

平成21年5月28日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380032
 研究課題名（和文） 植物の感染防御応答におけるNOと活性酸素種の
 協奏的作用機構の解明
 研究課題名（英文） Harmonious mode of NO and reactive oxygen species action in defense
 responses in plants
 研究代表者
 川北 一人（KAWKAKITA KAZUHITO）
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
 研究者番号：90186065

研究成果の概要： 病原体の感染に対する植物の防御応答において、細胞死を伴った一連の抵抗反応が誘導される。活性酸素と一酸化窒素（NO）は抵抗反応の誘導・増幅シグナルとして機能していると考えられ、植物体内でのそれらの生成系の解析を行った。また、スーパーオキシド(O_2^-)とNOとの反応物であるパーオキシナイトライト（ONOO $^-$ ）が細胞死を誘導し、植物の基礎抵抗性に関与している可能性を示した。さらに細胞死を誘導するセラミド関連化合物を特定し、抵抗反応誘導機構の解明における有用性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2007年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	12,200,000	3,660,000	15,860,000

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：一酸化窒素、活性酸素種、パーオキシナイトライト、感染防御応答、シグナル伝達、ジャガイモ、ジャガイモ疫病菌、ベンサミアナタバコ

1. 研究開始当初の背景

植物組織に病原菌が感染すると、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) や過酸化水素 (H_2O_2) といった活性酸素分子種の急激な生成（オキシダティブバースト）が起こることが広く知られる。これら活性酸素が植物の感染応答反応を誘導するシグナル因子として働くことが支持されている。一方で、 O_2^- が関与しない応答反応もあり、 O_2^- を介さない情報伝達経路の存在が考えられた。先に当該研究

室では、活性窒素分子である一酸化窒素（NO）が新たなシグナル因子として働く可能性を見いだした。研究開始時までに明らかにした以下の成果を踏まえて、本研究課題を設定した。

(1) 活性酸素生成系

O_2^- 生成系としてNADPH酸化酵素複合系の活性本体である gp91phox のホモログ（respiratory burst oxidase homolog : rboh）遺伝子 (*StrbohA* および *StrbohB*) が機能する

こと、オキシダティブバーストの制御に Ca^{2+} 、タンパク質リン酸化酵素が関与することを明らかにした。

(2) 植物の感染防御応答における NO の関与
植物の感染防御応答において NO が生成し、その NO が複数の応答反応の誘導に関与することを示した。例えば、ジャガイモ塊茎組織に NO 生成剤を処理するとファイトアレキシン (リシチン) の生成・蓄積が起こった。タバコ懸濁培養細胞 (BY-2) にエリシタータンパク質 (INF1) を処理すると NO 生成が誘導される。エリシター処理した BY-2 細胞において誘導される細胞死、41 kD タンパク質リン酸化酵素の活性化、防御関連遺伝子の発現は、いずれも NO 消去剤の添加により顕著に抑制され、NO 生成がこれらの反応に関与すると推測された。

(3) NO 生成系

植物での NO 生成機構については、NO 合成酵素 (NOS) は単離されておらず、詳細は不明であった。NO 生成系の候補として硝酸還元酵素 (NR) に着目した。ジャガイモ疫病菌非親和性菌を接種、あるいは疫病菌菌体壁成分エリシターを処理したジャガイモ塊茎において、NR 遺伝子の発現と NR タンパク質の蓄積、NO 生成活性の誘導が認められた。ジャガイモから単離した NR 遺伝子 (*StNR5* および *StNR6*) の発現がエリシター処理ジャガイモ塊茎において誘導され、感染防御反応への関与が示された。

2. 研究の目的

植物の感染防御応答において、動的抵抗反応の始動と統御を司る活性酸素分子種の機能を理解するため、 O_2^- 生成系に関する解析に加え、もう一方の活性分子種である NO 生成について、生成系およびその機能解析を進める。また、 O_2^- と NO は協調して細胞死誘導のシグナル因子として働いている可能性を想定し、 O_2^- と NO との反応物であるパーオキシナイトライト (ONOO^-) の検出と機能解析を行う。以下の課題の解明を目的とした。

- (1) ジャガイモ植物における O_2^- 生成機構
- (2) NO 生成機構
- (3) ONOO^- の検出と過敏感細胞死誘導の作用機構
- (4) ジャガイモ疫病菌からの O_2^- の生成活性を持つエリシター分子の精製とその作用機構

3. 研究の方法

(1) O_2^- 生成、NO 生成、 ONOO^- 生成の測定

O_2^- 生成の検出は O_2^- 特異的発光試薬である L-012 を用い、高感度発光画像解析装置 (Aquacosmos 2.5、浜松ホトニクス) を用いて化学発光量を測定した。NO 生成の検出は NO 特異的発光試薬 DAF-2DA を用い、 ONOO^- 生成の検出は発光試薬 APF を用いて行った。どちらも発光実体顕微鏡下で発光像を観察し、発光量の定量は CCD カメラで撮影した画像を解析ソフトを用いて数値化することにより行った。

(2) 各種遺伝子サイレンシング株の作出

rboh、NR、NOA1 各遺伝子単独のサイレンシング株や二重サイレンシング株をウイルス誘導型遺伝子サイレンシング (virus-induced gene silencing: VIGS) 法により作出した。目的 DNA 断片を挿入したウイルスベクターにより形質転換されたアグロバクテリウムを、播種後 18 から 20 日目のベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) 葉の細胞間隙に注入した。ウイルス接種後 3 - 4 週間の植物の上位葉を使用した。

(3) 細胞死の定量

細胞死の定量はエバンスブルー法により行った。染色後、色素を溶出した可溶化液の A_{595} を測定した。

(4) O_2^- 生成エリシターの精製と構造解析

ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 菌体のメタノール抽出物を材料として、 O_2^- 生成の活性測定を指標に O_2^- 生成エリシターの精製を試みた。得られたエリシターについて NMR 解析、MS 解析により構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) O_2^- 生成系とその活性調節

O_2^- 生成を担う NADPH 酸化酵素の活性本体である rboh 遺伝子として、先にジャガイモ塊茎から単離した *StrbohA* と *StrbohB* に加え、葉組織において機能する病原菌誘導性の *StrbohC* と *StrbohD* を単離した。阻害剤と過剰発現ジャガイモ植物を用いた解析の結果、*StrbohC* と *StrbohD* は MAPK (mitogen-activated protein kinase) カスケードにより転写レベルで制御されることを明らかにした。

また、StrbohB の N 末端領域の Ser82 をリン酸化する酵素のスクリーニングを抗リン酸化ペプチド抗体を用いて行い、2 種の Ca^{2+} 依存性タンパク質リン酸化酵素 (CDPK) StCDPK4 および StCDPK5 を単離した。StCDPK の機能解析をベンサミアナタバコを用いて行った結果、恒常活性型 StCDPK5 は、StrbohB の Ser82 と Ser97 をリン酸化することにより O_2^- 生成を誘導すると推定された。

(2) NO 生成系とその活性調節

NO 生成系として、硝酸還元酵素 (NR) が機能することに加え、動物細胞における NO 生成系として知られる NO 合成酵素 (NOS) が植物においても機能すると推定された。植物における NOS 本体は不明であり、NOS の活性調節タンパク質をコードすると推定される *AtNOAI* ホモログである *NbNOAI* をベンサミアナタバコより単離した。VIGS 法により作製した *NbNOAI* サイレンシング葉において、INF1 エリクターにより誘導される NO 生成ならびに防御関連遺伝子の発現が抑制され、INF1 エリクターにตอบสนองした NO 生成には、NR に加えて NOAI が関与することが示唆された。植物細胞においてもアルギニンを基質とした NO 生成機構が存在することが推測されるが、植物の NOS の詳細については未だに不明な点が多く、今後の課題である。

(3) O_2^- 生成エリクターの精製と関連化合物抵抗反応誘導活性

活性酸素分子種の統御シグナルとしての機能解析を行うため、ジャガイモ疫病菌菌体のメタノール抽出物を材料として、 O_2^- 生成の活性測定を指標に O_2^- 生成エリクターの精製を試みた。精製した活性物質の 1 つはセラミドであると推定された。そこで、セラミド関連化合物 10 種についてジャガイモ懸濁培養細胞に対する O_2^- 生成活性を調べたところ、いずれの化合物も活性を示さなかった。一方、調べた化合物のうち N, N-dimethyl sphingosine (DMS) はジャガイモ塊茎に対してファイトアレキシンの生成蓄積を誘導した。DMS はジャガイモ懸濁培養細胞に対して細胞死を誘導し、この細胞死において核でのクロマチン凝集が認められた。また、ベンサミアナタバコ葉やタバコ懸濁培養細胞 BY-2 においても DMS 処理により細胞死の誘導が認められた。従って、DMS は過敏感細胞死を誘導するエリクター物質であることが示唆された。

(4) S-ニトロソ化タンパク質の検出

植物の抵抗反応誘導時に S-ニトロソ化により制御をうける標的タンパク質を特定するため、ジャガイモ葉抽出タンパク質に NO 供与体 GSN0 を処理し、ビオチンスイッチ法を用いて S-ニトロソ化されるタンパク質の検出を行った。その結果、S-ニトロソ化タンパク質が認められ、ビオチン標識した S-ニトロソ化タンパク質をアビジンアガロースにより精製し、得られたタンパク質を質量分析計を用いた解析により同定した。近年、植物における S-ニトロソ化やその制御因子についての報告がなされているが、NO シグナルの直接的な標的分子として、S-ニトロソ化タンパク質の特定が望まれる。

(5) 植物の病害抵抗反応へのパーオキシナイトライドの関与

O_2^- は NO と協調して細胞死誘導のシグナル因子として働いている可能性が高く、 O_2^- と NO との反応物である ONOO⁻ の存在と機能が推定される。ベンサミアナタバコ葉において、INF1 エリクター処理により ONOO⁻ 生成が誘導された。 O_2^- 生成酵素である *NbRbohB*、NO 生成に関与する *NbNOAI* および *NbNR* をベンサミアナタバコ葉においてサイレンシングしたところ、INF1 処理により誘導される ONOO⁻ 生成が抑制され、植物体内で生成される O_2^- と NO から ONOO⁻ が生成されることが示唆された。また、ベンサミアナタバコ葉に対して病原性を示さないインゲン炭そ病菌を接種したところ、病原性を示すウリ類炭そ病菌接種の場合と比較して、より多くの ONOO⁻ 生成が認められた。また *NbRbohB* および *NbNOAI* をサイレンシングしたベンサミアナタバコ葉にウリ類炭そ病菌を接種したところ、病斑数が上昇し、ONOO⁻ 発生剤を処理することにより病斑数が減少した。従って、ONOO⁻ は病原菌に対する植物の基礎抵抗性に関与する可能性が示された。

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 9 件)

- ① Uruma, S., Shibata, Y., Takemoto, D., and Kawakita, K., N, N-dimethylsphingosine, an inhibitor of sphingosine kinase, induce phytoalexin production and hypersensitive cell death of *Solanaceae* plants without production of reactive oxygen species, *J. Gen. Plant Pathol.*, 2009 in press, 査読有

- ② Kato, H., Asai, S., Yamamoto-Katou, A., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K. Involvement of *NbNOAI* in NO production and defense responses in INF1-treated *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 74, 15-23, 2008, 査読有
- ③ Kobayashi, M. Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N. and Yoshioka, H. Calcium-dependent protein kinase regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase., *Plant Cell*, 19, 1065-1080, 2007, 査読有
- ④ Yamamizo, C. Doke, N., Yoshioka, H. and Kawakita, K., Involvement of mitogen-activated protein kinase in the induction of genes for *StrbohC* and *StrbohD* in response to pathogen signals in the potato., *J. Gen. Plant Pathol.*, 73, 304-313, 2007, 査読有
- ⑤ Takemoto, D., Tanaka, A. and Scott, B., NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation., *Fungal Genet. Biol.* 44, 1065-1076, 2007, 査読有
- ⑥ Kobayashi, M., Kawakita, K., Maeshima, M., Doke, N., and Yoshioka H., Subcellular localization of Strboh proteins and NADPH-dependent O₂⁻ generating activity in potato tuber tissues. *J. Exp. Bot.* 57, 1373-1379. 2006, 査読有
- ⑦ Yamamoto-Katou, A., Katou, S., Yoshioka, H., Doke, N., and Kawakita, K., Nitrate reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol.* 47, 726-735, 2006, 査読有
- ⑧ Yamamizo, C., Kuchimura, K., Kobayashi, A., Katou, S., Kawakita, K., Jones, J.D.G., Doke N. and Yoshioka, H., Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feedback confers potato blight resistance. *Plant Physiol.* 140, 681-692. 2006, 査読有
- ⑨ Saito, S., Yamamoto-Katou, A., Yoshioka, H., Doke, N., and Kawakita, K., Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells., *Plant Cell Physiol.* 47, 689-697, 2006, 査読有
- [学会発表] (計 20件)
- ① 加藤大明. ジャガイモ葉におけるS-ニトロソ化され得るタンパク質の特定. 平成21年度日本植物病理学会大会, 2009年3月28日, 山形県山形市山形大学
- ② 樹神博士. ペルオキシ亜硝酸イオン(ONOO-)の植物抵抗反応への関与. 平成21年度日本植物病理学会大会, 2009年3月28日, 山形県山形市山形大学
- ③ 柴田裕介. ジャガイモ疫病菌に対するペンサミアナタバコ植物の防御応答におけるサリチル酸およびエチレンの関与. 平成21年度日本植物病理学会大会, 2009年3月28日, 山形県山形市山形大学
- ④ 加藤大明. ジャガイモ葉におけるS-ニトロソ化され得るタンパク質の探索. 平成21年度日本植物生理学会年会, 2009年3月22日, 愛知県名古屋市名古屋大学
- ⑤ 樹神博士. ペルオキシ亜硝酸イオン(ONOO-)の植物抵抗反応への関与. 平成21年度日本植物生理学会年会, 2009年3月22日, 愛知県名古屋市名古屋大学
- ⑥ 柴田裕介. N,N-ジメチルスフィンゴシンは活性酸素を介さずに植物の防御応答を誘導する. 平成21年度日本植物生理学会年会, 2009年3月22日, 愛知県名古屋市名古屋大学
- ⑦ 川北一人. 植物の感染応答における活性酸素および活性窒素生成. 第61回日本酸化ストレス学会学術集会, 2008年6月19日, 京都府京都市国立京都国際会館
- ⑧ 関間貞雄. ジャガイモ植物におけるセラミド関連化合物の抵抗反応誘導活性. 平成21年度日本植物病理学会大会, 2008年4月27日, 島根県松江市くにびきメッセ
- ⑨ 川北一人. 植物の感染応答におけるNO生成. 日本植物生理学会, 2008年3月20日, 北海道札幌市札幌コンベンションセンター
- ⑩ 竹本大吾. Dynamic subcellular responses in plants during interactions with fungal and oomycete pathogens. Workshop "Dynamics of

biological networks in and around plant cells".
2007年10月31日, Kobe University, Kobe

- ⑪ 加藤大明. ベンサミアナタバコ植物の感染防御応答におけるNO生成関連因子 *NbNOA-1* の関与. 平成19年度日本植物病理学会関西部会, 2007年10月7日, 岐阜県岐阜市岐阜大学
- ⑫ 加藤大明. ベンサミアナタバコ植物の感染防御応答時のNO生成における *NbNOA1* の関与. 植物感染生理談話会, 2007年8月10日, 京都府京都市京都府立大学
- ⑬ 川北一人. Involvement of NO in plant defense responses and role of nitrate reductase in NO production., XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007年7月23日, Hilton Sorrento Palace Hotel and Congress Center, Italy
- ⑭ 小林光智衣. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase., XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007年7月23日, Hilton Sorrento Palace Hotel and Congress Center, Italy
- ⑮ 加藤大明. タバコ植物の防御応答時のNO生成における *NbNOA1* の関与. 日本NO学会学術集会, 2007年5月17日, 滋賀県大津市滋賀県立県民交流センター
- ⑯ 小林光智衣. Calcium-dependent protein kinases regulate the oxidative burst produced by the plant NADPH oxidase. Meiji University International Symposium "Plant Immunity: From MAMPs/PAMPs Recognition to Gene-for-Gene Resistance" 2007年3月12日, Meiji University, Tokyo
- ⑰ 加藤大明. ベンサミアナタバコ植物でのNO生成における *NbNOS1* の関与. 平成18年度日本植物病理学会関西部会, 2006年10月28日, 京都府京都市京都大学
- ⑱ 山溝千尋. ジャガイモファイトアレキシン合成遺伝子プロモータの制御機構の解析. 平成18年度日本植物病理学会関西部会, 2006年10月28日, 京都府京都市京都大学
- ⑲ 山溝千尋. ジャガイモファイトアレキシン合成遺伝子プロモータの制御機構の解析. 感染生理談話会. 2006年8月18日, 島根県松江市松江テレサ

- ⑳ 小林光智衣. CDPKはNADPHオキシダーゼを活性化する. 感染生理談話会, 2006年8月18日, 島根県松江市松江テレサ

[図書] (計 3件)

- ① 道家紀志・川北一人・吉岡博文. 北海道大学出版会, エリシターの受容とオキシダティブバーストの分子機構とその機能, 微生物の病原性と植物の防御応答. 上田一郎編著, 2007, pp.32-43.
- ② 川北一人・山本(加藤)文子・齋藤修・加藤新平・加藤大明・浅井秀太・樹神博士・吉岡博文・道家紀志. 日本植物病理学会, 植物の感染応答因子としてのNO病原体の寄生戦略と植物の応答. 荒瀬榮・上野 誠編, 2006, pp.11-22.
- ③ 川北一人. 名古屋大学出版会, 植物の生体防御. 実験免疫学ハンドブック, 中島泉編, 2006, pp. 328-329.

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~byori/papers.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川北 一人 (KAWAKITA KAZUHITO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 90186065

(2) 研究分担者

竹本 大吾 (TAKEMOTO DAIGO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 30456587

園田 雅俊 (SONODA MASATOSHI)
千葉大学・自然科学研究科・助教
研究者番号: 70376367