

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15412

研究課題名（和文）細胞膜マイクロドメインが制御する植物免疫機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of plant innate immunity regulated by plasma membrane microdomains

研究代表者

長野 稔 (Nagano, Minoru)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：80598251

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では植物免疫における細胞膜マイクロドメインの役割を明らかにするために、マイクロドメインが減少したシロイヌナズナの形質転換系統、及び変異体を確立した。その系統を用いたプロテオーム解析等により、主要な免疫タンパク質がマイクロドメインに存在することを明らかにした。また、マイクロドメインが病害応答時の活性酸素種の産生に貢献することも明らかにした。以上の結果から、シロイヌナズナの免疫においてマイクロドメインが重要な働きをすることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、恒常的にマイクロドメインが減少したシロイヌナズナ系統を作出することができたため、マイクロドメインに関する生化学実験や生理学実験を容易に行うことが可能となった。そのため、マイクロドメインの植物免疫における役割を解明することができた。マイクロドメインは免疫以外にも様々な環境ストレス応答や生育に関与することが示唆されているため、本研究で確立した実験系は他の生理学的機能とマイクロドメインの関係の解明にも展開できる。またマイクロドメインの機能が解明できれば、マイクロドメインを利用した植物機能の強化が期待できる。

研究成果の概要（英文）：To reveal the role of plasma membrane microdomains in plant innate immunity, we established the Arabidopsis transgenic lines and mutants in which microdomains were decreased. Proteome analysis showed that major immune proteins existed on microdomains. We also demonstrated that microdomains contributed to the generation of reactive oxygen species during disease response. These results suggest that microdomains play an important role in Arabidopsis immunity.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：植物免疫 細胞膜 マイクロドメイン スフィンゴ脂質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜にはマイクロドメインと呼ばれる、スフィンゴ脂質とステロールを中心とした脂質とタンパク質が集積した特殊な小ドメインが点在する。植物免疫に関連するタンパク質の足場としてマイクロドメインが注目される一方、植物免疫において本当にマイクロドメインが必要なのか、その本質的な重要性を証明する研究はなかった。これまでに、イネのスフィンゴ脂質脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼ (FAH) を発現抑制することにより作出したマイクロドメイン減少イネを用いた解析から、イネの免疫にマイクロドメインが関与することを明らかにしていた。しかし、マイクロドメインによる免疫の制御は植物共通の機構であるのか明らかにされておらず、現状ではマイクロドメインと植物免疫の関係を理解したとは言い難かった。

### 2. 研究の目的

本研究では、新たにシロイヌナズナを用いて免疫におけるマイクロドメインの機能を解析することにより、マイクロドメインによる植物免疫制御機構の共通性や相違性、及び包括性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) マイクロドメインが減少したシロイヌナズナ系統の作出

RNAi 法によりシロイヌナズナの FAH1 と FAH2 を同時に発現抑制した系統 RNAi-FAH1/2 を確立した。また、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 により、*fah1* 変異体を作成し、既存の *fah2* 変異体と掛け合わせることで、*fah1fah2* 二重欠損変異体を作成した。

#### (2) スフィンゴ脂質分析

RNAi-FAH1/2 系統、及び *fah1fah2* 二重変異体から脂質を抽出し、液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) により、スフィンゴ脂質分子種を定量分析した。

#### (3) 細胞膜の解析

*fah1fah2* 二重変異体から細胞膜を抽出し、そのスフィンゴ脂質分子種を LC-MS/MS により分析した。また、流動性可視化試薬 di-4-ANEPPDHQ を用いた蛍光観察により、シロイヌナズナ野生型と *fah1fah2* 二重変異体の細胞膜の流動性を比較した。さらに、マイクロドメイン可視化プローブを用いて、シロイヌナズナ野生型と *fah1fah2* 二重変異体の細胞膜表面のマイクロドメインを比較した。

#### (4) 細胞膜タンパク質の解析

シロイヌナズナ野生型と *fah1fah2* 二重変異体から細胞膜を抽出し、LC-MSMS を用いたプロテオーム解析を行うことにより、細胞膜タンパク質を比較した。また、*fah1fah2* 二重変異体の細胞膜で減少している免疫タンパク質に対しては、細胞膜画分を抽出しウエスタンブロット解析を行った。

#### (5) 耐病性解析

flg22 やキチン処理を行い、病害応答時に産生される活性酸素種 (ROS) の解析を行った。また、flg22 やキチン処理時の耐病性遺伝子の発現解析を行った。また、AvrRPT2 を有するシュードモナス菌の感染実験を行った。

#### (6) FAH 過剰発現シロイヌナズナ系統の解析

FAH1、あるいは FAH2 を過剰発現したシロイヌナズナ系統 (FAH1-OX、及び FAH2-OX) のスフィンゴ脂質分析を LC-MS/MS を用いて行った。また、AvrRPT2 を有するシュードモナス菌の感染実験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) マイクロドメインが減少したシロイヌナズナ系統の作出

CRISPR/Cas9 により作出した *fah1* 変異体、及び *fah2* 変異体は、野生型と比べて見た目の表現型に大きな違いは見られなかったが、RNAi-FAH1/2、及び *fah1fah2* 二重変異体は矮小な表現型を示した。

#### (2) スフィンゴ脂質分析

RNAi-FAH1/2 系統、及び *fah1fah2* 二重変異体のスフィンゴ脂質分析を行った結果、野生型に比べてセラミド、グルコシルセラミド、グリコシルイノシトールホスホセラミドの 2-ヒドロキシ脂肪酸が大幅に減少していることを明らかにした。上記の(1)の結果と合わせて、2-ヒドロキシスフィンゴ脂質は植物の生長に重要であることが明らかとなった。

### (3)細胞膜の解析

2-ヒドロキシスフィンゴ脂質が細胞膜に与える影響を調べるために、*fah1fah2* 二重変異体の細胞膜のスフィンゴ脂質分析を行った。その結果、*fah1fah2* 二重変異体の細胞膜のセラミド、グルコシルセラミド、グリコシルイノシトールホスホセラミドの 2-ヒドロキシ脂肪酸が大幅に減少していることを明らかにした。また、2-ヒドロキシスフィンゴ脂質と細胞膜の流動性の関係を調べるために、蛍光イメージング実験を行った。その結果、*fah1fah2* 二重変異体の細胞膜の流動性が上昇していることが明らかになった。したがって、2-ヒドロキシスフィンゴ脂質は膜の秩序を高めることが示された。さらに、マイクロドメイン可視化プローブを用いたマイクロドメインの可視化を行った結果、*fah1fah2* 二重変異体はマイクロドメインが減少していることが明らかになった。以上の結果から、2-ヒドロキシスフィンゴ脂質はマイクロドメインの形成に関与することが明らかとなった。

### (4)細胞膜タンパク質の解析

2-ヒドロキシスフィンゴ脂質と細胞膜タンパク質の関係を明らかにするために、細胞膜のプロテオーム解析を行った。その結果、*fah1fah2* 二重変異体で減少している 163 タンパク質を同定した。その中にはパターン認識受容体や NADPH オキシダーゼなど、17 個の免疫関連タンパク質が含まれていた。これらのうち主要な免疫タンパク質に対して細胞膜画分のウエスタンブロット解析を行った結果、BAK1, CERK1, RBOHD, GPA1 が *fah1fah2* 変異体の細胞膜で減少していることを明らかにした。

### (5)耐病性解析

上記の(4)の解析で病害応答時の ROS の産生に関与する RBOHD が減少していたことや、フラジェリンの共免疫受容体 BAK1 やキチンの共免疫受容体 CERK1 も減少していたことから、flg22 及びキチン処理時の ROS の産生量を調べた。その結果、flg22 処理、およびキチン処理時ともに *fah1fah2* で ROS の産生量が減少していることが明らかになった。その一方で、flg22 やキチン処理時の耐病性関連遺伝子の発現量を解析した結果、*fah1fah2* では野生型よりも発現が増加していることが明らかになった。また、2-ヒドロキシスフィンゴ脂質と耐病性の関係を明確にするためにシュードモナス菌 (*AvrRPT2*) の感染実験を行った。イオン漏出量を調べた結果、*fah1fah2* ではイオン漏出量が低下していたことから、過敏反応が抑制されることが明らかになった。その一方で、菌の増殖量については野生型と変化がなかった。以上の結果から、2-ヒドロキシスフィンゴ脂質は ROS の産生や過敏反応の制御には関与する一方で、耐病性には影響を与えないことが明らかとなった。

### (6)FAH 過剰発現シロイヌナズナ系統の解析

FAH の過剰発現がスフィンゴ脂質組成と耐病性に与える影響を調べるために、まず FAH1 過剰発現系統、および FAH2 過剰発現系統のスフィンゴ脂質分析を行った。その結果、両系統とも 2-ヒドロキシスフィンゴ脂質量の割合が増加していることが明らかになった。次に *AvrRPT2* を有するシュードモナス菌の感染実験を行った結果、耐病性が向上していることが明らかになった。以上の結果から、2-ヒドロキシスフィンゴ脂質の増大は、耐病性の向上に寄与することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mamode Cassim Adiilah, Navon Yotam, Gao Yu, Decossas Marion, Fouillen Laetitia, Grelard Axelle, Nagano Minoru, Lambert Olivier, Bahammou Delphine, Van Delft Pierre, Maneta-Peyret Lilly, Simon-Plas Françoise, Heux Laurent, Jean Bruno, Fragneto Giovanna, Mortimer Jenny C., Deleu Magali, Lins Laurence, Mongrand Sebastien	4. 巻 296
2. 論文標題 Biophysical analysis of the plant-specific GIPC sphingolipids reveals multiple modes of membrane regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100602 ~ 100602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagano Minoru, Ueda Haruko, Fukao Yoichiro, Kawai-Yamada Maki, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 15
2. 論文標題 Generation of Arabidopsis lines with a red fluorescent marker for endoplasmic reticulum using a tail-anchored protein cytochrome b5-B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1790196 ~ 1790196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2020.1790196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagahage Isura Sumeda Priyadarshana, Sakamoto Shingo, Nagano Minoru, Ishikawa Toshiki, Mitsuda Nobutaka, Kawai Yamada Maki, Yamaguchi Masatoshi	4. 巻 170
2. 論文標題 An Arabidopsis NAC domain transcription factor, ATAF2, promotes age dependent and dark induced leaf senescence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 299 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pp1.13156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato M, Nagano M, Jin S, Miyagi A, Yamaguchi M, Kawai-Yamada M, Ishikawa T	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Plant-unique cis/trans isomerism of long-chain base unsaturation is selectively required for aluminum tolerance resulting from glucosylceramide-dependent plasma membrane fluidity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9010019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagano M., Kakuta C., Fukao Y., Fujiwara M., Uchimiya H., Kawai-Yamada M.	4. 巻 132
2. 論文標題 Arabidopsis Bax inhibitor-1 interacts with enzymes related to very-long-chain fatty acid synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Plant Res.	6. 最初と最後の頁 131-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-018-01081-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Y., Miyagi A., Ishikawa T., Nagano M., Yamaguchi M., Hihara Y., Kaneko Y., Kawai-Yamada M.	4. 巻 -
2. 論文標題 One of the NAD kinases, sll1415, is required for the glucose metabolism of Synechocystis sp. PCC 6803	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant J.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.14262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagahage Isura Sumeda Priyadarshana, Sakamoto Shingo, Nagano Minoru, Ishikawa Toshiki, Kawai-Yamada Maki, Mitsuda Nobutaka, Yamaguchi Masatoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 An NAC domain transcription factor ATAF2 acts as transcriptional activator or repressor dependent on promoter context	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 285 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.18.0507a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 長野稔
2. 発表標題 植物ナノドメインの機能解明を目指した可視化プローブの開発
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長野稔
2. 発表標題 植物スフィンゴ脂質が制御する病害抵抗性機構
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長野稔、宇川智水、伴野文彦、石川寿樹、山口雅利、深尾陽一朗、川合真紀
2. 発表標題 細胞膜を介した植物免疫制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長野稔、宇川智水、伴野文彦、石川寿樹、山口雅利、深尾陽一朗、川合真紀
2. 発表標題 スフィンゴ脂質2-ヒドロキシル化が制御するシロイヌナズナ免疫システムの解析
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagano M, Ukawa T, Banno F, Ishikawa T, Yamaguchi M, Fukao Y, Kawai-Yamada M
2. 発表標題 Functional association of 2-hydroxy sphingolipids with innate immunity in Arabidopsis
3. 学会等名 8th Asian-Ocean Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長野稔、Boutte Y., Mamode-Cassim A., Fouillen L., 川合真紀, Mongrand S.
2. 発表標題 スフィンゴ脂質による植物細胞膜ダイナミクスの制御
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagano M., Boutte Y., Mamode-Cassim A., Fouillen L., Kawai-Yamada M., Mongrand S.
2. 発表標題 The Role of Sphingolipids in the Dynamics of Plasma Membrane in Plants
3. 学会等名 The 23rd International Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagano M., Boutte Y., Mamode-Cassim A., Fouillen L., Kawai-Yamada M., Mongrand S.
2. 発表標題 The Role of Sphingolipids in the Dynamics of Plasma Membrane in Plants
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Plant Lipids: Structure, Metabolism and Function (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長野稔、Boutte Y., Mamode-Cassim A., Fouillen L., 川合真紀, Mongrand S.
2. 発表標題 植物の細胞膜動態におけるスフィンゴ脂質の役割
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minoru Nagano, Chikako Kakuta, Masayuki Fujiwara, Yoichiro Fukao and Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 Arabidopsis Bax inhibitor-1 promotes VLCFA synthesis through the interaction with VLCFA-related enzymes
3. 学会等名 28th International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇川智水、長野稔、石川寿樹、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 2-ヒドロキシスフィンゴ脂質によるシロイヌナズナ耐病性の解析
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Minoru Nagano and Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 The role of plasma membrane microdomains in plant innate immunity
3. 学会等名 GDRI-IPB NETWORK (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomomi Ukawa, Minoru Nagano, Toshiki Ishikawa, Masatoshi Yamaguchi and Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 Analysis of the impact of 2-hydroxy sphingolipids on disease resistance in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 The 7th Asian Symposium on Plant Lipid (国際学会)
4. 発表年 2017年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------