

機関番号：82112

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20380030

研究課題名 (和文) 過敏感細胞死誘導における解糖系酵素 GAPDH の新機能解明

研究課題名 (英文) Functional analysis of glycolysis enzyme GAPDH in HR cell death

研究代表者

西澤 洋子 (NISHIZAWA YOKO)

独立行政法人農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット 上級研究員

研究者番号：40355756

研究成果の概要 (和文)：

植物は病原菌由来の物質 (MAMPs) を認識して過敏感細胞死などの防御反応を起こす。本研究では、イネが糸状菌の代表的 MAMPs であるキチンオリゴ糖を認識して活性酸素だけでなく活性窒素を生成し、それが過敏感細胞死誘導に重要であることを示した。また、キチンオリゴ糖で発現が誘導されるイネ EL5 遺伝子の機能、EL5 と GAPDH のイネ細胞内での相互作用、および、防御応答時の GAPDH の挙動を解析し、解糖系酵素として知られている GAPDH が植物の細胞死誘導にも関与することを示した。

研究成果の概要 (英文)：

Various defense reactions such as hypersensitive cell death are induced in plants on recognition of microbe-associated molecular patterns (MAMPs). In this study, we showed that chitin oligosaccharides, which are representative fungal MAMPs, elicit the production of both reactive oxygen and nitrogen species, and the production of these radicals is required for the induction of hypersensitive cell death in rice cultured cells. In addition, we performed functional analysis of rice EL5 gene, whose expression is induced by chitin, confirmation of interaction between EL5 and GAPDH in rice cells, and characterization of GAPDH during cell death. Our data indicate that GAPDH, a glycolysis enzyme, is also involved in the induction of cell death in plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：植物感染生理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物免疫、過敏感細胞死、MAMPs 受容体

1. 研究開始当初の背景

病原菌の侵入を察知した植物細胞内では、自己防御のために様々な生理反応が誘導さ

れる。その一つが急激な活性酸素種 (ROS) の生成と一酸化窒素 (NO) 等の活性窒素種 (RNS) の生成である。この植物細胞の病原菌認識か

ら ROS・RNS 生成を起すまでのシグナル伝達機構については、病原菌由来のエリシターの受容体や MAP キナーゼカスケードの解析を中心に断片的にはあるが徐々に明らかになってきた。しかしながら、病原菌の認識から細胞死に至る分子機構の多くは不明のままであった。

EL5 は、キチンエリシターによって 30 分以内に一過的に発現が増加する遺伝子としてイネ培養細胞から単離され、膜貫通領域と RING-H2 ドメインを持つユビキチンリガーゼ (E3) をコードする。各種変異 EL5 遺伝子を強発現させることによって内在性 EL5 の機能を阻害した形質転換イネの表現型解析の結果から、EL5 は硝酸態窒素存在下の根端分裂組織の維持に重要な、細胞死抑制型のユビキチンリガーゼであることが明らかになっていた。また、我々は、細胞質型のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) が EL5 の C 末端領域 (EL5-C) と試験管内で相互作用することを見いだした。興味深いことに、動物細胞ではアポトーシスが引き起こされる際、GAPDH が核に蓄積することが知られており、この場合、GAPDH は解糖系酵素としてではなく細胞死誘導における NO センサーとして機能し、酵母においても同様であることが報告された。

一方、イネでは、真性抵抗性遺伝子 (R) とそれに対応するタンパク質として機能する非病原力遺伝子がセットで単離された例が Pita/AvrPita の一例しかなかった。たとえ単離されたとしても、植物体への病原菌接種では、植物、病原菌双方の状態を実験間で一定に保つのは難しい。また、全ての細胞に菌が感染するわけではないため、R-Avr 相互作用の結果おこる ROS・RNS 生成や細胞死等の諸反応を定量化するのは困難である。そこで我々は、キチンオリゴ糖結合タンパク質 CEBiP と白葉枯病抵抗性遺伝子 Xa21 産物の細胞内領域を融合させた人工キメラタンパク質を発現させることで、キチンエリシター処理によって R 遺伝子依存的細胞死を起動するイネの培養細胞系を構築した。

以上を基に、EL5 と GAPDH の機能発現機構を主に ROS・NO 生成の観点から解析し、そこで得られた知見を R 遺伝子依存的細胞死誘導機構に当てはめることで病原菌認識から細胞死誘導に至る分子機構の一端を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

病原菌の侵入を察知した植物細胞は過敏感細胞死を起こし、菌の伸展を抑制することが知られている。しかしながら、病原菌の認識から細胞死に至る分子機構の多くは未だ不明のままである。本研究は我々が独自に開

発した培養細胞系を利用することで、イネの R 遺伝子依存的に起動する過敏感細胞死における活性窒素種の関与を明らかにするとともに、試験管内で細胞死抑制型ユビキチンリガーゼ EL5 と相互作用することが明らかになった解糖系酵素 GAPDH の細胞死誘導における機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) R 遺伝子依存的過敏感反応の解析

イネのキチンエリシター受容体遺伝子 CEBiP の細胞外領域と、受容体型プロテインキナーゼをコードするイネ白葉枯病抵抗性遺伝子 Xa21 の細胞内領域を 3 種類の連結法で融合させたキメラ遺伝子 (CRXa1~3) をそれぞれ恒常的に発現するイネの T₁ 種子からカルスを誘導し、液体培養後、キチンエリシター (GN₇) 処理後の ROS・RNS 生成量、細胞死誘導や遺伝子発現変動を解析した。

(2) 細胞死誘導における EL5 の機能解析

E3 活性を欠失させた変異型 EL5 遺伝子の C 末端に FLAG タグを付加した EL5W165A-FLAG (EL5-3) を恒常的に発現するイネカルスを作製し、GN₇ 処理後の ROS・RNS 生成や細胞死誘導を解析した。また、植物体での細胞死については、E3 活性を一部保持している EL5V162A 遺伝子 (EL5-5) を恒常的に発現する形質転換イネを作製し、表現型の解析が容易な根を用いて、亜硝酸処理後の側根出根部位 (LRES) における ROS・NO 生成を共焦点蛍光顕微鏡で解析した。亜硝酸処理による根全体の内在性ホルモンの変動は理研・神谷博士、軸丸博士のご協力で測定した。

(3) EL5 と GAPDH の相互作用解析

EL5 は非常に不安定なタンパク質であるため、生化学的解析には、その E3 活性を欠失させた EL5-3 をイネ培養細胞で過剰発現させて用いた。イネゲノムデータベースにある 3 種類の細胞質型 GAPDH のうち、大腸菌内で EL5-C と最も強く相互作用した GapC2 に HA タグや蛍光タンパク質 DsRed を付加し、イネで恒常的に発現させた。EL5-3 カルスならびに GapC2-HA カルスのミクロソーム画分を調製し、1% TritonX-100 で可溶化後、それぞれ、アガロースビーズ結合 FLAG 抗体、HA 抗体を用いて免疫共沈を行った。大腸菌での相互作用解析は BacterioMatch II Two-Hybrid システム (B2H; アジレントテクノロジー) を用いて行った。

(4) 細胞死誘導における GAPDH の解析

液体培養カルスを GN₇ 処理や NO 発生剤 (SNP) で処理し、水溶性画分の GapC2 を BlueNative-PAGE 法や二次元電気泳動法で解

析した。また、GapC2 の細胞内局在については、培養細胞では GN₇ 処理、根では亜硝酸処理後の GapC2-DsRed 発現細胞を蛍光顕微鏡で観察した。さらに、GapC2-HA を恒常的に発現する形質転換イネを用いて、葉身におけるもち病抵抗性をスポット接種法で検定した。

4. 研究成果

(1) CRXa キメラ遺伝子発現細胞の GN₇ 応答性

① Xa21 下流の ROS・RNS 生成と細胞死誘導の関係：CRXa を発現するイネカルスを GN₇ で処理し、細胞死誘導ならびに過酸化水素生成を定量したところ、いずれも空ベクター導入カルスより有意に増加した。一方、リポ多糖応答性は変化しなかった。また、Xa21 の自己リン酸化領域を欠くキメラタンパク質を発現するカルスでは GN₇ 応答性は変化しなかった。以上の結果から、GN₇ シグナルが CRXa によって細胞死誘導シグナルに変換されると考えられた。次に、GN₇ 処理後の RNS (NO、ONOO⁻) 生成を測定した結果、空ベクター導入コントロールカルスにおいても両 RNS の生成が誘導されることが明らかになったが、CRXa 発現カルスではより多く生成されることが示された。さらに、ROS 生成阻害剤 (DPI) や RNS 消去剤 (PTIO、尿酸) を用いた実験結果から、Xa21 を介した細胞死誘導には superoxide や NO が関与するが、ONOO⁻ は関与しないことが示唆された。

② Xa21 依存的細胞死誘導とジャスモン酸 (JA) の関係：CRXa を発現するイネカルスを GN₇ で処理し、発現パターンがコントロールカルスと異なる遺伝子を 44k マイクロアレイで探索したところ、JA 合成に関与する可能性のあるリパーゼ、リポキシゲナーゼ、アレンオキシドシンターゼ遺伝子の発現誘導が亢進していた。そこで、Xa21 依存的細胞死誘導への JA の関与を調べるために、CRXa 遺伝子を JA 欠損変異体 (アレンオキシドサイクラーゼ変異体) で発現させ、GN₇ 処理後の過敏感反応を解析した。その結果、変異カルスにおける過酸化水素生成、NO 生成および細胞死誘導は CRXa を発現する野生株のものと同様であったことから、Xa21 下流の過敏感反応に JA は関与しないことが強く示唆された。

(2) 細胞死誘導における EL5 の機能解析

① 変異 EL5 遺伝子発現細胞における細胞死誘導時の ROS・NO 生成：変異 EL5 遺伝子を過剰発現させたイネは MS 培地上で発根しないが、その主原因が培地中の窒素 (特に硝酸態窒素) であったことから、EL5-5 発現イネシユートを窒素源を含まない水耕液で発根させた後、硝酸や亜硝酸入りの水耕液に移し、LRES 周辺の ROS・NO 蓄積を非形質転換イネ

(NT) のものと詳細に比較解析した。その結果、NO については細胞死が誘導されない NT でも蓄積することが明らかになったが、Superoxide の蓄積は細胞死が誘導される EL5-5 イネ根でのみ検出された。そこで次に、亜硝酸と同時に活性酸素生成阻害剤で処理した結果、EL5-5 イネ根の細胞死が誘導されなくなった。以上の結果から、EL5 は硝酸態窒素吸収に伴う ROS 生成を抑制することによって根細胞の維持に寄与していることが強く示唆された。

② EL5-5 イネ根における植物ホルモンの内在量の変化：根における各種ホルモン量を NT と比較した結果、IAA 量が低下していたのに対し、サイトカイニン (iP, tZ) は増加していた。これは EL5-5 イネでは脇芽や側根が分化しやすいという表現型を裏付ける結果であった。一方、亜硝酸処理によってサイトカイニン量が増加することが明らかになったが、その他のホルモンを含め変動パターンは NT のものと有意差がなかったことから、EL5 の機能を阻害すると亜硝酸処理によって根細胞が死ぬ原因は亜硝酸処理後の異常なホルモン変動によるものではないことが示された。そこで次に、EL5-5 根ではサイトカイニンの基底量が高いために 亜硝酸シグナルを受けて細胞死が誘導されやすい状態にある可能性を検証するため、NT をサイトカイニン存在下で亜硝酸処理した。その結果、EL5-5 イネと同様に LRES の褐変が誘導された。以上の結果から、EL5 は根のサイトカイニン量の抑制に関与し、変異 EL5 発現イネ根では内生サイトカイニンの基底量が高いために、硝酸シグナルでサイトカイニンの生合成がさらに高められると細胞死が誘引されるものと考えられた。

(3) EL5 と GAPDH の相互作用

① イネ培養細胞中で EL5 と相互作用するタンパク質の探索：EL5-3 を発現するイネ培養細胞からミクロソーム画分 (P100) を調製し、FLAG 抗体による免疫共沈で得られたサンプルを SDS-PAGE で分画後、質量分析によって同定した。その結果、これまでに試験管内で EL5-C と相互作用することがわかっていた GapC2 を含む 3 種の細胞質型 GAPDH が同定された。

② イネ培養細胞における EL5 と GAPDH の相互作用：EL5-3 発現カルスならびに EL5-3&GapC2-HA 発現カルスのミクロソーム画分の免疫共沈とウェスタン分析の結果、EL5-FLAG の免疫沈降物の中には GapC2 が、逆に、GapC2-HA の免疫沈降物の中には EL5 が含まれることが明らかになり、細胞膜に存在することがわかっている EL5 が細胞膜で細胞質

型 GAPDH と相互作用することが強く示唆された。また、EL5 と GapC2 の相互作用は、上述の P100 を BlueNative-PAGE にかき、FLAG 抗体 (EL5)、GapC2 抗体でそれぞれウェスタン分析した結果からも強く示唆された。

③ GAPDH と相互作用する EL5-C 領域の同定 : EL5-C の様々な領域を Bait とし、GapC2 との相互作用を B2H 法で解析した。その結果、GapC2 は EL5-C 中の塩基性アミノ酸残基に富む領域と相互作用することが明らかになった。また、さらに C 末端側に両者の相互作用を阻害する配列が存在することが明らかになった。

(4) 細胞死誘導における GAPDH の解析

① 細胞死誘導時の GapC2 の生化学的解析 : GN₇ 処理後のイネ培養細胞の水溶性画分を BlueNative-PAGE で分離後 GapC2 抗体でウェスタン分析した。その結果、細胞質に四量体で存在することが知られている GAPDH は、GN₇ 処理によって解離することが示唆された。イネ細胞は GN₇ に応答して NO を生成するが、NO 発生剤 (SNP) 処理によっても GAPDH 複合体のバンドは低分子側にシフトした。次に、SNP 処理後の水溶性画分を二次元電気泳動し、GapC2 抗体でウェスタン分析したところ、検出されたドットが塩基側へシフトしていたことから、SNP 処理によって GapC2 が修飾されることが示唆された。次に、GN₇ や SNP 処理による EL5/GapC2 相互作用の変化を検出することを試みた。EL5-3 発現カルスの P100 画分から検出される GapC2 量は空ベクターカルスと比べ増加していることが明らかになったが、その量は GN₇ や SNP 処理の前後で変化しなかった。以上の結果から、GN₇ 応答において NO が生成して GapC2 の修飾が起き、GAPDH 複合体が解離するが、EL5 と GapC2 の親和性は刺激の前後で変化しないことが示唆された。

② GapC2 の細胞内局在 : DsRed を付加した GapC2 を発現するイネ系統を用いて、細胞死に伴う DsRed 蛍光の細胞内局在の変化を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、カルスでは GN₇ 処理によって細胞死を誘導すると核の DsRed 蛍光が増加した後に細胞全体の蛍光が認められなくなることが明らかになった。また、この核での DsRed 蛍光の増加は GapC2-DsRed 遺伝子を導入した EL5-5 カルスでより顕著であった。GapC2-DsRed 発現根の亜硝酸処理では、表皮細胞において核での DsRed 蛍光が高まる傾向が認められた。以上の結果から、一部の GapC2 は細胞死に先んじて細胞質から核に移行することが示唆され、EL5 はその移行を抑制している可能性が考えられた。

③ GapC2 過剰発現イネの表現型 : EL5 遺伝子の発現はキチンエリシターその他、いもち病菌の感染部位で誘導されることなどから、EL5 は病害応答時にも細胞死を抑制するユビキチンリガーゼとして機能していると考えられている。また、GapC2 過剰発現カルスでは GN₇ 処理後の細胞死誘導が高まる傾向が認められている。そこで、GapC2 過剰発現イネのいもち病抵抗性を検定した。これまでのところ、親和性組み合わせの菌株を接種した結果が得られているが、空ベクター導入イネと比較して、いもち病抵抗性に有意差は認められなかった。また、EL5-5 過剰発現イネ根とは異なり、窒素源存在下における GapC2 過剰発現イネ根の褐変化は認められなかった。以上のように、GapC2 過剰発現イネの表現型からは病害抵抗性や根形成における GapC2 の機能を示すことはできなかった。GapC2 は恒常的に発現するいわゆるハウスキーピング遺伝子であり、ウェスタン分析のバンドから類推した過剰発現のレベルは NT の 2 倍程度であったことなどから、過剰発現イネのより詳細な解析の他、発現抑制イネや遺伝子欠損イネの作製が必要と考えている。

(5) 結論および今後の展望

本研究では我々が独自に開発したキチン受容体-白葉枯抵抗性タンパク質 Xa21 キメラ受容体を発現するイネ培養細胞を用いて、キチンエリシター処理によって Xa21 の下流の細胞死誘導シグナル経路を起動し、その細胞死誘導に ROS・RNS が寄与していることを明らかにした。同時に、キチンエリシター処理で ROS だけでなく RNS 生成も増加することを明らかにした。本研究開始時は、Xa21 は真性抵抗性遺伝子 (R) といわれていたが、その後、対応する avrXa21 と考えられていた物質が白葉枯病菌に広く存在する硫化ペプチド (Ax21) であると報告され、現在では、Xa21 は CEBiP と同様、MAMPs 受容体に分類されている。従って、本研究成果は、R 遺伝子下流の過敏感細胞死における RNS の関与を明らかにするという本研究の当初の目標とは異なるものとなったが、Xa21 が細胞死を伴って白葉枯病を阻止する強い抵抗性をもたらすことや、CRXa 発現イネではいもち病抵抗性が向上することから、病害抵抗性につながる細胞死誘導において RNS 生成の重要性をイネで示した意義は大きいと考えている。ただし、本実験系では Xa21 の下流を起動すると同時に、キチンエリシターシグナル経路が起動される。Xa21 と相互作用する Ax21 が同定された現在、Ax21 処理による Xa21 依存的細胞応答を解析することも可能となった。本研究で観察された諸反応が Ax21 単独処理でも起動されるのか、それとも、キチンエリシターシグ

ナリングとの協働の結果であるのかを今後検証するために、現在、キチンエリシターシグナリング欠失イネを作製しているところである。

当初、EL5はNOシグナリングに関与すると予想していたが、EL5の機能を阻害した形質転換イネの詳細な解析から、EL5が硝酸態窒素吸収後のイネ根細胞におけるROS生成を抑制する機能を担っていることが示された。また、EL5の機能を阻害すると内生サイトカイン量が増加し、オーキシン量が低下することが明らかになった。現時点では、ROSとサイトカイン、オーキシンのいずれがEL5の直接の制御を受けているのかは不明であるが、本研究によって、植物が硝酸態窒素によるROS生成を抑制することで根細胞の壊死を防ぐ機構を持つことが初めて示された。

このように、本研究においてEL5の機能解明が進展したと同時に、イネ細胞内でもEL5とGapC2が相互作用することが明らかになった。EL5は非常に不安定なタンパク質であるため、その生化学的解析はE3活性を欠失させて安定性を高めた変異EL5を対象にして培養細胞を用いて行う必要があった。培養細胞においては、キチンエリシター処理によってNOが生成してGapC2の修飾が起き、GAPDH複合体が解離すること、また、細胞死に先んじて一部のGapC2が核に移行するが、その移行をEL5が抑制している可能性が示唆された。これらのGAPDHと細胞死の関連性は本研究で初めて得られた知見である。今回明らかになったEL5の機能から、GapC2はNOよりROSシグナリングに関与している可能性が考えられた。病原菌認識後に生成されるROSの媒介因子と制御機構を解明するためには、今後、病原菌認識後の細胞死誘導におけるGAPDHの関与を明らかにした上で、GapC2のROSによる修飾や、EL5-GapC2相互作用の生物学的意義を明らかにしていくことが重要である。

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3件)

- ① K. Kishimoto, Y. Kouzai, H. Kaku, N. Shibuya, E. Minami, Y. Nishizawa (2011) Enhancement of MAMP signaling by chimeric receptors improves disease resistance in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6(3), 449-451. (査読無)
- ② K. Kishimoto, Y. Kouzai, H. Kaku, N. Shibuya, E. Minami, Y. Nishizawa (2010) Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus

Magnaporthe oryzae in rice. *The Plant Journal* 64, 343-354. (査読有)

- ③ Y. Nishizawa, S. Katoh, H. Koiwai, E. Katoh (2008) EL5 is involved in root development as an anti-cell death ubiquitin ligase. *Plant Signaling & Behavior*, 3(2), 148-150. (査読無)

[学会発表] (計14件)

- ① 香西雄介・岸本久太郎・賀来華江・渋谷直人・南栄一・西澤洋子、キチンオリゴ糖応答性の改変によるイネの菌類病抵抗性増強の試み。第52回日本植物生理学会年会、2011年3月11日(講演要旨集のみ)
- ② 近藤勝彦・小岩井花恵・望月進・岸本久太郎・加藤悦子・南栄一・西澤洋子、エリシターにより発現誘導されるイネ膜結合型 ubiquitin ligase EL5 と相互作用するタンパク質の解析。日本育種学会第117回講演会、2010年3月27日(京都)
- ③ 望月進・岸本久太郎・近藤勝彦・中島恵美・倉野洋子・南栄一・西澤洋子、イネのユビキチンリガーゼEL5は側根形成と細胞死を制御する。第50回日本植物生理学会年会、2009年3月23日(名古屋)
- ④ Y. Nishizawa, E. Katoh, E. Minami, Rice EL5, an unstable RING-H2 type E3, protects cells from nitrate-related stress. ZOMES 第5回国際シンポジウム、2008年11月13日(横浜)
- ⑤ 岸本久太郎・賀来華江・渋谷直人・南栄一・西澤洋子、キチン受容シグナルをHR細胞死誘導シグナルに変換するキメラ受容体創出の試み。平成20年度植物感染生理談話会、2008年8月7日(茨城県大子町)

[図書] (計1件)

- ① Y. Nishizawa, S. Mochizuki, K. Saitoh, K. Kishimoto, Y. Kouzai, E. Minami (APS Press) Defense mechanisms mediated by chitin in rice-blast interactions. *in* Genome-enabled Analysis of Plant-Pathogen Interactions. 2011, pp.121-129.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：イネの側根を発達させる方法
発明者：西澤洋子、望月進、南栄一
権利者：農業生物資源研究所
種類：特許権
番号：特願2009-53434
出願年月日：2009年3月6日
国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：ユビキチン依存型タンパク質分解系を利用したタンパク分解システム

発明者：加藤悦子、加藤静恵、角田由紀、赤木香予、南栄一、西澤洋子

権利者：農業生物資源研究所

種類：特許権

番号：特許第 4465444 号

取得年月日：2010年3月5日

国内外の別：国内

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西澤 洋子 (Nishizawa Yoko)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物・

微生物間相互作用ユニット・上級研究員

研究者番号：40355756

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし