

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2006 ～ 2009

課題番号：18207003

研究課題名(和文)

シロイヌナズナにおける形態形成と耐病性のクロストークに関する分子遺伝学的研究

研究課題名(英文)

Crosstalk between morphogenesis and immunity in *Arabidopsis thaliana*

研究代表者

田坂 昌生 (TASAKA MASAO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：90179680

研究成果の概要(和文)：茎頂分裂組織および腋生分裂組織にユニークな異常を示し、抵抗性遺伝子の一部が恒常的に活性化している半優性変異株 *uni-1D* 変異体の解析を通じて形態形成と耐病性のクロストークの分子実体を調べた。*UNI* は R タンパク質の一つをコードしており、*uni-1D* では恒常活性型変異になっている。この変異株のサプレッサーとして *ERECTA* (*ER*) 受容体キナーゼの機能欠損変異株等が得られた。また、*UNI* とタンパク質相互作用を行う 26S プロテアソームの一員である *RPT2a* の変異もサプレッサーとして機能した。これらがクロストークで重要な働きをする可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Semi-dominant *uni-1D* mutant of *Arabidopsis thaliana* showed interesting phenotypes, loss of shoot apical meristem activity, extra lateral shoot meristem formation and constitutive *PR* genes activation. *UNI* encodes one of the R-protein suggesting there is a crosstalk between shoot morphogenesis and immunity. We have isolate some extragenic suppressors including *erecta*. We also make clear that *UNI* protein binds with *RPT2a* protein, which is a member of 26S proteasome, and the *rpt2a* can also suppress *uni-1D*.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費       | 合計         |
|--------|------------|------------|------------|
| 2006年度 | 9,300,000  | 2,790,000  | 12,090,000 |
| 2007年度 | 8,700,000  | 2,610,000  | 11,310,000 |
| 2008年度 | 8,700,000  | 2,610,000  | 11,310,000 |
| 2009年度 | 8,800,000  | 2,640,000  | 11,440,000 |
| 総計     | 35,500,000 | 10,650,000 | 46,150,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：シロイヌナズナ、CC-NB-LRR、*UNI* 遺伝子、メリステム形成、サイトカイニン、病原応答、

## 1. 研究開始当初の背景

高等植物の基本的な体は、地上部と根を貫く上下軸とそれに直交する同心円状の軸を仮定し、これらの軸を組み合わせる事でうまく説明できる。そして、この2種類の軸は胚発生過程で確立し、この過程で上下軸にそって胚軸と幼根の先端に分裂組織ができる。発芽後、地上部では茎頂の分裂組織（茎頂分裂組織）から葉と茎が次々と作られ、葉の根元に新たな分裂組織（腋芽分裂組織）が出来る事で枝が生じ、全体としての植物個体の形が出来上がる。この形態形成過程に関する分子レベルでの解析は世界で精力的に行われている。そして、発芽後の体作りの過程において植物は多くの環境要因（光、水分、重力等）の影響を受ける事も良く知られている。この外界の影響の中には他の生物特に細菌や菌類の感染が含まれる。これらの生物の感染は植物に病気を引き起こし、植物側に抵抗性の反応を引き起こす。そして、形態形成と耐病性の間に何らかのクロストークがある事が最近示唆されてきた。しかし、病気の発生と植物の体作りの間に分子レベルでどのようなクロストークがあるのかほとんど判っていない。我々は、シロイヌナズナから1遺伝子の変異により地上部の形態に多大な異常を引き起こす半優性の*uni1D*変異株を単離し、その原因遺伝子を決定した。そして、次の様な事を既に明らかにしていた。(1)*uni-1D*変異株は半優性変異であり、新規のCC-NBS-LRRタンパク質をコードする遺伝子のLRR領域内の保存されたアミノ酸3つに変異が見つかりこれが原因遺伝子である事。(2)*uni-1D*ヘテロ個体は栄養成長期に本葉の形成の遅れ、本葉の形態異常、葉序の乱れ、葉脇や葉柄に多くの側枝を形成、花成の遅延、花序の成長停止など地上部の形態形成のいろいろな時期に多面的な異常が生じる事。さらに、*uni-1D*ホモ個体は矮小化し、花成を行わず、栄養成



図1  
長期のまま枯死しやすい事。(3)*un-1Di* 変異株

では多くの抵抗性遺伝子が恒常的に発現している事。

## 2. 研究の目的

本研究では次の4つの点を明らかにする事を目的とした。

- (1)、この変異株でどのような耐病性反応が引き起こされているかを分子レベルで明らかにし、*UNI* 遺伝子の耐病性反応過程における役割を分子・細胞レベルで明確にする。
- (2) この変異株でどのような形態異常が引き起こされているかを分子レベルで明らかにし、*uni-1D*変異で引き起こされた形態異常を分子レベルで明確にする。
- (3) *uni-1D* 変異の遺伝子外サプレッサーを多数単離して解析する事で形態形成と耐病性のクロストークの実態を遺伝学的に解明する。
- (4)変異型 *UNI* タンパク質と相互作用するタンパク質を、*in vivo* と *in vitro* で検索し耐病性と形態形成のクロストークの分子実体を明らかにする。

## 3. 研究の方法

目的別に次の研究の4つの細目で研究を行った。

- (1) *uni-1D* 変異株で見られる耐病性反応に関して
  - ①シロイヌナズナに感染できる *Pseudomonas syringae* をヘテロ個体の本葉に接種した。
  - ②トリパンブルーで染色する事で器官や組織における死細胞の数や分布を調べた。また、過敏細胞に関連する可能性が高いプロテアーゼ遺伝子等の発現も調べた。
  - ③抵抗性遺伝子の発現の為に細胞内信号伝達系には、サリチル酸、ジャスモン酸、G-タンパク質など幾つかの重要な要素が関わる事が知られている。これらのシグナル伝達系に欠陥を持つ変異株と *un-1D* を掛け合わせて2重変異株を作成し、その中で種々の抵抗性遺伝子の発現を調べた。
- (2)茎頂分裂組織形成と維持に関わる *WUS*, *CLV1*, *2*, *3* 遺伝子及び *STM* 遺伝子等の発現を調べた。さらに、これらの遺伝子の変異株との2重変異株を作成しその性質を調べた。
- (3)*uni-1D*変異の遺伝子外サプレッサーを多数単離して解析する事で形態形成と耐病性のクロストークの実態を遺伝学的に解明する研究を行った。
- (4)*UNI* タンパク質と相互作用するタンパク質を、イースト2ハイブリッドを使って同定し、その遺伝子との相互作用を遺伝学的に調べた。

## 4. 研究成果

- (1) *uni-1D* のヘテロ接合体でサリチル酸信

号伝達経路が恒常的に活性化しておりそれに伴って抵抗性遺伝子である *PR* 遺伝子群が恒常的に活性化していた。しかし、ジャスモン酸信号伝達系で活性化される抵抗性関連遺伝子は活性化しておらず、また、顕著な細胞死も引き起こされていなかった。なお、サリチル酸経路は形態異常に直接関与していない事も明らかにした。*Pseudomonas syringae* を用いた感染実験では、野生型植物に比べて若干抵抗性を増す様にも見られるが、*uni-1D* の形態が大きく変化しているため評価が難しく、明確な結論を得る事は出来なかった。

(2) *uni-1D* の形態異常は、大きく既存の茎頂分裂組織の活性低下と、葉脇における多数の腋芽茎頂分裂組織形成のに分けられる。解析の結果、*uni-1D* で植物ホルモンの一つであるサイトカイニンが恒常的に高発現している事が明らかになった。そしてこれは、サイトカイニン合成に関わる *IPT3* と *CYP735A2* の高発現によってもたらされており、サイトカイニンの濃度上昇により、タイプ A レスポンスレギュレータの発現も恒常的に上昇し、恒常的にサイトカイニン信号伝達系が活性化されている事が明らかになった。サイトカイニンを分解する活性を高めると葉脇における腋芽分裂組織形成の異常が見られなくなる事からこの現象にサイトカイニン信号伝達系の関与が示唆される。そして、サイトカイニン濃度を下げた *uni-1D* ではサリチル酸信号伝達系を介した *PR* 遺伝子群の上昇も一部抑えられる事から、サイトカイニン経路からサリチル酸経路に信号が送られる事が示唆された。サイトカイニンの恒常的な濃度上昇が茎頂分裂組織の活性低下にも関わるかどうかは明確ではないが、人工的にサイトカイニン濃度を低く抑えた *uni-1D* の栄養成長期の本葉形成の様

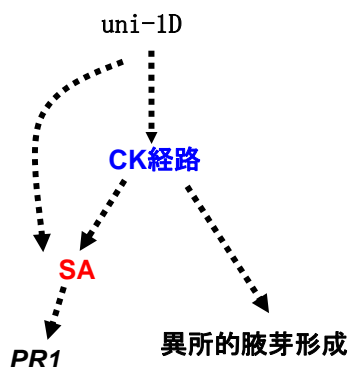


図 2

子はサイトカイニン欠乏植物の性質を示した。この事から、サイトカイニンは *uni-1D* で見られる全ての形態異常に関与する可能性が高い。

これをまとめると図2の様になる。

さらに、活性型 UNI タンパク質の下流で機能する因子を明らかにするために、既知の茎頂分裂組織の形成や維持に関わる遺伝子との関連を、発現解析と多重変異株の作成で調べた。その結果、野生型では *CUC* (*Cup-shaped Cotyledon*) 1, 2, 3 の発現している領域の中心に一つしか *STM* (*Shoot meristemless*) の発現スポットは生じずそこからしか腋芽は発生しないが、*uni-1D* からの刺激によりこの領域で多数の *STM* 発現スポットが生じ、それらが腋芽に発生する事が明らかになった。そして、これらの *uni-1D* によって誘導された腋芽は全て *WUS* (*Wuschel*)-*CLV* (*Clavata*) を正常に発現している分裂組織であった。一方、*WUS* や *CLV* の機能がなくても腋芽分裂組織は *uni-1D* で誘導される事が明らかになった。もともと、*uni-1D* に形成された主茎や腋芽の茎頂分裂組織は、生殖成長期に入ると顕著に活性を失い、それに伴って *WUS* の発現が弱まり、しばしば発現が消失する事も明らかになった。これは *WUS-CLV* 系を茎頂分裂組織中に安定に保つ機構が存在し、*uni-1D* はその活性を弱める事を示唆している。

(3) *uni-1D* をサプレッスする新規の変異を取得するために、*uni-1D* ゲノム断片と薬剤耐性をつなげた DNA を野生型植物に導入し、薬剤耐性を持ちかつ形態が *uni-1D* ヘテロ変異を示すラインを確立した。この種子を多量に取得して、薬剤耐性と形態から *uni-1D* 変異のサプレッサー候補を一次選抜し、PCR により導入した変異型 *uni-1D* が存在するラインを2次スクリーニングとして選抜した。なお、変異原には主に EMS を使用した。花芽が伸長するサプレッサー候補のシュートが得られた時、それに作られた次世代の種子に対してゲノムと表現型を解析する事で最終的なサプレッサーラインの確立を行った。驚いた事に EMS で処理をした形質転換植物の中で約 1 / 4 の *uni-1D* 表現型の植物個体から伸びたシュートが形成された。そして、そこに生じた次世代の種子の多くは *uni-1D* ゲノムを持つにも関わらず野生型の表現型の植物となった。これらのゲノムを解析した所、そのほとんどは形質転換した *uni-1D* のコード領域に EMS 特有の塩基置換が生じ、機能喪失型に変化していた。*UNI* 遺伝子の欠損変異は表現型を示さない。この結果は、高頻度で遺伝子内変異が生じた事を示している。新たに生じた変異部位は *UNI* 遺伝子全体に散在しており、特に特異的なドメインとの関連は無かった。今回見られた高頻度の変異の誘発は非常に面白い現象であるが残念ながら解析を十分に行う時間が無く今後の面白い問題として残された。また、同時に多数の遺伝子外変異に基づくサプレッサーも得られた。これらのサプレッサー変異の幾つかは既にクローニングが終っており、その



一つは *ERECTA* 受容体器ナーゼの機能欠損変異株であった。この変異がサブプレッサーとして機能した事はコンプリメンテーションテスト並びに既知の *erecta* 変異を使った遺伝学的解析で確かめられた。このサブプレッサー変異の形態学的な観察から、この変異は *uni-ID* が引き起こす異常の中で花茎の茎頂分裂組織の異常のみを回復しており、しかもこの花茎では *WUS* の発現が継続して観察された。しかし、腋芽の異常生成等の他の形態異常は回復しない。シロイヌナズナには *ERECTA* 類似遺伝子が他に 2 遺伝子見つかっている。これらにさらに変異を入れた多重変異体に *uni-ID* も導入すると、この多重変異体では *uni-ID* で誘導される多数の腋芽分裂組織の形成異常が抑えられた。しかし、*PR* 遺伝子群の恒常的な発現は継続して観察された。*PINHEAD* を含む他のサブプレッサー変異株の表現型も解析し、それらを分類した所、*uni-ID* で引き起こされる異常、茎頂分裂組織の機能異常、腋芽分裂組織の異常形成と、*PR* 遺伝子の活性化がそれぞれ遺伝学的に分離できる事が明らかになった。(図 3)

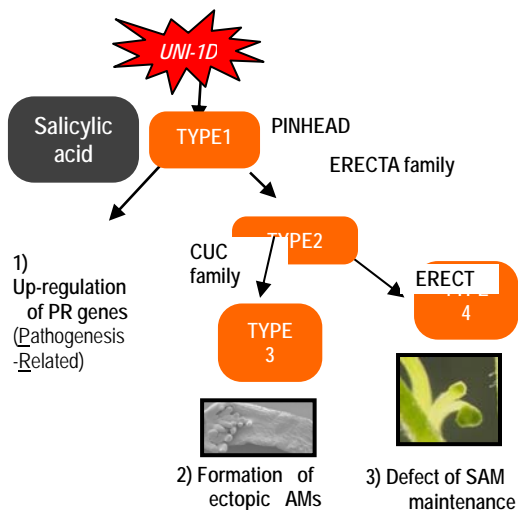


図 3

*UNI* は主茎の茎頂分裂組織の未分化細胞のある中心領域では発現せず、下部領域で発現する。この領域でのみ *ERECTA* を発現しても 2 重変異体のサブプレッサー機能が見られなくなり、中心部の *WUS* の発現が再度失われる事が明らかになった。これは、*ERECTA* が茎頂分裂組織の下部から細胞非自立的に中心部の活性を調節している可能性を示唆している。そして、これらを踏まえた解析の結果、野生型背景においても、茎頂分裂組織外での *ERECTA* ファミリーの機能が茎頂分裂組織の制御に関わる事が示唆された。まだ、解析を行いつつ有る遺伝子外サブプレッサーが多数存在し、今後それらを順次解析する事で形態形成と耐病性のク

ロストークの分子実体の全体像がより明瞭になると期待できるだけでなく、正常な茎頂分裂組織の形成や維持に関する新たな分子生物学的知見が得られると期待できる。

(4)野生株に野生型の *UNI* ゲノムを形質導入してコピー数を増やすと *uni-ID* ヘテロ接合体と同じ異常な表現型を示す事が明らかになった。この形質導入植物では野生型の *UNI* タンパク質が過剰発現していた。これと、半優性変異において、*uni-ID* がタンパク量が増えて行くと表現型が強くなる事を合わせると、*uni-ID* 変異は、新規の機能を獲得した変異の可能性は低く、むしろ *UNI* タンパク質が持つ本来の機能が強化され、恒常的に活性化された変異であるというこれまでの主張が強く支持される。興味ある事に、ゲノムの 3' UTR を別のターミネーターに置き換えると *UNI* タンパク質量が減少し、表現型が見られなくなった。これも、上記の可能性を支持しており、今後、3' UTR と翻訳との関連を調べる事は新しい研究の方向性として面白い。

*UNI* タンパク質は CC(Coiled-Coil)-NBS(Nuclear binding)-LRR(Leucine-Rich Repeat)の構造を取る。酵母 2 ハイブリッドにより、CC あるいは CC-NBS に結合するタンパク質を検索した所、高頻度で 26S プロテアソームの構成タンパク質の一つである RPT2a が取れた。*rpt2a* 変異体と *uni-ID* の 2 重変異体を作成し、その性質を調べた所、*rpt2a* が *uni-ID* をサブプレッサーする事が明らかになった。この結果から、*UNI* と RPT2a はタンパク質相互作用を行いつつ協調して信号伝達を行う可能性が示唆された。*UNI* と相互作用する候補タンパク質は他にも幾つか得られており、さらに免疫沈降で網羅的に相互作用するタンパク質を取得する実験系も整備できたので今後より、直接的なクロストークの実体が解明できると期待できる。

#### 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 24 件) (全て査読有り)

- 1, Uchida N. & Tasaka M. Intersections between immune responses and morphological regulation in plants J exp, Bot. In press
- 2, Hashiguchi Y., Niihama M., Takahashi T., Saito C., Nakano A., Tasaka M. and Morita M. T. (2009) Loss-of-function mutations of retromer large subunits suppress the phenotype of *zig* mutant that lacks Qb-SNARE VTI11 Plant Cell 22: 159-172
- 3, Karim M. R., Hirota A., kwiatkowska D., Tasaka M. and Aida M. (2009) A role

- for *Arabidopsis PUCHI* in floral meristem identity and bract suppression *Plant Cell* 21 1360-1372
- 4, Chung K., Igari K., Uchida N. & Tasaka M. (2008) New perspectives on plant defense responses through modulation of developmental pathway *Mol. Cells* 26 107-112
  - 5, Igari K., Endo S., Hibara K., Aida M., Sakakibara H., Kawasaki T. and Tasaka M. (2008) Constitutive Activation of a CC-NB-LRR Protein Alters Morphogenesis through the Cytokinin Pathway in *Arabidopsis* *The Plant Journal* 55 14-27
  - 6, Furutani M., Kajiwarara T., Kato T., Trembl B.S., Stochum C., Torres-Ruis R. and Tasaka M. (2007) The gene *MACCHI-BOU4/ENHNCER OF PINOID* encodes a NPH3-like protein and reveals similarities between organogenesis and phototropism at the molecular level *Development* 134 3849-3859  
[学会発表] (計 72 件)
  - 1, Tasaka M. MAB4/ENP family proteins involved in AUXIN-regulated morphogenesis in *Arabidopsis* *The 9th International Plant Molecular Biology St. Louis\_USA 2009 10 月* (key note speaker)
  - 2, Uchida N., Igari K., Tasaka M. Signaling triggered by activation of CC-NB-LRR related UNI affects SAM activity in a non-cell-autonomous manner involving ERECTA receptor kinase *The 20th International Conference on Arabidopsis Research Edinburgh (UK) 2009 7 月*
  - 3, Chung K., Igari K. and Tasaka M.: Control mechanisms for activation of a novel CC-NB-LRR protein, UNI-mediated signals that induce both SA-dependent defense and CK-dependent morphological signals *The 20th International Conference on Arabidopsis Research Edinburgh (UK) 2009 7 月*
  - 4, Tasaka M., Igari K., Chung K.M., Uchida N. Uni-1D, constitutive active form of novel CC-NB-LRR protein altered morphogenesis through cytokinin pathway in *Arabidopsis* *The 9th International Congress on Cell Biology Seoul (Korea) 2008 10 月* (Invited speaker)
  - 5, Tasaka M., Nakamura M. and Morita T.M. Actin dynamics involved in gravity perception in *Arabidopsis* inflorescence stem *37th COSPAR scientific Assembly Montreal (Canada) 2008 7 月* (Invited speaker)
  - 6 Tasaka M. Auxin mediated lateral root development in *Arabidopsis* *5th International Symposium on Adventitious Root Formation Madrid (Spain) 2008 6 月* (Plenary lecture)
  - 7, Tasaka M. Genetic analysis of the role of amyloplasts in shoot gravitropism *Gordon Research Conferences Biddeford (Boston) UAS 2007 5 月* (Invited speaker)
- [図書] (計 3 件)
- 1, Morita M.T., Tasaka M. Signal transduction in gravitropism. *Plant Tropism* 21- 45 2008 Blackwell
  - 2, 田坂昌生 植物と動物—どこがちがうのか— 植物の生存戦略 2008 朝日新聞社
  - 3, 森田(寺尾)美代、田坂昌生 重力屈性—重力の感受 生物の科学 遺伝 2007 裳華房
- [その他]  
ホームページ等  
<http://bsw3.aist-nara.ac.jp/keihatsu/keihatsu.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
田坂昌生 (TASAKA MASAO )  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授  
研究者番号：90179680
  - (2) 研究分担者  
相田光宏 (AIDA MITUHIRO )  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任准教授  
研究者番号：90311787  
(2006 年-2008 年)
- 打田直行 (UCHIDA NAOYUKI)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教  
研究者番号：40467692  
(2008 年-2009 年)