

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780036

研究課題名（和文） 化合物探索から単離したサリチル酸アゴニストを用いた植物免疫ホルモンの受容機構解明

研究課題名（英文） Characterization of perception mechanism of plant immune hormone using an salicylic acid agonist isolated from a chemical screening

研究代表者

能年 義輝（NOUTOSHI YOSHITERU）

岡山大学・異分野融合先端研究コア・助教

研究者番号：70332278

研究成果の概要（和文）：

サリチル酸(SA)は植物免疫応答を司るホルモンだがその作用機序は不明である。本研究ではSAアナログであるImprimatinC1を利用したSA受容機構解明を目指した。ImprimatinC1は生体内での代謝を受け4-chlorobenzoic acidとして作用することがわかった。また、ImprimatinC1はSAの多面的機能のうち防御遺伝子発現誘導能のみを模倣した。ImprimatinC1非感受性シロイヌナズナ変異体を探索し、恒常的に防御応答を活性化する3変異体を同定した。これらはSA受容体に変異を持つ可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Salicylic acid (SA) is a phytohormone which regulates immunity responses but its perception mechanism is still unclear. In this study, SA receptor was explored using ImprimatinC1, an SA analog. ImprimatinC1 seems to be converted to 4-chlorobenzoic acid inside plants. It mimic only SA function for downstream signaling, suggesting its function as partial agonist of SA. We isolated ImprimatinC1 insensitive Arabidopsis mutants and revealed that three of them expressed defense genes constitutively. They are expected to have mutations in SA receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：(1)植物 (2)病害抵抗性 (3)ケミカルバイオロジー (4)薬剤反応性 (5)植物免疫

1. 研究開始当初の背景

高等植物は動物の自然免疫系に類似した独自の免疫システムを持っており病原体感染から身を守っている。植物内生の生理活性物質であるサリチル酸(SA)は免疫ホルモンとして活物性(生体栄養性)の病原体に対する植物の病害抵抗性反応を司っている。耐病性は農業上の重要性質であり、その制御に重要な役割を担うSAの働きについては、古くから研究が進められてきた。これまでに生化学的および遺伝学的手法を駆使した多くの研究が世界規模で進められてきたものの、SAの作用機序は未だ明らかになっていない。

代表者は植物の免疫応答を活性化する薬剤を探索する為のアッセイ系を独自に開発した。そして市販の化合物ライブラリーの大規模スクリーニングを実施して複数の植物免疫活性化剤を獲得することに成功した。その後さらに解析を進め、それら薬剤の中の一つであるImprimatinC1と命名した薬剤がSAのアナログとして作用することを明らかにした(図1a)。種々のホルモン作用の解明にはその働きの一部を模倣するパーシャルアゴニストが貢献してきたという事実から、ImprimatinC1を使うことでSAの機能解明に迫れるのではないかと考えた。特に、ImprimatinC1は小分子であるSAと比して大きな分子量を持つユニークな化合物であることから、生化学的アプローチが使えるのではないかと期待した。

2. 研究の目的

そこで本研究ではSAアナログ活性を持つImprimatinC1を利用し、その標的タンパク質を同定することでSA受容機構の解明につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

生理活性物質の標的タンパク質の同定手法としては、一般に生化学的手法が多用される。

しかしSAは小さな分子であり、化学的修飾によってその活性が失われてしまうことからこれまで分子プローブ作製に関する報告はなかった。ただしImprimatinC1はユニークな構造を持ち遊離アミノ基を保持している。そこで、一つ目の方法としてImprimatinC1を架橋した光反応性ビオチン化プローブを作製し、シロイヌナズナ抽出タンパク質からImprimatinC1に結合する分子を精製するという生化学的手法によって標的タンパク質を単離同定する方法を計画した。

一方、動物とは異なり植物科学においては標的タンパク質の同定に遺伝学的手法を使えることが強みである。そこで上記の生化学的手法がうまく機能しない場合に備え、ImprimatinC1に非感受性を示すシロイヌナズナ変異体を単離してその原因遺伝子からSA受容分子同定に迫るといった遺伝学的手法を平行して実施することを計画した。

4. 研究成果

① まず、ImprimatinC1に存在する遊離アミノ基と光反応性ビオチン化プローブのカルボキシル基を縮合しようと複数の方法を試みたものの、当初の予想に反しプローブを作製することができなかった。この理由はImprimatinC1の遊離アミノ基の反応性が低いことに依るものと考えられた。そこでプローブ作製に適した分子の入手およびImprimatinC1の詳細な解析を行う為、類縁体の探索と解析を行った。

② ImprimatinC1の類縁体として塩素原子が一つ多く付加したImprimatinC2を入手しそれらの活性を調べた。これらは共に植物体に投与すると防御遺伝子*PRI*の発現を誘導し、ImprimatinC2はImprimatinC1より若干強い活性を示した(図1b)。ただしその強度は

SA のそれよりは弱いものであった。

次にこれら薬剤の種々の派生物を入手してその構造活性相関解析を実施した (data not shown)。結果として、ImprimatinC1 および ImprimatinC2 は生体内での代謝を受けて、それぞれ 4-chlorobenzoic acid(4-CBA) および 3,4-dichlorobenzoic acid(3,4-DCBA) になり、それらが活性本体として機能しているということを明らかにした (図 1a)。4-CBA および 3,4-CBA はそれぞれ対応する Imprimatins と同程度の活性を示した (図 1b)。

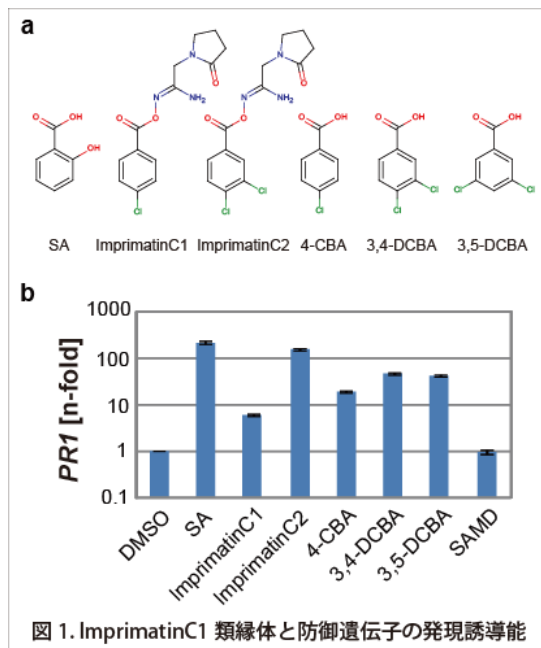


図 1. ImprimatinC1 類縁体と防御遺伝子の発現誘導能

③ SA は防御遺伝子の発現誘導を活性化する活性と共に、自身の生合成を正にフィードバック制御する活性を持ち、さらにジャスモン酸 (JA) シグナル伝達に対する拮抗阻害活性も持つことが知られている (図 2d)。

200 μ M の ImprimatinC1 をシロイヌナズナ植物体に噴霧投与すると、病原性および非病原性の細菌に対する耐病性を 100 μ M の SA と同程度に向上させた (図 2d)。これは先の防御遺伝子発現誘導能の結果と一致した。

ImprimatinC1 はシロイヌナズナ培養細胞に 100 μ M、24 時間投与しても SA 合成を活性

化しなかった (図 2b)。

また、SA がメチルジャスモン酸によって誘導されるリポキシゲナーゼ遺伝子 (*LOX2*) の発現誘導を抑制するのに対し、ImprimatinC1 はその活性を示さなかった (図 2c)。

これらの結果は ImprimatinC1 が SA の多面的機能のうちの防御遺伝子発現誘導能のみを模倣する薬剤であるということを示している (図 2d)。

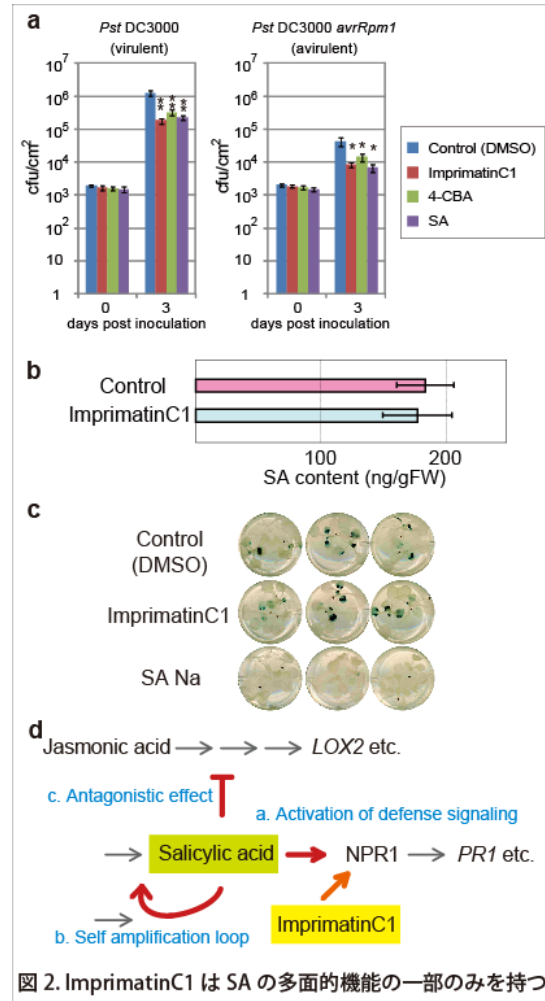


図 2. ImprimatinC1 は SA の多面的機能の一部のみを持つ

④ ImprimatinC1 と SA とを同時に植物体に投与して、各種防御遺伝子の発現量を調べたところ、それらは相加的には作用せず ImprimatinC1 の発現レベルに抑制されることがわかった (図 3)。このことは、ImprimatinC1 が防御遺伝子発現誘導において SA のパーシャルアゴニストとして作用す

ることが明らかとなり、SA 受容分子同定のツールとしての有用性が確かめられた。

今回、ImprimatinC1 は 4-CBA のプロドラッグであることが明らかとなったが、その化学構造は農薬等の生理活性物質の持続性をコントロールする為のプロドラッグ化に応用できる可能性がある。

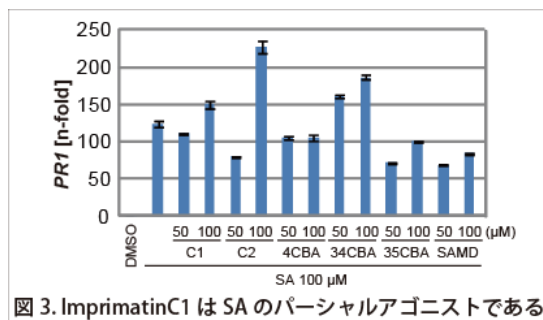


図 3. ImprimatinC1 は SA のパーシャルアゴニストである

⑤ 上記の結果から、もし ImprimatinC1 自体を当初の予定通り分子プローブにできていたとしても、それを用いて SA の標的タンパク質を得ることはできていなかったということを示していた。そこでバックアップとして遺伝学的手法を中心に研究を進めた。

ImprimatinC1 を含有する寒天培地上でモデル植物であるシロイヌナズナを生育させると、病害抵抗性反応が誘導されて発達遅延を示す (図 4a)。そこでシロイヌナズナ EMS 変異種子から、ImprimatinC1 の生育抑制効果に対して非感受性を示す変異体の探索を進めた。100μM の ImprimatinC1 を添加した寒天培地上に変異種子を播種し、野生型に比べて良好な生育を示す個体を選抜し、通常培地に移植して回収した。結果として 14 個の候補株を得ることに成功し SA agonist insensitive (*sgi*) 変異体と命名した。これらの変異体を SA 含有培地で生育させたところ、SA に対しては通常に反応することがわかった (図 4a, 一部 data not shown)。SA 受容分子は機能重複した複数の分子から構成されると予想されるが、*sgi* 変異体は

ImprimatinC1 が標的とする一部の遺伝子のみに変異を持つ可能性が考えられた。

また遺伝子発現解析を実施したところ、3 変異体については恒常的に防御応答が活性化していることを見出した (図 4b)。これらの 3 変異体は SA シグナル伝達経路における転写活性化因子である NPR1 に依存した経路が活性化しており、そのうち 1 つは NPR1 非依存的経路も活性化されていた。以上の結果から、これらの 3 変異体では、受容体の欠損によるフィードバックによってシグナルが増強したものも含まれるのではないかと推察された。

これら変異体については、野生型植物に戻し交配し、その次世代の個体群から変異形質を示すものを選抜した。今後、次世代シーケンサーによる変異点同定を進める予定である。

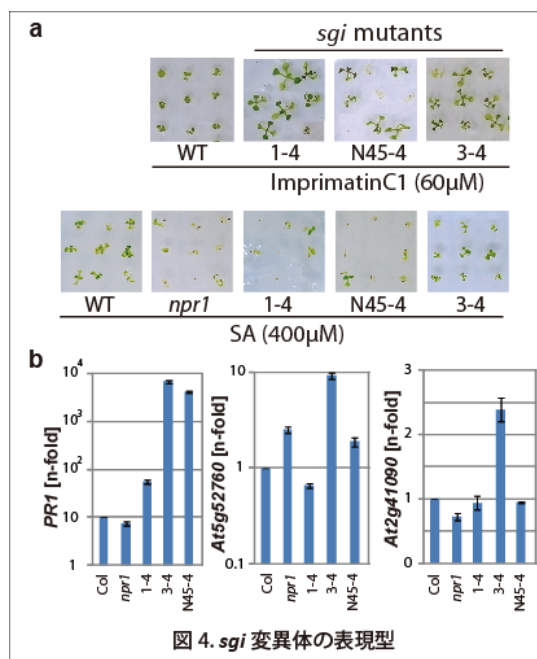


図 4. *sgi* 変異体の表現型

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Yoshiomto, K., Noutoshi, Y., Hayashi, K.I., Shirasu, K., Takahashi, T. and Motose, H. A chemical biology approach reveals an opposite action between thermospermine and auxin in xylem development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 53(4):635-45. (2012) 査読有

② 鳴坂義弘、平塚和之、能年義輝、プラントアクティベーターによる植物免疫の活性化と化学遺伝学への利用、化学と生物、査読無、Vo48、No. 10、2010、pp. 706-712、

[学会発表] (計 5 件)

① 能年義輝、多検体スクリーニングにより単離した植物免疫プライミング剤の作用機序解明、日本植物生理学会第 53 回年会、2012/3/16、京都産業大学

② Noutoshi, Y., Chemical Biology Approach toward Understanding Molecular Mechanism of Plant Immune Responses in *Arabidopsis thaliana*, 2011 RIKEN Chemical Biology Symposium, 2011/10/21, RIKEN WAKO

③ Masateru Okazaki, Chemical genetics for salicylic acid signal transduction in *Arabidopsis* using an analog isolated from a high-throughput screening, EMBO Conference Series - Chemical Biology 2010, 2010/9/22, EMBL Heidelberg

④ 能年義輝、薬剤探索から得た新規アゴニストを用いたサリチル酸情報伝達機構の解析、日本植物生理学会第 52 回年会、2011/3/20、震災の為 WEB 発表

⑤ 能年義輝、ケミカルバイオロジーによる植物免疫研究、日本植物学会第 74 回大会、2010/9/9、中部大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能年 義輝 (NOUTOSHI YOSHITERU)
岡山大学・異分野融合先端研究コア・助教
研究者番号：70332278