *B. plantarii* のトロポロン生産制御に関与するトロポロンオペロン。*RR1*、*HK3*、*RR2* は *troR1*、*troK*、*troR2* 遺伝子として、DDBJ1 に Accession number LC097192 として登録された。

表2 *RR1* (*troR1*)、*RR2* (*troR2*)、*HK3* (*troK*) 遺伝子破壊株におけるトロポロン生産抑制。

strain	トロポロン生産	
	比色定量法 ($\mu\text{g/ml}$)	HPLC法 ($\mu\text{g/ml}$)
WT	81.2	67.8
$\Delta RR1$	17.2	18
$\Delta RR2$	13.9	9
$\Delta HK3$	17	17

2-b) トロポロン生産制御遺伝子と病害防除

実際に新たに見出されたトロポロン生産制御遺伝子、*troR1*、*troK*、*troR2* がイネ苗立枯細菌病に関与するかを最終確認するために、これらの、各変異株 KE1、KE2、KE3 株をイネもみに水中で感染後（15℃、3日）、80粒を寒天培地に植えて、25℃で、1週間培養後、光照射下で（9h, 0lux; 15h, 30,000lux）増殖させて、病徴を観察した。その結果、明らかに、KE1 ($\Delta troR1$)、KE2 ($\Delta troK$)、KE3 ($\Delta troR2$) 欠損株では、いずれも、イネ苗立枯細菌病の発病が抑制された。これらの結果もまた、本研究において、見出した、3成分制御遺伝子 *troR1*、*troK*、*troR2* がトロポロン生産制御に関与するだけでなく、イネ苗立枯細菌病の原因遺伝子としても重要な役割を果たしていることを示唆した。

2-c) 3成分制御システムにおけるリン酸化ならびにリン酸基転移反応

TroK が実際に自己ヒスチジンキナーゼで、自己リン酸化反応活性を示すことを明らかにするために、精製された TroK を [γ - 32 P]ATP と反応させ、SDS-PAGE 後イメージアナライザーを用いて、解析した。その結果、リン酸化された TroK は反応後 5、10、20、30 分で、観察されたが、TroK の自己リン酸化されるヒスチジンのアラニン変異体 H253A では、同様の反応時間で、自己リン酸化反応を行ったが、全くリン酸化バンドは観察されなかった。この結果は、TroK が自己リン酸ヒスチジンキナーゼで、あることを明らかにしただけでなく、イネ苗立枯細菌病がヒスチジンキナーゼによって制御されていることを初めて見出したものである。

次にリン酸化 TroK から TroR1、TroR2 へのリン酸基転移反応実験を TroR1D52A、TroR2D46A 変異体を用いたリン酸基転移反応と比較して、評価した。その結果 TroK と TroR1、TroR2 へのリン酸基転移反応速度は大変遅く、本システムの特徴と理解された。一方、TroR1D52A、TroR2D46A 変異体へは、全く同様の反応時間においてもリン酸基転移が観察されなかった。これらの結果は、リン酸化 TroK から、TroR1 と TroR2 にリン酸転移反応が遅い速度であるが、実際に生じていることを示唆した。

最後に、これらの変異体の TroKH253A、TroR1D52A、TroR2D46A を用いた相補実験を行ったが、これらの変異によって、相補されなかった。これらの結果は、実際に TroK の 253 番目のヒスチジン酸基のリン酸化、ならびに TroR1 のアスパラギン酸 52、TroR2 のアスパラギン酸 46 へのリン酸基転移がトロポロン生産制御に重要な役割をしていることを示した。

2-d) イネ苗立枯細菌病菌 (*Burkholderia plantarii*) のトロポロン生産制御ネットワーク: 3成分制御システムとトロポロンによるオートインデューサー機能

B. plantarii を培養開始後、トロポロン生産量を測定すると、野生株では、培養後、24時間において、急激な生産が開始された。しかしながら、RR1、RR2、HK3 の変異株においては、抑制効果が観察された。これらの結果はトロポロンの生産には、3成分 (RR1、HK3、RR2) 制御以外に、細胞密度に依存した (クオラムセンシング) トロポロンによるオートインデューサー機能が働いている可能性を示唆した。

細胞密度依存的な合成がどのような制御によって、担われているかを検討するために、培養初期に、トロポロンを添加し、その効果を調べた。その結果、明らかに、トロポロン添加によって、トロポロン生産が誘導された。トロポロンの密度依存的生産がトロポロンの自己誘導的な作用 (オートインデューサー) によると考えられた。密度依存的合成事例としてはホモセリンラクトンと LuxR (DNA 結合転写因子) によるホモセリンラクトン誘導合成が知られている。*B. plantarii* のゲノム情報をもとにクオラムセンシングに必要となるタンパク質である *luxI*、*luxR* 相同遺伝子の探索を行った。その結果、見出された 12 個の相同遺伝子の破壊株を作成し、それらの変異株のトロポロン生産を測定した。その結果 *luxR* と相同性を示した QS2 遺伝子破壊株ではトロポロンによるトロポロンの誘導生産が観察されなかった。その QS2 変異株に野生型 QS2 遺伝子を含むプラスミドを形質転換株では、トロポロン生産は野生

型と同様に回復した。さらに、定量的リアルタイム PCR の結果、トロポロンによる QS2 遺伝子の転写発現は RR1 に非依存的に誘導されることが明らかになった。これらの結果はトロポロン生産は QS2 遺伝子と密度依存的に生産されるトロポロンに依存していることを示唆した。

QS2 遺伝子の C 末端部ドメイン構成には典型的な DNA 結合性のヘリクスターナーヘリクスモチーフが存在し、N 末端ドメインは LuxR (*Vibrio fischeri*) の N 末端ドメイン (ホモセリンラクトン結合性) と高い相同性を示した。本研究においては、QS2 と luxR に保存されている D75、V78、W90 のアミノ酸をそれぞれ、アラニン置換した変異株における、トロポロン生産に及ぶ効果を調べた。その結果、これらの 3 種の変異株では、いずれも、トロポロン生産が抑制された。これらの結果は、QS2 の N 末端ドメインがトロポロン結合性部位であることを示唆した。

3 成分 RR1、HK3、RR2 によって制御され、トロポロン生産に関与している遺伝子群を明らかにするために、*B. plantarii* の野性株 (WT)、 $\Delta RR1$ 、 $\Delta HK3$ 、 $\Delta RR2$ 各変異株の RNA を調製し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行った。その結果、RR1、HK3、RR2 の 3 成分によって、制御される候補遺伝子が 43 個見出された (図 10)。これらの遺伝子について、順次遺伝子破壊株を取得して、トロポロン生産の有無を確認した。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) トロポロン排出ポンプ遺伝子 *emrK*、d) 転写制御遺伝子 *lysR* である。さらに、これらの遺伝子のトロポロンによる誘導発現を定量的リアルタイム PCR を用いて、解析した。その結果 QS2 遺伝子以外に *paaD*、*emrK* の遺伝子発現がトロポロンによって、誘導生産されることが明らかになった。*paaD* に関しては、QS2 が破壊されることによって遺伝子の発現が抑制していることから、トロポロン合成遺伝子 *paaD* は、QS2 に直接制御されていることが示唆された。

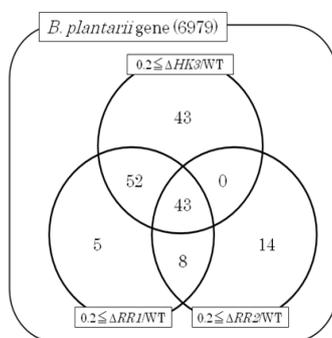


図 10 3 成分制御系によって制御される遺伝子群

3) ヒスチジンキナーゼ (HK) 分子を標的にした阻害剤の作用機構

新規ヒスチジンキナーゼ阻害剤、シグナマイシン B は PhoQ を含めて、様々な細菌 HK を阻害することが明らかになっている。本研究では、シグナマイシン B の作用機構を明らかにした。

3-a) シグナマイシン B の各種 HK に対する自己リン酸化阻害

グラム陰性菌である大腸菌の各種 HK 及び、グラム陽性菌である枯草菌、黄色ブドウ球菌、腸球菌、う蝕菌の各種 HK に対する IC50 を測定した。これらの結果より、枯草菌の WalK を標的にしたスクリーニングから得られたシグナマイシン B は、グラム陰性菌、陽性菌それぞれの HK の自己リン酸化を阻害することが明らかとなった。シグナマイシン B は HK に共

通に保存されている領域に作用していると考えられた。一般的に HK は細胞質内の領域に自己リン酸化する His を含み、二量体化に関与する、Dimerization Histidine phosphorylation domain(DHp domain) と ATP が結合し、HK 活性を触媒する Catalytic ATP binding domain (CA domain) が保存されており、シグナマイシン B はこれらのドメインに作用していると考えられた。

3-b) シグナマイシン B の HK 阻害作用機構

HK の各種ドメインに対するシグナマイシン B の親和性を Biacore X100 を用いて、評価した。HK としては、枯草菌の HK である WalK の N-末端 207aa-611aa の WalK(tru) (細胞内ドメイン)を用いた (図 11)。図 11 に示すように、WalK (tru)は WalK (A)(二量体形成ドメイン、376aa-443aa)と WalK (B)(ATP 結合ドメイン、488aa-611aa)から構成されている。WalK (A) と WalK (B)をそれぞれ、センサーチップ上にアミンカップリング法によって固定した。このように調製したセンサーチップを用いて、Biacore X100 を用いて、シグナマイシン B の各ドメインに対する結合性を測定した (図 12)。その結果、シグナマイシンは、WalK (A)に特異的に結合するが、WalK (B)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 WalK(B)に特異的な結合するが、WalK (A)には結合性を示さなかった。次に、シグナマイシン B の WalK の二量体形成ドメインに対する結合性を明らかにするために、グルタルアルデヒド(GA)のクロスリンキング実験を行った (図 13)。すなわち、WalK (tru)を GA と反応後、SDS-PAGE を行うと WalK(tru)の二量体バンドが出現する。これはGAの両末端のアルデヒドが WalK(A)中に存在するリジンの ϵ アミノ基と反応して、二量体がクロスリンクされるからである。WalK (tru)とシグナマイシン B 処理後、GA と反応させると、二量体バンドの形成が阻害され、モノマーバンドにシフトしていることが、SDS-PAGE 分析によって、明らかになった。これらの阻害濃度は、シグナマイシン B の WalK に対する HK 阻害濃度(IC₅₀)とよく一致した。これらの結果は、シグナマイシンが 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 (図 14)。

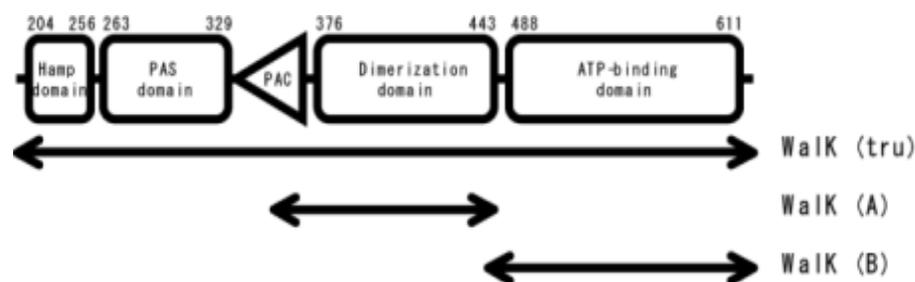


図 11 HK のドメイン構造

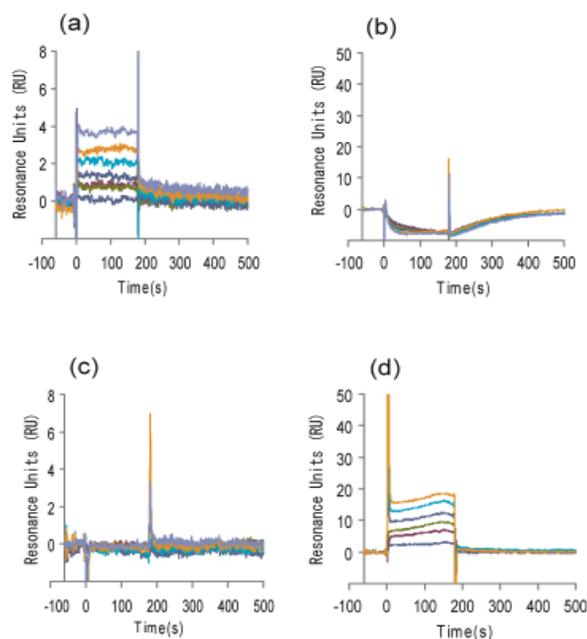


図 12 表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定。

(a), (c)は WaiK (A); (b), (d)は WaiK (B)とをセンサーチップに固定して、その後、種々の濃度のシグナマイシン B (a, b) と ATP (c, d)との SPR 測定が Biacore X100 を用いて行われた。

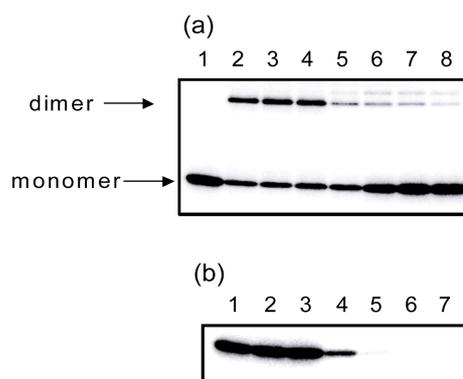


図 13 クロスリンクング実験

(a) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で自己リン酸化された WaiK をグルタルアルデヒド (GA) と反応後 SDS-PAGE を行い、イメージングプレートに露光したのちに、FLA-7000 (Fuji Film) で、解析した。1, WaiK; 2, WaiK+GA; 3-8, WaiK とシグナマイシン B (20-640 μM) を処理後、GA と反応させた。(b) WaiK をシグナマイシン B 存在で、自己リン酸化反応を行った。1, WaiK; 2-7, WaiK +シグナマイシン B (20-640 μM)

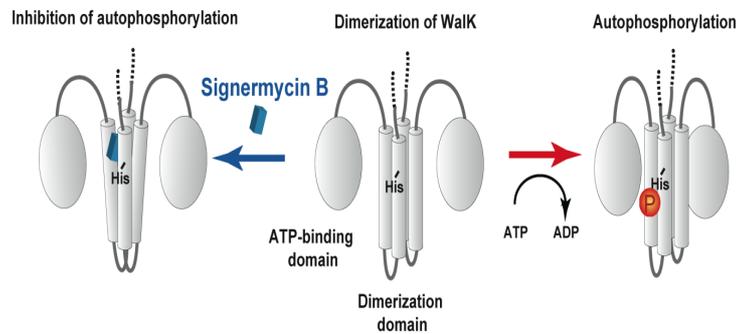


図 14 シグナマイシン B の作用機構

3-c) シグナマイシン B に対する *Erwinia carotovora* の病原性発現の情報伝達に及ぼす影響
 上記の結果はシグナマイシン B が細菌に存在する情報伝達機構に参与する HK に共通に存在する 2 量体ドメインに作用し、その HK 活性を阻害することを示している。本研究では、*Erwinia carotovora* に存在し、そのペクチナーゼ生産の制御に参与する PehS (HK) / PehR (RR) 情報伝達に及ぼすシグナマイシン B の効果を評価するために、PehS の細胞質内ドメインを精製単離し、HK 活性阻害濃度を測定した。その結果、シグナマイシン B は *Erwinia carotovora* の PehS に対して、 IC_{50} (32.9 μ M) で阻害活性を示した。さらに、シグナマイシン B の *Erwinia carotovora* の培養上清中のポリガラクトナーゼ活性を測定した結果、シグナマイシン B 添加により、ポリガラクトナーゼの分泌生産が抑制されていることが示された。これらの結果はシグナマイシン B が *Erwinia carotovora* の HK を阻害し、その情報伝達を阻害して、病原性を抑制する作用を示唆した。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

今回、我々は、植物病原菌における病原性発現制御に、参与する情報伝達機構として知られている TCS の詳細な分子機構を多面的に研究することにより、新たに、植物病原性細菌の病原性制御の情報伝達ネットワークの分子機構を見出した。

最初に、白菜軟腐病菌等の多くの病原性細菌の病原性制御に参与する TCS である、PhoQ/PhoP TCS の PhoQ のヒスチジンキナーゼ (HK) 活性制御を行う細胞膜小タンパク質 SafA (65 aa) による PhoQ の活性化機構を解明した。すなわち PhoQ のセンサードメインに SafA が結合することにより、PhoQ の活性化が生じることが明らかにされた。本成果により、今後、PhoQ のセンサードメインを制御する薬剤の標的として、新たな植物病害防除剤の開発が期待される。

次に *B. plantarii* の病原性因子であるトロポロンを生産制御する遺伝子の探索をゲノムシーケンスデータを用いて行った。*B. Plantarii* には 55 個の HK と 75 個の RR (レスポンスレギュレーター) が存在している。我々は、この TCS 遺伝子破壊株から、新たにトロポロン生産制御に参与するトロポロンオペロンを構成する、*troR1*、*troK*、*troR2* 遺伝子を発見し、DDBJ

Accession number LC097192 として登録認定された。従来、1 個の HK に対して、1 個の RR からなる 2 成分制御による病原性制御システムが知られているが、今回の、我々の研究成果によって、TroK→TroR1、TroR2 からなる、TroK の自己リン酸化（ヒスチジンキナーゼ）、リン酸化された TroK から TroR1、TroR2 へのリン酸基転移反応による、3 成分情報伝達システムによって、*B. plantarii* の病原性が制御されていることが明らかにされた。今後、この情報伝達ネットワークの広がりや、RNAseq 解析結果も合わせて、考えると、さらなる、病原性制御因子の関与が期待された。このような制御因子を標的にした分子薬剤もまた、21 世紀の植物病害防除剤として、期待される。

最後に当研究室で、開発した新規抗生物質シグナマイシン B の HK に対する作用機構解析研究を行った。シグナマイシン B は HKs に共通に存在するヒスチジン残基を含む DHp ドメインに結合していることが明らかにされた。このように、特異的な HK 阻害剤は、今まで見出されていない。HK 阻害剤は細菌細胞内においても、同様に作用することが明らかにされており、今後、21 世紀における、新たな抗生物質として、また、抗病原性制御剤の開発、多剤耐性細菌に有効な薬剤開発と、様々な用途開発が期待される。

4. 研究成果

a. 原著論文

1. Fakhruzzaman MD, Inukai Y, Yanagida Y, Kino H, Igarashi M, Eguchi Y, Utsumi R. Study on in vivo effects of bacterial histidine kinase inhibitor, Waldiomycin, in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *J Gen Appl Microbiol*. 2015, 61(5):177-184.
2. Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Eguchi Y, Yanagihara S, Eda Hiro K, Inoue Y, Taniguchi M, Yoshida M, Yamamoto K, Takahashi H, Sawasaki T, Utsumi R, Koike T. Functional characterization of the receiver domain for phosphorelay control in hybrid sensor kinases. *PLoS One*. 2015, 10(7):e0132598.doi:10.1371/journal.pone.0132598
3. Eguchi Y, Utsumi R. Alkali Metals in addition to acidic pH activate the EvgS histidine kinase sensor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2014, 196(17):3140-3149.
4. Ishii E, Eguchi Y, Utsumi R. The activation mechanism of PhoQ/PhoP system by SafA, an auxiliary protein of histidine kinase in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013, 77(4):814-819.
5. Igarashi M, Watanabe T, Hashida T, Umekita M, Hatano M, Yanagita Y, Kino H, Kimura T, Kinoshita N, Inouye K, Sawa R, Nishimura Y, Utsumi R, Nomoto A. Waldiomycin, a novel WalK-histidine kinase inhibitor from *Streptomyces* sp. MK844-mF10. *J Antibiot*. 2013, 66(8):459-464
6. Kato A, Hayashi H, Nomura W, Emori H, Hagihara K, Utsumi R. A connector-like factor, Caca, links RssB/RpoS and the CpxR/CpxA two-component system in *Salmonella*. *BMC Microbiol*. 2012, 12: 224-235.
7. Watanabe T, Igarashi M, Okajima T, Ishii E, Kino H, Hatano, M, Sawa R, Umekita M, Kimura T, Okamoto S, Eguchi Y, Akamatsu Y, Utsumi R. Isolation and characterization of signermycin B, an antibiotic that targets the dimerization domain of histidine kinase WalK. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012, 56(11):3657-3663.
8. Eguchi, Y., Ishii, E., Yamane, M., Utsumi, R. The connector SafA interacts with the multi-sensing domain of PhoQ in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2012, 85(2): 299-313.
9. Kato A, Chen HD, Latifi T, Groisman EA. Reciprocal control between a bacterium's regulatory system and the modification status of its lipopolysaccharide. *Molecular Cell*. 2012, 45 (9):897-908.
10. Yeo WS, Zwir I, Huang HV, Shin D, Kato A, Groisman EA. Intrinsic negative feedback governs activation surge in two-component regulatory systems. *Molecular Cell*. 2012, 45(2):409-421.
11. Okamoto S, Yu F, Harada H, Okajima T, Misawa N, Utsumi R. A short-chain dehydrogenase involved in terpene metabolism from *Zingiber zerumbet*. *FEBS J*. 2011, 278(16):2892-2900.
12. Yu F, Okamoto S, Harada H, Yamasaki K, Misawa N, Utsumi R. Zingiber zerumbet CYP71BA1 catalyzes the conversion of alpha-humulene to 8-hydroxy-alpha-humulene in zerumbone biosynthesis. *Cell Mol Life Sci*. 2011, 68:1033-1040.
13. Harada H, Shindo K, Iki K, Teraoka A, Okamoto S, Yu F, Hattan J, Utsumi R, Misawa N. Efficient functional analysis system for cyanobacterial or plant cytochromes P450 involved in sesquiterpene biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011, 90(2):467-476.
14. Eguchi Y, Kubo N, Matsunaga H, Igarashi M, Utsumi R. Development of an Antivirulence Drug

- against *Streptococcus mutans*: Repression of Biofilm Formation, Acid Tolerance, and Competence by a Histidine Kinase Inhibitor, Walkmycin C. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(14):1475-1484.
15. Eguchi Y, Ishii E, Hata K, Utsumi R. Regulation of acid resistance by connectors of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2011, 193(5):1222-1228.

b. 総説

1. 内海龍太郎:コネクター分子 SafA による、大腸菌酸耐性情報伝達ネットワークの制御機構、平成 25 年度大型研究助成報告 (公益社団法人発酵研究所)、2015、29:37-50.
2. Eguchi Y, Utsumi R.: Two-Component System in Sensing and Adaptation to Acid Stress in *Escherichia coli* in *Stress and Environmental Control of Gene Expression in Bacteria*, 2015, ed. by Frans J. de Bruijn, Wiley-Blackwell Publishers. Chapter 16.3 in press.
3. 江口陽子、加藤明宣、石井英治、内海龍太郎:コネクターがつなぐ細菌情報伝達ネットワーク、*化学と生物*、2013、51(4):241-249.
4. 江口陽子、内海龍太郎:細菌情報伝達阻害薬開発の現状、*化学療法の領域*、2013、29(1):100-105.
5. Ishii E, Eguchi Y, Utsumi R. :Pretein-Peptide Interaction by Surface Plasmon Resonance, 2013, *Bio-Protocol*, <http://www.bio-protocol.org>
6. 内海龍太郎、五十嵐雅之、:病原細菌に対する新しい薬剤標的—二成分情報伝達システム、*YAKUGAKU ZASSHI*、2012、132(1):51-58.
7. Eguchi Y, Ishii E, Utsumi R. : Molecular Mechanism of Bacterial Two-Component Signal Transduction Networks via Connectors, in *Two-Component Systems in Bacteria*, 2012, ed. by Gross Rand Beier D, Horizon Scientific Press. pp.149-162.

c. 招待講演、シンポジウムなど

1. Ryutaro Utsumi: “Isolation and characterization of waldiomycin as a new antibiotic targeting bacterial histidine kinases”, *Antibiotic alternatives for the New Millennium*, London, UK, 5-7 Nov, 2014.
2. 内海龍太郎、「細菌情報伝達阻害型薬剤の開発と応用」、第 25 回新薬創製談話会、京都 嵐山、2014 年 9 月 9 日.
3. 内海龍太郎、「細菌分子標的剤開発に向けた微生物代謝工学」、日本農芸化学会平成 26 年度大会シンポジウム「ゲノムからアプローチした微生物代謝工学」、明治大学、2014 年 3 月 30 日.
4. 内海龍太郎、「細菌情報伝達阻害型薬剤の開発」、日本農芸化学会平成 25 年度大会シンポジウム「薬剤耐性とその克服へのアプローチ」、東北大学、2013 年 3 月 27 日.
5. 内海龍太郎、「細菌情報伝達機構と新規抗菌剤の開発」、日本細菌学会平成 24 年度大会シンポジウム、長崎新聞文化ホール、2012 年 3 月 23 日.
6. 内海龍太郎、「新しい環境調和型抗菌剤の開発と応用」、日本農芸化学会平成 24 年度大会シンポジウム 京都女子大学、2012 年 3 月 25 日.
7. Ryutaro Utsumi: “Antibacterial and antivirulent drugs targeting bacterial signal transduction”, *The Commemorative International Conference for the 20th Anniversary of Korea Society of Life Science*, Bexico, Busan, Korea, 27-28 Oct, 2011.
8. Ryutaro Utsumi: “Antibacterial and antivirulent drugs targeting bacterial histidine kinases”, *BIT's 1st Annual World Congress and Microbes-2011*, Beijing International Convention Center, Beijing, China, 30 July-1 Aug, 2011.

d. 国際学会発表（一般講演のみ）

1. Yoko Eguchi, Kohei Yoshitani and Ryutaro Utsumi: Structural changes of the sensory domain of PhoQ histidine kinase upon activation, Cold Spring Harbor Asia, Mechanism of Transmembrane Signaling, Suzhou, China, 27-31 Oct, 2014.
2. Yoko Eguchi, Mei Yamanaka and Ryutaro Utsumi: Signal recognition sites of the acid responding EvgS histidine kinase sensor in *Escherichia coli*, Gordon Research Conference on Microbial Stress Response, South Hardley, MA, USA, 27 July-1 Aug, 2014.
3. Yoko Eguchi, Naoya Tochio, Maya Umekita, Masayuki Igarashi, Akio Nomoto, Takanori Kigawa, and Ryutaro Utsumi: Walkmycins targets the dimerization domain of bacterial histidine kinase. 13th International Conference of the Chemistry of Antibiotics and Other Bioactive Compounds, Yamanashi, Japan, 24-27 Sep, 2013.
4. Yohei Inukai, Hirokazu Kino, Masayuki Igarash, Akio Nomoto, Yoko Eguchi, Yu Shiwa, Hirobumi Yoshikawa and Ryutaro Utsumi: Waldiomycin inhibits Walk, a histidine kinase essential for cell wall metabolism in bacteria. 13th International Conference of the Chemistry of Antibiotics and Other Bioactive Compounds, Yamanashi, Japan, 24-27 Sep, 2013.
5. Yoko Eguchi, Eiji Ishii and Ryutaro Utsumi: The connector SafA interacts with the multi-sensing domain of PhoQ in *Escherichia coli*, Gordon Conference on Microbial Stress Response, Mount Holyoke College, USA, 7 -10 July, 2012.
6. Eiji Ihii, Yoko Eguchi and Ryutaro Utsumi: Activation mechanisms of PhoQ/PhoP signal transduction via the TCS connector SafA, The 12th Asian and Oceanian Conference on Transcription Korea, 1-3 June, 2012.

e. 国内学会発表件数（一般講演のみ）

- 2016年 日本農芸化学会 3件
 2015年 日本農芸化学会 4件、日本生化学会近畿支部例会 2件、日本分子生物学会 4件、日本ケミカルバイオロジー学会 1件
 2014年 日本農芸化学会 3件、日本生化学会 1件、日本ケミカルバイオロジー学会 2件
 2013年 日本農芸化学会 8件、日本細菌学会 1件、
 2012年 日本農芸化学会 5件、日本分子生物学会 5件、21世紀大腸菌研究会 5件、日本農芸化学会関西支部大会 3件、日本ケミカルバイオロジー学会 1件
 2011年 日本生化学 3件、日本分子生物学会 3件

合計 54件

f. 特許（取得）

1. 内海龍太郎、五十嵐雅之 “新規化合物 MK844-mF10 物質、その製造法及びその用途”：特許第 5686981 号 登録日：平成 27 年 1 月 30 日
2. 内海龍太郎 五十嵐雅之 “新規化合物ウオークマイシン、その製造法及びその用途”：特許第 5636179 号 登録日：平成 26 年 10 月 24 日
3. 内海龍太郎、余豊年、三沢典彦、岡本尚、原田尚志 “セスキテルペン変換酵素遺伝子及びそれを利用した酸化セスキテルペンの製造方法”：特許第 5526381 号 登録日：平成 26 年 4 月 25 日
4. 内海龍太郎、原田尚志、三沢典彦 “組換え大腸菌を用いたイソプレノイドの製造方法”：特許第 5405030 号、登録日：平成 25 年 11 月 8 日
5. 内海龍太郎、五十嵐雅之、波多野和樹、渡邊崇史 “植物病害防除剤”：特許第 5254097 号、登録日：平成 25 年 4 月 26 日
6. 内海龍太郎、五十嵐雅之 “新規化合物シグナマイシン、その製造方法、及びその用途”：特許 5220862 号 登録日：平成 25 年 3 月 15 日

7. 内海龍太郎 “セスキテルペンシクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸”：特許第 5219025、登録日：平成 25 年 3 月 15 日

g. その他（学会賞、報道など）

1. 三輪瞬平：21 世紀大腸菌研究会 ポスター発表賞：イネ苗立枯細菌病菌のトロポロン生産制御機構、大津、2015 年 6 月 5 日.
2. 清水莉子：第 62 回日本生化学会近畿支部例会 発表優秀賞：細菌ヒスチジンキナーゼの Hbox を標的とする新規抗生物質 waldiomycin、立命館大学、2015 年 5 月 16 日.
3. 平井有紀：第 84 回日本生化学会大会 鈴木紘一メモリアル賞：増殖に必須な転写因子 WalR タンパク質標的にした新規抗菌剤の作用部位の解析、京都、2011 年 9 月 24 日.
4. 松永弘子：2011 年度日本農芸化学会大会トピックス賞：う蝕菌バイオフィーム形成に関するアロマデンドレン類縁化合物の阻害機構、京都、2011 年 3 月 28 日.
5. 内海龍太郎、日本経済新聞：院内感染、多剤耐性細菌の効果の高い抗生物質、2012 年 7 月 18 日.

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～平成 27 年度)
研究成果最終報告書

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・教授・深溝 慶

研究協力者：准教授：大沼貴之

定時職員：近藤香織、有村和紘、田淵利弥、田中 盾

RA：梅本尚之、新家粧子、北奥喜仁

実験補助：岡崎蓉子、神田有華、道善聡、永田琢也、浦崎惇、竹中祥子、
西平知世、河本大毅、高島智也、

1. 研究の目的

植物と微生物の相互作用は、農業生産性に大きな影響をおよぼす重要な要素の一つである。植物病原菌による感染は作物収量を大きく減少させ、また、共生関係にある微生物との相互作用は植物に生育促進効果をもたらす。これら二つの相反する植物-微生物間相互作用の分子基盤を理解するためには、植物にこれらの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、そのようなタンパク質の中で植物キチナーゼおよび土壌細菌のキトサナーゼに注目し、微生物表層多糖との相互作用を構造生物学的に明らかにし、作物保護の新たな方策を分子レベルで設計することを目的としている。具体的には、いくつかの種類の植物キチナーゼや細菌キトサナーゼを大腸菌で発現させ、これらのリコンビナントタンパク質とキチン/キトサン-オリゴ糖との相互作用を、X線結晶構造解析、NMR、ITCなどの手法によって、分子レベルで明らかにする。このような目的に従って、1) Family GH19 キチナーゼの結晶構造およびNMR滴定実験、2) コケ由来 Family GH19 キチナーゼ (BcChiA)の新規阻害剤の開発、3) Family GH19 キチナーゼのオリゴ糖合成酵素への変換、4) ソテツ由来 Family GH18 キチナーゼの結晶構造と糖転移活性、および5) 土壌細菌由来キトサナーゼに存在するキトサン結合モジュールの構造と機能、以上5つのテーマについて研究を行った。

2. 研究内容

1) Family GH19 キチナーゼの結晶構造およびNMR滴定実験

キチナーゼはアミノ酸配列の相同性によって Family GH18 と Family GH19 の二つのファミリーに分類されている(<http://www.cazy.org>)。Family GH18 キチナーゼが生物界に普遍的に存在するのに対し、Family GH19 キチナーゼはその多くが植物中に見出されており、GH19 キチナーゼは植物界に特徴的な酵素であると言ってよい。我々は植物由来のキチナーゼの中で、大腸菌によって効率的に発現でき、精製も比較的容易であるライムギ由来の Family GH19 キチナーゼ(RSC-c)とコケ由来の Family GH19 キチナーゼ(BcChiA)の二つのキチナーゼを用い

て、その基質であるキチンとの相互作用機構を X 線結晶構造解析および NMR 滴定実験によって調べることにした。

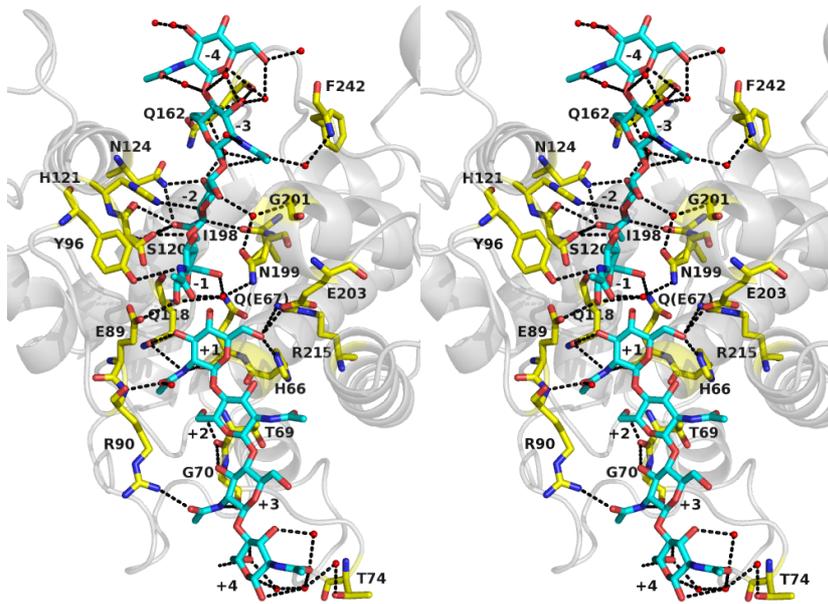


図 1 RSC-cE67Q/W72A-2x(GlcNAc)₄ 複合体の結晶構造 (ステレオ図)。緑; BcChiA, 赤; RSC-c。

ことが明らかになった。この構造に基づいて、基質結合クレフト全体において基質と相互作用するアミノ酸残基をほぼ完全に同定することができた (図 1)。しかし、触媒部位には触媒反応のターゲットとなるグリコシド結合が存在せず、触媒反応機構に関する情報は、この複合体から得ることはできなかった。

一方、植物中に見出されているキチナーゼ中で最も低分子量のものは、コケ (*Bryum coronatum*) 由来の Family GH19 キチナーゼ (BcChi-A) である (Taira et al., *Glycobiology*. 2011, 21, 644-654)。アミノ酸配列の比較に基づいて、このような低い分子量は、いくつかのループ構造の欠失によるものであることが推定されていた。そこで、我々は BcChi-A の結晶構造および基質との結合様式を調べることにした。大腸菌の発現系で得られた触媒酸 Glu61 を Ala に変異させた不活性変異体 BcChi-A E61A と (GlcNAc)₄ との混合溶液を用いて結晶化を試みたところ、200 × 20 × 20 μm³ の棒状の結晶を 1 か月程度で得ることができた。セレンメチオニンでラベルされたタンパク質を用いて SAD 法で結晶解析を行い、最終的に図 2 の緑で示す構造を得た。

赤で示した RSC-c と比べると、アミノ酸配列からの予測の通り BcChiA では Loop I、Loop II、Loop IV、Loop V が欠失しているのが明らかになった。触媒酸 Glu61 は RSC-c の触媒酸 Glu67 とほぼ同じ位置にあり、触媒塩基 Glu70 および求核性の水分子を配向させる Ser102 も基質結合

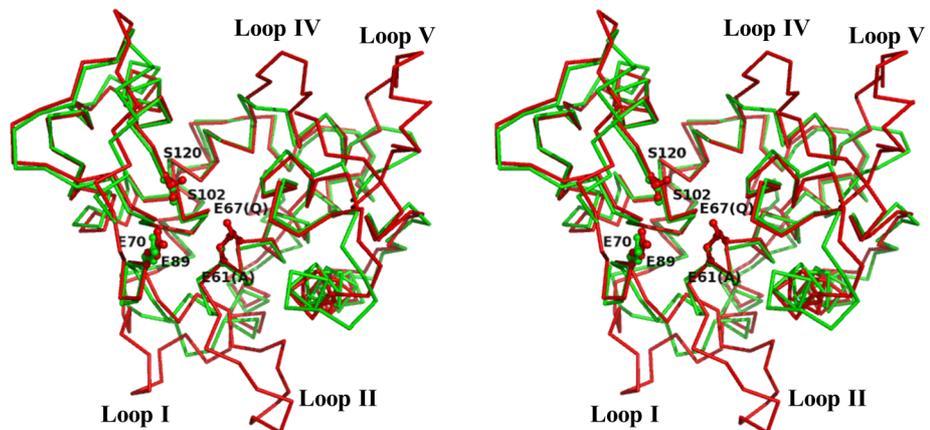


図 2 BcChiAE61A-(GlcNAc)₄ 複合体と RSC-cE67Q/W72A-2x(GlcNAc)₄ 複合体との主鎖構造の比較。緑; BcChiA, 赤; RSC-c。

クレフトを挟んで Glu61 と対峙するように位置している。なお、これらの二つの触媒残基は、RSC-c においては Glu89, Ser120 に対応しており、**図 2** から明らかなように、立体的にほぼ同じ配置をとることがわかった。

この結晶解析から得られた $(\text{GlcNAc})_4$ と BcChi-A E61A の相互作用様式を **図 3** に示す。 $(\text{GlcNAc})_4$ は触媒部位を跨いで、BcChi-A の基質結合クレフト全体に結合していることがわかった。ただし、これはあくまでも結晶構造での相互作用様式である。果たして、溶液中においても同様の相互作用様式を示すのであろうか？そのことを調べるために、NMR 法に基づく

$(\text{GlcNAc})_4$ 滴定実験を行った。大腸菌の発現系および M9 最小培地を用いて、BcChiA E61A の ^{15}N -ラベル化を行い、HSQC スペクトルを測定した。HSQC スペクトル中のいくつかの主鎖のシグナルは、 $(\text{GlcNAc})_4$ の滴定に伴って徐々にシフトした。過去の帰属結果に基づいて (Shinya et al., Biomol. NMR

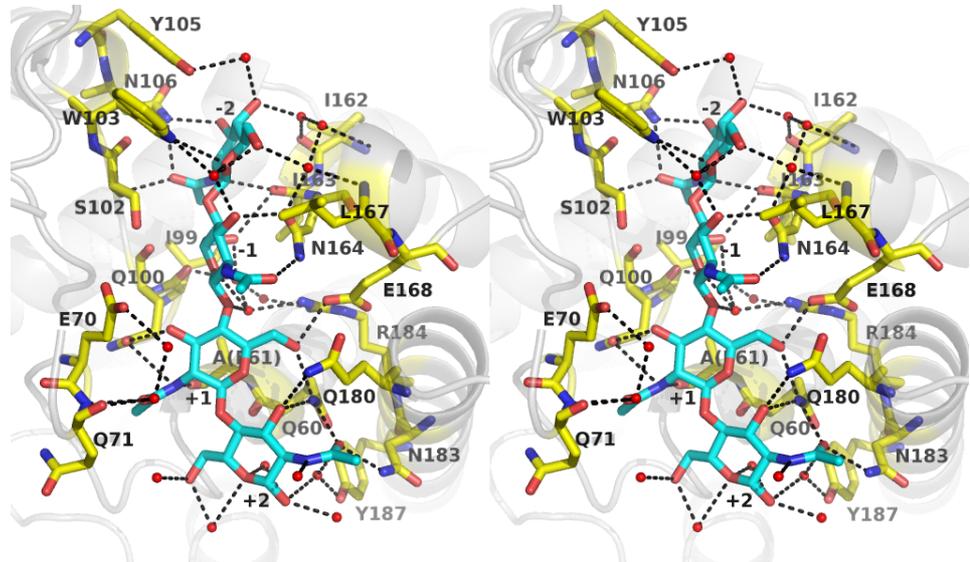


図 3 BcChi-A E61A- $(\text{GlcNAc})_4$ 複合体の結晶構造 (ステレオ図)

Assign., 2012, 6, 157-161)、どのアミノ酸残基が影響を受けたかを調べたところ、**図 4** に示すように触媒残基 (Glu61, 赤) 周辺の基質結合クレフトに沿って存在するアミノ酸残基が最も強く影響を受けており (青あるいは緑で色付けされた部分)、それは結晶解析で得られた $(\text{GlcNAc})_4$ の結合位置 (**図 4**、オレンジの stick モデルで表示) とほぼ一致した。よって、溶液中では、結晶中と同様の相互作用が行われているものと思われる。

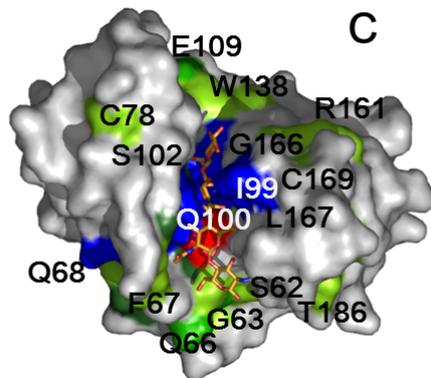


図 4 ^{15}N -ラベル BcChi-A E61A の NMR 滴定実験より推定された $(\text{GlcNAc})_4$ の相互作用部位

ものである。すなわち、Glu61 のカルボキシル基からグリコシル酸素原子にプロトンが供与され、結合開裂が起こる。その後、Glu70 の共役塩基によって活性化された水分子が -1 サイトの C-1 炭素を攻撃し、加水分解が完結する。その際、C-1 炭素を攻撃する水分子は Ser102 の水酸基との水素結合によって固定されている。この一連の反応に関わる原子間の距離 (**図**

図 3 の結晶構造解析において、初めて基質オリゴ糖 $(\text{GlcNAc})_4$ が触媒部位を跨いで結合している状態をとらえることができた。このような構造において、活性中心近傍のアミノ酸残基およびキチンオリゴ糖の配置を詳細に調べることによって、より精密な触媒機構の考察が可能になるはずである。**図 5** に活性中心近傍の触媒反応に直接関わる部分を原子レベルで表示している。なお、この図においては、結晶解析で得られた BcChi-A E61A の構造を鋳型として、モデル計算によって Ala61 を Glu に置換し野生型酵素を再現させている。この構造は、これまで考えられていた Family GH19 キチナーゼの触媒機構を強く支持する

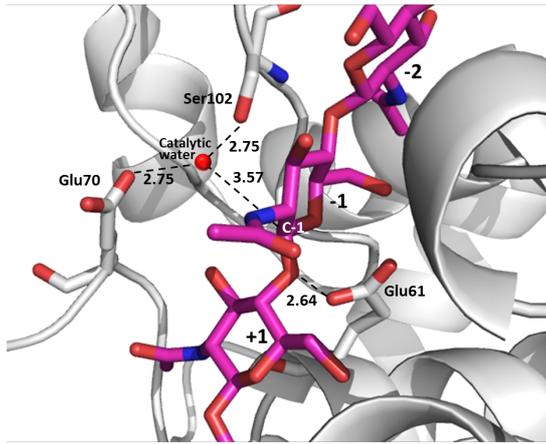


図5 BcChi-A E61A-(GlcNAc)₄ 複合体結晶構造の活性中心近傍のクローズアップ。Ala61には Glu 側鎖をモデルによって導入している。

2) コケ由来 Family GH19 キチナーゼ(BcChiA)の新規阻害剤の開発

酵素阻害剤は、対応する酵素の反応機構や構造と機能の解析を行う際に、極めて有効に活用することができる。強い阻害剤があれば、X線結晶構造解析において複合体を形成しや

Moranoline (1-deoxynojirimycin)

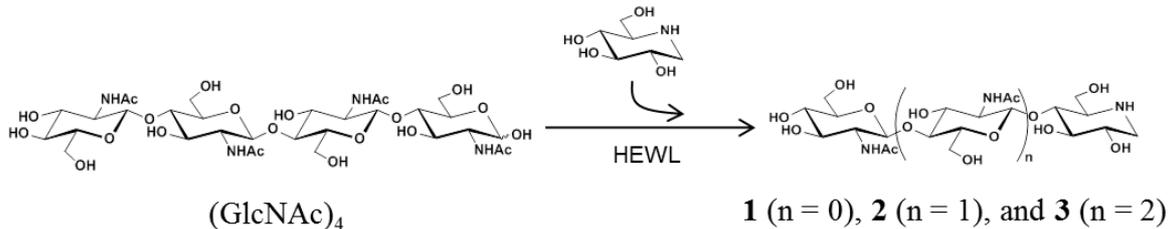


図6 キトオリゴシルモラノリンの酵素合成

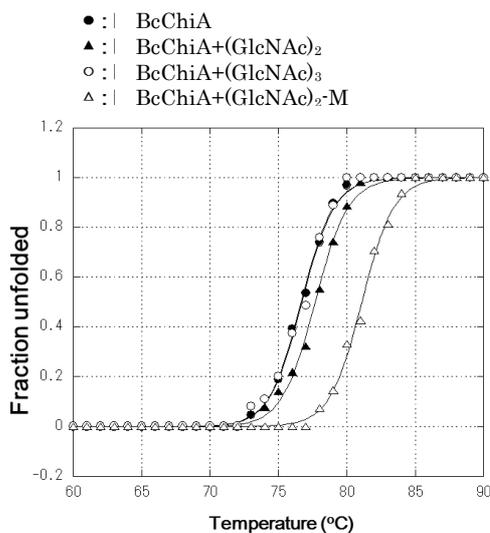


図7 CDによって得られたBcChiAの熱変性曲線。リガンド結合に伴うTm値の上昇に基づく結合性評価。

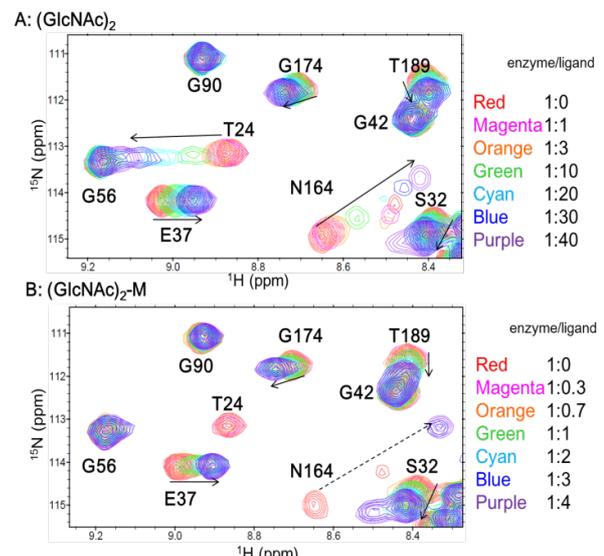


図8 リガンド結合に伴う¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの変化。(GlcNAc)₂と(GlcNAc)₂-M とではシグナルの応答が異なる。

すく、複合体構造が得られると、触媒部位あるいは基質結合部位を容易に特定することができ、反応機構に関する情報までも得ることが可能である。しかしながら、植物に多数存在するファミリー GH19 キチナーゼの有効な阻害剤はいまだに見出されておらず、このことはこのファミリーの酵素の構造と機能に関する理解を妨げていたものと思われる。一方、最近 Ogata らは、キチンオリゴ糖の還元末端にモラノリン (1-デオキシノジリマイシン) を転移させ、**図 6** に示すようなキトオリゴシルモラノリン, $(\text{GlcNAc})_n\text{-M}$ ($n=1, 2, 3$) を酵素合成した。さらに彼らは、 $(\text{GlcNAc})_3\text{-M}$ がリゾチームの極めて有効な阻害剤であることも明らかにした (Ogata et al., J. Biol. Chem. 2013, 288, 6072-6082)。Family GH19 キチナーゼが Family GH22 に属するリゾチームと類似の触媒クレフトをもち、リゾチームスーパーファミリーとして類似の触媒性をもつ酵素群として捉えられていることを考えるならば、Family GH19 キチナーゼもキトオリゴシルモラノリンによって阻害を受ける可能性が示唆される。そこで、我々は、 $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ について、コケ由来の Family GH19 キチナーゼ (BcChiA) に対する結合性および阻害活性を調べてみた。なお、 $(\text{GlcNAc})_3\text{-M}$ は BcChiA によってわずかではあるが加水分解を受けたので、ここでは使用しなかった。

図 7 は、BcChiA の熱変性実験を $(\text{GlcNAc})_2$, $(\text{GlcNAc})_3$, および $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ の存在下あるいは非存在下で行った結果である。BcChiA に対する安定化効果は、 $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ が $(\text{GlcNAc})_2$ および $(\text{GlcNAc})_3$ に比べはるかに高いことがわかる。すなわち、 $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ はそれだけ強く結合しているからである。安定同位体 ^{15}N -ラベルを施した BcChiA を用いて NMR による $(\text{GlcNAc})_2$ と $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ の結合性を調べてみると、**図 8** に示すように、いくつかの NMR シグナルにおいて、この二つのリガンドは異なる影響を及ぼすことがわかった。さらにこの影響を受けたシグナルの化学シフト変化量を遊離のオリゴ糖濃度に対してプロットすると、**図 9** のような滴定曲線が得られた。得られた滴定曲線は、**図** に示すようにアブノーマルなものであり、結合定数を得ることはできなかった。しかし、これらの曲線から少なくとも、 $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ は $(\text{GlcNAc})_2$ に比べはるかに強く BcChiA に結合していることが明らかになった。これらの結果は、 $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ が BcChiA の有効な阻害剤となりうることを示唆する。そこで、BcChiA の $(\text{GlcNAc})_4$ および $(\text{GlcNAc})_6$ に対する加水分解反応が、 $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ によってどれくらい阻害されるのかを、HPLC による反応速度解析によって調べた。その結果、**図 10** に示すように、50% 阻害濃度 IC_{50} について、 $(\text{GlcNAc})_4$ 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。 $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ のリゾチーム溶菌反応に対する IC_{50} が、

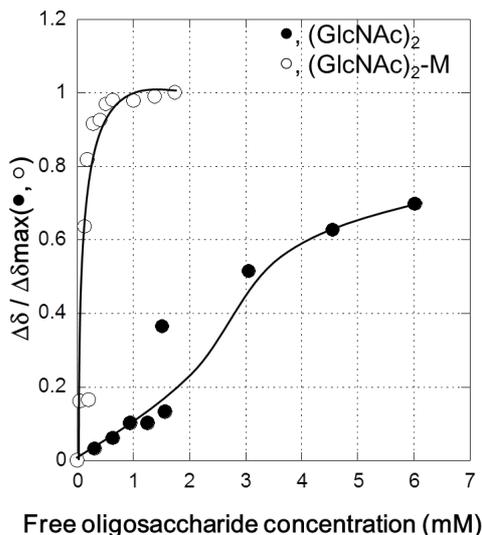


図 9 NMR シグナル変化に基づく、それぞれのリガンド結合の滴定曲線。●, $(\text{GlcNAc})_2$; ○, $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$

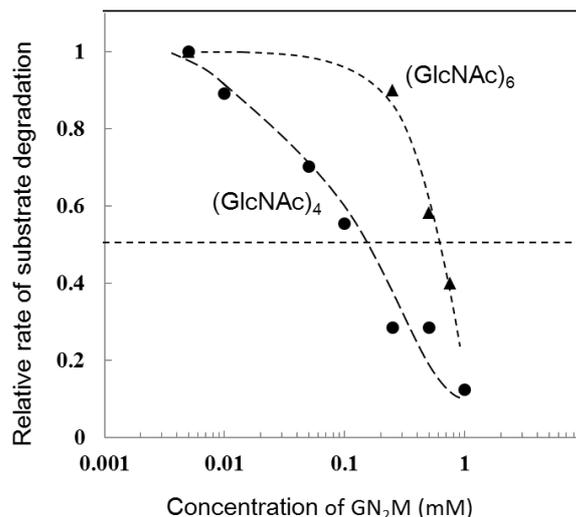


図 10 $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ の BcChiA 加水分解反応に対する阻害活性 (IC_{50})。基質 $(\text{GlcNAc})_4$, ●; $(\text{GlcNAc})_6$, ▲

16.7 μM であったことから考えると、BcChiA に対する阻害は、リゾチームに対するほど強くはないことがわかった。しかしながら、**図 10** に見られる $(\text{GlcNAc})_2\text{-M}$ による BcChiA 加水分解反応に対する有意な阻害作用は、今後、Family GH19 キチナーゼの阻害剤の分子設計を行っていく上で、有用な情報となるであろう。

3) Family GH19 キチナーゼのオリゴ糖合成酵素への変換

最近、アノマー型反転の機構をもつ糖質加水分解酵素の部位特異的変異によって、合成活性を付与しうることが報告されるようになった(Honda and Kitaoka, *J Biol Chem.* 2006, **281**, 1426-1431; Honda et al., *Glycobiology.* 2008, **18**, 325-330)。これらの報告に基づいて、我々は、アノマー反転型酵素であるコケ由来 Family GH19 キチナーゼ(BcChiA)に部位特異的変異を施し、本酵素に合成活性を付与することを試みた。

一般的にアノマー反転型の糖質加水分解酵素に真の基質の逆のアノマーをもつフッ化オ

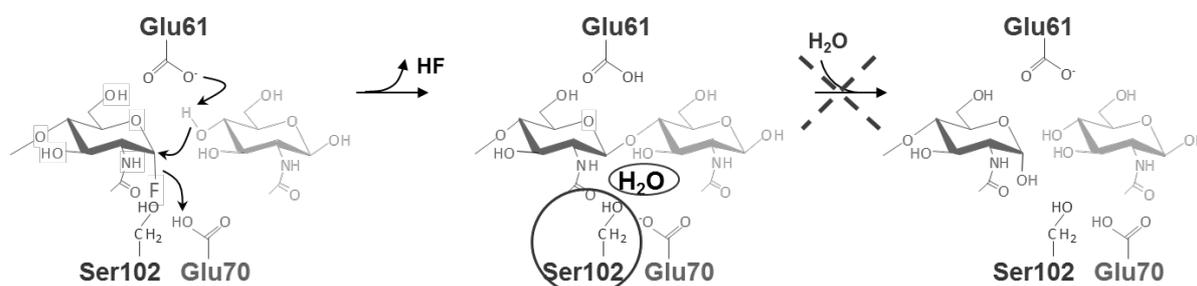


図 11 BcChiA とフッ化キチンオリゴ糖とアクセプターとの反応機構

リゴ糖をグリコシルドナーとして反応させると、**図 11** に示すように HF を放出しながら合成反応が起こり (第一段階)、より長鎖のオリゴ糖が生成される。しかし、合成によって生成されたオリゴ糖は、その酵素が本来もっている加水分解活性によって再加水分解され (第二段階)、元の基質の長さに戻ってしまう。このような酵素へ合成活性を付与するためには、合成後に起こる加水分解活性 (第二段階) を抑え、合成反応生成物を蓄積させる必要がある。そこで、本研究では、BcChiA の触媒中心において、求核性の水分子を保持する役割をもつ Ser102 に変異を施し、加水分解活性を抑えることによって、合成酵素への変換を試みた。

グリコシルドナーとして $\alpha\text{-(GlcNAc)}_2\text{-F}$ 、グリコシルアクセプターとして $(\text{GlcNAc})_2$ を用いて、野生型の BcChiA および種々の変異酵素と反応させ、生成物を TLC で分析した。その結果を **図 12** に示す。野生型酵素の場合(Lane 2)、酵素を入れない場合(Lane 1)に比較して、 $\alpha\text{-(GlcNAc)}_2\text{-F}$ のスポットが弱くなり、逆に $(\text{GlcNAc})_2$ (II) のスポットが強くなっているのがわかる。すなわち、**図 11** に示すような二段階の反応を経て、 $\alpha\text{-(GlcNAc)}_2\text{-F}$ は $(\text{GlcNAc})_2$ へと変換されていることがわかる。一方、S102A (Lane 3), S102C (Lane 4), S102G (Lane 6), E70G (Lane 9) において、 $\alpha\text{-(GlcNAc)}_2\text{-F}$ のスポットが弱くなるとともに、 $(\text{GlcNAc})_4$ のスポットが有意に検出されていた。以上より、Ser102 の変異によって、合成酵素への変換が可能であることがわかった。

同様の合成酵素への変換はより長いサブサイト構造 (-4, -3, -2, -1, +1, +2, +3, +4) をもつ RSC-c にも適用できることがわかった。グリコシルドナーとして $\alpha\text{-(GlcNAc)}_3\text{-F}$ 、グリコシルアクセ

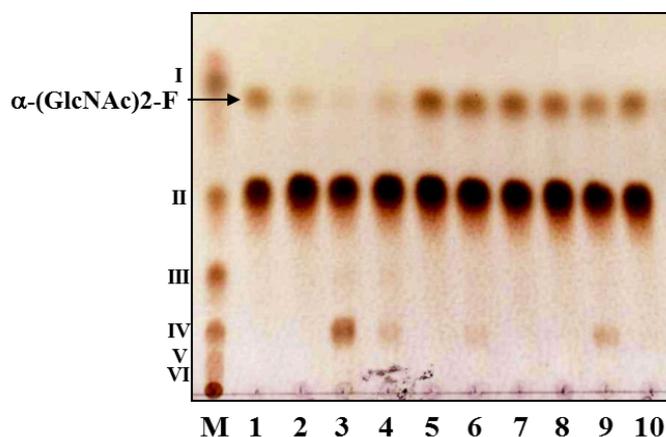


図 12 BcChiA 野生型および変異体の $(\text{GlcNAc})_2\text{-F}+(\text{GlcNAc})_2$ に対する反応の TLC 解析

プターとして(GlcNAc)₄を用いて、野生型の RSC-c および種々の変異酵素と反応させ、反応生成物を HPLC で調べた。その結果を図 13 に示す。野生型と反応させると、図 13A に示すようにα-(GlcNAc)₃-F のピークは経時的に減少していき、その代わりに(GlcNAc)₃ のピークが増大した。この結果も図 11 のような二段階反応が起こっていることを示している。野生型酵素の代わりに E89G, S120A, および E89G/S120A を用いて反応させた結果をそれぞれ 図 13B, 13C, および 13D に示している。いずれの場合も明確な(GlcNAc)₇のピークが検出された。これらの変異酵素はオリゴ糖合成活性をもち、α-(GlcNAc)₃-F と(GlcNAc)₄から(GlcNAc)₇を合成しうることが明らかになった。E89G/S120A を用いて 12 時間反応させ、生成物を調べてみると 図 13E に示すように多量の(GlcNAc)₇を蓄積することがわかった。以上より、Family GH19 キチナーゼに対して同様の変異戦略によって、合成活性を付与することが可能であることがわかった。

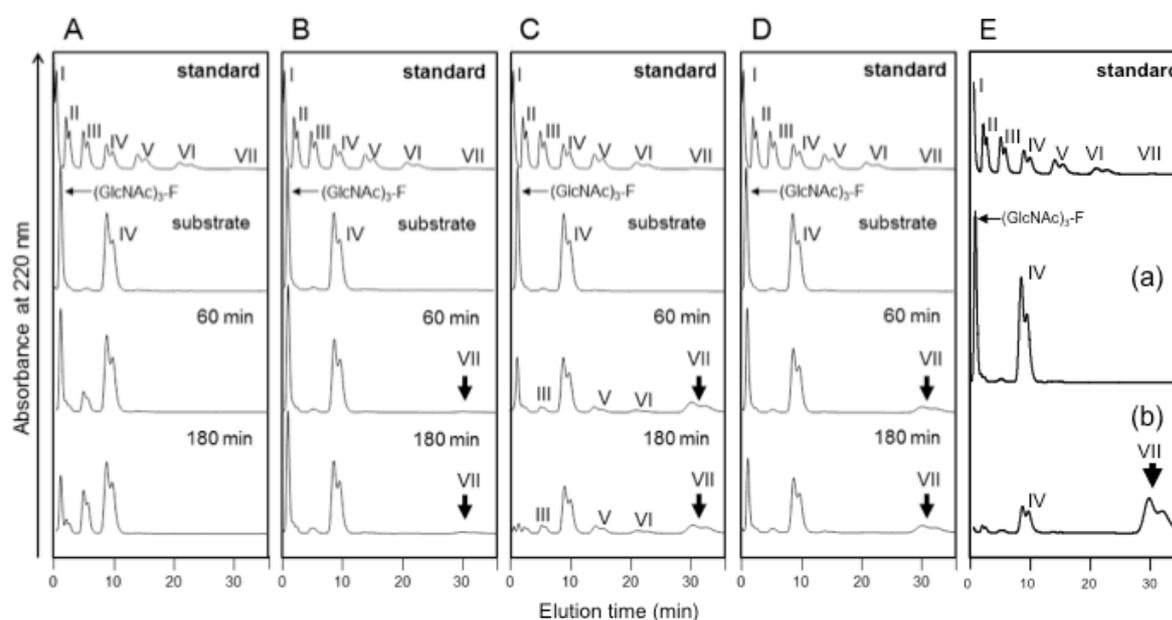


図 13 RSC-c 野生型あるいは変異型酵素のフッ化(GlcNAc)₃+(GlcNAc)₄に対する反応の HPLC 解析。(A) 野生型 (B) E89G, (C) S120A, (D) E89G/S120A. (E) E89G/S120A で 12 時間反応させた場合の生成物。

4) ソテツ由来 Family GH18 キチナーゼの結晶構造と糖転移活性

糖質加水分解酵素の反応において、その逆反応である糖転移反応が観察されることは古くから認められている。なぜ、加水分解を担う酵素に一見不利とも思えるような転移活性が存在するのか、どのような酵素の立体構造がこのような逆反応を触媒する機能をもたらすのか、これらの問題は長い間、多くの研究者によって検討され、その研究成果は酵素による非天然有用糖質の効率的合成のために大きく貢献してきた。しかし、その分子基盤が明らかになってくるのはごく最近のことである。我々は植物由来のキチナーゼの構造と機能の研究を進める中で、非常に高い糖転移活性をもつキチナーゼをソテツ (*Cycas revoluta*) より分離し、CrChiA と名付けた(Taira et al., *Glycobiology* 2009, 19, 1452-1461)。このキチナーゼは、植物キチナーゼのアミノ酸配列の相同性に基づく分類 (クラス I からクラス V) によるとクラス V に属するものであり、CAZy データベースによる分類では、GH (Glycoside Hydrolase) Family 18 (GH18) に属する。GH18 キチナーゼにおいては、基質補助機構によるアノマー保持のメカニズムで触媒反応が進み、多くのアノマー保持型の糖質加水分解酵素で糖転移活性が見出されているように、GH18 キチナーゼにおいても糖転移反応を触媒するものが多い(Fukamizo et al., *Biochemistry*, 2001, 27, 2448-2454)。しかし、植物由来のキチナーゼにおいて CrChiA のように極めて高効率に糖転移反応を触媒するキチナーゼは、これまでに報告がない。我々は最近、

CrChiA の結晶構造と同じクラスVに属しながらも糖転移活性が極めて低いタバコ由来のキチナーゼ(NtChiV)およびシロイヌナズナ由来のキチナーゼ(AtChiC)の結晶構造を比較し、糖転移反応に必要な機能構造に関する有用な知見を得ることができた。以下に、それらのいくつかの知見について紹介させていただく。

これら三種の植物キチナーゼはいずれも、 $(\alpha/\beta)_8$ バレルドメインと、逆平行 β シート (β ストランド5本) と1個の α -ヘリックスからなる挿入ドメインの、二つのドメインからなる。

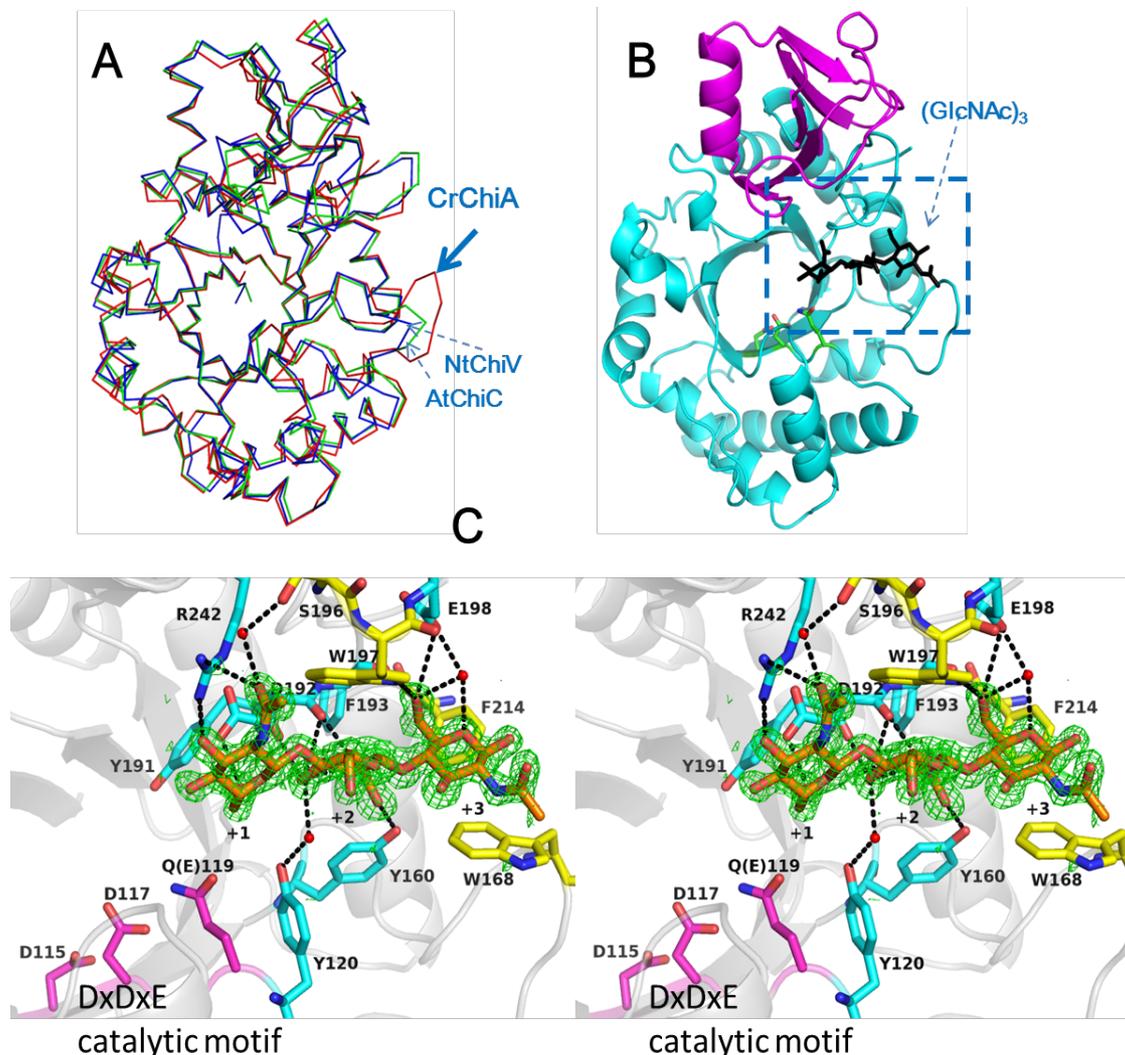


図 14 CrChiA の X 線結晶構造。A. CrChiA, NtChiV および AtChiC の Ca トレースを重ね合わせ。B. CrChiA-E119A と $(\text{GlcNAc})_3$ の複合体構造。 $(\text{GlcNAc})_3$ は +1, +2, +3 部位に結合している。C. CrChiA-E119A と $(\text{GlcNAc})_3$ の結合様式。B の図の点線で囲んだ領域を拡大し、ステレオで表示。

これら三つの構造の Ca トレースを重ね合わせた **図 14A** をみると、いずれの角度からみてもほとんど相違は感じられない。ただ、一つだけ注目すべき点は、CrChiA にだけ見出される基質結合クレフト末端のループのふくらみである (**図 14A** の太い矢印)。糖転移活性が極めて低い NtChiV と AtChiC にはこのようなループのふくらみは見られない。このループ構造の違いがどのように触媒反応に関わってくるのかは、やはりキチンオリゴ糖との複合体結晶の構造解析が必要になってくる。我々は、CrChiA の触媒中心である Glu119 をグルタミンに変異させて不活性にした変異体(CrChiA-E119Q)を用いて、キチンオリゴ糖 (トリマー) との複合体構造を得ることに成功した。**図 14B** にその複合体構造を示す。先に注目した CrChiA にだけ存在するループ構造のふくらみは確かに結合したキチンオリゴ糖の還元末端糖残基近傍に位置する。このキチンオリゴ糖結合部位 (点線で囲んだ部分) を拡大してステレオ図にした

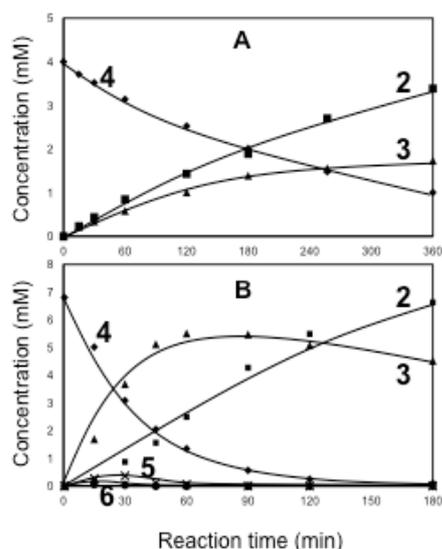


図 15 CrChiA 野生型(A)とCrChiA-G77W 変異体(B)の(GlcNAc)₄に対する反応の経時変化。

おり、プロセッシングなキチン分解において重要な役割を担っている。SmChiBのTrp97に対応するアミノ酸残基は、NtChiV, AtChiC, CrChiAのそれぞれにおいてGly74, Gly75, Gly77であるので、我々はこれらのグリシン残基をトリプトファンへと変異させ、糖転移活性の促進を試みた。その結果、いずれの変異酵素においても野生型と比べ、糖転移活性が促進されており、特に、CrChiA-G77Wでは、4糖基質から糖転移反応を経由して生成される3糖の著しい生成促進効果がみられた(図15)。また、CrChiA-G77Wとキトオリゴ糖複合体のX線結晶構造も得ることができ、変異導入されたトリプトファンインドール環と+1ピラノース環とのCH- π スタッキングによる重なりを確認することができた(図16B)。興味深いことに、変異導入されたトリプトファン残基のインドール環は、+1サブサイトから糖残基がなくなると反転し、糖残基の結合状態によって配向を変えることが明らかになった(図16A)。

最近、Zakkariassenらは、GH18キチナーゼにおいてほぼ完全に保存されているDxDxE触媒モチーフの中央に位置するアスパラギン酸(D₂)に変異を導入し、著しい糖転移活性の増大を実現した。この変異によって活性中心近傍の静電的環境が変化し、水分子の攻撃が抑制されたものと彼らは説明している。このことは、DxDxE触媒モチーフのD₂の存在

ものが図14Cである。このトリマーは+1、+2、+3の三つのサブサイトに結合していた。いくらかの水素結合がそれぞれの糖残基に形成されているが、それとともに+2の糖残基にはTrp197が、そして+3の糖残基にはTrp168がそれぞれCH- π スタッキングによって重なりあっていることが明らかになった。これら二つのトリプトファン残基をそれぞれアラニンに変異させると、CrChiAがもつ糖転移活性が著しく減少し、特にTrp168の変異は糖転移活性をほぼ完全に消失させた(Umemoto et al., FEBS Lett., 2015, 589, 2327-2333)。サブサイト+1、+2、+3へのアクセプター分子の結合力は、糖転移活性を決める重要な要因なのである。

一方、図14Cを詳細にみても、+2と+3の糖残基にみられたトリプトファン残基との相互作用は、+1部位にはみられない。このことは、+1部位へのトリプトファン残基の導入はその部位の糖残基との相互作用を強め、糖転移活性を高めるものと考えられる。実のところ、*Serratia marcescens* キチナーゼB(SmChiB)の+1部位ではTrp97が糖残基との相互作用に関わって

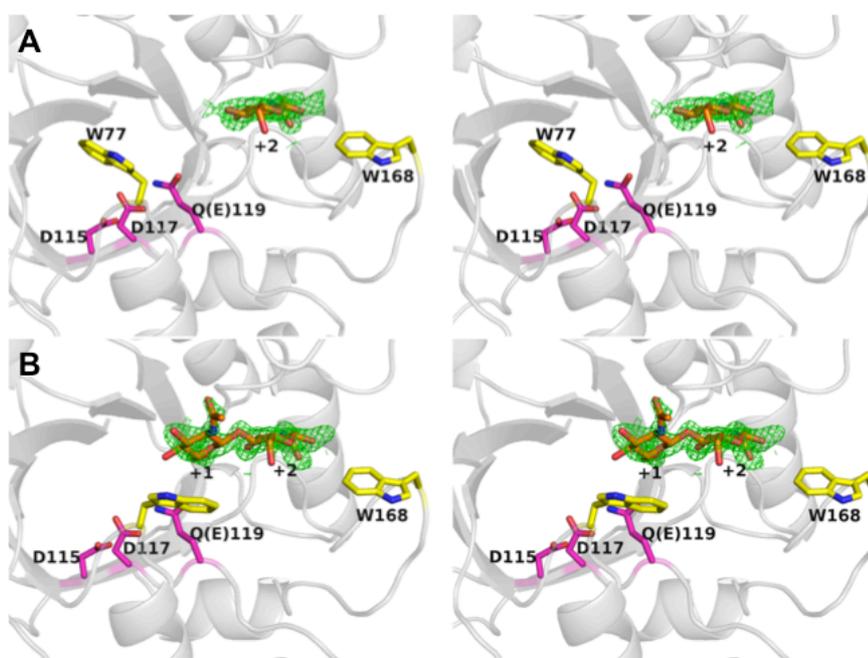


図 16 CrChiA-G77W-キチンオリゴ糖複合体の結晶構造のステレオ図。

結合力の違いがなく、それぞれのモジュールにおいて接触している糖残基の数（サブサイトの数）は多くても3個くらいであろうと考えられる。また DD2 に比べ DD1 の方がはるかにキトサン結合能が高いということもわかった。

次に、それぞれのモジュールを大腸菌発現系によって ^{15}N を含む M9 培地で発現させ、 ^{15}N -ラベル化タンパク質を得た。また ^{15}N とともに ^{13}C -グルコースを培地に加えることにより、 ^{13}C 、 ^{15}N -ダブルラベル化タンパク質を得、主鎖シグナルの帰属のために、三次元の HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCA, HNCACO, HNCO, および HNCOCA スペクトルを測定した。また、側鎖シグナルを帰属するために、 ^1H - ^{13}C -HSQC, HCCH-TOCSY, CCH-TOCSY スペクトルを測定し、さらに ^{15}N -edited NOESY および ^{13}C -edited NOESY の測定を行って、NOE 情報を得た。得られた NOE 情報をプログラム CYANA によって処理し、溶液中での立体構造を得た。その結果を図 20 に示す。図に示すように、これら二つの結合モジュールは β -サンドイッチとよばれる二つの β -シートが前後に重なるような構造をもつことがわかった。両者にはいくらかの違いもみられる。 β -サンドイッチコアの上部に突き出しているいくつかのループ構造のコンフォメーションは両者でいくらか異なっており、特に DD1 だけに付加的な β -ストランドがみられる。次に、 $(\text{GlcN})_4$

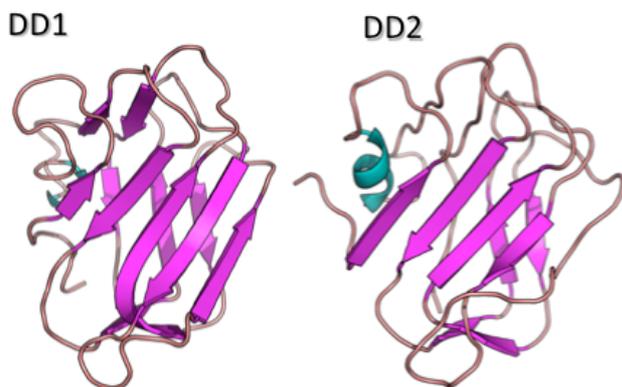


図 20 NMR 法によって得られた DD1 および DD2 の溶液構造。

るアミノ酸残基がキトサン分子の結合に重要であり、DD1 と DD2 の結合性の違いを生じさせているものと推測できる。しかし、図 21B と 21D の比較からそのアミノ酸残基を特定することは難しい。そこで我々は、X 線結晶構造解析によってキトサンオリゴ糖との複合体構造を

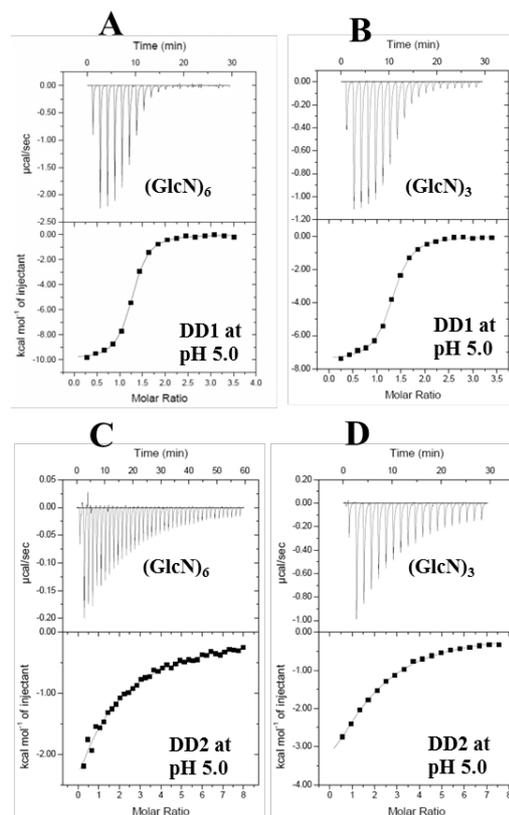


図 19 DD1 および DD2 に対するキトサンオリゴ糖結合の ITC プロファイル

図 21A と 21C に示しているようにいくつかの HSQC シグナルにおいて明確なシフトが見られ、またわずかではあるが、両者ともシグナルがブロードニングを起こし、消失するものもあった。シフトしたシグナルに注目すると、シフトの量 ($\Delta\delta$) は DD1 に比べ DD2 の方が大きかったが、加えられる $(\text{GlcN})_4$ に対する応答は、はるかに DD1 の方が鋭敏であった。このことは ITC で得られた結果、DD2 に比べると DD1 の方が結合能が高いという結果と一致する。

図 21A と 21C に示すスペクトルの帰属結果に基づいて、どのアミノ酸残基のシグナルにシフトあるいはブロードニングが生じたかを調べ、該当するアミノ酸残基を DD1 と DD2 の溶液構造上にマッピングを行った。 $(\text{GlcN})_4$ の滴定によって、有意なシグナル変化がみられたアミノ酸残基をマゼンタで、ブロードニングを起こしたアミノ酸残基をブルーでハイライトしたところ、図 21B と 21D に示すように、 $(\text{GlcN})_4$ はこれら DD1 と DD2 の上部ループ構造部分と相互作用を行うことが明らかになった。これらの相互作用部位に存在す

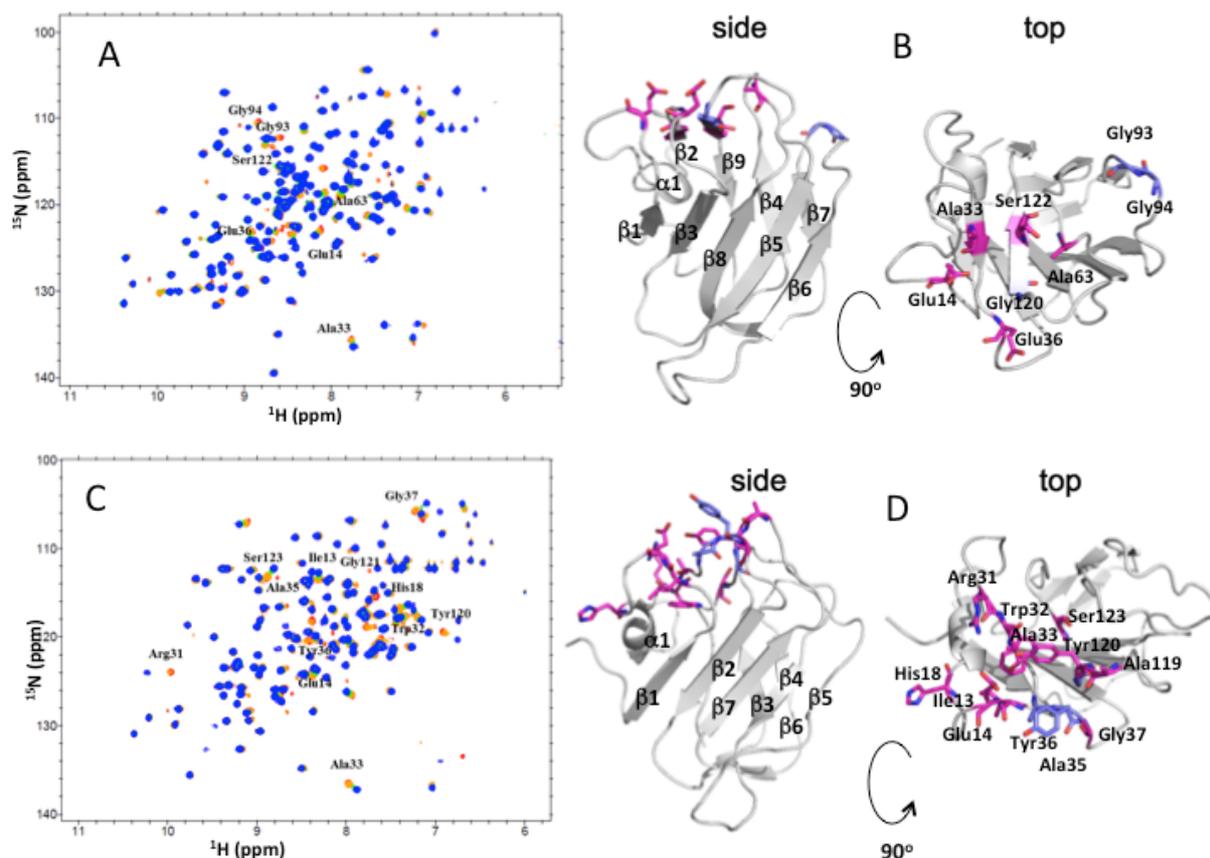


図 21 DD1(A と B)および DD2(C と D)に対するキトサンオリゴ糖の NMR 滴定実験。A と C ;(GlcN)₄ 結合に伴う ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの変化。オレンジ、(GlcN)₄ 非存在下；ブルー、(GlcN)₄ 存在下。B と D ;シグナルに変化がみられたアミノ酸残基。マゼンタはシグナルがシフトしたもの、ブルーはブロードになったもの。

明らかにすることを試みた。種々の結晶化条件で DD1 と DD2 のキトサンオリゴ糖との複合体結晶を得ることを試みたが、唯一、DD2 と(GlcN)₃との複合体結晶が得られ、セレンメチオンでラベルしたタンパク質を用いた SAD 法によって位相を決定することができ、さらに、この複合体の結晶構造を得ることができた。その構造のステレオ図を **図 22** に示す。DD2 と(GlcN)₃との相互作用はほとんど非還元末端糖残基だけで行われており、オリゴ糖は結合部位に対して直立するように結合していた。非還元末端との相互作用は、Glu14, Arg31, Tyr36, Glu61, および Tyr120 の側鎖によって行われており、特に、Glu14 のカルボキシ基は非還元末端 GlcN のアミノ基と静電的に相互作用を行う重要なアミノ酸であると思われた。**図 21B** と **21D** の結果から考えると、DD1 も DD2 の場合と同様の結合部位でキトサンオリゴ糖と相互作用を行っているものと思われる。しかし、DD2 においてキトサンオリゴ糖との相互作用に関わる五つのアミノ酸 Glu14, Arg31, Tyr36, Glu61, および Tyr120 の保存性を、アミノ酸配列上で調べてみると、DD2 の Tyr36 は、DD1 では Glu36 に置換しており、他のアミノ酸はすべて保存されていた。このことより、DD1 と DD2 のキトサンオリゴ糖結合性の違いは、36 番目のアミノ酸の置換(Glu/Tyr)によるものであると推定された。このことを実験的に確認するために、DD1 と DD2 の 36 番目のアミノ酸に部位特異的の変異を施し、変異に伴うキトサンオリゴ糖結合性の変化を ITC によって調べてみた。その結果、(GlcN)₄に対する結合自由エネルギー変化は、DD1 が-7.8 kcal/mol、DD2 が-5.2 kcal/mol であるのに対し、DD1 の Glu36→Tyr 変異体は-5.1 kcal/mol、DD2 の Tyr36→Glu 変異体は-6.0 kcal/mol という結果が得られた。すなわち、36 番目のアミノ酸はグルタミン酸である方が、キトサンオリゴ糖結合に有利であることがわかった。以上より、DD1 と DD2 の結合性の違いをもたらしているものは 36 番目のアミノ酸置換であり、また、これらのキトサン結合モジュールとリガンドとの相互作用において、

グルタミン酸残基と糖のアミノ基との静電的相互作用は重要な働きをしていると結論することができた。

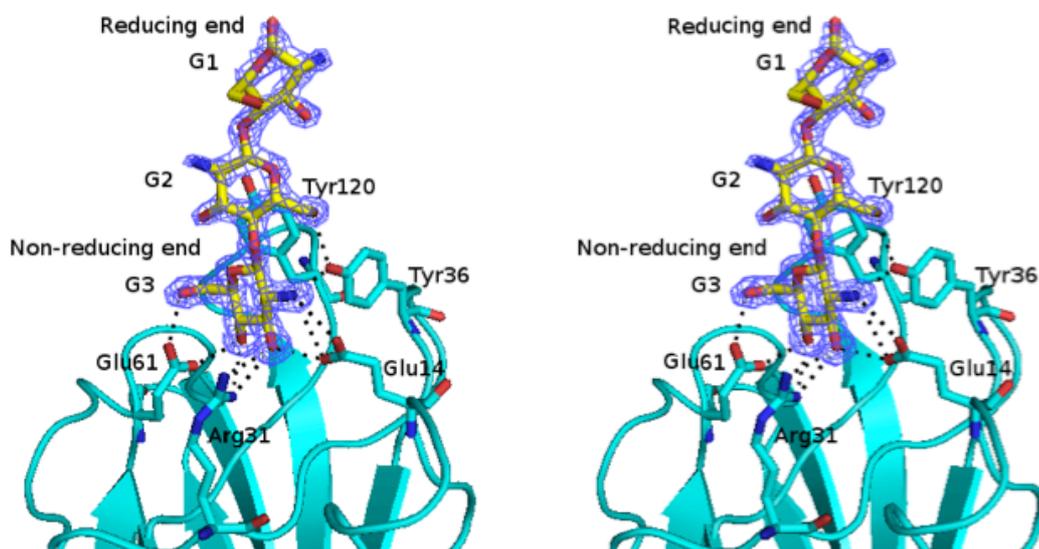


図 22 DD2 と(GlcN)₃の複合体結晶構造のステレオ図。シアン、DD2の主鎖構造とリガンドとの相互作用に関わるアミノ酸残基；イエロー、結合した(GlcN)₃；ブルー、(GlcN)₃の電子密度マップ。点線、予想しうる水素結合あるいは静電的相互作用。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

今回、我々はRSC-cを用いてFamily GH19 キチナーゼの基質結合クレフト全体のサブサイトマッピングを完全に行うことができた。また、BcChiA と(GlcN)₄の複合体構造に基づき、これまでに推定されていたGH19 キチナーゼの触媒機構に関する実験的な証拠を提出することができた。これらの結果に基づいて、GH19 キチナーゼをキチンオリゴ糖合成酵素へと変換していくための有用な方策を確立することができた。現在、スギ花粉アレルギーとして同定されているGH19 キチナーゼ、あるいは冬ライムギに見出される不凍活性をもつGH19 キチナーゼの構造について解析を進めている。このように、主として植物に見出されるFamily GH19 キチナーゼはキチンの加水分解活性とともに付加的な機能を持つ場合が多い。それら付加的な機能と構造との関連を明らかにすることは、今後、革新的なアグリバイオ技術を開発するための大きな情報源となるであろう。Family GH19 キチナーゼの新たな阻害剤、(GlcNAc)₂-Mが見出されたことは、今後のこのファミリーの酵素研究に大きく影響することであろう。しかしながら、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と、まだまだその阻害力は不十分であり、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。ソテツ由来クラスVキチナーゼの糖転移反応触媒の高効率性について、結晶構造に基づいてその構造的要因を二つ特定することができた。また、+1サブサイトへのトリプトファン残基の導入によってもたらされる糖転移反応の促進効果について、X線結晶構造に基づく考察を行うことができた。今後、このような情報を考慮に入れながらエンジニアリングを行うことによって、より効率の良い糖転移酵素の創製が可能になるものと思われる。一方、キトサナーゼ中に見出されたキトサン結合モジュールの結合特性解析を行い、キトサンに特異的な糖質結合モジュールを世界に先駆けて明らかにした。さらに、これらのモジュールの立体構造をNMR法およびX線結晶構造解析によって解き、キトサン認識機構について原子レベルで考察することができた。このようなモジュールは単独での発現だけではなく、他の触媒モジュールとのハイブリッドとして発現させることも可能である。様々なモジュールの組み合わせより、新規の特異性をもつ糖質加水分解酵素の創製も可能と

なり、植物の生育環境を適正に保つためのアグリバイオ技術革新が可能となった。

4. 研究成果

a. 原著論文

1. Umemoto N, Ohnuma T, Osawa T, Numata T, Fukamizo T. Modulation of the transglycosylation activity of plant family GH18 chitinase by removing or introducing a tryptophan side chain. *FEBS Lett.* 2015, 589(18):2327-2333.
2. Kitaoku Y, Umemoto N, Ohnuma T, Numata T, Taira T, Sakuda S, Fukamizo T. A class III chitinase without disulfide bonds from the fern, *Pteris ryukyuensis*: crystal structure and ligand-binding studies. *Planta.* 2015, 242(4):895-907.
3. Umemoto N, Kanda Y, Ohnuma T, Osawa T, Numata T, Sakuda S, Taira T, Fukamizo T. Crystal structures and inhibitor binding properties of plant class V chitinases: the cycad enzyme exhibits unique structural and functional features. *Plant J.* 2015, 82(1):54-66.
4. Nishihira T, Miyano A, Ohnuma T, Gotoh T, Takahashi S, Narihiro K, Yamashita K, Fukamizo T. A simple turbidimetric assay using chitin nanofiber as the substrate for determination of chitinase activity. *J. Appl. Glycosci.* 2014, 61(4):113-116.
5. Sirimontree P, Suginta W, Sritho N, Kanda Y, Shinya S, Ohnuma T, Fukamizo T. Mutation strategies for obtaining chitooligosaccharides with longer chains by transglycosylation reaction of family GH18 chitinase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014, 78(12):2014-2021.
6. Shinya S, Urasaki A, Ohnuma T, Taira T, Suzuki A, Ogata M, Usui T, Lampela O, Juffer AH, Fukamizo T. Interaction of di-N-acetylchitobiosyl moranoline with a family GH19 chitinase from moss, *Bryum coronatum*. *Glycobiology.* 2014, 24(10):945-955.
7. Ohnuma T, Umemoto N, Nagata T, Shinya S, Numata T, Taira T, Fukamizo T. Crystal structure of a "loopless" GH19 chitinase in complex with chitin tetrasaccharide spanning the catalytic center, *Biochim. Biophys. Acta.* 2014, 1844(4):793-802.
8. Mahata M, Shinya S, Masaki E, Yamamoto T, Ohnuma T, Brzezinski R, Mazumder TK, Yamashita K, Narihiro K, Fukamizo T. Production of chitooligosaccharides from *Rhizopus oligosporus* NRRL2710 cells by chitosanase digestion. *Carbohydr Res.* 2014, 383:27-33.
9. Ohnuma T, Umemoto N, Taira T, Fukamizo T, Numata T. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an active-site mutant of 'loopless' family GH19 chitinase from *Bryum coronatum* in a complex with chitotetraose. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2013; 69(12):1360-1362.
10. Shinya S, Ohnuma T, Yamashiro R, Kimoto H, Kusaoke H, Anbazhagan P, Juffer AH, Fukamizo T. The first identification of carbohydrate binding modules specific to chitosan. *J Biol Chem.* 2013, 288(42):30042-30053.
11. Ohnuma T, Umemoto N, Kondo K, Numata T, Fukamizo T. Complete subsite mapping of a "loopful" GH19 chitinase from rye seeds based on its crystal structure. *FEBS Lett.* 2013, 587(16): 2691-2697.
12. Arimori T, Kawamoto N, Shinya S, Okazaki N, Nakazawa M, Miyatake K, Fukamizo T, Ueda M, Tamada T. Crystal structures of the catalytic domain of a novel glycohydrolase family 23 chitinase from *Ralstonia* sp. A-471 reveals a unique arrangement of the catalytic residues for inverting chitin hydrolysis. *J Biol Chem.* 2013, 288(26):18696-18706.
13. Ogata M, Umemoto N, Ohnuma T, Numata T, Suzuki A, Usui T, Fukamizo T. A novel transition-state analogue for lysozyme, 4-O- β -tri-N-acetylchitotriosyl moranoline, provided evidence supporting the covalent glycosyl-enzyme intermediate. *J Biol Chem.* 2013, 288(9):6072-6082.
14. Ohnuma T, Fukuda T, Dozen S, Honda Y, Kitaoka M, Fukamizo T. A glycosynthase derived from an inverting GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum*. *Biochem J.* 2012, 444(3):437-443.
15. Arakane Y, Taira T, Ohnuma T, Fukamizo T. Chitin-related enzymes in agro-biosciences. *Curr Drug Targets.* 2012, 13(4):442-470.

16. Shinya S, Nagata T, Ohnuma T, Taira T, Nishimura S, Fukamizo T. Backbone chemical shifts assignments, secondary structure, and ligand binding of a family GH-19 chitinase from moss, *Bryum coronatum*. *Biomol NMR Assign*. 2012, 6(2):157-161.
17. Ohnuma T, Sørlie M, Fukuda T, Kawamoto N, Taira T, Fukamizo T. Chitin oligosaccharide binding to a family GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum*. *FEBS J*. 2011, 278(21):3991-4001.
18. Letzel T, Sahmel-Schneider E, Skriver K, Ohnuma T, Fukamizo T. Chitinase-catalyzed hydrolysis of 4-nitrophenyl penta-N-acetyl- β -chitopentaoside as determined by real-time ESIMS: the 4-nitrophenyl moiety of the substrate interacts with the enzyme binding site. *Carbohydr Res*. 2011, 346(6):863-866.
19. Ohnuma T, Numata T, Osawa T, Mizuhara M, Lampela O, Juffer AH, Skriver K, Fukamizo T. A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta*. 2011, 234(1):123-137.
20. Taira T, Mahoe Y, Kawamoto N, Onaga S, Iwasaki H, Ohnuma T, Fukamizo T. Cloning and characterization of a small family 19 chitinase from moss (*Bryum coronatum*). *Glycobiology*. 2011, 21(5):644-654.
21. Ohnuma T, Numata T, Osawa T, Mizuhara M, Vårum KM, Fukamizo T. Crystal structure and mode of action of a class V chitinase from *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol*. 2011, 75(3):291-304.

他 10 件 合計 31 件

b. 総説

1. 北奥喜仁、大沼貴之：等温滴定型カロリメトリーを用いた生体分子間相互作用解析、化学と生物、2015, 53(12):834-842.
2. 梅本尚之、深溝慶：糖質の加水分解と転移をめぐる酵素研究の新展開、化学と生物、2015, 53(8):491-493.
3. 尾形 慎、碓氷泰市、梅本尚之、大沼貴之、深溝 慶、沼田倫征：リゾチーム遷移状態アナログの設計に基づく反応機構の検証、化学と生物、2014, 52(12):819-824.
4. 新家粧子、深溝 慶：CBM32 ファミリーに属する糖質結合モジュールの構造と特異性、キチン・キトサン研究、2014, 20(1):38-43.
5. 尾形 慎、碓氷泰市、梅本尚之、大沼貴之、深溝 慶、沼田倫征：リゾチーム遷移状態アナログの合成と反応機構の解析、応用糖質科学、2014, 4(4):308-313.
6. 深溝 慶：—緒言—キチン質多糖の分解とオリゴ糖合成、応用糖質科学、2014, 4(2):103-106.
7. 大沼貴之、平良東紀：植物キチナーゼの構造と機能、その利用、応用糖質科学、2014, 4(2):121-126.
8. Umemoto N, Ohnuma T, Fukamizo T.: Enzymatic Synthesis of Chitin Oligosaccharides with Longer Chains., in *Marine Medicinal Glycomics*, 2013, ed. by Pomin VH, Nova Science Publishers Inc., pp. 39-58.
9. Shinya S, Ohnuma T, Brzezinski R, Scheerle RK, Grassmann J, Letzel T, and Fukamizo T.: Lysozyme Superfamily: Progress in Functional Analysis using ESI-MS and NMR Spectroscopy, in *Lysozymes: Sources, Functions and Role in Disease*, 2013, ed. by Maang XG, Cheung WF, Nova Science Publishers, Inc. pp. 127-153.
10. 大沼貴之、深溝 慶：糖質とタンパク質の相互作用解析、『機能性糖質素材の開発と食品への応用Ⅱ』2013, 監修：井上國世、シーエムシー出版、pp. 232-240.
11. 新家粧子、深溝 慶：ディスコイジン・ドメインの多様な結合特異性、キチン・キトサン研究 *Chitin and Chitosan Research*, 2013, 19(1):28-33.
12. 深溝 慶、新家粧子：キトサナーゼの加水分解機構と基質認識機構、食品酵素化学の最新技術と応用Ⅱ—展開するフードプロテオミクス— 2011, 編集：井上國世、シーエムシー出版、pp. 58-69.
13. Ohnuma T, Fukamizo T.: Expression and Purification of Bioactive Proteins/Peptides with Conventional Liquid Chromatography. in *Protein and Peptide Analysis by LC-MS: Experimental*

Strategies (RSC Chromatography Monographs) 2011, (ed. by Letzel T), RSC, Publishing pp. 26-37.

c. 招待講演、シンポジウムなど

1. Tamo Fukamizo and Shoko Shinya : Binding Mode of Chitosan Oligosaccharides to Novel Chitosan-Specific Carbohydrate-Binding Modules (CBM32) of a Chitosanase from *Paenibacillus* sp. IK-5, Keynote Lecture of Biological Materials Workshop at 8th KIFEE International Symposium on Environment, Energy and Materials, Trondheim, Norway, Sept. 20-23th, 2015
2. 大沼貴之、日本応用糖質科学会奨励賞受賞講演、「キチン質分解酵素の構造と機能および利用に関する研究」、奈良県春日野国際フォーラム、2015年9月17日。
3. 新家粧子、西村重徳、北奥喜仁、木元久、草桶秀夫、沼田倫征、大沼貴之、深溝慶、「溶液 NMR 法と X 線結晶解析によるキトサン結合モジュールとキトサンの相互作用解析、応用糖質科学シンポジウム、2015年9月18日、東大寺総合文化センター・金鐘ホール。
4. 大沼貴之：キチンオリゴ糖の酵素合成を目指した植物キチナーゼのエンジニアリング、第43回 GRL 静岡セミナー、静岡大学、2014年9月18日。
5. Tamo Fukamizo: Keynote Lecture “Crystal structures of family GH19 chitinases complexed with chitooligomers revealed the difference in the substrate-binding mode between loopful and loopless enzymes”, 10th Conference of Insect Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, China, Jun. 15-19, 2013.
6. Tamo Fukamizo: Keynote Lecture “The Mode of Action of Chitinolytic Enzymes: Production of Bioactive Oligosaccharides as Animal Nutrients”, 3rd AINI International Seminar “The role of Nutrition and Feed in Supporting Self Sufficient in Animal Products, Food Safety and Human Welfare”, Andalas University, Padang, Indonesia, 24-25 September, 2013.
7. Tamo Fukamizo: “Crystal structures and engineering of plant family GH18 chitinases”, Biochemistry Special Lecture for Graduate Students, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, Jun. 15-19, 2013.
8. 大沼貴之、深溝慶、Family GH-19 キチナーゼに関する新しい知見、日本応用糖質科学会平成 23 年度大会特別シンポジウム「応用糖質科学研究の新時代を拓く」、北大学術交流会館、2011年9月29日。
9. Tamo Fukamizo: an Invited Lecture “Plant Chitinases: New Insights from Crystallography, Substrate Binding, and Engineering Studies”, 9th Asian Pacific Chitin/Chitosan Symposium, Yasaka Saigon Hotel, Nha Trang, Vietnam, Aug. 3-6, 2011.

d. 国際学会発表（一般講演のみ）

1. Tamo Fukamizo: Crystal structures and engineering of plant family GH18 chitinases. Oral presentation at the 5th International Conference of Insect Physiology, Biochemistry and Molecular Biology (IPBMB 2015), Sun Yat-sen Univeristy (135 West Xingang Road, Haizhu District, Guangzhou), China, June 15th - 18th, 2015.
2. Takayuki Ohnuma, Satoshi Dozen and Tamo Fukamizo: Chemo-enzymatic synthesis of chitoheptaose using a glycosynthase derived from an inverting chitinase with an extended binding cleft. 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM10), Helsinki, Finland, 10-13 May 2015.
3. Yoshihito Kitaoku, Toki Taira, Tomoyuki Numata, Tamo Fukamizo, Takayuki Ohnuma: Structural and functional insights into the CBM50modules attached to the plant GH18 chitinases. 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM10), Helsinki, Finland, 10-13 May 2015.
4. Takayuki Ohnuma, Satoshi Dozen and Tamo Fukamizo: Chemo-enzymatic synthesis of chitoheptaose using a glycosynthase derived from an inverting chitinase with an extended binding cleft, 12th International Conference of the European Chitin Society, Münster, Germany, August 30th to September 2nd, 2015.
5. Takayuki Ohnuma: Chemo-enzymatic synthesis of chitoheptaose using a glycosynthase derived from an inverting chitinase with extended binding cleft, Oral presentation at Mie Bioforum 2014,

- Ise-shima, Japan, 18-21th Nov. 2014.
6. Yoshihito, Kitaoku, Takayuki Ohnuma, Toki Taira, Tamo Fukamizo: Characterization of a GH18 chitin's containing a family 50 carbohydrate-binding module from a horsetail, *Equisetum arvense*, Poster presentation at the Mie Bioforum 2014 Lignocellulose Degradation and Biorefinery, Mie, Japan, 18-21st Nov. 2014.
 7. Shoko Shinya, Shigenori Nishimura, Hisashi Kimoto, Hideo Kusaoke, Takayuki Ohnuma, Tamo Fukamizo: Chitosan-binding modules (CBM32) of a chitosanase from *Paenibacillus* sp. IK-5, Poster presentation at Mie Bioforum 2014, Ise-Shima, Japan, 18-21th Nov. 2014.
 8. Shoko Shinya, Takayuki Ohnuma, Hisashi Kimoto, Hideo Kusaoke, Tamo Fukamizo: Chitosan-binding modules (CBM32) of a chitosanase from *Paenibacillus* sp. IK-5--- Amino acid residues responsible for chitosan binding---. Poster presentation at the 28th annual symposium of the protein society, SanDiego, USA, 27-30th Jul. 2014.
 9. Tamo Fukamizo, Naoyuki Umemoto, Takayuki Ohnuma, Toki Taira, Tomoyuki Numata: Crystal structure of a family GH18 (class V) chitinase from cycad, *Cycas revolute*. Poster presentation at the 28th annual symposium of the protein society, SanDiego, USA, 27-30th Jul. 2014.
 10. Takayuki Ohnuma, Naoyuki Umemoto, Toki Taira, Tomoyuki Numata, Tamo Fukamizo: Structural Basis for chitin oligosaccharide recognition by plant chitinases and their antifungal activity, Poster presentation at XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Rhodes, Greece, 6-10th Jul. 2014.
 11. Yoshihito. Kitaoku, Takayuki Ohnuma, Toki Taira, Tamo Fukamizo: A class III chitin's containing LysM domain from *Equisetum arvense*: role of LysM domain in the enzymatic activity, Poster presentation at the XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions 2014, Rhodes, Greece, 6-10th Jul. 2014.
 12. Shoko Shinya, Takayuki Ohnuma, Reina Yamashiro, Padmanabhan Anbazhagan, André H. Juffer, Hisashi Kimoto, Hideo Kusaoke, Tamo Fukamizo : Binding Mode of Chitosan Oligosaccharides to Novel Chitosan-Specific Carbohydrate-Binding Modules (CBM32) of a Chitosanase from *Paenibacillus* sp. IK-5, Oral presentation at 7th KIFEE International Symposium on Environment, Energy and Materials, Kyoto, Japan, 16-19th Mar. 2014.
 13. Tamo Fukamizo: Plant family GH19 chitinases: Crystal structures of enzyme-substrate complexes, Oral presentation at the 10th Asia Pacific Chitin & Chitosan Symposium, Yonago, Japan, 4-8th Oct. 2013.
 14. Takayuki Ohnuma, Satoshi Dozen, Yuji Honda, Motomitsu Kitaoka, Tamo Fukamizo: A glycosynthase derived from a "loopful" family GH19 chitinase from *Secale cereal*. Chemo-enzymatic synthesis of chitoheptaose, Oral presentation at the 10th Asia Pacific Chitin & Chitosan Symposium, Yonago, Japan, 4-8th Oct. 2013.
 15. Ohnuma T, Fukuda T, Dozen S, Shinya S, Numata T, Honda Y, Kitaoka M, Fukamizo, T A novel glycosynthase derived from an inverting family GH19 chitinase The 26th International Carbohydrate Symposium, Madrid, Spain, July 23, 2012.
 16. Ohnuma T, Umemoto N, Shinya S, Numata T, Fukamizo T Structure, function, and engineering of plant family GH-18 chitinases 12th International Conference on Chitin and Chitosan, Fortaleza, Brazil, Sept 3, 2012.
 17. Umemoto N, Ogata M, Suzuki A, Ohnuma T, Numata T, Usui T, Fukamizo T X-ray crystal structure analysis of lysozyme in a complex with new inhibitors, N-acetylchitooligosyl deoxynojirimycin (GN_n-M) 12th International Conference on Chitin and Chitosan, Fortaleza, Brazil, Sept 3, 2012.
 18. Shinya S, Matsumoto M, Takeuchi H, Ohnuma T, Kimoto H, Kusaoke H, Fukamizo T A novel chitosan-specific carbohydrate-binding module of Family GH-8 chitosanase from *Paenibacillus* sp. IK-5 12th International Conference on Chitin and Chitosan, Fortaleza, Brazil, Sept 3, 2012.
 19. Ohnuma T and Fukamizo T A novel glycosynthase derived from an inverting family GH19 chitinase, 6th Kyoto International Forum for Energy and Environment (KIFEE) Symposium, Trondheim, Norway, Sept 11, 2012.
 20. Ohnuma, T., Fukamizo, T., Sørli, M., Numata, T., Honda, Y., Family GH19 chitinase: New insights from crystallography, binding study, and engineering into a glycosynthase, 9th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Lisbon, Portugal, May 16, 2011.

21. Umemoto, N., Yamamoto, T., Sato, H., Ohnuma, T., Urpilainen, H., Mizuhara, M., Fukamizo, T., Structural and mutational analysis of plant class V chitinase, 10th International Conference of the European Chitin Society, St. Petersburg, Russia, May 21, 2011.
22. Shinya, S., Nagata, T., Ohnuma, T., Kawamura, S., Torikata, T., Taira, T., Nishimura, S., Fukamizo, T., Substrate binding to Family GH-23 lysozyme and Family GH-19 chitinase as determined by NMR spectroscopy, 16th European Carbohydrate Symposium, Sorrento, Italy, July 5, 2011.
23. Fukamizo, T., Ohnuma, T., Shoko, S., Nagata, T., Fukuda, T., Sørli, M., Honda, Y., Taira, T., Family GH19 chitinase from moss: New insights from NMR spectroscopy, ITC experiments, and engineering into a glycosynthase, 16th European Carbohydrate Symposium, Sorrento, Italy, July 5, 2011.

e. 国内学会発表件数（一般講演のみ）

- 2016年 日本農芸化学会 5件
 2015年 日本農芸化学会 6件、日本応用糖質科学会 3件、日本キチンキトサン学会 3件、
 2014年 日本農芸化学会 5件、日本応用糖質科学会 5件、日本キチンキトサン学会 5件
 関西グライコサイエンスフォーラム 1件
 2013年 日本農芸化学会 5件、日本応用糖質科学会 5件、日本キチンキトサン学会 7件
 関西グライコサイエンスフォーラム 1件
 2012年 日本農芸化学会 8件、日本応用糖質科学会 4件、日本キチンキトサン学会 4件
 2011年 日本農芸化学会 5件、日本応用糖質科学会 5件、日本キチンキトサン学会 4件

合計 81件

d. 特許 なし

e. その他（学会賞、報道など）

1. 大沼貴之：平成 27 年度日本応用糖質科学会奨励賞受賞、キチン質分解酵素の構造と機能および利用に関する研究」奈良県春日野国際フォーラム、2015 年 9 月 17 日。
2. 北奥喜仁：日本農芸化学会関西支部例会（第 487 回講演会）支部賛助企業特別賞：LysM ドメインの構造と機能：Receptor 型 LysM と Carbohydrate-Binding Module 型 LysM との比較、神戸大学、2014 年 12 月 6 日。
3. Yoshihito Kitaoku: Excellent Poster Award at the Mie Bioforum 2014 Lignocellulose Degradation and Biorefinery, “Characterization of a GH18 chitin’ s containing a family 50 carbohydrate-binding module from a horsetail, *Equisetum arvense*” Poster presentation Mie, Japan, 18-21st Nov. 2014
4. 北奥喜仁：第 28 会キチン・キトサンシンポジウム、ポスター賞：植物由来ファミリーGH18 キチナーゼがもつ LysM ドメインの構造と機能、順天堂大学（東京）、2014 年 8 月 7 日。
5. 新家粧子：第 15 回関西グライコサイエンスフォーラム口頭発表奨励賞：*Paenibacillus* sp. IK-5 キトサナーゼの CBM32 キトサン結合モジュールリガンド結合に関与するアミノ酸残基、大阪市立大学、2014 年 5 月 24 日。
6. Shoko Shinya: Young Author’ s Award at the 7th KIFEE International Symposium on Environment, Energy and Materials : Binding Mode of Chitosan Oligosaccharides to Novel Chitosan-Specific Carbohydrate-Binding Modules (CBM32) of a Chitosanase from *Paenibacillus* sp. IK-5, Kyoto, Japan, 16-19th Mar. 2014.
7. 新家粧子：第 10 回アジア・太平洋キチン・キトサン国際シンポジウム・ポスター賞” Binding mode of chitosan oligosaccharides to novel chitosan-specific

- carbohydrate-binding module (CBM32) of a chitosanase from *Paenibacillus* sp. IK-5”
米子、ビッグシップ、2013年10月4日～8日.
8. 竹中祥子：第10回アジア・太平洋キチン・キトサン国際シンポジウム () ポスター賞
「Interaction of partially-N-acetylated chitooligosaccharides with a family GH19
chitinase from moss *Bryum coronatum*」米子、ビッグシップ、2013年10月4日～8日.
 9. 深溝 慶：キトサン結合タンパク質を発見。奈良新聞 (平成25年9月5日)、福井新聞 (平
成25年9月5日)、化学工業日報 (平成25年9月6日)、日経産業新聞 (平成25年9月
6日)、毎日新聞 (平成25年9月8日)、讀賣新聞 (平成25年9月30日)
 10. 梅本尚之：第14回関西グライコサイエンスフォーラム最優秀講演賞、「新規糖誘導体 N-
アセチルキトオリゴシルモラノリンの阻害特性：GH22 リゾチームと Family GH19 キチナ
ーゼの阻害」大阪大学、2013年5月25日.
 11. 梅本尚之：日本農芸化学会関西支部第477回講演会・若手優秀発表賞「新規リゾチーム
阻害剤，N-アセチルキトオリゴシルモラノリン (GN_n-M)：リゾチームおよび Family
GH19 キチナーゼに対する阻害機構」神戸大学、2012年12月1日.
 12. 新家粧子：第26回キチン・キトサンシンポジウム・ポスター賞「*Paenibacillus* sp. IK-5
Family GH-8 キトサナーゼに存在する新規のキトサン特異的糖質結合モジュール」北海道
大学、2012年7月12日(木)～13日
 13. 新家粧子：日本農芸化学会関西支部第472回講演会若手優秀発表賞「リゾチームスーパ
ーファミリーに属する酵素の基質結合様式に関する研究：NMRによる解析」神戸大学、2011
年12月10日.

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～平成 27 年度)
研究成果最終報告書

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：准教授：森本正則、講師：伊原誠

研究員：菊田幸雄、植田浩一

RA：古谷章悟、阪森宏治

実験補助：竹内孝幸、宇都宮麻衣、安達元希、山崎智穂子

その他：武田健吾、光森智紀、山田現

1. 研究の目的

植物は動物のように攻撃者から身を守るために逃避することができないため、多重の防御機構を備えている。植物の防御機構は直接防御と間接防御に大別され、前者の例として植食者を忌避あるいは弱体化させる二次代謝物質の蓄積を、後者例として揮発性化合物を介した植物の免疫力の向上と天敵の誘引がある。これらの現象は、総じて、ケミカルリガンドによる生物間相互作用の制御と捉えることができる。

本研究では、除虫菊による天然殺虫剤ピレスリンの生合成を一つの中心課題として、その生合成と揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compounds, VOCs) によるその調節機構を設定する。とくにピレスリン生合成の調節では、傷害ストレスに応じて放出される VOCs による調節機構に焦点を絞って研究する。さらに間接誘導防衛機構では、微生物の関与を念頭に置いて、植食者を介した微生物の感染に対する植物応答による植食者の防御や、植物成分を含有する培地で生育させた糸状菌が植物因子を認識して生合成する昆虫制御物質の活性発現機構と昆虫選択性を解明することを目的とする。

これら一連の研究を通じて、植食者に対する植物の防御機構を、生物間相互作用を媒介するケミカルリガンドの意義について理解を深めたので、以下にその概要を記す。

2. 研究内容

1) 揮発性物質による Plant-Plant Communication を介したピレスリン生合成の制御

植物は動くことによって危機を脱することができないため、様々な種類の VOCs を SOS 信号として放出する。これを受容した同種の植物は、被害を受けている植物の状況を知り、来るべき将来の危機に備えて抵抗性を強化する。植物で理解されつつあるこうした Plant-Plant Communication の原理を深く解明するため、本研究ではキク科植物・除虫菊 (*Tanacetum cinerariifolium*) を採用した。除虫菊は古来より天然殺虫剤ピレスリンを生合成することで知られている。ピレスリンは、シクロプロパン環を持つ酸部 (菊酸) とシクロペンテノン環を持つアルコール (レスロロン) とのエステル化合物である。その酸部で 2 種 (第一菊酸と第二菊酸)、アルコール部で 3 種 (ピレスロロン、シネロロン、ジャスモロロン) のバリエーションがあるため、ピレスリンは計 6 種の類縁体で構成される (図 1)。

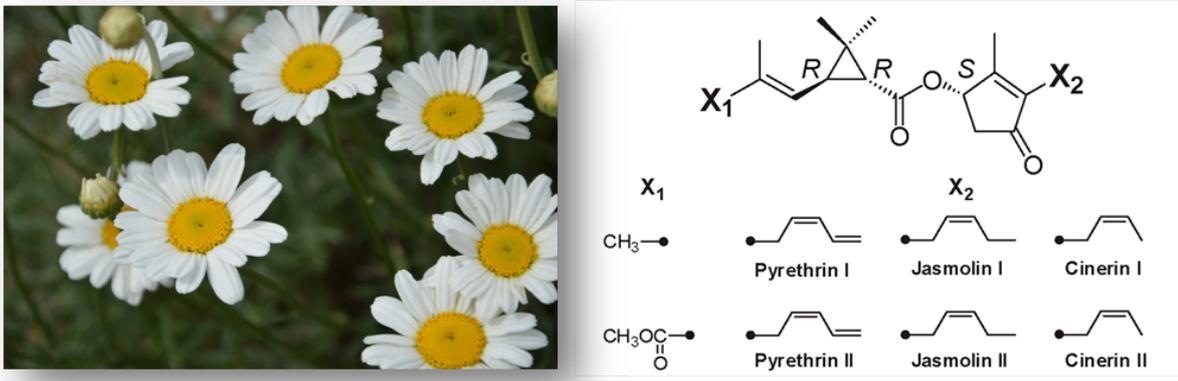


図 1 除虫菊が生合成する天然殺虫剤ピレスリン

除虫菊幼苗に対して物理的傷害を与えると図 2 のように傷害を与える前には見られない VOCs が生じた。VOCs は傷害後の時間の経過とともにダイナミックに変動した。すなわち、傷害を与えた直後は(Z)-3-hexenal や(E)-2-hexenal などの Green Leaf Volatile (GLVs)が生じ、傷害後 30 分以上経過すると、(Z)-3-hexen-1-yl acetate と(E)- β -ファルネセンが生じた。そこで傷害後 30–60 分で生じた VOCs のブレンドを GCMS で定量し、再構成した。一方、こうした傷害誘導的に生じる VOCs を無傷の除虫菊幼苗が受容した時のピレスリンの濃度の変化を調べた。すなわち、傷をつけた幼苗の横に無傷の幼苗を置いたところ、無傷の幼苗のピレスリン含量が有意に上昇した。次に、上記の VOCs ブレンドを綿棒から揮発させて無傷の幼苗に処理したところ、この場合も無傷の幼苗のピレスリン含量が有意に増加した (図 3)。

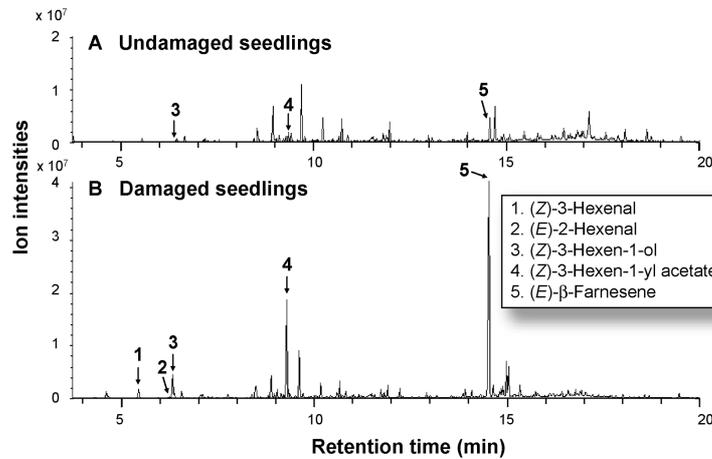


図 2 物理的傷害を与える前と後に除虫菊から生じた VOCs の GCMS クロマトグラム

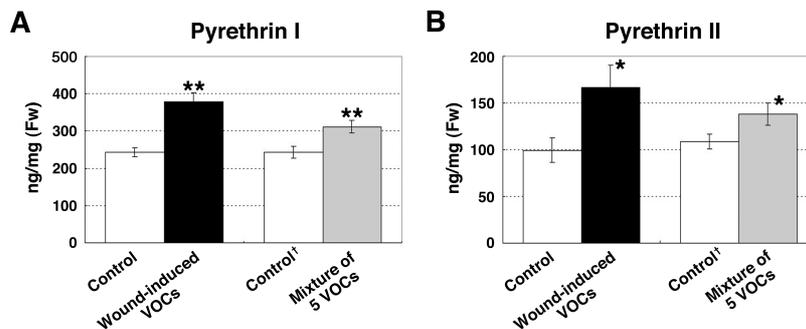


図 3 傷害揮発性物質を受容した無傷の除虫菊幼苗のピレスリン濃度の変化

A 傷害を与えた幼苗の横においた場合; B 傷害誘導性 VOCs のブレンドを受容した場合

これまでに著者らはピレスリンの生合成の概要について調べ、酸部は MEP 経路で、アルコール部はオキシリピン経路で生合成されることを明らかにしている (図 4)。DXS (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase)、CDS (chrysanthemyl diphosphate synthase)、LOX (lipoxygenase)、AOS (allene oxide synthase) 遺伝子の発現変動を指標に傷害誘導性 VOCs によるピレスリン生合成の活性化について検討した。その結果、とくに CDS 遺伝子の発現が他の遺伝子に比べて顕著に VOCs 感受性を示した。VOCs の成分のうち、一つでも欠損させると CDS の発現促進作用が低下したことから、傷害誘導性の VOCs はブレンドとしてピレスリン生合成を活性化する作用を持つことが示唆された。

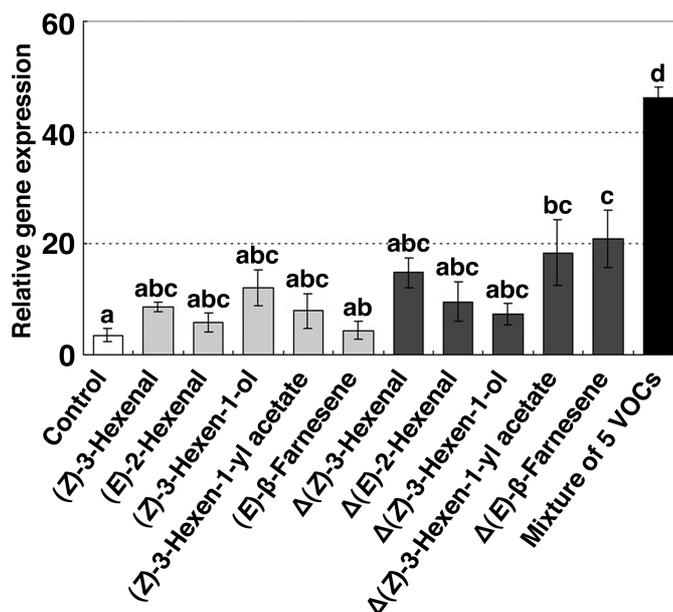


図 4 VOCs を単独または様々な組み合わせで処理した除虫菊幼苗での CDS 遺伝子の発現。アルファベットは ANOVA で分析したときの有意差の有無を示している。

ピレスリンは昆虫に対する防御物質としてつくられると仮定すると、傷害応答性を示すと推定された。しかし、傷害を与える自らが放出する VOCs に被曝する。そこで傷害を与えた部位に袋掛けをしたものとしなないもので、袋掛けをしてない居場所での除虫菊幼苗のピレスリン量を、傷害を与える前と比較した (図 5、6)。

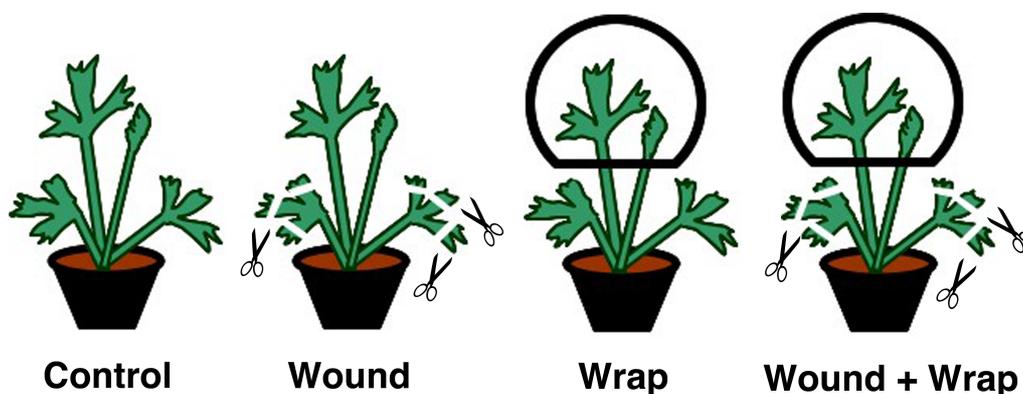


図 5 物理的傷害によって生じるピレスリン生合成の変化 (VOCs の自己被ばくの効果を配慮)

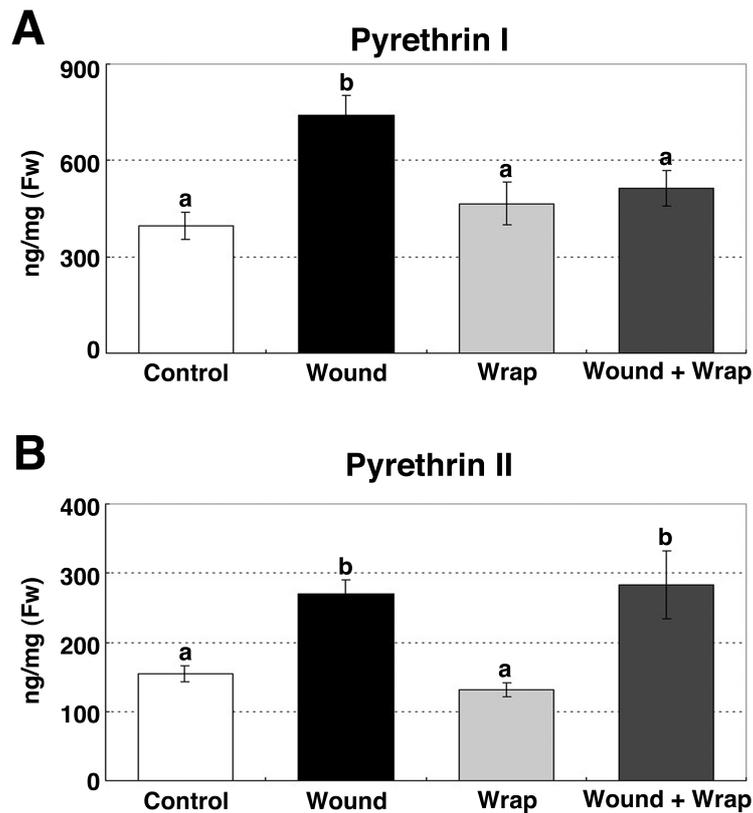


図 6 除虫菊でのピレスリン生合成の傷害応答

物理的傷害を与えると幼苗内のピレスリン I、II、とも有意に増大した。しかし、傷害を与えたところに袋掛けをした場合、袋掛けをしていないところでのピレスリン I の増大量は顕著でないか、ピレスリン II は袋掛けをしていない場合と大差なく増大した。こうした結果から、ピレスリン I から II への変換酵素遺伝子 (図 7) は、観察した時点では、VOCs よりも植物内を通るシグナル分子により依存して調節されている可能性が示唆された。

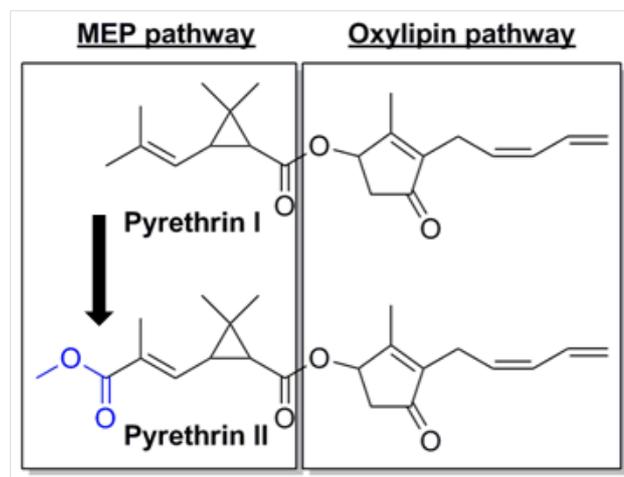


図 7 ピレスリン I から II への変換：そこには酸化代謝とメチル基転移反応が関与

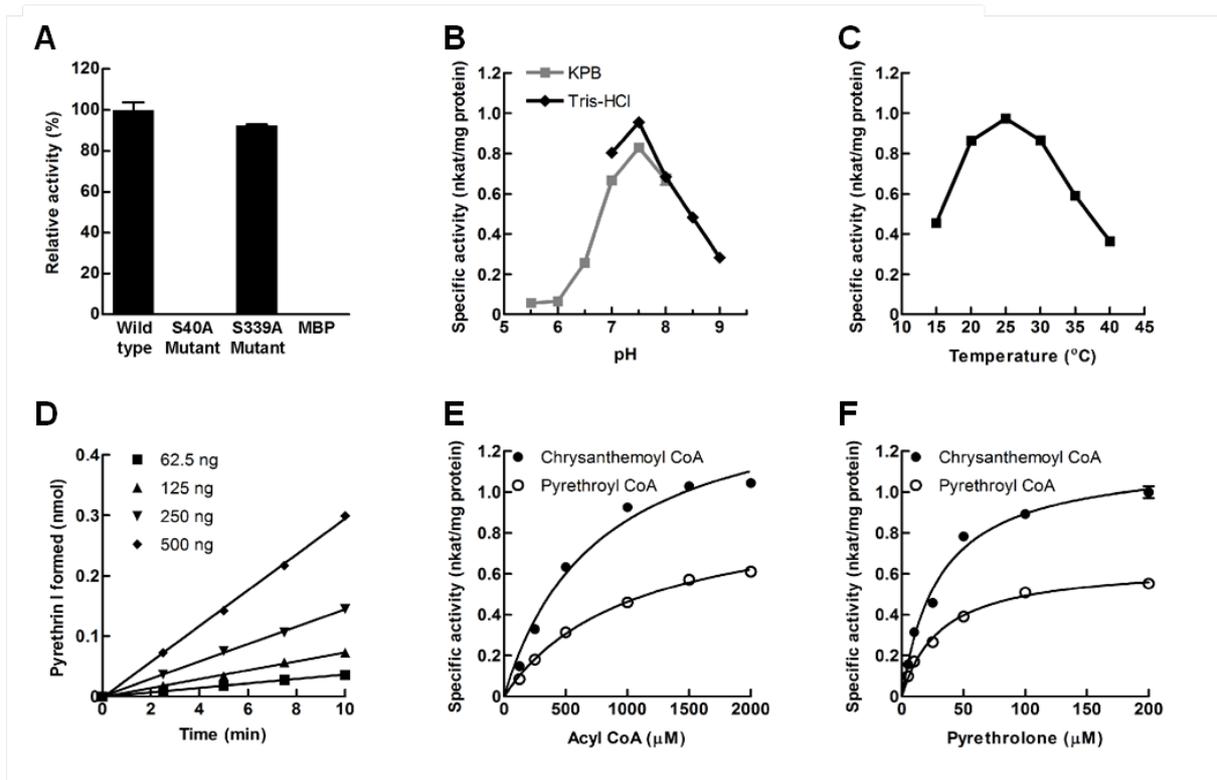


図 10 ピレスリン生合成の最終ステップを担う GDSL リパーゼの特性解析

A 部位特異的変異と酵素活性；B 酵素活性に対する pH の影響；C 酵素活性に対する温度の影響；D 酵素活性に対する反応時間および蛋白質質量の影響；E 酵素活性に対するアシル部基質の濃度変化の影響；F 酵素活性に対するピレスロロンの濃度変化の影響

TcGLIP のキネティクスを求めるため、まず MBP 融合蛋白質として発現させた本酵素のピレスリン合成活性に対する酵素蛋白質量と反応時間との関係について検討し、どちらも活性に対して直線関係が成立することを確認した。そこで、アシル CoA とピレスロロンのキネティクスを解析し、菊酸 CoA は数百 μM 、ピレスロロンは数十 μM の親和性を持つことが明らかとなった。次に、TcGLIP の基質特異性を求めるために、アルコール部をベンジルアルコール、あるいはアシル部を安息香酸の CoA エステルに置換した場合の TcGLIP のエステル合成活性について調べ、どちらの場合もエステルが生成しないことを見出した (図 11)。

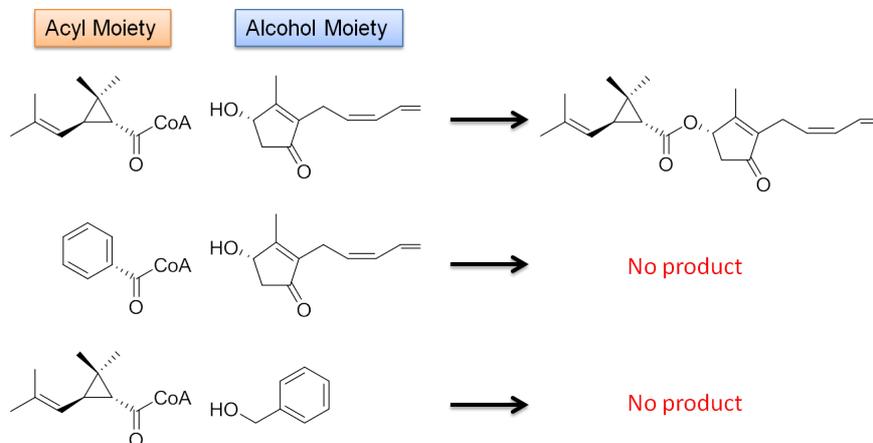


図 11 TcGLIP の基質特異性：アシル部およびアルコールの大きな構造変化と酵素活性

さらに TcGLIP の基質認識の厳密性を明らかにするため、菊酸の2つの不斉炭素に由来する4つの菊酸 CoA の立体異性体と、ピレスロロンの一つの不斉炭素に由来する2つのピレスロロンの立体異性体をそれぞれ合成し (図 12)、それぞれの立体異性体に対する TcGLIP の選好性を調べた。その結果、TcGLIP は、アシル部、アルコール部のどちらにおいても、不斉炭素の絶対配置が天然物と同じでないと、効率良くエステル合成反応を触媒しないことが初めて明らかになった (表 1)。

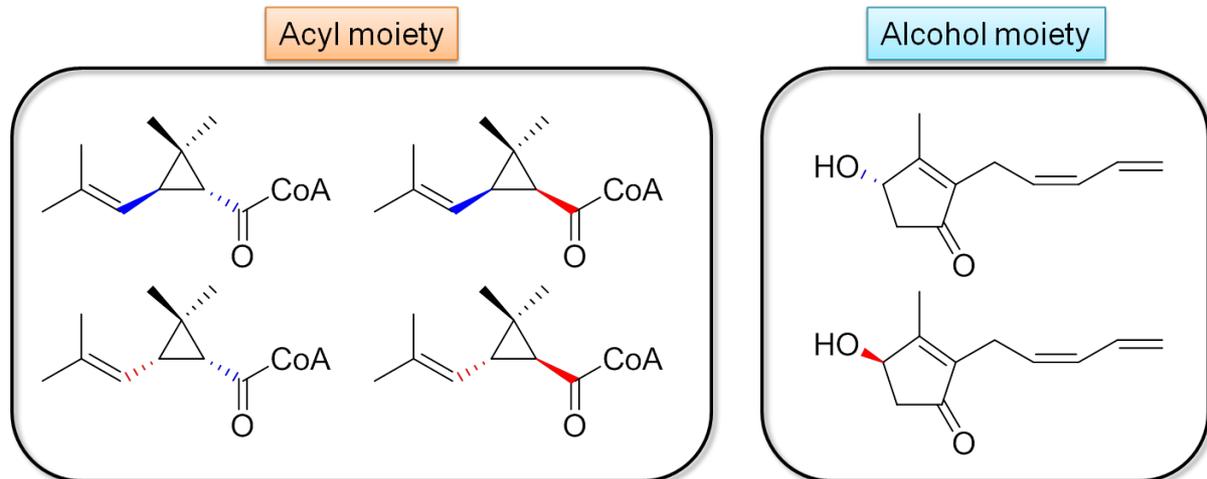
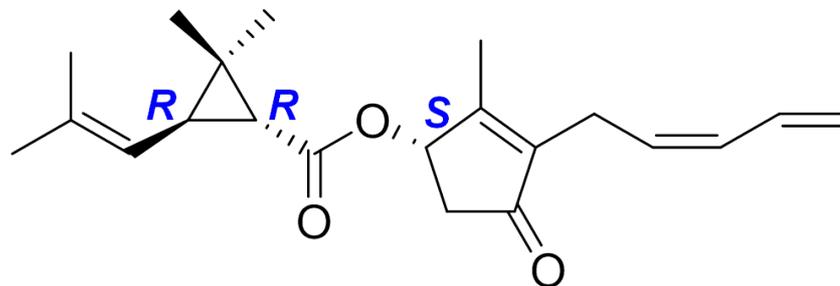


図 12 天然基質とその立体異性体

表 1 基質の立体配置と TcGLIP の酵素活性



Acyl moiety	Alcohol moiety	Relative activity (%)
(1 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-Chrysanthemoyl CoA	(<i>S</i>)-Pyrethrolone	100
(1 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)-Chrysanthemoyl CoA	(<i>S</i>)-Pyrethrolone	15.0
(1 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-Chrysanthemoyl CoA	(<i>S</i>)-Pyrethrolone	23.9
(1 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-Chrysanthemoyl CoA	(<i>S</i>)-Pyrethrolone	7.2
(1 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-Chrysanthemoyl CoA	(<i>R</i>)-Pyrethrolone	9.4

C 末端に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を融合させて TcGLIP の局在について調べてみたところ、本酵素はアポプラストに局在し、あたかもシールドとして機能しているように見えた (図 13)。このことは、ピレスリンが昆虫抵抗性因子であることと矛盾しない。

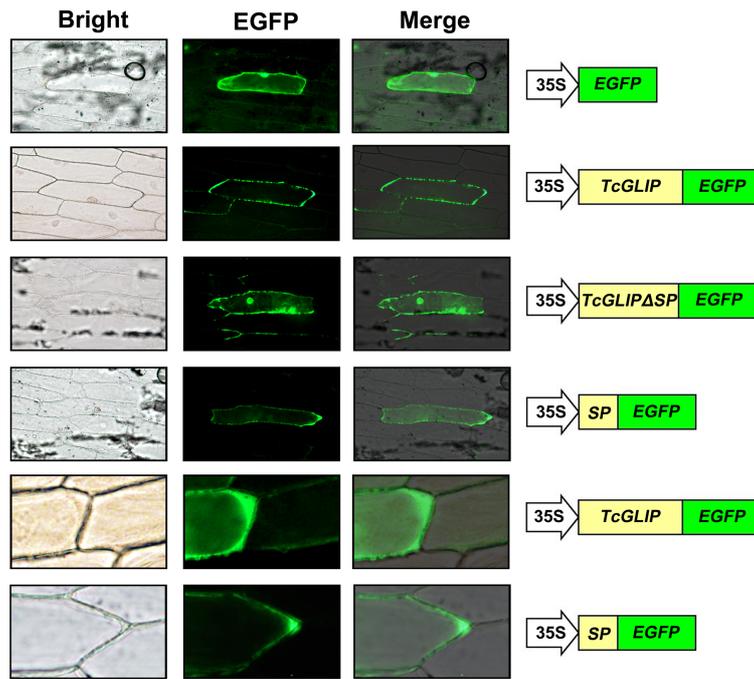


図 13 TcGLIP あるいはシグナルペプチド-GFP 融合蛋白質の植物細胞中での局在

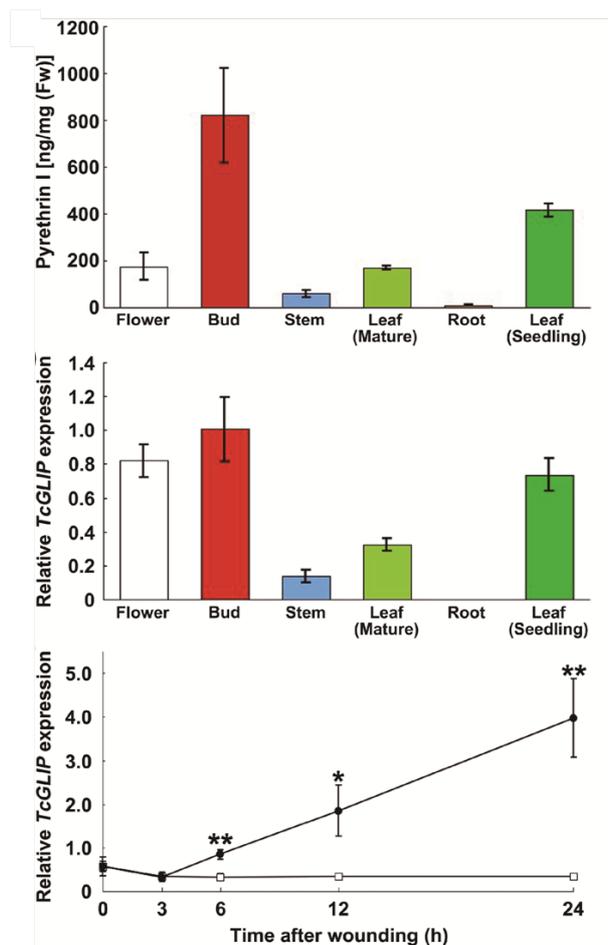


図 14 除虫菊のピレスリン量(上)、TcGLIP 発現量 (中) および TcGLIP の傷害応答
TcGLIP が真にピレスリン生合成に寄与しているならば、遺伝子の発現量とピレスリン量

との間には相関がなくてはならない。本酵素遺伝子の発現量と除虫菊の各部位のピレスリン量との間の関係について調べてみると、高い相関が認められた (図 14)。また、遺伝子は物理的傷害に対して応答性を示し、傷害 24 時間後まで増幅が観察された (図 14)。以上の結果から、TcGLIP はピレスリン生合成において重要な役割を果たし、かつ除虫菊の防御応答に貢献していることが初めて明らかとなった。

3) ピレスリン生合成酵素 TcGLIP の触媒機構

GDSL リパーゼの一種 TcGLIP がピレスリン生合成に関与することは証明した。その際、TcGLIP の機能解析ではそれを MBP 融合蛋白質として発現させた。しかし MBP が TcGLIP に対してどの程度影響を及ぼすのか不明であった。そこで MBP 融合蛋白質として発現させた TcGLIP をプロテアーゼにより切断し (図 15)、切断前とキネティクスを比較した (表 2)。その結果、MBP は TcGLIP のキネティクスには影響を及ぼさないことが明らかとなった。

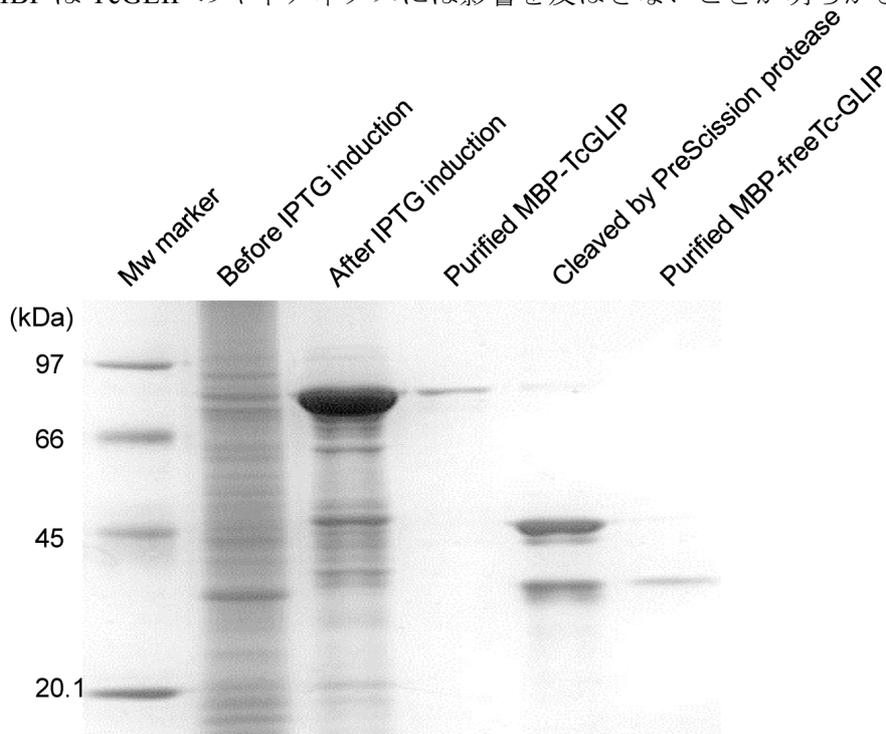


図 15 MBP-TcGLIP 融合蛋白質からの MBP の除去

表 2 MBP 融合型の TcGLIP と MBP を持たない TcGLIP のキネティクスの比較

Substrates (TcGLIP status)	K_m (μ M)	V_{max} [nkat (mg protein) $^{-1}$]	kcat (s^{-1})	kcat/ K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
Chrysanthemoyl CoA (MBP-fused)	750.8 ± 100.8	1.53 ± 0.08	0.125 ± 0.007	166.9
Pyrethrolone (MBP-fused)	29.5 ± 2.0	1.17 ± 0.03	0.095 ± 0.002	3229
Chrysanthemoyl CoA (<u>MBP-FREE</u>)	832.1 ± 105.3	3.24 ± 0.17	0.123 ± 0.007	147.4
Pyrethrolone (<u>MBP-FREE</u>)	33.7 ± 3.5	2.63 ± 0.09	0.100 ± 0.004	2956

TcGLIP の活性中心は GDSL 配列を持ち、アシル基転移反応には触媒三残基とアシル中間体を支えるオキシアニオンホールが必要と推定された。そこで、係る役割を持つと推定されたアミノ酸をアラニンに置換したところ、Asn168 の置換例を除いて活性は消失し、N168A 変異についても、活性は元の 20%にまで低下した (図 16)。

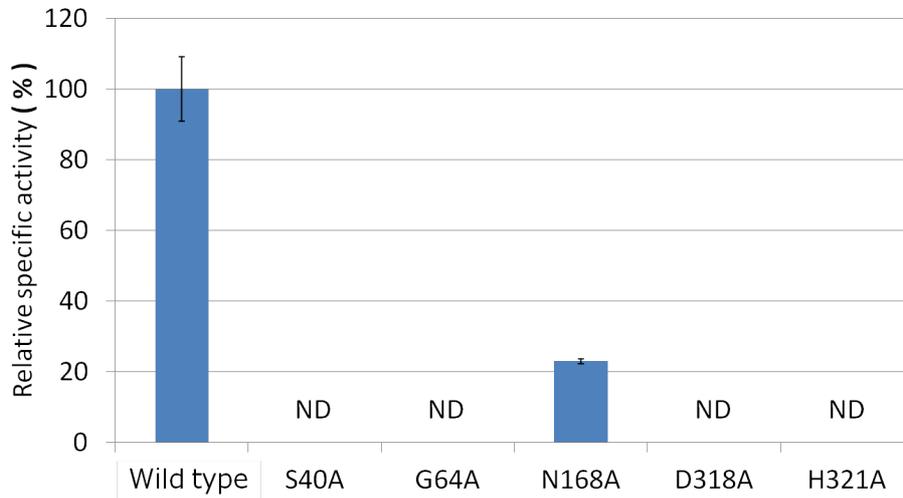


図 15 部位特異的アミノ酸置換による TcGLIP のピレスリン合成活性の変化

このことから、TcGLIP の触媒機構は図 16 の様に行進すると推定された。すなわち、Ser40 が菊酸 CoA のカルボニル基を求核攻撃し、四面体中間体が生成する。この間い生じる負電荷を帯びた酸素を Gly64 と N168 が固定する。続いてレスロロンのヒドロキシ基が Asp318 と H321 との触媒機構で活性化して四面体中間体を攻撃し、CoA が脱離することでピレスリンが生合成されると考えられた (図 17)。

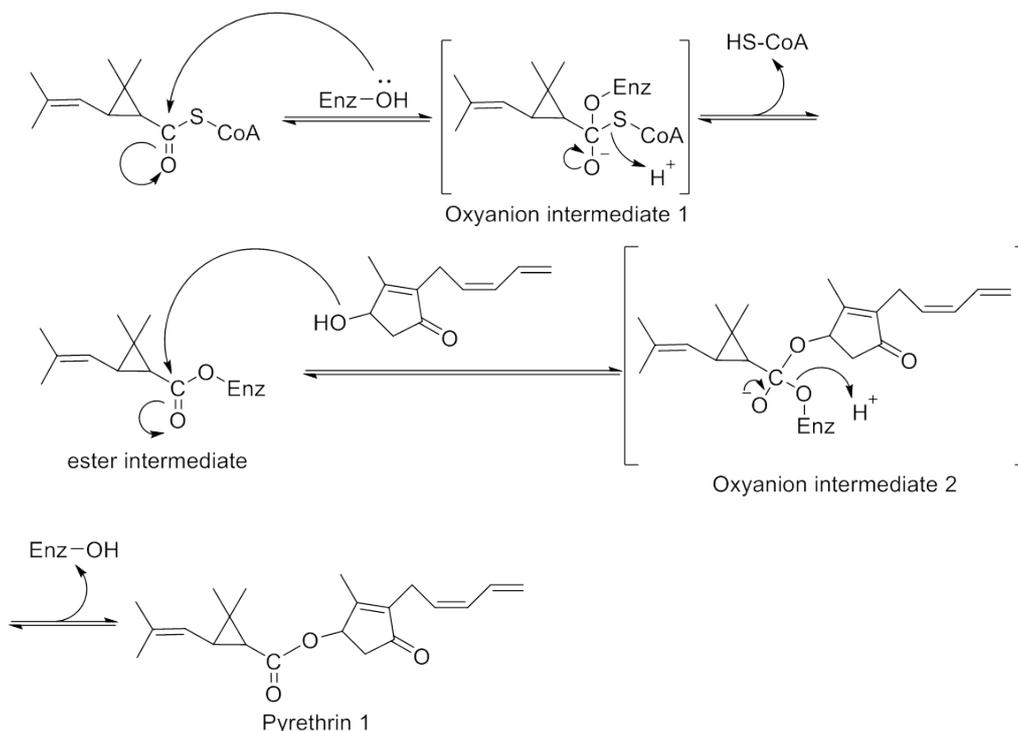


図 16 TcGLIP のピレスリン合成活性の推定触媒機構

4) 植物因子に誘導されて糸状菌が生産する殺虫性物質に関する研究

糸状菌は様々な生理活性物質を生産し、その多様性は培地の成分によってダイナミックに変化する。糸状菌はマイコトキシンを作ることで有名である。そのため、糸状菌を用いて植物保護に有用な物質を探索しようとする研究は少ない。このような状況の中で、林らは、豆腐の製造工程で廃棄物として生じるオカラに着目した。その理由は、廃棄物であるので低コストであり、微生物の培地としての使用例が皆無であったからである。このユニークな培養法を用いて、林らは 1989 年にオカラ培地で培養した糸状菌 *Penicillium simplicissimum* が、食毒試験法でカイコガ幼虫に対して殺虫活性を示す物質としてオカラミン A と B (図 17) を生産することを見出した。本化合物群はインドールアルカロイド骨格を持ち、カイコガ幼虫のみならず、広範囲の害虫類に対して低濃度で殺虫活性を示した。オカラミン類のユニークな構造は著名な合成化学者の目を引き、全合成研究の対象となった。その一方で、オカラミン類の作用機構は長年に渡り不明な状態が続き、本化合物群が昆虫選択的に毒性を発揮するのか、それとも昆虫に選択的に毒性を示すのかについても謎であった。

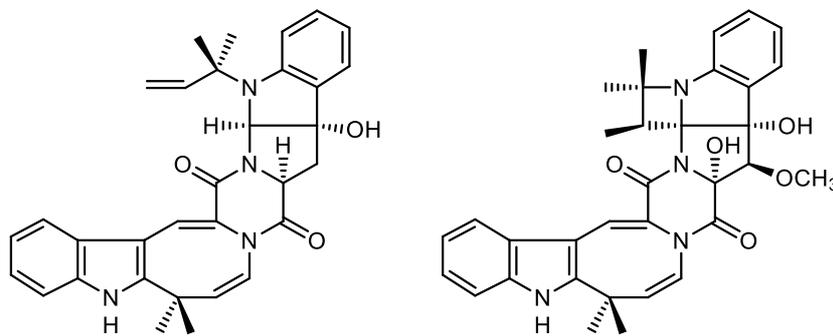


図 17 オカラミン A (左) と B (右)

著者はオカラミンを投与したカイコガ幼虫が比較的短時間で致死するため、オカラミンの作用点は神経系にあるのではないかと推察した。そこで、長年に渡り不明であった本化合物の作用機構を解くため、whole-cell patch-clamp 法を用いてカイコガ幼虫の脳神経細胞で発現するイオンチャネルの応答を記録する技術を確認した (図 18)。

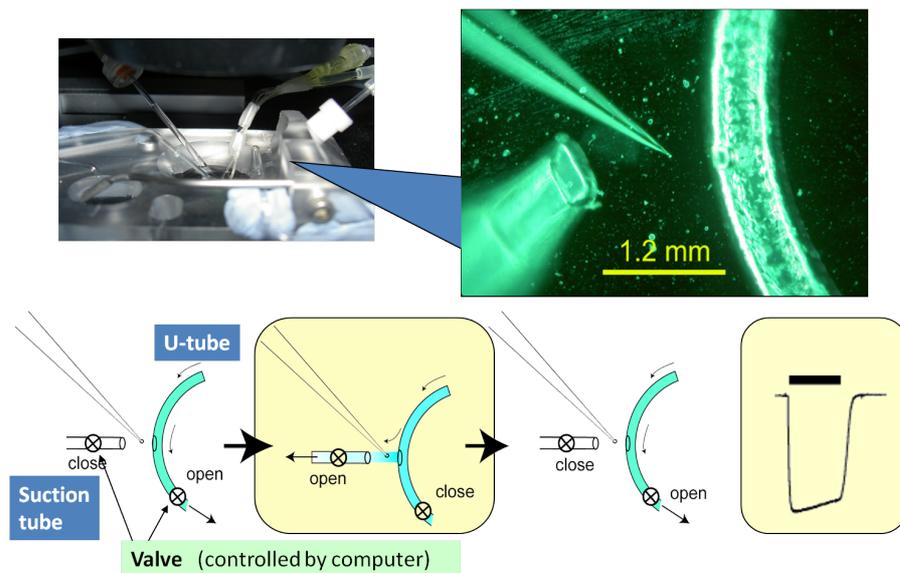


図 18 Whole cell patch clamp 法の概要 アゴニストは U-tube の小孔から処理

Whole-cell patch-clamp 計測技術を用いて、カイコガ幼虫の脳神経細胞に対するオカラミン類の中で最強の殺虫活性を示すオカラミン B の作用を調べた。その結果、本化合物を神経細胞に処理すると細胞に内向きイオン電流を誘起した。オカラミンによって誘導されたイオン電流はニコチン性アセチルコリン受容体阻害剤メカミルアミンでは阻害されず、リガンド作動性塩素チャネル阻害剤であるフィプロニルによって顕著に抑制された (図 19)。さらにオカラミン B によって誘導されるイオン電流の逆転電位を測定したところ、本電位は塩素イオンに対する平衡電位に近い値を示したことから (図 20)、オカラミン B はカイコガ幼虫の脳神経で発現する抑制性塩素チャネルのいずれかを活性化しているものと推察された。

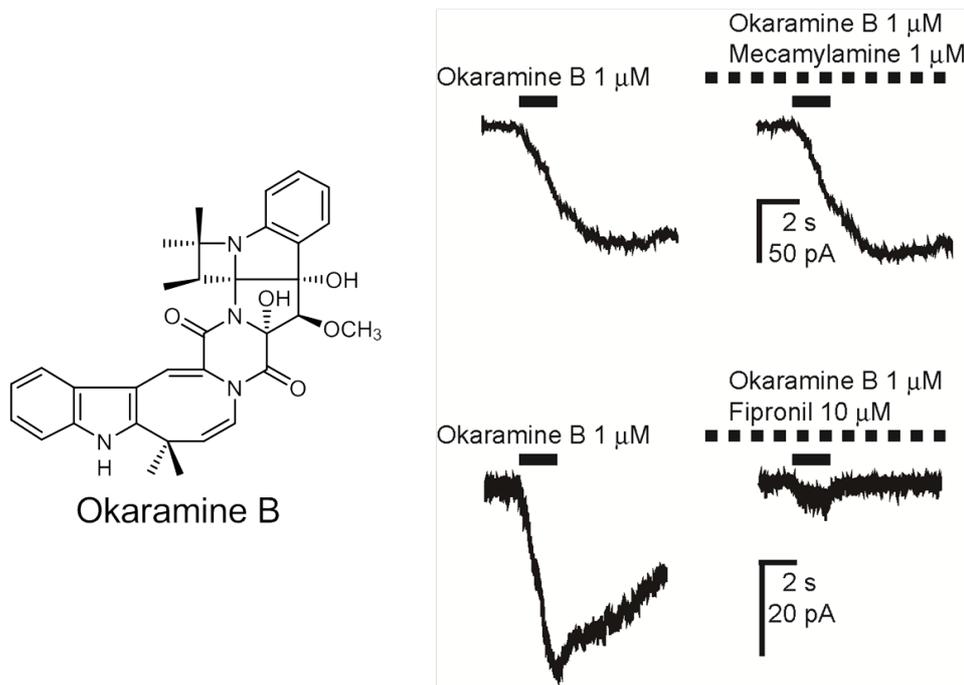


図 19 カイコガ幼虫の脳神経細胞に対するオカラミン B の作用

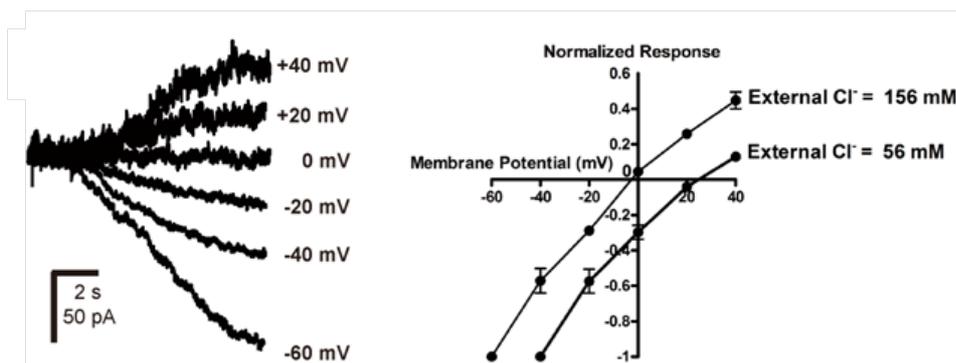


図 20 カイコガ幼虫の脳神経細胞にオカラミン B が誘起したイオン電流の逆転電位測定

カイコガ脳神経細胞では γ -アミノ酪酸受容体(GABA_R)と抑制性グルタミン酸受容体(GluCl) が主なリガンド作動性塩素チャネルとして発現している。そこで、これらの受容体の遺伝子をカイコガから単離した。これらの遺伝子を鋳型として cRNA を *in vitro* で合成し polyA 鎖を付加した後、アフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションした。このようにして発現させた GluCl と GABA_R に対するオカラミン B の活性化作用により生じるイオン電流を、膜電位固定法の一つである two electrode voltage clamp 法で測定した。その結果、化合物は GluCl のみを選択的に活性化し、イオン電流を誘起した (図 21)。また、GluCl

に対する複数のオカラミン類の活性は殺虫活性と高い相関を示したことから (図 22)、オカラミンは GluCl を活性化し、殺虫活性を発揮することが初めて明らかとなった。GluCl は昆虫などの無脊椎動物でのみ見られる受容体であり、こうした受容体に対して選択的に作用する物質が植物生物を含有する培地で著量生産されることから、糸状菌には何らかの植物成分を認識し、植物を守るために殺虫性物質を生産した可能性がある」と推察される。

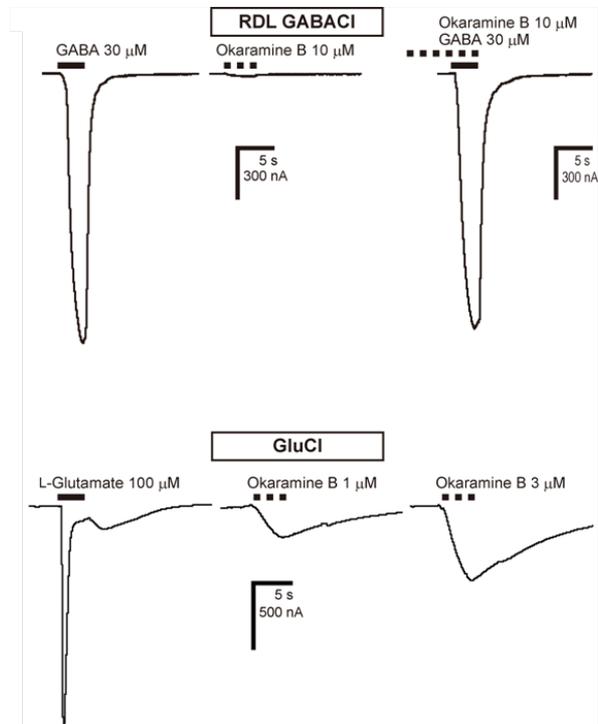


図 21 カイコガ GABAR と GluCl に対するオカラミン B の作用

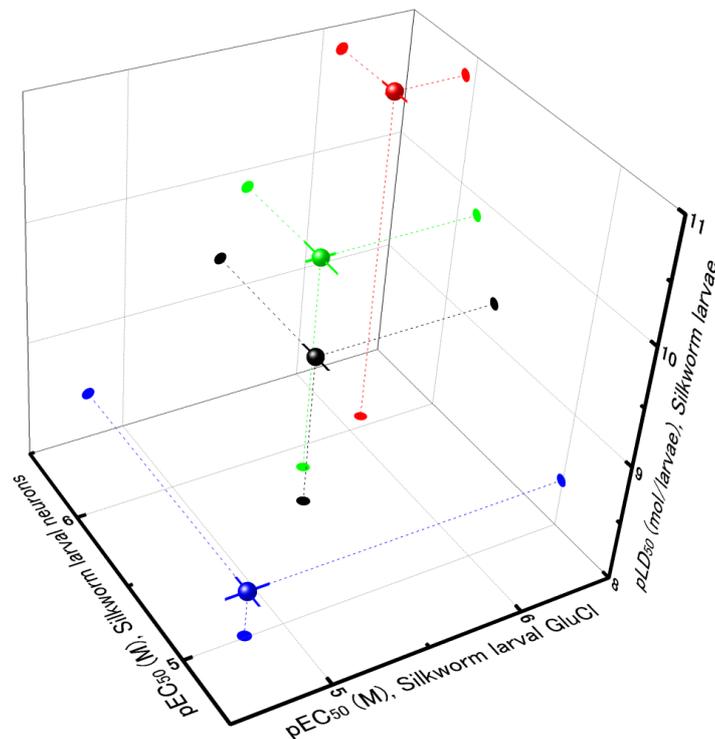


図 22 オカラミン類の GluCl 活性化作用と殺虫活性との関係

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

本研究で、我々は除虫菊がつくる天然殺虫剤ピレスリンの生合成に焦点を当て、傷害誘導的に生じる VOCs による生合成調節機構を調査し、VOCs はブレンドとして生合成を活性化することを見出した。またピレスリンの生合成の頂点ともいべきエステル化反応に関わるアシル基転移活性酵素が GDSL リパーゼであることを発見した。本酵素の触媒機構は部位特異的変異実験によって推測されたが、その反応機構に基づいて強力な阻害剤を生み出し、酵素蛋白質との共結晶の X線結晶構造を解明することが大切である。TcGLIP は加水分解系酵素であるので中間体としてアシル化酵素が生じる。このプロセスをもとに自殺的阻害剤を設計開発することは決して困難ではなく、将来の課題として挑まなければならない。

ピレスリン生合成にはまだ不明な酵素がいくつかある。それをやみくもに探索するのではなく、これまでに見出された酵素の遺伝子発現パターンとの類似性に注目すれば目的とする酵素を同定できる可能性がある。本プロジェクトは5年間を期間としたが、その間に次世代シーケンズ (NGS) 技術が発展した。NGS の技術の中でも RNA-Seq は、対象生物のゲノムの解読の有無によらず発現遺伝子を網羅的に取得することができる。この方法を除虫菊に適用して、候補遺伝子を探索する際に、発現類似性 (共発現性) を利用することが将来の重要課題の一つである。

除虫菊が対昆虫防御物質としてピレスリンをつくるのと同様に、微生物も昆虫制御物質をつくる例が多数知られている。本研究では、植物の一種ダイズの絞りかすであるオカラを培地として *Penicillium* 属の糸状菌がつくる殺虫性物質オカラミンの作用機構を研究し、それが昆虫に特有の GluCl を標的とすることを明らかにした。もしも植物が糸状菌に対して積極的にはたらきかけて昆虫選択的制御物質オカラミンの生産が生じたのであれば、この現象は共生の一種と考えることができる。このことの真偽については、糸状菌を対象を固定せずに、より広い微生物にまで広げて検証していく必要があると考えられる。

4. 研究成果

a. 原著論文

1. Nakatani Y, Furutani S, Ihara M, Matsuda K, Ivermectin modulation of pH-sensitive chloride channels in the silkworm larvae of *Bombyx mori*, Pestic. Biochem. Physiol., in press.
2. Fuse T, Ikeda I, Kita T, Furutani S, Nakajima H, Matsuda K, Ozoe F., Ozoe Y., Synthesis of photoreactive ivermectin B_{1a} derivatives and their actions on *Haemonchus* and *Bombyx* glutamate-gated chloride channels. 2015, Pestic. Biochem. Physiol. 120, 82-90.
3. Mongkol R, Chavasiri W, Ishida M, Matsuda K, Morimoto M, Phytotoxic and antiphytopathogenic compounds from Thai *Alpinia galanga* (L.) Willd. rhizomes. 2015, 15, 87-93.
4. Kikuta Y, Nakayama K, Katsuda Y, Hatanaka A, Yamada G, Mitsumori T, Matsuda K, Variations of the *Tanacetum cinerariifolium* lipase influence its acyltransferase activity for pyrethrin synthesis. 2015, Acta Hort. 1073, 153-156.
5. Xu Y, Furutani S, Ihara M, Ling Y, Yang X, Kai K, Hayashi H, Matsuda K, Meroterpenoid chrodrimanins are selective and potent blockers of insect GABA-gated chloride channels. 2015, PLoS One 10, e0122629.
6. Ihara M, Okajima T, Yamashita A, Oda T, Asano T, Matsui M, Sattelle DB, Matsuda K., Studies on an acetylcholine binding protein identify a basic residue in loop G on the β 1 strand as a new structural determinant of neonicotinoid actions. 2014, Mol. Pharmacol. 86,736-746 (2014).
7. Furutani S, Nakatani Y, Miura Y, Ihara M, Kai K, Hayashi H, Matsuda K, GluCl a target of indole alkaloid okaramines: a 25 year enigma solved. 2014, *Sci. Rep.* 4, 6190.
8. Furutani S, Ihara M, Nishino Y, Akamatsu M, Jones AK, Sattelle DB, Matsuda K, Exon 3 splicing and mutagenesis identify residues influencing cell surface density of heterologously-expressed silkworm (*Bombyx mori*) glutamate-gated chloride channels. 2014, Mol. Pharmacol. 86, 686-895.
9. Lees K, Jones AK, Matsuda K, Akamatsu M, Sattelle DB, Woods DJ, Bowman AS, Functional characterization of a nicotinic acetylcholine receptor α subunit from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. 2014, Int. J. Parasitol. 44, 75-81.

10. Ihara M, Shimadzu N, Utsunomiya M, Akamatsu M, Sattelle DB, Matsuda K, A single amino acid polymorphism in the *Drosophila melanogaster* Dα1 (ALS) subunit enhances neonicotinoid efficacy at Dα1-chicken β2 hybrid nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. 2014, Biosci. Biotechnol. Biochem. 78, 543-549.
11. Kikuta Y, Yamada G, Mitsumori T, Takeuchi T, Nakayama K, Katsuda Y, Hatanaka A, Matsuda K, Catalytic-triad and related amino acids are required for acyltransferase activity of the *Tanacetum cinerariifolium* GDSL lipase/esterase-like enzyme TcGLIP for ester-bond formation in pyrethrin biosynthesis. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2013, 77, 1822-1825.
12. Akiyoshi Y, Ju X.-L, Furutani S, Matsuda K, Ozoe Y, Electrophysiological evidence for 4-isobutyl-3-isopropylbicyclophosphorothionate as a selective blocker of insect GABA-gated chloride channels. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013, 23, 3373-3376.
13. Rahman MM, Akiyoshi Y, Furutani S Matsuda K, Furuta K, Ikeda I, Ozoe Y, Competitive antagonism of insect GABA receptors by iminopyridazine derivatives of GABA. 2012, Bioorg. Med. Chem. 20, 5957-5964.
14. Kikuta Y, Ueda H, Takahashi M, Mitsumori T, Yamada G, Sakamori K, Takeda K, Furutani S, Nakayama K, Katsuda Y, Hatanaka A, Matsuda K, Identification and characterization of a GDSL-lipase like protein that catalyzes the ester forming reaction for pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifolium* - a new target for plant protection. 2012, Plant J. 71, 183-193.
15. Yamaguchi M, Sawa Y, Matsuda K, Ozoe F, Ozoe Y, Amino acid residues of both the extracellular and transmembrane domains influence binding of the antiparasitic agent milbemycin A₄ to *Haemonchus contortus* AVR-14B glutamate-gated chloride channels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012, 419, 562-526.
16. Hiragaki S, Kobayashi T, Ochiai N, Toshima K, Dekeyser MA, Matsuda K and Takeda M, A novel action of highly specific miticide, bifentazate as a synergist for a GABA-gated chloride channel of *Tetranychus urticae* [Acari: Tetranychidae]. 2012, *Neurotoxicology* 33, 307-313.
17. Hirata K Kataoka S, Furutani S, Hayashi H, Matsuda K, A fungal metabolite asperparaline A strongly and selectively blocks insect nicotinic acetylcholine receptors: The first report on the mode of action. 2011, PLoS One 6, e18354.
18. Kikuta Y, Ueda H, Nakayama K, Katsuda Y, Ozawa R, Takabayashi J, Hatanaka A, Matsuda K, Specific regulation of pyrethrin biosynthesis in *Chrysanthemum cinerariaefolium* by a blend of volatiles emitted from artificially damaged conspecific plant. 2011, Plant Cell Physiol. 52, 588-596.
19. Ueda H. and Matsuda K., VOC-mediated within-plant communications and nonvolatile systemic signals upregulate pyrethrin biosynthesis in wounded seedlings of *Chrysanthemum cinerariaefolium*, J. Plant Interact., 6, 89-91 (2011).
20. Kataoka S, Furutani S, Hirata K, Hayashi H, Matsuda K, Three austin family compounds from *Penicillium brasilianum* exhibit selective blocking action on cockroach nicotinic acetylcholine receptors. 2011, Neurotoxicology 32, 123-129.

b. 総説

1. 松田一彦, 昆虫制御のケミカルバイオロジー –オカラミンが示す世界, 2015, 化学, 70, 12-16.
2. Ihara M., Sattelle D. B. and Matsuda K., Probing new components (loop G and the α-α interface) of neonicotinoid binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. 2015, Pestic. Biochem. Physiol. 121, 47-52.
3. 松田一彦, 植物は揮発性有機化合物をどのように感じるのか? –除虫菊を例にとって–, 2013, Aroma Research 14, 376-379.
4. Matsuda K, Pyrethrin Biosynthesis and Its Regulation in *Chrysanthemum cinerariaefolium*. 2012, Top. Cur. Chem. 314, 73-82.
5. Ueda H, Kikuta Y, Matsuda K, Plant communication: mediated by individual or blended VOCs? 2012, Plant Signal. Behav. 7, 222-226.

c. 招待講演、シンポジウムなど

1. Kazuhiko Matsuda: Deciphering biosynthesis of natural insecticides pyrethrins, Phytochemicals for crop protection: Discovery to Molecular Target, Pacificchem 2015, 2015, Honolulu, Hawaii, USA, Dec 15.
2. 松田 一彦: 昆虫制御のケミカルバイオロジー 糸状菌が産生する昆虫制御物質の標的解明とその意味、新農薬を志向したケミカルバイオロジー、日本生化学会ワークショップ、2015年12月3日
3. Kazuhiko Matsuda: Structural, functional and mutagenesis studies identify components of neonicotinoid binding to nicotinic receptors and facilitate prediction of resistance, Resistance 2015, Rothamsted Research, Harpenden, UK, Sep 14.
4. Kazuhiko Matsuda: Molecular mechanisms for diverse actions and selectivity of neonicotinoids, 2015, 250th ACS National Meeting, Boston, Massachusetts, USA, Aug 16.
5. 松田 一彦: 温故知新: ピレスリンから学ぶ昆虫制御の原理、第17回中四国支部若手シンポジウム(第6回農芸化学の未来開拓セミナー)、岡山大学、2014年5月16日。
6. 松田 一彦: ケミカルセンシングによる生命恒常性の維持と昆虫制御、日本学術振興会「日本におけるケミカルバイオロジー研究の新展開」、東京大学、2014年6月14日。
7. Kazuhiko Matsuda: Structural determinants of selective and diverse target site actions of neonicotinoids, 2014 Nicotinic Acetylcholine Receptor, University of Cambridge, UK, July 24.
8. Kazuhiko Matsuda K: Probing insect LGICs using selective ligands, 13th International Congress of Pesticide Chemistry, 2014, San Francisco, USA, August 13.
9. Kazuhiko Matsuda: Unraveling the mechanism of pyrethrin biosynthesis”, Studies on ecological interaction networks that promote biodiversity-From gene to ecosystem-, 2012, The Max Planck Institute for Chemical Ecology, Yena, Germany. Oct. 15.
10. Kazuhiko Matsuda: Predicting the hot spot for neonicotinoid resistance in nature, NARO International Symposium 2012, New insight into insecticide resistance of rice planthoppers and the insect-borne viruses, 2012, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan, Dec. 7.
11. 松田 一彦、昆虫制御のケミカルバイオロジー、ケミカルバイオロジー勉強会、理化学研究所, 和光, 埼玉, 2012年2月21日
12. Kazuhiko Matsuda: Toward mechanism of selectivity and resistance management of neonicotinoids (Plenary Lecture), 2nd International Conference on Agrochemicals Protecting Crops, Health and Natural Environment - Role of Chemistry for Sustainable Agriculture, 2012, Delhi, India, Feb 15.
13. Kazuhiko Matsuda: VOC-mediated communications in *Chrysanthemum cinerariaefolium*, Studies on ecological interaction networks that promote biodiversity-From gene to ecosystem-, 2011, Neuchatel, Switzerland, Sep. 9.
14. Kazuhiko Matsuda: Structural insights into the mode of actions of and resistance to neonicotinoids, 5th Pan Pacific Conference on Pesticide Science, 2012, Beijing, China, Sep 17.
15. Kazuhiko Matsuda: “Viewing natural pyrethrins from a modern angle”, International Pyrethrum Symposium, 2011, Launceston, Tasmania, Australia, Nov. 2-4.

d. 国際学会発表 (一般講演のみ)

1. Shogo Furutani and Kazuhiko Matsuda, Exon 3 splicing and mutagenesis identify residues influencing cell surface density of heterologously-expressed silkworm (*Bombyx mori*) glutamate-gated chloride channels, 13th International Congress of Pesticide Chemistry, 2014, San Francisco, USA, Aug 13
2. Yuri Nakatani and Kazuhiko Matsuda, Modulation by chloride-channel-targeting pesticides of proton-sensitive chloride channels expressed in the silkworm *Bombyx mori*, 13th International Congress of Pesticide Chemistry, 2014, San Francisco, USA, Aug 13.

3. Miki Ishida, Masanori Morimoto, Sayaka Kamikubo, Kazuhiko Matsuda, Diterpenes and iridoid glucosides from *Orobanchaceae* and their biological activities, 13th International Congress of Pesticide Chemistry, 2014, San Francisco, USA, Aug 13.
4. Masanori Morimoto, Yasuki Nakamura, Warinthorn Chavasiri, Kazuhiko Matsuda, Structure-activity relationships of α -mangostin and derivatives against termite feeding, 13th International Congress of Pesticide Chemistry, 2014, San Francisco, USA, Aug 13.
5. Keiji Tanaka, Zhou Xue, Arata Katayama, Kazuhiko Matsuda, Norio Kurihara, Comparative metabolism of α -BHC enantiomers, 13th International Congress of Pesticide Chemistry, 2014, San Francisco, USA, Aug 13.
6. Keiji Tanaka, Tsukasa Tatsumi, Karin Nagasaki, Yoshihisa Ozoe, Kou Kuroda, Kazuhiko Matsuda, Norio Kurihara, Inhibitory effect of γ -BHC analogs on [³H]EBOB binding to nerve membranes of housefly head and its GABA-gated Cl⁻ channel, 13th International Congress of Pesticide Chemistry, 2014, San Francisco, USA, Aug 13.
7. Keiji Tanaka, Yoshihisa Ozoe, Kazuhiko Matsuda, Masanori Morimoto, Norio Kurihara, Optical resolution of α -BHC and 1-OH- γ -BHC analog racemates and the insecticidal activities of their enantiomers, 13th International Congress of Pesticide Chemistry, 2014, San Francisco, USA, Aug 13.
8. Karin Nagasaki, Keiji Tanaka, Tsukasa Tatsumi, Kazuhiko Matsuda, Yoshihisa Ozoe, Norio Kurihara, Synthesis of OCH₃-, OH-substituted γ -BHC analogs, and their inhibitory activities on the GABA-gated Cl⁻ channel, 13th International Congress of Pesticide Chemistry, 2014, San Francisco, USA, Aug 13.

e. 国内学会発表件数（一般講演のみ）

2016年 日本農芸化学会 12件、日本農薬学会 4件
 2015年 日本農芸化学会 10件、日本農薬学会 5件
 2014年 日本農芸化学会 11件、日本農薬学会 7件
 2013年 日本農芸化学会 8件、日本農薬学会 3件
 2012年 日本農芸化学会 8件、日本農薬学会 3件
 2011年 日本農芸化学会 2件

合計 73件

d. 特許

なし

e. その他（学会賞、報道など）

なし

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～平成 27 年度)
研究成果最終報告書

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・教授・森山達哉

研究協力者：准教授：財満信宏

定時職員：矢野えりか

実験補助：吉村征浩、鵜澤有希、末森祐輔、若木泰子、崎川貴文、小林知世、久後裕菜、和田宏章、三口志穂、山本美里

1. 研究の目的

本課題では、植物と動物（ヒト）との相互作用を適正化するために必要な知見の集積を目的として、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不利益なアレルゲン性や、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、相互作用機構の解明、低リスク化／高機能化を行う。具体的には、①アレルゲン性の解明に関しては、どのような植物タンパク質がアレルゲンとなりうるか、アレルゲンの探索を行うと共に、アレルゲン性を評価する手法の高度化や研究に必須の抗アレルゲン抗体の作製や整備などを行う。そして、どのような要因で植物のアレルゲンが増減するか、その変動要因を明らかにする。対象とするアレルゲンは特に、研究波及効果の広汎性という観点から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主要農作物の各種汎アレルゲン（pan-allergens）や主要な高タンパク質穀類の代表として大豆のアレルゲンに関して研究を行った。これらのアレルゲン群を発現・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群を作製し、変動解析に有効なツールのカタログ化を行った。そして得られた抗体を用いて、種々の要因（品種・栽培法・病虫害被害・加工法・ガンマ線処理・調理法など）におけるアレルゲンリスクの変動解析を行った。その他、アレルゲン以外の不利益な相互作用の代表として、タバコ等の嗜好植物に含まれるニコチンの生体に及ぼす影響についても検討した。

②植物タンパク質などの植物含有成分のヒトに対する有益な細胞機能性・生理機能性の探索では、先進国での深刻な増加が大きな社会問題となっている生活習慣病の原因病態に対して予防改善効果を発揮しうる植物由来成分の探索とその作用機構の解明を目的として研究を行った。生活習慣病発症にはメタボリック・シンドロームが深く関与しており、その基盤には脂肪細胞機能が重要な役割を演じている。肥満等の進行により脂肪細胞機能に変質することで、インスリン抵抗性や炎症などの基盤病態が進行する。従って、主に脂肪細胞機能、特に脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカイン類に注目してその変動解析や、分泌を調節しうる植物由来成分の探索や作用機構を中心に解析した。アディポサイトカイン類の中でも、未だその機能性や変動に関して知見が少ないレジスチンに焦点を当てた。

また、このような植物由来の機能性成分の植物内での局在性の解明や動物体内での動態解析などを詳細に検討する手法の確立を目的として、アレルゲン等のタンパク質の場合は抗体を用いた検出定量手法の高度化を進め、低分子化合物の場合はイメージングマスマスペクトロメトリー（MALDI-IMS）を用いた解析手法の高度化とその有効性の実証を進めた。

2. 研究内容

1) 植物汎アレルゲンの抗体作製、検出・定量系構築と抗アレルゲン抗体のカタログ化

多くの植物アレルゲンはある一定のグループに分類されることが明らかとなりつつある。これらは多くの植物間で共通に検出され、存在することから、多種類の植物間での交差反応性の原因となる。このようなアレルゲンの一群を汎アレルゲン(pan-allergen)と呼ぶ。さらに、汎アレルゲンの多くは感染特異的タンパク質 (Pathogenesis-related proteins; PR-proteins) と呼ばれる一群のタンパク質グループに分類されることが明らかになってきており、植物が感染や虫害、環境ストレスなどに晒されると発現を増大させることが明らかとなってきた。このように、農作物アレルゲンはある一定のグループに属することから、これらをカタログ化し、共用可能な抗体群を準備すれば多くの植物アレルゲンの変動解析に有用である。そこで本研究では、植物、特に野菜や穀類、果物などの主要な農作物について、主要汎アレルゲンを発現・精製し、これを元に抗体を取得し、検出・定量系を構築し、さまざまな条件下でのアレルゲンの変動解析を行うことを研究の柱の一つとしている。これまでに主要な植物汎アレルゲンの発現や精製を行い、これらを抗原としてウサギやマウス、モルモット等に免疫して、多くの植物での当該汎アレルゲンを検出できるようなポリクローナル抗体を作製した。また、作製した抗体群が、どのような農作物の汎アレルゲンを検出できるかどうか、その反応性を調べ、作製した抗体群のカタログ化を進めた。

2) 各種要因における植物アレルゲンのリスク変動解析

次に、これまでに作製し反応性を確認した植物汎アレルゲン抗体群を用いて、種々の変動条件下での植物アレルゲンの変動解析を行い、アレルゲン性の変動要因と変動パターンを明らかにする研究を行った。特に、多くの汎アレルゲンが感染特異的タンパク質 (PR-proteins) に属することから、病虫害被害などのストレスを与えることによってアレルゲン量が増加することが推察される。そこで、農作物にカビ被害を与え、主要な汎アレルゲンの変動解析を行った。収穫後の保存中に、カビの発生したサクランボやキュウリ等を用いて、これらの汎アレルゲンの変動を解析したところ、いずれの場合も、PR-10 ファミリーアレルゲンは著しい増加が確認された。一方、同じ感染特異的タンパク質に属する PR-5 ファミリーアレルゲン(ソーマチンライクプロテイン)は増加する場合や変化しない場合があることが判明した。細胞骨格関連タンパク質であるプロフィリンも主要な汎アレルゲンであるが、これについては、有意な変化は見られなかった。このように、汎アレルゲン間でカビ被害時の変動には多様性があることが判明した (図1、図2)。本研究の結果で特記すべき結果の一つとしては、カビ被害を受けた個体のなかでも直接的な被害を受けていない部位においてもこれらの PR-Ps に属する PR-5 (ソーマチンライクプロテイン) が約 2 倍に増加した。この結果から、カビ被害のシグナルは非被害部にも伝達され非被害部でのアレルゲン増加に寄与することを示唆している。

さらに収穫後の殺菌処理の一環として実用化が検討されているガンマ線処理によるアレルゲンの変動解析を行った (一部、農研機構 食総研・等々力博士らとの共同研究)。モデル穀物として、2種類の品種の食用大豆 (フクユタカ、エンレイ) を用い、コバルト 60 を用いてガンマ線を 0~30kGy 照射し、照射後 3 ヶ月保管したのち破碎し、大豆の主要なアレルゲンの含有量やアレルゲン性を評価した (図3)。その結果、7S グロブリン (β -コングリシニン) や Gly mBd 30K、Gly m4 に関しては含有量は変化しなかった。Gly m4 は大豆における PR-10 タンパク質であるが、乾燥大豆へのガンマ線照射ではこれらの PR タンパク質は増加しないことが示唆され、先のカビ被害農作物での成績と比較すると興味深い。一方、Soybean trypsin inhibitor (STI) に関しては、ガンマ線照射で増加することはなく反対に有意に低減化することが競合 ELISA にて示された。本アレルゲンは特に分子内に S-S 結合が多く、ガンマ線照射によって発生しうるラジカル分子の攻撃に対して感受性が高い可能性が示唆され

る。さらに、大豆アレルギー患者の市販血清を用いたイムノブロットによる評価では、照射によって新たに出現したり反応性が増大する IgE 結合タンパク質（アレルゲン候補）は見られず、IgE-ELISA の結果、むしろ一部反応性は有意に低下した。これらの結果から、ポストハーベストでの殺菌処理の一環として実用化が検討されているガンマ線処理によって大豆のアレルゲンレベルやアレルゲン活性が増加することはなく、むしろ低下する可能性が示された。現在、香辛料に関しても、検討を進めているが、同様の結果を得ている。

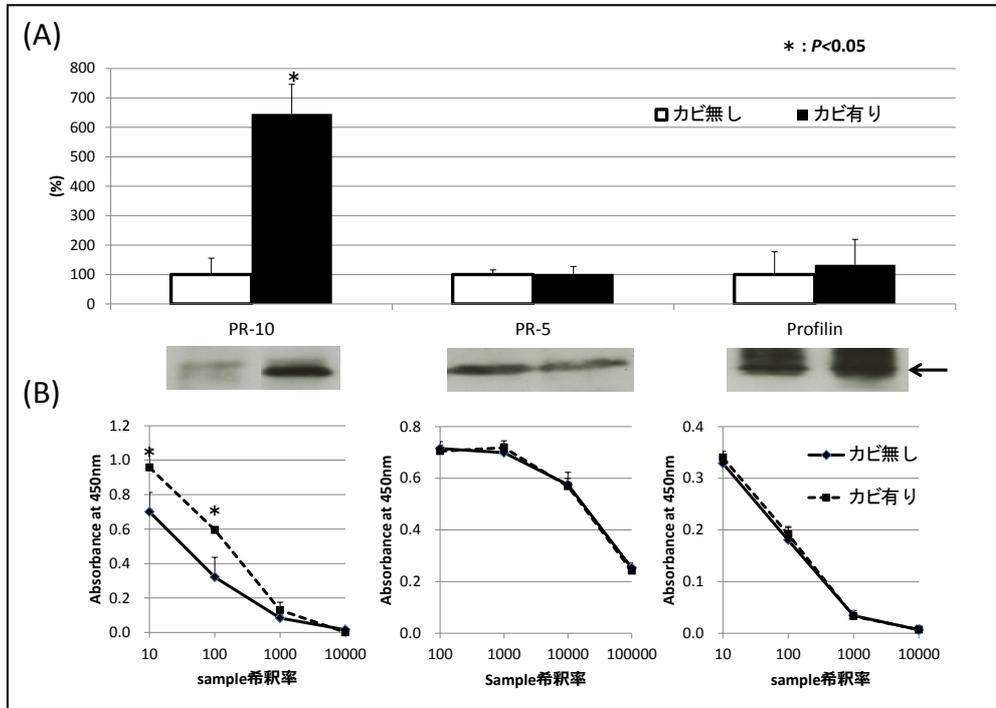


図 1. サクラソビのカビ被害による汎アレルゲンの変動解析
(A)ウエスタンブロッティング (B)ELISA

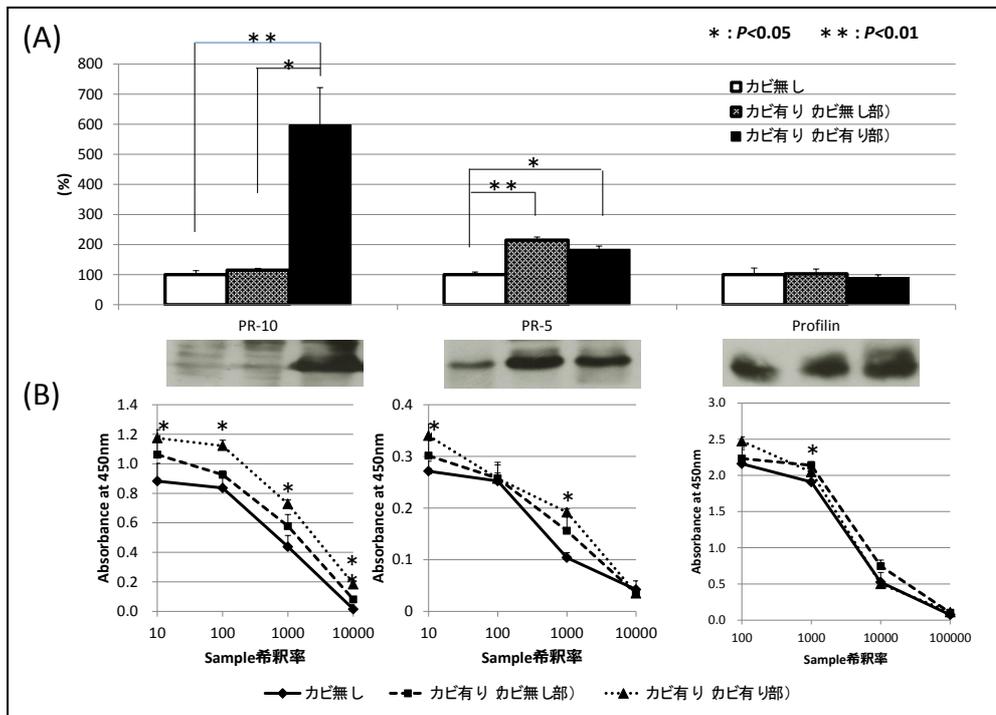


図 2. サクラソビのカビ被害による汎アレルゲンの変動解析
(A)ウエスタンブロッティング (B)ELISA

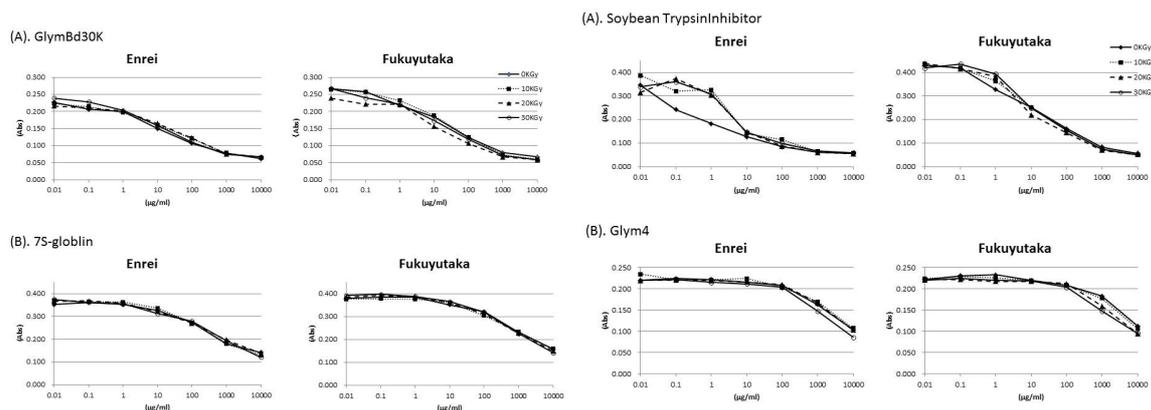


図3. ガンマ線照射した大豆中のアレルゲンレベルの変動解析

アレルゲンリスクの加工による変動解析として、各種味噌におけるアレルゲンレベルの変動解析についても検討を行った。大豆を原料とする味噌は日本および他のアジアの国々において一般的な食品であるが、大豆はアレルゲン食品の一つとしても知られている。そこで日本において入手可能な様々な種類の味噌のアレルゲン性を評価した。まず、甘口米味噌、辛口米味噌、麦味噌及び豆味噌からタンパク質を抽出し、SDS-PAGEにてタンパク質パターンを分析した。大豆抽出物中に検出される主要タンパク質バンドは、どの種類の味噌サンプルにおいても認められず、代わりに約10~25 kDaの様々な低分子量のタンパク質バンドを検出した。これらのパターンは味噌の種類によって多少異なっていた。次に、各味噌における、6つの主要大豆アレルゲンの存在レベルについて、特異抗体を使用したウェスタンブロット法によって解析した。その結果、味噌の種類やアレルゲンの種類によって様々な多様性が見られたが、いずれの味噌でも大豆抽出物よりも各アレルゲンレベルは有意に低いことが示された。さらに、大豆アレルギー患者の血清を用いたIgE-ELISA実験においても同様の結果が得られた。一般的に発酵・熟成期間が長いことが知られている色調の濃い一部の辛口米味噌や豆味噌は、特に低アレルゲン化されていることが示された。反対に白味噌では比較的残存が見られた。これらの結果から、味噌におけるアレルゲンレベルの低減化は発酵・熟成期間の長さが重要な要因となっていることが示唆された。

3) 花粉症に関連する大豆のクラス2食物アレルゲンに関する研究

大豆は世界で広く生産され、油糧植物で高タンパク質ゆえ、油脂原料や食糧、飼料など多くの目的で広く栽培・使用されている。タンパク質栄養の指標であるアミノ酸スコアも100と、植物タンパク質では例外的に高く、加工特性などのタンパク質としての特性にも優れ、優れた植物資源である。さらに近年では、大豆に含まれるさまざまな成分が生理機能性を示し、健康増進に有益な作物としても広く認識されるようになってきた。しかしながら大豆は他の高タンパク質食品と同様に、主要な食物アレルギー惹起食品として認識されており、その安全性が懸念されている。そこで、本研究では、重要な穀物植物である大豆の種子に含まれる大豆タンパク質のアレルゲンの探索、カタログ化、検出・定量法の開発、変動解析及びそのアレルゲン性の評価方法の開発などを目標として研究を進めている。

近年、新しい大豆アレルギーが知られるようになり、また大きな社会問題となっている。これは、大豆のクラス2食物アレルギーとしても知られ、シラカバ・ハンノキ属の花粉症患者では、豆乳や豆腐などを摂取した際に口腔内アレルギー症候群(OAS)を引き起こす事がある。これは、シラカバ・ハンノキ属の花粉アレルゲンであるBet v1と大豆のアレルゲンGly m4の交差反応に起因する。(このBet v1やGly m4は前述の汎アレルゲンPR-10に属する。)また、一部のパターンではシラカバ・ハンノキ属の花粉アレルゲンであるBet v2と大豆のアレルゲンGly m3の交差反応も関与していることを明らかにした。(このBet v2やGly m3は前述の汎アレルゲンのプロフィリンに属する。)この原因抗原Gly m4に関して、これまでにクローニング・大腸菌での発現・精製を行い種々の抗体を作製した。得られた抗体

はイムノブロットや直接 ELISA に有効に使用することが可能であった。現在、サンドイッチ ELISA や競合 ELISA への適用を検討中である。また、その生化学的特性を解析する目的で、本分子を大豆種子より **native** な状態で精製し、その諸性質を解析するとともに、精製抗原を元に検出系を構築し、可溶性の本分子の検出によってそのリスク評価が可能となることを示した。本方法によって凍り豆腐などの様々な大豆加工食品のアレルギー (OAS) リスクを評価することに成功した。もう一つのクラス 2 大豆アレルゲンである **Gly m3** についても、発現や精製、抗体作製を行い、その検出、半定量に成功した。さらに、大豆から、新規アレルゲン候補分子を 2 種類探索し、その同定に成功した。またそれらの抗体作製も行い、検出法の開発及び変動解析、アレルゲン性の評価法の検討などを行った。クラス 1 大豆アレルゲンとして知られている **Gly m5** や **Gly m6** に対する抗体の作製も行った。これらの研究により、大豆のアレルゲン性評価に資する主要なアレルゲンの検出・半定量系の構築を深化させ様々な要因でのアレルゲン性変動解析が可能となった。最終的には、これらの種々のアレルゲン抗体を組み合わせることによって、より定量性の優れたサンドイッチ ELISA 構築や患者血清との反応性をミックスするようなアレルゲン性評価抗体の作製を目指している。また、得られた抗体を用いて本分子の低減・欠失品種のハイスループットなスクリーニングを試みており、より安全な低アレルゲン品種の探索につなげたい。

4) 食物アレルゲンのアレルゲン性評価法の確立と高度化に関する研究

(人工消化系と腸管細胞透過性を組み合わせた新規アレルゲン性評価法の開発 等)

これまでに植物性タンパク質のアレルゲン性を評価する方法として低プロテアーゼ法による人工消化系実験の有用性について明らかにした。また、マウスに経口的に投与し、血中への移行をモニターすることでアレルゲン性の評価や制御方法の解析、腸管培養細胞を用いたアレルゲンの透過性実験系を用いてアレルゲンの生体への吸収の解析などを行ってきた。今年度は、低プロテアーゼ法による人工消化系実験と腸管培養細胞を用いたアレルゲンの透過性実験系を組み合わせて、より生理的条件に近い *in vitro* アレルゲン性評価系の構築を行った。ペプシンによる人工消化の後、ハンクス液にて希釈後、トランスウエル上にモノレイヤーとして腸管上皮様に分化させたヒト腸管培養細胞 Caco-2 細胞の管腔側にサンプルを添加し、基底膜側への腸管上皮細胞モノレイヤーを介した移行を ELISA や近赤外蛍光ドットプロット法、WB 等によって評価した。この方法は、経腸的に感作されるか否かを簡便に判定することができるため、クラス 1 食物アレルゲンとクラス 2 食物アレルゲンを判定する方法として利用可能である。この方法によってサクランボの PR-5 (ソーマチンライクプロテイン) が消化抵抗性を示したまま腸管細胞から透過することが示され、本汎アレルゲンがクラス 1 食物アレルゲンとして機能することが示唆された。食物アレルギー (クラス 1) の発症過程では、感作と惹起の両過程でこのような腸管膜を介したアレルゲンの移行が関与するため、この過程を抑制することによりアレルギーの感作と惹起をともに抑制しうる。これまでのマウスを用いた *in vivo* での評価系で、ペクチンやキサントガムなどのヒドロコロイド系増粘多糖類がアレルゲンの血中移行を抑制することを明らかにしたので、この細胞系においてもヒドロコロイド系増粘多糖類の効果を検討した。その結果、マウスの場合と同様にこれらのヒドロコロイド系増粘多糖類はアレルゲンの腸管膜を介した移行を抑制することを明らかにした (図 4)。従ってこれらの成分は抗アレルギーを発揮する食品成分として機能しうる可能性を示した。本アレルゲン性評価方法は、食品の加工形態や共存物 (食べ合わせ) の影響などを *in vitro* で評価する方法として有益であると考えられた。

また、近年、食品タンパク質成分が皮膚を介して侵入し、Th2 型の免疫応答を引き起こす事で IgE 抗体を産生させる経皮感作の現象が知られるようになり、大きな社会問題にも発展した。そこで本研究では、この経皮感作をマウスモデルで検討し、大豆等を経皮感作させることに成功した。今後は、植物性の食品タンパク質のうち、どのようなタンパク質が経皮感作しうるか、その特性を明らかにする予定である。

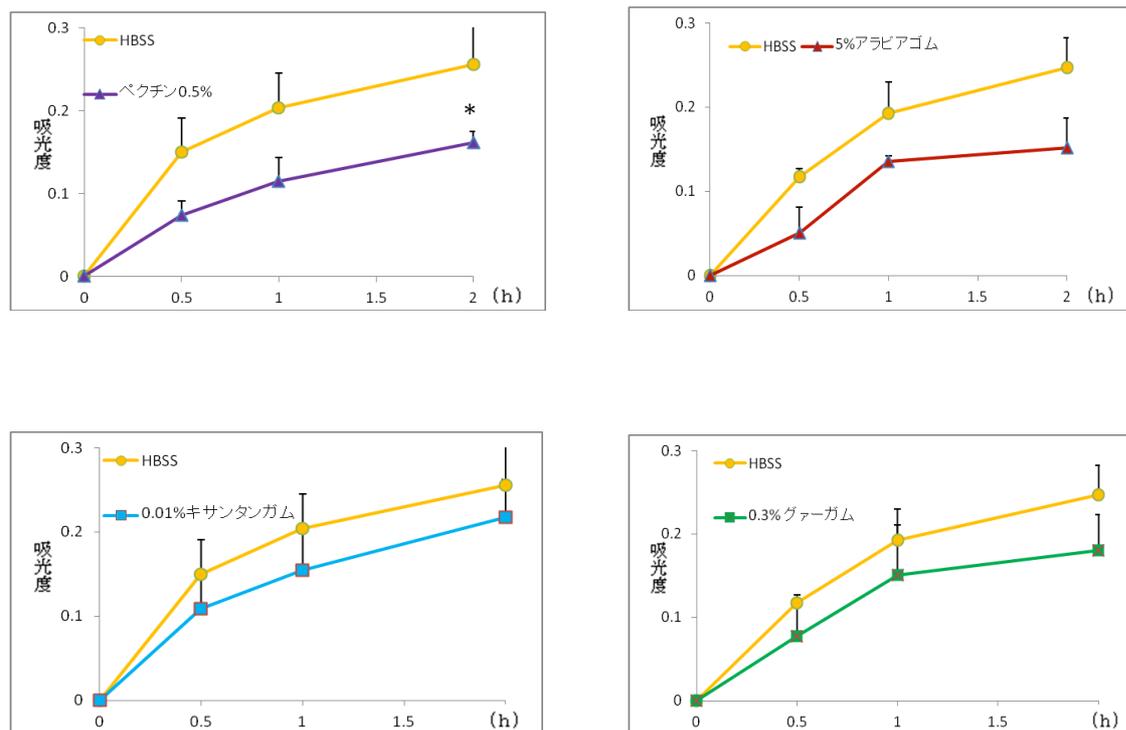


図4. ハイドロコロイド系増粘多糖類によるヒト腸管細胞でのアレルゲン透過抑制効果

5) 植物由来分子のヒトに対する細胞機能性・生理機能性の探索と利用

現代社会では食生活の変化から肥満人口が増加しており、肥満の進行は高脂血症や動脈硬化、また2型糖尿病などの生活習慣病の発症リスクを上昇させる。これら肥満および生活習慣病の発症や進展を予防・改善するために、食品由来の生理活性作用を有する機能成分の研究が多数報告されてきている。本研究では、肥満および2型糖尿病の発症に関与する主要な組織として脂肪組織に焦点を当て、脂肪細胞の培養細胞実験モデルである3T3-L1細胞を用いて植物由来成分の生理活性を検討した。

脂肪細胞は脂肪を合成・蓄積するだけではなく、体内での最も大きな分泌器官である。脂肪細胞からの分泌タンパク質であるアディポサイトカインは、エネルギー恒常、脂質代謝、免疫その他の生理学的機能において重要な役割を担っている。特に、インスリン抵抗性や炎症への関与が明らかとなっているレジスチン、これに対してインスリン感受性や脂肪酸酸化による脂質代謝を上昇させるアディポネクチンは大きな関心が寄せられている。従って、植物由来成分による脂肪細胞の機能調節、特にアディポサイトカインの分泌制御は、植物成分による肥満や2型糖尿病などの生活習慣病の予防・改善につながることを期待される。そこで本研究では、インスリン抵抗性や炎症への関与が明らかとなっているレジスチンの分泌を抑制する植物成分の探索を行った。

(1) ザクロ抽出物およびエラグ酸のレジスチン分泌抑制効果 (細胞実験)

レジスチンは、2型糖尿病の要因病態であるインスリン抵抗性や炎症に寄与するアディポサイトカインとして注目されている。そこで本研究ではマウス3T3-L1脂肪細胞からのレジスチンの分泌に及ぼす植物成分を探索した。その結果、ザクロ果汁(PFE)に抑制効果が確認されたため、その作用を詳細に検討した。PFEはレジスチン分泌量を濃度(10, 50, 100 µg/ml)および時間(0, 3, 6, 9 hr)依存的に顕著に抑制した。一方、インスリン感受性アディポサイトカインであるアディポネクチンの分泌量には影響を及ぼさなかった(図5)。そこで、PFEがレジスチンの分泌を抑制する機構について調べた。一般的に、レジスチンの分泌は遺伝子発現変動を介して制御される。そこで、PFE添加後のレジスチンmRNA発現量をリアルタイムRT-PCRにより解析したが、レジスチンmRNA発現量に変化はみられな

かった。一方、細胞内レジスチン量については PFE 添加後有意な減少がみられ、さらにタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (cycloheximide; CHX) を添加した実験から、細胞内のレジスチン量は PFE の添加により分解が促進されていることが示された。細胞内アディポネクチン量についても検討したが、この場合も分泌と同様に影響は見られなかった (図 6)。

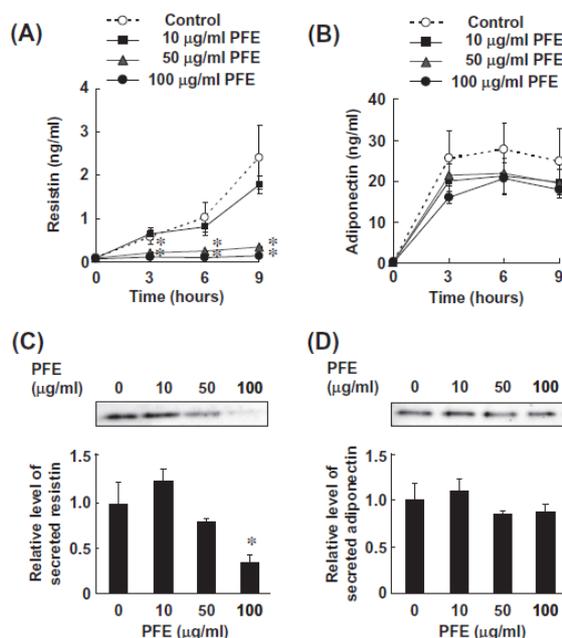


Fig. 1. Effects of the PFE on the secretion of resistin and adiponectin by adipocytes. (A and B) Adipocytes were treated with various concentrations of the PFE in serum-free medium, and the secretion levels of resistin (A) and adiponectin (B) in the medium collected at every time point were determined by EUSA. (C and D) At 12 h after the addition of the PFE, media were collected and analyzed by western blotting to detect resistin (C) and adiponectin (D). The upper inserts show representative blots. The lower plots represent the optical densities of the blots in an arbitrary unit indicated as the ratio against the control. Data represent means \pm SE from three separate experiments; * p < 0.05 versus the control (Student's t -test).

図 5. ザクロエキスによる脂肪細胞からのレジスチン分泌抑制効果

これら PFE の結果と同様の作用を示すザクロ中の候補成分を同定するために、ザクロに含まれる代表的な生理機能成分であるエラグ酸およびプニカ酸を検討したところ、3T3-L1 脂肪細胞においてエラグ酸 (Ellagic acid; EA) は PFE の結果と同様に、アディポネクチンには影響を及ぼさずにレジスチンの分泌量及び細胞内タンパク質量を顕著に抑制した。また、ザクロ中の植物エストロゲンの関与を検討するために、エストロゲン受容体のアンタゴニスト ICI-182,780 を用いて、エストロゲン受容体の阻害が PFE のレジスチン分泌抑制を阻止するかどうかを検討したが、変化はみられなかった。これらの結果から EA は PFE 中に含まれるレジスチン分泌量を抑制する成分であると示唆された (図 7)。また、このようなレジスチンの分解促進による分泌抑制効果は初めての知見である。

(2) ザクロ抽出物及びエラグ酸投与マウスでの効果の検証 (動物実験)

マウス個体を用いた *in vivo* の実験においてもザクロの摂取が血中レジスチン量に影響を及ぼすかどうかを、レジスチン上昇モデルである卵巣摘出 (OVX) マウスにザクロ抽出物 (pomegranate fruit extract; PFE) を摂取させて検討した。12 週間の PFE の摂取 (30 mg/kg/day) は、OVX マウスにおける血清中レジスチン濃度を OVX 対照群に対して有意に抑制した。一方、アディポネクチン濃度は細胞実験の場合と同様に変化しなかった。また寄与成分であるエラグ酸を肥満糖尿病モデルマウスである KK-Ay に投与し、その生理作用を詳細に検討した。その結果、この場合でも血清のレジスチン濃度の低下や肝臓中性脂肪量低下、肝臓における脂肪酸分解系酵素遺伝子群の発現亢進などの効果が見られた。こうして、多くの植物に存在するエラグ酸が、脂質代謝や生活習慣病の予防などに有益な効果を有することが明らかとなった。このように、ザクロの効果はマウスを用いた *in vivo* の実験でも有効であることが示唆され、ヒトへの応用も期待される。

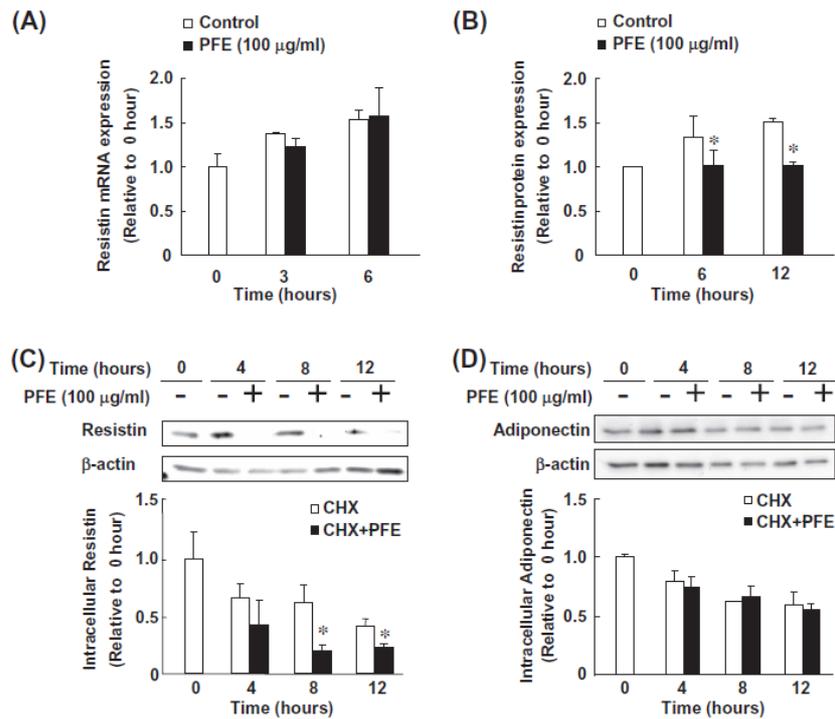


Fig. 2. Effects of the PFE on mRNA and protein expression and intracellular content of resistin in adipocytes. Adipocytes were treated with serum-free medium containing the PFE (100 µg/mL), and total mRNA and whole-cell lysates were collected at the indicated times. (A) mRNA expression of resistin was determined by real-time RT-PCR assay and normalized to *Gapdh* expression. (B) Protein expression of resistin was detected by western blotting analysis and normalized to the levels of β -actin. Further, adipocytes were treated with CHX with or without the PFE (100 µg/mL) in serum-free medium, and whole-cell lysates were collected at the indicated times. The intracellular levels of (C) resistin and (D) adiponectin were detected by western blotting analysis and normalized to the levels of β -actin. The upper inserts show representative blots. The lower plots represent the optical densities of the blots in an arbitrary unit indicated as the ratio against the control at time 0. Data represent means \pm SE from three independent experiments; * p < 0.05 versus the control (Student's *t*-test).

図 6. ザクロエキスによるレジスチン遺伝子発現とタンパク質動態への影響

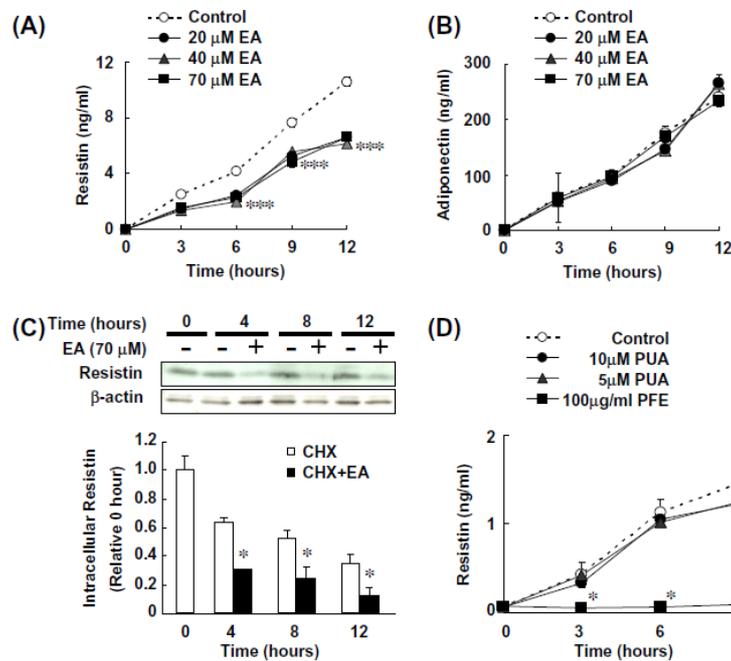


Fig. 3. Effects of EA on resistin secretion by adipocytes. (A and B) Adipocytes were treated with the indicated concentrations of EA in serum-free medium, and the secretion levels of (A) resistin and (B) adiponectin in the medium collected at every time point were determined by ELISA. (C) Adipocytes were treated with CHX with or without EA (70 µM) in serum-free medium, and whole-cell lysates were collected at the indicated time points. The intracellular levels of resistin were detected by western blotting analysis and normalized to the levels of β -actin. The upper inserts show representative blots. The lower plots represent the optical densities of the blots in an arbitrary unit indicated as the ratio against the control at time 0. (D) Effects of the PUA on the secretion of resistin by adipocytes. Adipocytes were treated with the indicated concentrations of PUA and PFE (100 µg/mL) in serum-free medium, and the secretion levels of resistin in the medium collected at every time point were determined by ELISA. Data represent means \pm SE from three independent experiments; * p < 0.05 versus the control (Student's *t*-test).

図 7. エラグ酸によるレジスチン分泌抑制効果及びレジスチン分解促進効果

(3) その他の植物成分の機能性解析

また、植物アレルゲンタンパク質についても、生理機能性が示唆されている。今回は、大豆のクラス1主要アレルゲンである7Sグロブリン(β-コングリシニン)やトリプシンインヒビターをマウスに与え、生理機能性を解析したところ、血糖値や脂質代謝に好ましい効果を示すことが示唆された。今後も、他のアレルゲンタンパク質の生理機能性を解明し、その作用機構について検討する。これらの植物由来機能性成分の効果や作用機構の解析が進むことにより、植物由来の新たな機能性食品素材の開発につながることを期待される。

(4) 植物由来機能性分子の体内動態解析

植物の機能性成分の機能を評価するうえで、摂取した機能性成分がどのような代謝を受け、どの臓器に分布するのかという体内動態情報を理解することは非常に重要である。しかしながら、低分子で複雑な構造を持つ機能性成分は、特異的抗体などの作出が困難であり、現段階で、機能性食品成分の動態を可視化して解析する汎用的な手法は確立されていない。

そこで本研究では、機能性成分の動態解析を可能にする汎用的な手法を確立することを目的として、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)を用いた機能性成分の動態解析を試みた。機能性成分モデルには、エラグ酸ならびにクズに特徴的なイソフラボンであるプエラリンを用いた。プエラリン投与後に解析したマウス臓器(肝臓、腎臓、心臓、脳、脾臓、肺、大腿骨)のうち、脳以外の臓器でプエラリン由来のピークが検出された。コントロール群と比較し、投与群では、 m/z 417のピークが特徴的に検出された(図8)。このピークは、配糖体の形のインタクトなプエラリンに由来するものであり、プエラリンは消化酵素による分解を受けずに臓器に移行することが示唆された。エラグ酸を投与したマウスの肝

臓では、インタクトなエラグ酸のピークは検出されなかったものの、エラグ酸代謝物の理論的 m/z と一致するピークが検出された(図9)。これらの結果から、MALDI-IMSによる体内動態の解析が可能であることが示され、植物由来分子とヒトなどの動物の生体成分との相互作用を明らかにするための新たな方法として活用することができると期待される。

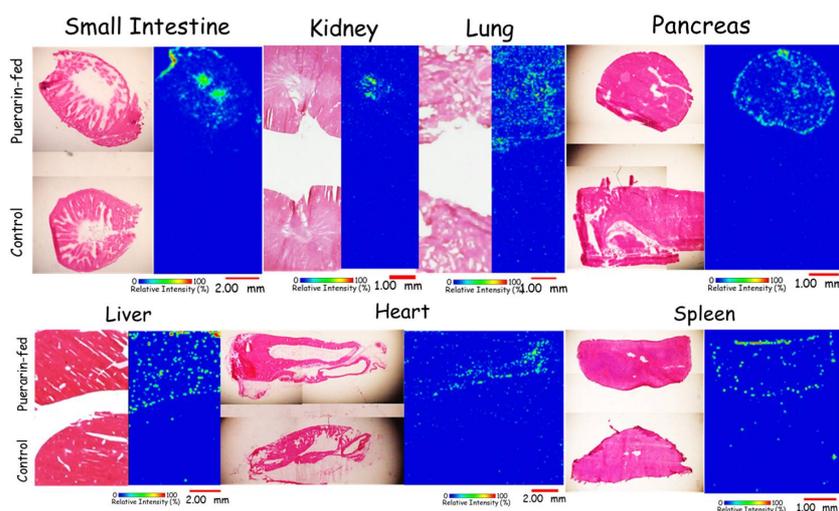


図8 マウス各臓器切片で検出されたプエラリン

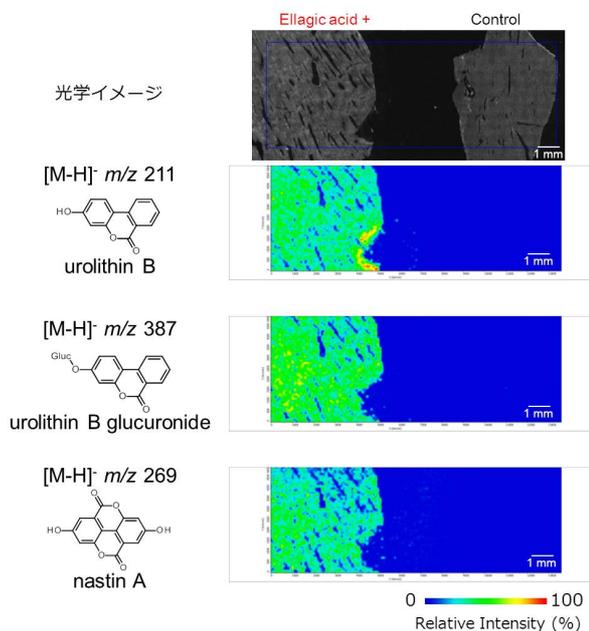


図9 マウス肝臓切片で検出されたエラグ酸代謝物

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

副次的効果としては、食物アレルギーに関する相談が複数の食品会社や医療機関から寄せられ、種々のアドバイス等、適切に対応することができた。また、本研究を進めることで得られた知見の社会還元という意味から、市民公開講座や管理栄養士養成校、食品会社等で食物アレルギーに関する啓蒙的な講演の機会を得ることができた。

今後の計画としては、植物中の汎アレルギーや新規アレルギーの探索を通して、どのような植物成分がアレルギーとなりうるのかという点をさらに検討していくとともに、それらのクローニング、発現、抗体作製を行い、カタログ化と変動解析を続ける。どのような処理によって植物のアレルギー性は変動するのか、また植物食糧資源利用の側面から、アレルギーの低減化品種の探索や加工法・調理法による低減化などについても引き続き検討する。さらに、消化抵抗性や血中移行性、経口・経皮感作能などを評価する系を高度化し、患者血清を用いることなく評価しうる、より信頼性のあるアレルギー性評価系の構築を行う。

植物成分の細胞機能性に関する研究では、今後も肥満やインスリン抵抗性等の生活習慣病改善効果を指標にして、その探索を行い、エラグ酸やサポニンなどの有用化合物の分布や局在性、動物での摂取後の動態解析なども進めていく。さらに植物性アレルギータンパク質の細胞機能性や生理機能性についても検討する予定である。エラグ酸がメタボリック・シンドロームの予防改善効果が期待されたため、今後、機会があればヒトでの臨床試験による検証や実用化を目指してエラグ酸の高含有作物・品種の探索なども視野に入れている。

4. 研究成果

a. 原著論文

1. 山本美里、何陽、財満信宏、森山達哉、炎症・アレルギーに関わるレジスチンの変動解析、アレルギーの臨床、2015, 35(14), 58-61.
2. 和田宏章、矢野えりか、末森祐輔、財満信宏、森山達哉、大豆アレルギー Gly m 4 の検出による各種大豆加工食品の OAS リスク評価、アレルギーの臨床、2015, 35(12), 64-67.
3. 三口志穂、矢野えりか、末森祐輔、財満信宏、森山達哉、カビ被害による農作物汎アレルギー (PR-10, PR-5, プロフィリン) の変動解析、アレルギーの臨床、2015, 35 (9), 64-67.
4. Yagami A, Suzuki K, Sano A, Iwata Y, Arima M, Moriyama T, Matsunaga K, Immediate allergy due to raw garlic (*Allium sativum*L.) *The Journal of Dermatology*, 2015, 42(10), 1026-1027.
5. Inomata N, Okazaki F, Moriyama T, Nomura Y, Yamaguchi Y, Honjoh T, Kawamura Y, Narita H, Aihara M, Identification of peamaclein as a marker allergen related to systemic reactions in peach allergy, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2014,112, 175-177.
6. Iijima S, Tsunoda T, Moriyama T, Three Cases of oral allergy syndrome due to walnut: detection of IgE-binding walnut proteins. *J. Envir. Derma. Cut. Allergol.* 2014, 8(2), 95-102.
7. Zaima N, Yoshimura Y, Kawamura Y, Moriyama T. Distribution of lyso- phosphatidylcholine in endosperm of *Oryza sativa* rice. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2014, 28,1515-1520.
8. Moriyama T, Yanagihara M, Yano E, Kimura G, Seishima M, Tani H, Kanno T, Nakamura-Hirota T, Hashimoto K, Tatefuji T, Ogawa T, Kawamura Y. Hypoallergenicity and immunological characterization of the enzyme-treated royal jelly from *Apis mellifera*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2013, 77: 789-795.
9. Yoshimura Y, Nishii S, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-A^y mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013, 434, 486-491.
10. Moriyama T, Yano E, Suemori Y, Nakano K, Zaima N, and Kawamura Y. Evaluation of Hypoallergenicity of Various Miso Pastes Manufactured in Japan. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2013, 59:462-469.
11. Moriyama T, Yano E, Kitta K, Kawamoto S-I, Kawamura Y, Todoriki S. Effect of Gamma

- Irradiation on Soybean Allergen Levels. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2013, 77:2371-2377.
12. 舟木聡子、加藤敦子、森山達哉、染毛剤ヘナによる職業性接触蕁麻疹発症後、多種の野菜による即時型アレルギーを併発した1例、皮膚科の臨床、2013, 55,(11):1401-1404.
 13. 原田 晋、森山達哉、有津 崇、中山 哲、田中 昭、モヤシ摂取によりアナフィラキシー症状をきたした Pollen-food Allergy Syndrome の1例、皮膚科の臨床、2013, 55,(8): 1013-1017.
 14. Chikako Sugiura, Shiho Nishimatsu, Tatsuya Moriyama, Sayaka Ozasa, Teruo Kawada, and Kazutoshi Sayama, Catechins and Caffeine Inhibit Fat Accumulation in Mice through the Improvement of Hepatic Lipid Metabolism, *J. Obesity*, Volume 2012 ,2012, Article ID 520510, 10 pages.
 15. 吉田珠英、近藤享子、石黒直子、森山達哉、川島 眞、豆乳による口腔アレルギー症候群の2例、皮膚科の臨床、2012, 54(3): 418-422.
 16. Michihara S, Tanaka T, Uzawa Y, Moriyama T, Kawamura Y. Puerarin exerted anti-osteoporotic action independent of estrogen receptor-mediated pathway. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2012, 58(3):202-209.
 17. Makino-Wakagi, Y., Yoshimura, Y., Uzawa, Y., Zaima, N., Moriyama, T., Kawamura, Ellagic acid in pomegranate suppresses resistin secretion by a novel regulatory mechanism involving the degradation of intracellular resistin protein in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012, 417: 880-885.
 18. Yoshimura Y, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Different localization patterns of anthocyanin species in the pericarp of black rice revealed by imaging mass spectrometry. *PLoS One*. 2012, 7(2):e31285.
 19. 足立厚子、森山達哉、清水秀樹、堀川達弥、田中 昭、SJOLANDER Sigrid、大豆アレルギーにおける Gly m4, Gly m5, Gly m6 特異 IgE の重要性および Gly m5, Gly m6 サブユニット特異 IgE について、*J. Envir. Derma. Cut. Allergol*. 2012, 6(2): 60-66.
 20. Mizutani Y, Shibuya Y, Takahashi T, Tsunoda T, Moriyama T, Seishima M. "Major royal jelly protein 3 as a possible allergen in royal jelly-induced anaphylaxis." *J Dermatol*. 2011, 38(11):1079-1081.
 21. 飯島茂子、森山達哉、クラス1 およびクラス2 の両方が関与したと考えた豆乳によるアナフィラキシーの1例、*J. Envir. Derma. Cut. Allergol*. 2011, 5(5): 439-449.
 22. 原田 晋、田中 功、有津 崇、田中 昭、森山達哉、ピーナッツアレルギー：果物類の OAS および豆乳アレルギーとの合併例、*皮膚病診療*、2011, 33(5):479-482.
 23. 原田 晋、三好麻里、森山達哉、田中 昭、オオアワガエリとの交叉反応が疑われたライチ、ピスタチオアレルギーの1例、*皮膚臨床*、2011, 53(3):421-425.
 24. 原田 晋、森山達哉、田中 功、有津 崇、田中 昭、ピーナッツ豆腐摂取後にアナフィラキシー症状をきたしたクラス2 ピーナッツアレルギーの1例、*日本ラテックストアアレルギー研究会会誌*、2011, 15(1):70-75.

合計 24 件

b. 総説

1. 森山達哉：イムノブロットング法によるアレルゲンの解析方法, *MB Derma*.増刊号,2015, 「日常皮膚診療に役立つアレルギー百科」 pp. 28-32,
2. Moriyama T : Diversity of Food Allergy, *J. Nutr. Sci.Vitaminol*. 61 (Suppl.), 2015, S106-108, 2015-05.
3. 森山達哉：食物アレルギーの現状と多様性（森山達哉、穠山 浩 監修「食物アレルギーの現状とリスク低減化食品素材の開発」）2015、シーエムシー出版、pp.1-6.
4. 森山達哉：クラス2 食物アレルギーリスクの変動と低減化（森山達哉、穠山 浩 監修「食物アレルギーの現状とリスク低減化食品素材の開発」）2015、シーエムシー出版、pp.264-169.
5. 森山達哉：食品素材のアレルゲンリスク、食品の包装、2014, 46(1):32-38.

6. 森山達哉：植物性食品による食物アレルギーとアレルゲン、Sesame Newsletter, 2014, No.28, p.16-18.
7. 森山達哉：消化器系と栄養、「健康栄養学－健康科学としての栄養生理化学（第2版）」2014, 小田裕昭・加藤久典・関 泰一郎編、共立出版、pp. 93-104.
8. 森山達哉、河田照雄：脂肪組織と栄養、「健康栄養学－健康科学としての栄養生理化学（第2版）」2014, 小田裕昭・加藤久典・関 泰一郎編、共立出版、pp. 123-132.
9. 森山達哉、河田照雄：肥満と栄養、「健康栄養学－健康科学としての栄養生理化学（第2版）」2014, 小田裕昭・加藤久典・関 泰一郎編、共立出版、pp. 212-219.
10. 森山達哉：食物アレルギー、「健康栄養学－健康科学としての栄養生理化学（第2版）」2014, 小田裕昭・加藤久典・関 泰一郎編、共立出版、pp. 262-269.
11. 森山達哉：大豆アレルギーと大豆アレルゲン、「大豆の栄養と機能性」2014、監修：家森幸男、シーエムシー出版、pp.176-182.
12. 森山達哉、長瀬二郎：大豆ペースト、「大豆の栄養と機能性」2014、監修：家森幸男、シーエムシー出版、pp. 153-160.
13. 森山達哉：花粉－食物アレルギー症候群－花粉症に関連する新規の食物アレルギー、臨床栄養、2014、124(2) p.2-3 .
14. 森山達哉：大豆アレルギーの多様性と大豆食品の低アレルゲン性、温故知新、2012、
15. 森山達哉：モモのアレルギーはどこまでわかっているのか、月刊 食生活、2012、106 号 (7) p.41-45.
16. 森山達哉：植物性食品素材による新たな食物アレルギーリスク、明日の食品産業 2012, 11 月号、p.36-42.
17. 森山達哉：イムノブロッティング法によるアレルゲンの抗原解析：原因素材及びリコンビナント・アレルゲンを用いて、アレルギーの臨床、2012, 32(13), p.1253-1257.
18. 森山達哉：食品素材の新規アレルゲンリスクについて、日本食品新素材研究会誌、2012, 15 巻 2 号 (12 月号) 、p.51-57.
19. 森山達哉：各種大豆加工食品のアレルゲンリスク評価、フードジャーナル、2012、2012 年 1 月号、 pp.55.
20. 森山達哉：大豆アレルゲンの多様性と味噌の低アレルゲン性の検証、日本醸造協会誌 (Journal of the Brewing society of Japan)、2011、Vol. 106, (10), pp.645-655.
21. 森山達哉：最新の食物アレルギー事情とその多様性－新規な食物アレルギーを中心に、食品と科学、2011, 53(3), 65-71.
22. 足立厚子、森山達哉：大豆アレルギー、「食物アレルギー外来診療のポイント 63」（診断と治療社）改訂第2版 2013 年、pp.111-112.
23. 森山達哉、小川 正：大豆アレルギーの多様性とそのリスク低減化戦略 ～低アレルゲン大豆加工食品の開発と流通システムの構築の試み～「アレルギーと食品－食品開発のためのアレルギー制御・検査技術－」8 章、食品工業 NEO 2012 年 光琳 食品工業編集部編. pp.129-151.

c. 招待講演、シンポジウムなど

1. 森山達哉：食物アレルギーの多様性とリスク変動解析、兵庫県立大学環境人間学部専門教育講演会、兵庫県立大学環境人間学部姫路新在家キャンパス、2015 年 11 月 19 日.
2. Tatsuya Moriyama : Diversity of food allergy, (Organizer and speaker) ACN2015 Symposium 32, (How can we fight against food allergy?), 12th Asian Congress of Nutrition, May 16, 2015 (PACIFICO Yokohama, Kanagawa, Japan).
3. 森山達哉：花粉症に関連する新しいタイプの食物アレルギー、市民公開講座「第7回ひと・健康・未来シンポジウム 2015 福岡「食物アレルギーの最新情報」ホテルニューオータニ博多、2015 年 7 月 4 日.
4. 森山達哉：食物アレルギーの原因抗原解析とリスク変動解析、第 10 回 東京皮膚疾患フォーラム、ザ・ランドマークスクエア TOKYO、2015 年 7 月 16 日.
5. 森山達哉：食物アレルギーの多様性とリスク変動解析、日本食品科学工学会シンポジウム、京都大学本部キャンパス、2015 年 8 月 28 日.

6. 森山達哉：花粉症に関連する新しいタイプの食物アレルギー、市民公開講座 第5回ひと・健康・未来シンポジウム2015名古屋「食物アレルギーの最新情報」メルパルク名古屋、2015年2月28日。
7. 森山達哉：農作物の健康機能性とアレルギー性、京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻特別セミナー、京都大学宇治キャンパス、2014年11月27日。
8. 森山達哉：大豆・豆乳のタンパク質栄養価に関する研究、日本豆乳協会講演（東京）2014年8月8日。
9. 森山達哉：食物アレルギーの現状と学校現場での対応について、近畿大学教員免許更新講習、近畿大学東大阪キャンパス、2014年8月7日。
10. 森山達哉：穀類による食物アレルギー：大豆アレルギーを中心に、第29回ゴマ科学大会招待講演、近畿大学東大阪キャンパス、2014年10月4日。
11. 森山達哉：花粉症に関連する新しい食物アレルギーとその発症リスク変動、NPO食の安全と安心を科学する会（SFSS）食の安全と安心フォーラムⅦ、グランフロント大阪、2014年11月28日。
12. 財満信宏、森山達哉：イメージングマスマスペクトロメトリーによる食品機能研究、第59回食品新素材研究会特別講演、京都テルサ、2014年9月4日。
13. 森山達哉：クラス2食物アレルギーの現状とそのリスク変動解析、日本食品免疫学会（JAFI）第7回シンポジウム（東京）招待講演、東京大学、2014年6月30日。
14. 森山達哉：野菜と豆で健康に、京丹波町健康講座、京丹波町瑞穂保健福祉センター、2014年2月26日。
15. 森山達哉：新しいタイプの食物アレルギーとその発症リスク変動：（抗原解析の立場から）、NPO食の安全と安心を科学する会（SFSS）食の安全と安心フォーラムⅦ「我が国における食物アレルギーのリスク管理と低減化策」東京大学、2014年2月2日。
16. 森山達哉：日本食の中心素材：大豆と味噌の健康機能性、関西味噌生販協議会総会 特別講演、ホテルグランヴィア大阪、2013年10月22日。
17. 森山達哉：知ってナットク！日本食素材の健康機能、農学部公開講座（名古屋）近畿大学農学部公開講座「食べ物と健康」、名古屋マリオットアソシアホテル、2013年10月19日。
18. 森山達哉：食物アレルギーの多様性：花粉症関連の食物アレルギーを中心に、第60回日本栄養改善学会学術総会 研究自由集会（栄養士食物アレルギー研究会）招待講演、神戸ポートピアホテル、2013年9月12日。
19. 森山達哉：大人でも要注意！新しい食物アレルギーのお話、近畿大学農学部 公開講座（奈良）、東大寺総合文化センター・金鐘ホール、2012年4月28日。
20. 森山達哉：リコンビナント・アレルギー及び抗アレルギー抗体を用いた抗原解析、第24回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム、大阪国際会議場、2012年5月12日。
21. 森山達哉：肥満関連分子の分泌制御をターゲットにした抗メタボ食品因子の探索、岡山バイオアクティブ研究会招待講演、岡山大学、2012年6月8日。
22. 飯島茂子、森山達哉：クラス1およびクラス2の両方が関与したと考えた豆乳によるアナフィラキシーの1例、日本皮膚アレルギー学会受賞講演、仙台、2012年7月14日。
23. 森山達哉：食品素材の新規アレルギーリスクについて、第55回食品新素材研究会 特別講演、京都テルサ、2012年7月17日。
24. 森山達哉：スパイスのアレルギー性と健康機能性、第15回スパイス・ハーブ研究成果セミナー、東京、2012年7月4日。
25. 森山達哉：免疫と栄養、奈良県栄養士会主催 栄養士生涯学習研修会、帝塚山大学、2011年7月9日。
26. 森山達哉：醸造食品の低アレルギー性の検証（穀物アレルギーの最近の話題も含めて）、日本醸造協会主催 醸造調味食品研究会、王子、2011年7月13日。

d. 国際学会発表（一般講演のみ）

1. Hirona Kugo, Youhei Mouri, Ken-ichi Yanagimoto, Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama, The preventive effect of fish oil on the development of abdominal aortic aneurysm 12th Asian Congress of Nutrition (Poster number: PS-01-a-058) (PACIFICO Yokohama, Kanagawa, Japan) May 15, 2015.
2. Nobuhiro Zaima, Yukihiro Yoshimura, Yukio Kawamura, and Tatsuya Moriyama Characteristic Distribution of Metabolites in Oryza sativa Rice, 106th AOCS Annual Meeting Rosen Shingle Creek (Orlando, Florida, USA) May 3-6, 2015.

e. 国内学会発表件数（一般講演のみ）

- 2016年 日本栄養・食糧学会 4件（予定）
 2015年 日本農芸化学会 2件、日本食品科学工学会 1件、
 2014年 日本アレルギー学会 2件、日本農芸化学会 1件、日本栄養・食糧学会近畿支部大会 5件、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 4件、
 2013年 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 2件、日本栄養・食糧学会近畿支部大会 3件、日本食品科学工学会 2件、日本アレルギー学会 1件
 2012年 日本アレルギー学会 2件、日本農芸化学会 1件、日本微量栄養素学会学術集会 2件、日本栄養・食糧学会近畿支部大会 2件、
 2011年 日本アレルギー学会 2件、日本栄養・食糧学会近畿支部大会 2件、日本農芸化学会 2件、

合計 40件

f. 特許

なし

g. その他（学会賞、報道など）

1. 森山達哉：平成 24 年度 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会誌年間最優秀論文賞（共同受賞（連名））「大豆アレルギーにおける Gly m4, Gly m5, Gly m6 特異 IgE の重要性および Gly m5, Gly m6 サブユニット特異 IgE について」Journal of environmental dermatology and cutaneous allergology 6(2), 60-66) 2013 年 12 月 29 日.
2. 森山達哉：「凍り豆腐は大豆クラス 2 食物アレルギーのリスクが低減された大豆食品 - 近大」としてマイナビニュース（テクノロジー）に掲載。http://news.mynavi.jp/news/2013/10/25/041/、2013 年 10 月 25 日.
3. 森山達哉：独立行政法人 国民生活センター 2013 年 12 月 5 日発表情報（注意喚起）「豆乳等によるアレルギーについて－花粉症（カバノキ科花粉症）の方はご注意を－」の報告書（http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20131205_1.pdf）において、これまでの大豆アレルギーに関する発表論文・総説が引用使用。2013 年 12 月 5 日.
4. 森山達哉：近畿大学プレスリリース「ザクロ果汁成分「エラグ酸」に「レジスチン」分泌抑制作用 近畿大学農学部グループが発見、糖尿病予防に役立つ可能性」2012 年 7 月 9 日.
5. 森山達哉：朝日新聞デジタル「ザクロ果汁成分「エラグ酸」に「レジスチン」分泌抑制作用 近畿大学農学部グループが発見、糖尿病予防に役立つ可能性」2012 年 7 月 9 日.
6. 森山達哉：NHK 奈良放送局 テレビ放映「ザクロに糖尿病予防成分発見」2012 年 7 月 11 日.
7. 森山達哉：マイナビニュース（WEB ニュース）「「ザクロ」の果汁は 2 型糖尿病の改善に持ってこい! - 近畿大が発見」2012 年 7 月 11 日.