

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19880019
 研究課題名（和文） ピンポイントプロテオーム解析による
 植物病原体応答新規因子の探索と機能解明
 研究課題名（英文） Pinpoint proteomic analysis of a novel protein profile
 associated with pathogen infection
 研究代表者
 森山 陽介 (MORIYAMA YOHISUKE)
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員
 研究者番号：00452532

研究成果の概要：

代表的な病原糸状菌であるうどん粉病菌に対するシロイヌナズナの応答機構を明らかにすることを目的とし、二次元電気泳動により感染に特異的な変動を示すタンパク質の質量分析解析と、網羅的なショットガンプロテオーム解析を行った。その結果、感染初期に変動する22遺伝子を同定した。それらについてT-DNA挿入変異体を入手しうどん粉病菌感染実験を行うことで、耐病性に強く関与する遺伝子を特定した。また、promoter::GUSとpromoter::GFP、35s::CDsと35s::GFP-CDsのコンストラクトを作成し、野生型と変異体に導入することでそれらの遺伝子のうどん粉病菌感染時の発現組織と細胞内局在を確認する準備を進めており現在T2世代の選抜中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	210,000	1,610,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物生理学

キーワード：シロイヌナズナ，マイクロダイセクション，うどん粉病，プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

地球の人口は増え続けている一方で、耕地は減り続けている。100億人を越えようとする地球の人口を支えるには、人口増にみあうだけの食糧増産を農地を拡大することなく達成しなければならない。

耕地面積あたりの食糧生産の現状は理想

収量の20%であり、実に4/5が失われている。その理由の一つが植物病害による被害である。約8000種の植物病害のうち、80%以上は糸状菌病原体による被害である。植物の病害に対する抵抗性の機構を理解することは、人為的に抵抗性を誘導できる新たな方法を開発できるのではないかと期待され、ひいては人口増加と耕地減少からなる食糧問題を克

服する術となると考えられた。

病原体に対する植物の抵抗性は、植物が病原体を認識することにより誘導される。病原体の認識後には防御機構を活性化させるシグナル伝達が開始され、感染細胞での抵抗反応が生じるといわれている。以降、活性酸素の産生、病原体を攻撃できる感染時特異的タンパク質の蓄積、過敏細胞死による病原体増殖抑制、周囲の細胞でのサリチル酸などの抵抗性シグナルの蓄積による二次的な感染に備えた抵抗性が誘導される。

代表的な糸状菌病原体であるウドンコ病菌においては、特にシロイヌナズナ及びオオムギを用いて感染応答機構の解析が行われてきた。しかし、これまでの順遺伝学を基本とした網羅的変異体スクリーニングから単離されたウドンコ病菌応答に関わる遺伝子はあまり多くない。それらは二次的な感染に備えた抵抗性誘導因子がほとんどであり、また、新たに罹病性変異体の探索を試みても、既知の遺伝子に収斂するばかりであった。これは植物の病原体応答機構には冗長性があり、表現型を指標とした変異体解析からは病原体に対する最終的な応答に関与する遺伝子しか得られないためと考えられる。

そのため、感染初期の病原体認識やシグナル伝達に直接関わる新規因子の単離のための新しい手法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

植物の病原体応答機構には多重の冗長性があり、これまでの病原体に対し罹病性あるいは抵抗性となる表現型を指標とした変異体スクリーニングには限界があった。

しかし、病原体の初期認識にかかわる遺伝子や、冗長な病原体応答機構に関与する未知の新規遺伝子を探索し解析することは植物の病害に対する抵抗性の機構の理解につながり、病害に強い作物の作出につながると考えられる。

そのための手法として、本研究ではうどん粉病菌感染葉の局所的・経時的なサンプルを用いたピンポイントのプロテオーム解析を行い未知の新規因子を探索することを最も重要な目的とした。

特に感染の最も初期でのタンパク質変動を明らかにすることに大きな意義があると考えた。しかし、うどん粉病菌の感染と発達は表皮に限られており葉肉細胞には侵入しないため、細胞膜に存在するタンパク質の変動や、微量のタンパク質変動を解析するための新たな手法を開発する必要があった。

そこで、本研究では感染初期の葉でピンポイントに微量なタンパク質を解析する方法の開発も目的とした。

3. 研究の方法

うどん粉病菌は葉の表皮細胞のみに感染し、葉肉細胞には侵入しない。プロテオーム解析の際に効率的にタンパク質変動を見るためにはうどん粉病菌の感染している表皮細胞のみを単離してることが有効と考え、まずはパラフィン切片からマイクロダイセクションでシロイヌナズナ葉の表皮細胞のみの回収を試みた。しかし、二次元電気泳動に用いるのに充分量のサンプルを集めることは困難であり、また組織の固定を経てパラフィン切片を作成すること自体がタンパク質の保持に悪影響を与えるとの結論に至った。

そこで、感染葉全体を用いて2通りのプロテオーム解析を行うことで感染初期のタンパク質変動を解析することとした。

ひとつには高精度、高感度なフーリエ変換型質量分析機である Orbitrap をもちいたショットガンプロテオームの手法を新規に取り入れ、網羅的にタンパク質の変動を解析することを試みた。ショットガンプロテオームは、サンプルから抽出したタンパク質の総体をそのまま、あるいは一旦アクリルアミドゲルで泳動して大まかに分離したものに対し、トリプシン消化してペプチド断片とし、それを一度に質量分析にかけて網羅的にタンパク質の存在を解析できる強力な手法である。ただ、微量な存在のタンパク質も検出できることは大きなメリットであるが定量性を担保するには他の解析手法と組み合わせる必要がある。

そこで、定量性に対して信頼性の高い二次元電気泳動・LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析も行うことでショットガンプロテオームの結果の裏づけと、感染時に大きく変動するタンパク質の同定を行った。その際には通常は解析困難な膜面分のタンパク質も解析するために、新規に開発した脱 SDS 法を利用してタンパク質サンプルを二次元電気泳動に供した。

これらのプロテオーム解析では、対照サンプルとして非感染の野生株のほかに、サリチル酸蓄積能の欠損により抵抗性シグナルが伝達されない罹病性変異体 *pad4-1* も用いることで、抵抗性反応を差し引いた病原体の認識に関与する因子の同定も試みた。

以上の結果から、少なくとも感染後3日目までにうどん粉病菌感染に応答してタンパク質の蓄積量が大きく変動する遺伝子が同定された。

これらの遺伝子に関して、うどん粉病菌感染における抵抗性に関与しているものを明らかにするため、シロイヌナズナの過剰発現

体やT-DNA挿入変異体を用いた感染実験を行った。

またうどん粉病菌感染時の葉組織での発現部位や時期をみるために promoter::GUS と promoter::GFP を導入した形質転換体を作成した。

あわせて、感染時特異的に表皮で発現する遺伝子があることを示すため、感染葉全体を用いた定量的 RT-PCR によりこれら同定された遺伝子の転写量を感染から経時的に調べた。

4. 研究成果

まず、SDS で可溶化したタンパク質サンプルから脱 SDS する手法を新規に開発し、再現性が安定して得られることを確認した。したがって、通常は解析困難な膜画分のタンパク質も二次元電気泳動により解析する手法を確立できたと言える。

そこで、うどん粉病菌感染/非感染の野生株と罹病性変異体 *pad4-1* を用いたシロイヌナズナ本葉由来のタンパク質を二次元電気泳動し、変動の見られたタンパク質スポットを質量分析したところ、少なくとも感染後3日目までにうどん粉病菌感染に反応してタンパク質の蓄積量が大きく変動する22種の遺伝子が同定された。

これらについてはT-DNA挿入変異体を主にSALK研究所から入手し、ホモ変異体を選抜できたものからうどん粉病に対する罹病性の変化の解析を試みたところ、現在までに罹病性になるもの1種類と、抵抗性となる変異体が1種類得られている。

22種の遺伝子に関しては、表皮細胞特異的な発現や、感染部位特異的な局在変化を期待し、 promoter::GUS と promoter::GFP、35s::CDs と 35s::GFP-CDs のコンストラクトを作成して野生型とそれぞれの変異体に導入した。現在は T2 世代の選抜を行っているところである。

表皮細胞特異的な発現があるかどうか、あるいは翻訳後の蓄積量の制御があるかどうかを他の方法でも裏付けておく必要があると考え、感染葉を用いた経時的な定量的 RT-PCR を行い、22 の遺伝子のなかから、葉全体での転写量の変動とタンパク質の蓄積量が一致しない 16 遺伝子を明らかにした。これらは感染表皮特異的なタンパク質の蓄積や減少のためだと考えられる。

ここまでの結果は日本植物学会、日本植物生理学会年会で発表し、大きな反響が得られた。

うどん粉病菌感染葉における微量なタンパク質変動が解析できることを期待して高精度、高感度なフーリエ変換型質量分析機である Orbitrap をもちいたショットガンプロ

テオーム解析を行った結果からは、二次元電気泳動による解析で得られた 22 遺伝子の変動のほとんどが検出できた。したがって、ショットガンプロテオーム解析の手法の妥当性が確認されたと考えられる。現在はショットガンプロテオーム解析で得られた 3000 以上のタンパク質の存在量について、感染葉と非感染葉で詳細に比較検討を行っている。

今後はうどん粉病菌感染葉で大きく蓄積量が変動するとして得られた 22 遺伝子に加え、ショットガンプロテオーム解析で変動がみられたものも解析対象に加えるとともに、感染後のさらに初期のサンプルについてもショットガンプロテオーム解析を行い、うどん粉病菌に対する主要な応答遺伝子を絞り込んでいく予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 森山陽介, 藤原正幸, 深尾陽一郎, 稲田のりこ (全4名, 1番目), シロイヌナズナにおけるうどん粉病菌 (*Golovinomyces orontii*) 感染応答に関する新規因子の探索及び機能解析、第50回日本植物生理学会、2009. 3. 21-23, 愛知

(2) 森山陽介, 藤原正幸, 深尾陽一郎, 稲田のりこ (全4名, 1番目), シロイヌナズナにおけるうどん粉病菌 (*Golovinomyces orontii*) 感染応答のプロテオーム解析、第72回日本植物学会、2008. 9. 25-27, 愛媛

(3) 森山陽介, 藤原正幸, 深尾陽一郎, 稲田のりこ (全4名, 1番目), シロイヌナズナにおけるうどん粉病菌 (*Golovinomyces orontii*) 感染応答のプロテオーム解析、第49回日本植物生理学会、2008. 3. 20-22, 北海道

〔その他〕

ホームページアドレス

<http://bsw3.naist.jp/plantunit/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 陽介 (MORIYAMA YOHSUKE)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科・研究員

研究者番号：00452532

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者