

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05966

研究課題名（和文）細胞膜ナノドメインを基軸とする植物免疫経路の解明

研究課題名（英文）Elucidation of plant immune pathways based on plasma membrane nanodomains

研究代表者

長野 稔（Nagano, Minoru）

立命館大学・生命科学部・講師

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）：細胞膜にはナノ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微小領域が点在する。研究代表者はスフィンゴ脂質を改変することにより、ナノドメインが減少したシロイヌナズナ変異体を作成した。その変異体を用いた解析により、シロイヌナズナにおいて病害応答時にナノドメインが活性酸素種の産生を正に制御することを明らかにした。また、植物ナノドメインの簡易的な可視化方法も確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノドメインは細胞膜に点在する特殊な領域であり、様々なタンパク質の相互作用や活性化の足場となる。本研究により、植物のナノドメインが耐病性タンパク質を制御することにより、免疫に関与することを明らかにした。この結果は、複雑に制御される植物免疫の解明に、細胞膜の視点から貢献するとともに、将来的に耐病性を強化した作物の作出に繋がると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In the plasma membrane, there are specialized nano-scale domains called nanodomains, in which mainly sphingolipids and sterols accumulate. By modifying sphingolipids, the principal investigator has created an Arabidopsis mutant with fewer nanodomains. Analysis of the mutant revealed that nanodomains positively regulate the production of reactive oxygen species during disease response in Arabidopsis thaliana. We also established a simple visualization method for plant nanodomains.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：スフィンゴ脂質 細胞膜 ナノドメイン シロイヌナズナ 免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜にはナノ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微小領域が点在する。研究代表者はこれまでにイネにおいて、ナノドメインが活性酸素種の産生を介して、いもち病耐性に貢献することを明らかにした。しかし、ナノドメインが制御する免疫経路には、未だ不明な点が多く残されている。研究代表者はシロイヌナズナを用いたプロテオーム解析により、植物免疫に関連するナノドメイン局在性タンパク質候補として、免疫受容体 BAK1 と CERK1、三量体 G タンパク質 α サブユニット GPA1、 β サブユニット AGB1、 γ サブユニット AGG1 と AGG2、NADPH オキシダーゼ RBOHD などを同定した。この結果は、ナノドメインが上記タンパク質を介した多様な免疫経路を制御する可能性を示しているが、その関係性や制御機構は未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞膜ナノドメインが制御する植物免疫経路を特定し、病害抵抗性におけるナノドメインの重要性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) スフィンゴ脂質変異体の細胞膜脂質解析

研究代表者はこれまでに、ナノドメイン主要構成脂質であるスフィンゴ脂質がもつ脂肪酸のヒドロキシル化がナノドメインの形成に重要である可能性を示している。そこで、スフィンゴ脂質脂肪酸ヒドロキシラーゼ FAH1 と FAH2 のシロイヌナズナ二重変異体 *fah1fah2* を用いた解析を行っている。*fah1fah2* 変異体の細胞膜において、スフィンゴ脂質脂肪酸のヒドロキシル基が減少しているか調べるために、シロイヌナズナ野生型と *fah1fah2* 変異体から細胞膜を抽出し、スフィンゴ脂質分析を行った。また、ステロールとリン脂質の分析も行った。

(2) スフィンゴ脂質変異体のナノドメイン解析

fah1fah2 変異体においてナノドメインが変化しているか調べるために、シロイヌナズナ野生型と *fah1fah2* 変異体における細胞膜の流動性解析を、di-4-ANEPPDHQ を用いて行った。また、ナノドメイン可視化プローブである GFP-D4L を用いて、*fah1fah2* 変異体においてナノドメインが変化しているか観察を行った。

(3) 分子動力学解析による脂質のシミュレーション解析

スフィンゴ脂質脂肪酸のヒドロキシル化がナノドメインの形成に与える影響をより深く調べるために、分子動力学解析を行った。ヒドロキシル基をもつスフィンゴ脂質とヒドロキシル基をもたないスフィンゴ脂質における、脂質間の距離、および水素結合の頻度を解析した。

(4) 細胞膜のイムノプロット解析

プロテオーム解析によって同定した、免疫に関連するナノドメイン候補タンパク質が、ナノドメインに関連するか調べるために、シロイヌナズナ野生型と *fah1fah2* 変異体から細胞膜を抽出し、それらの特異抗体を用いたイムノプロット解析を行った。

(5) 細胞膜タンパク質のナノドメイン局在解析

プロテオーム解析によって同定した、免疫に関連するナノドメイン候補タンパク質が、ナノドメインに関連するか調べるために、それらタンパク質と蛍光タンパク質と融合したコンストラクトを作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた局在解析を行った。さらに、ナノドメイン可視化プローブである GFP-D4L との共局在解析も行った。

(6) 耐病性解析

ナノドメインが免疫に関与するか調べるために、病害応答時におけるシロイヌナズナ野生型と *fah1fah2* 変異体において、耐病性遺伝子の発現解析を行った。さらに、活性酸素種の産生を調べた。また、シュードモナス菌に対する耐性も調べた。

4. 研究成果

(1) スフィンゴ脂質変異体の細胞膜脂質解析

シロイヌナズナ野生型と *fah1fah2* 変異体の細胞膜におけるスフィンゴ脂質組成を調べた結果、細胞膜においても *fah1fah2* 変異体のヒドロキシ脂肪酸は減少し、その一方でノンヒドロキシ脂肪酸は増加していた。その結果、野生型と比べて *fah1fah2* 変異体のスフィンゴ脂質総量は変化せず、ヒドロキシ脂肪酸の割合が低下するということが明らかになった。また、*fah1fah2* 変異体におけるステロールの量やリン脂質の量は細胞膜では変化していないことも明らかとした。

(2) スフィンゴ脂質変異体のナノドメイン解析

fah1fah2 変異体における細胞膜の流動性を野生型と比較した結果、*fah1fah2* 変異体では細胞膜の流動性が高まっていることが明らかとなった。ナノドメインは流動性の低い高秩序領域であるため、*fah1fah2* 変異体においてナノドメインが減少している可能性が示唆された。また、細胞膜の詳細な観察により、野生型では観察された高秩序のドット状構造が、*fah1fah2* 変異体においては観察されないことも明らかにした。さらに、GFP-D4L を *fah1fah2* 変異体と掛け合わせたシロイヌナズナ形質転換体を作製し、ナノドメインの観察を行った結果、*fah1fah2* 変異体では野生型よりもナノドメインが減少していることを明らかにした。

(3) 分子動力学解析による脂質のシミュレーション解析

分子動力学シミュレーション解析の結果、脂肪酸にヒドロキシル基をもつスフィンゴ脂質は、スフィンゴ脂質同士の距離が 10 Å 以内であることを明らかにした。一方、脂肪酸にヒドロキシル基をもたないスフィンゴ脂質を用いると、スフィンゴ脂質同士の距離は 10 Å ではなく、20 Å 程度になることを明らかにした。また、スフィンゴ脂質脂肪酸のヒドロキシル基は、高頻度で水素結合を形成することも見出した。

(4) 細胞膜のイムノプロット解析

プロテオーム解析により同定された BAK1、CERK1、GPA1、AGB1、および RBOHD が *fah1fah2* 変異体の細胞膜において変化しているか調べるために、細胞膜のイムノプロット解析を行った。その結果、*fah1fah2* 変異体において BAK1、CERK1、GPA1、RBOHD の量が、野生型と比較して減少していることを明らかにした。

(5) 細胞膜タンパク質のナノドメイン局在解析

BAK1 と RBOHD がナノドメインに局在するか調べるために、赤色蛍光タンパク質を付加したコンストラクトを作製し、シロイヌナズナ形質転換体を作成した。共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、BAK1 も RBOHD も細胞膜状でドット状に観察することができた。GFP-D4L との共局在解析を行った結果、BAK1 も RBOHD も GFP-D4L と共局在したことから、ナノドメインに局在することが明らかとなった。

(6) 耐病性解析

ナノドメインがシロイヌナズナの免疫に関わるか調べるために、ナノドメインが減少した *fah1fah2* 変異体を用いた耐病性遺伝子発現解析を行った。細菌のべん毛成分であるフラジェリン (flg22) を処理した結果、FRK1、Chitinase、Nit4、WRKY53、WRKY75、および MYB51 の発現量が *fah1fah2* 変異体において野生型よりも増加することが明らかになった。また真菌の細胞壁成分であるキチン処理した際にも、耐病性遺伝子の発現が *fah1fah2* 変異体において野生型よりも増加することが明らかになった。その一方で、活性酸素種の産生量は、flg22 処理時もキチン処理時も *fah1fah2* 変異体において野生型よりも減少していた。さらに、シュードモナス菌の感染実験を行った結果、flg22 誘導性免疫は *fah1fah2* 変異体において野生型と変わらなかった。また、AvrRPT2 をもつシュードモナス菌に対する耐性も *fah1fah2* 変異体において野生型と変わらなかった。以上の結果から、シロイヌナズナのナノドメインは病害応答時における活性酸素種の産生には関わるが、病原菌に対する耐性には影響を与えないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagahage Isura Sumeda Priyadarshana, Matsuda Kohei, Miyashita Kyoko, Fujiwara Sumire, Mannapperuma Chanaka, Yamada Takuya, Sakamoto Shingo, Ishikawa Toshiki, Nagano Minoru, Ohtani Misato, Kato Ko, Uchimiya Hirofumi, Mitsuda Nobutaka, Kawai Yamada Maki, Demura Taku, Yamaguchi Masatoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 NAC domain transcription factors VNI2 and ATAF2 form protein complexes and regulate leaf senescence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.529	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 Ushio Marina, Ishikawa Toshiki, Matsuura Takakazu, Mori Izumi C., Kawai-Yamada Maki, Fukao Yoichiro, Nagano Minoru	4. 巻 336
2. 論文標題 MHP1 and MHL generate odd-chain fatty acids from 2-hydroxy fatty acids in sphingolipids and are related to immunity in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 111840 ~ 111840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plantsci.2023.111840	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 Kimura Sachie, Vaattovaara Aleksia, Ohshita Tomoya, Yokoyama Kotomi, Yoshida Kota, Hui Agnes, Kaya Hidetaka, Ozawa Ai, Kobayashi Mami, Mori Izumi C., Ogata Yoshiyuki, Ishino Yoko, Sugano Shigeo S., Nagano Minoru, Fukao Yoichiro	4. 巻 115
2. 論文標題 Zinc deficiency induced defensin like proteins are involved in the inhibition of root growth in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1071 ~ 1083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.16281	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 Suzuki Shota, Tanaka Daimu, Miyagi Atsuko, Takahara Kentaro, Kono Masaru, Chaomurilege, Noguchi Ko, Ishikawa Toshiki, Nagano Minoru, Yamaguchi Masatoshi, Kawai-Yamada Maki	4. 巻 283
2. 論文標題 Loss of peroxisomal NAD kinase 3 (NADK3) affects photorespiration metabolism in Arabidopsis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 153950 ~ 153950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jplph.2023.153950	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 Ukawa Tomomi, Banno Fumihiko, Ishikawa Toshiki, Kasahara Kota, Nishina Yuuta, Inoue Rika, Tsujii Keigo, Yamaguchi Masatoshi, Takahashi Takuya, Fukao Yoichiro, Kawai-Yamada Maki, Nagano Minoru	4. 巻 189
2. 論文標題 Sphingolipids with 2-hydroxy fatty acids aid in plasma membrane nanodomain organization and oxidative burst	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 839 ~ 857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiac134	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 Mamode Cassim Adiilah, Navon Yotam, Gao Yu, Decossas Marion, Fouillen Laetitia, Gr?lard Axelle, Nagano Minoru, Lambert Olivier, Bahammou Delphine, Van Delft Pierre, Maneta-Peyret Lilly, Simon-Plas Fran?oise, Heux Laurent, Jean Bruno, Fragneto Giovanna, Mortimer Jenny C., Deleu Magali, Lins Laurence, Mongrand S?bastien	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 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 松井詩倫、小宮山梨菜、安井碧、松浦智哉、石川寿樹、竹中悠人、石水毅、川合真紀、深尾陽一郎、長野稔
2. 発表標題 スフィンゴ脂質は植物の低ホウ素耐性に重要である
3. 学会等名 ホウ素栄養研究会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kimura S, Vaattovaara A, Kaya H, Kobayashi M, Mori IC, Nagano M, Fukao Y
2. 発表標題 Zinc deficiency-induced defensin-like proteins regulate Arabidopsis root growth
3. 学会等名 The 19th International Workshop on Plant Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takayama S, Fukao Y, Nagano M
2. 発表標題 Dynamics of plasma membrane nanodomains during disease response in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ushio M, Ishikawa T, Matsuura T, Mori IC, Kawai-Yamada M, Fukao Y, Nagano M
2. 発表標題 MHP1 and MHL generate odd-chain fatty acids from 2-hydroxy fatty acids in sphingolipids and are related to immunity in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kimura S, Vaattovaara A, Kaya H, Kobayashi M, Mori IC, Nagano M, Fukao Y
2. 発表標題 Defensin-like proteins induced by zinc deficiency are involved in Arabidopsis root elongation
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takagi J, Takahashi H, Nagano M, Kimori Y, Fukao Y, Ueda H, Tamura K, Shimada T, Hara-Nishimura I
2. 発表標題 MAIG03-dependent mechanism underlying dynamic capture-and-release process of ER exit sites by Golgi stacks in Arabidopsis
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takagi J, Takahashi H, Nagano M, Moriya K, Fukao Y, Ueda H, Tamura K, Shimada T, Hara-Nishimura I
2. 発表標題 MAIG03-mediated capture-and-release of ER exit sites facilitates protein transport from ER to Golgi stacks in Arabidopsis
3. 学会等名 TJPB2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hayashi R, Nagano M, Fukao Y
2. 発表標題 Characterization of plastids in zinc-deficient Arabidopsis roots
3. 学会等名 TJPB2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山紗季、深尾陽一朗、長野稔
2. 発表標題 病害応答時におけるシロイヌナズナ細胞膜ナノドメインの動態解析
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林竜史、長野稔、深尾陽一朗
2. 発表標題 亜鉛欠乏したシロイヌナズナ根端に観察されるプラスチドの生理的意義の解明
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2023年度愛媛大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高木純平、高橋英之、長野稔、守屋健太、深尾陽一朗、上田晴子、田村謙太郎、嶋田知生、西村いくこ
2. 発表標題 MAIG03は小胞体ドメインER exit siteとゴルジ体の相互作用に関与する
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長野稔、松井詩倫、小宮山梨菜、安井碧、松浦智哉、石川寿樹、竹中悠人、石水毅、川合真紀、深尾陽一朗
2. 発表標題 植物の低ホウ素耐性におけるスフィンゴ脂質の機能
3. 学会等名 第8回植物の栄養研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林竜史、長野稔、深尾陽一朗
2. 発表標題 亜鉛欠乏した植物の根におけるデンブンの蓄積誘導
3. 学会等名 第8回植物の栄養研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 城ノ下元毅、山口雄司、長野稔、深尾陽一朗
2. 発表標題 シロイヌナズナの根においてCEPR1が亜鉛恒常性維持に果たす機能の解明
3. 学会等名 第8回植物の栄養研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林竜史、長野稔、深尾陽一朗
2. 発表標題 なぜ亜鉛欠乏したシロイヌナズナの根においてデンブンが溜まるのか
3. 学会等名 2023年ニガウリの会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長野稔
2. 発表標題 スフィンゴ脂質から紐解く植物の生体膜機能
3. 学会等名 立命館大学生物資源研究センター × R-GIRO 「気候変動に対応する生命圏科学の基盤創生」プロジェクト共催シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山紗季、深尾陽一朗、長野稔
2. 発表標題 シロイヌナズナの病害応答時における細胞膜ナノドメイン動態の解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山紗季、深尾陽一朗、長野稔
2. 発表標題 病害応答時におけるシロイヌナズナ細胞膜ナノドメインの動態イメージング
3. 学会等名 第34回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長野稔、小宮山梨菜、安井碧、松浦智哉、石川寿樹、竹中悠人、石水毅、川合真紀、深尾陽一朗
2. 発表標題 スフィンゴ脂質は低ホウ素条件下におけるシロイヌナズナの生長に關与する
3. 学会等名 第33回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長野稔
2. 発表標題 植物スフィンゴ脂質が関わる多様な生理学的機能
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長野稔、小宮山梨菜、安井碧、松浦智哉、石川寿樹、竹中悠人、石水毅、川合真紀、深尾陽一朗
2. 発表標題 低ホウ素条件下における植物スフィンゴ脂質の機能
3. 学会等名 植物の栄養研究会第6回交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長野稔、小宮山梨菜、安井碧、松浦智哉、石川寿樹、竹中悠人、石水毅、川合真紀、深尾陽一朗
2. 発表標題 グルコシルセラミドは低ホウ素条件下における植物の生育に重要である
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://fukaoyoichirolab.wixsite.com/rits>

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
---------	---------