

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2009～2010

課題番号：21687003

研究課題名 (和文) 植物の病害抵抗性と細胞死機構の時空間的制御メカニズムの解明

研究課題名 (英文) The spatiotemporal analysis of disease resistance and cell death mechanism in plants.

研究代表者

初谷 紀幸 (HATSUGAI NORIYUKI)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：90456848

研究成果の概要 (和文)：

植物は細菌などの外敵の侵入に備えて、細胞内の液胞に抗菌性物質を多量に蓄積している。一方、植物体内に侵入した細菌は細胞間隙で増殖し植物の生命を脅かす。これまで、植物がどのように細胞内の抗菌性物質を使って細胞外の細菌を攻撃しているかということは謎であった。本研究において、感染を受けた植物細胞が積極的に液胞膜と細胞膜を融合させることによって液胞内の抗菌性物質を細胞間隙に放出し、細菌を攻撃するメカニズムを明らかにした。本研究成果は、国際学術雑誌に発表するとともに、国内外の学会・シンポジウム等で講演した。

研究成果の概要 (英文)：

Plants have developed their own defense strategies, because they have no immune cells. Here we provide a novel mechanism underlying cell-autonomous immunity, which involves the fusion of membranes of a large-central-vacuole with the plasma membrane, resulting in the discharge of vacuolar antibacterial proteins to the outside of the cells where bacteria proliferate. The extracellular fluid that was discharged from the vacuoles of infected leaves had both antibacterial activity and cell-death-inducing activity. Membrane fusion was triggered in a proteasome-dependent manner by the bacterial infection. This novel membrane fusion-based defense strategy provides plants with a mechanism for attacking extracellular bacterial pathogens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2010年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
年度			
年度			
年度			
総計	17,200,000	5,160,000	22,360,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物免疫・植物微生物間相互作用・プログラム細胞死・バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

プログラム細胞死 (PCD) は植物と動物を通して普遍的な生理プロセスであり、両者には形態的、生理的にも共通する部分が存在する。その

一方で、植物はマクロファージなどの食細胞を持たず、植物細胞は細胞壁で囲まれているため、動物細胞のようにアポトーシス小体が形成されて食食されることは考えにくい。これまでに

我々は、植物細胞に特有の液胞が自らの細胞成分を自力で分解することによりPCDを実行することを証明した。この研究成果は、それまで細胞内の“ゴミ箱”として考えられていた液胞が細胞の生死を決定する重なるオルガネラであることを明らかにした点でも高く評価された。

本研究開始当時、我々は、*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000/*avrRpm1*の感染を受けた細胞を電子顕微鏡を用いて観察し、感染初期に細胞膜と液胞膜の融合が起こることを発見していた。この膜融合の結果、細胞質は液胞膜と細胞膜で隔離され、液胞と細胞外を結ぶトンネルが形成される。我々は、感染を受けた細胞はこのトンネルを介して液胞内の分解酵素や抗菌物質を細胞外に放出し、細胞間隙に潜伏する細菌を攻撃すると同時に、自らも過敏細胞死を起こして死に至るのではないかと仮説を立てた。本課題研究では、液胞が主導する植物PCDに焦点を当て、細胞死の実行プロセスで働く分子を明らかにしていくことにより、動物のPCD研究から得られた知見では説明できない、植物オリジナルな全く新しいPCD機構を提唱すると同時に、植物免疫機構を解明することを目指した。

2. 研究の目的

ポストゲノム時代を迎え、モデル植物を中心に生命現象に関わる分子群とそれらの相互作用に関する膨大な情報が得られるようになった。しかしながら、大部分の情報は断片的であり、生命現象の包括的な理解には程遠い。より包括的な理解に迫るためには、細胞や組織において特定の生体分子がいつ、どこで、どのように、どの分子と相互作用し機能しているのかを正確に知る必要がある。そのためには、機能分子を個体および細胞レベルで“生きたまま”捉えるバイオイメージングの技術がひとつの有効な研究手法となる。

本研究課題では、シロイヌナズナに *Pst* DC3000/*avrRpm1* が感染した際に誘導される防御発現系をモデルとして、感染細胞の動態をバイオイメージングの技術を用いてリアルタイムで観察する。膜融合を介した植物免疫機構および細胞死機構の時間的・空間的制御メカニズムの解明を目指す。また、過敏細胞死の実行プロセスは老化や発生過程で起こる様々なタイプの植物細胞死と共通する機構があることが見出されている。この

点にも注目し、過敏細胞死の実行プロセスで機能する分子を一つずつ明らかにしていくことで、防御戦略としての細胞死の解析に留まらず、植物の生命現象を支えるプログラム細胞死へと研究を進展させたい。

3. 研究の方法

(1) これまでに我々は、シロイヌナズナの感染細胞を固定して電子顕微鏡で観察することにより、感染を受けた細胞は、細胞膜と液胞膜が融合させることを見いだした。生物個体内で進行する液胞膜と細胞膜の融合をバイオイメージングの技術を用いてリアルタイムでモニターすることにより、膜融合という生命現象の動態を蛍光色の変化で捉えることを目指した。具体的には、液胞膜局在タンパク質である *Vam3* および細胞膜局在タンパク質である *PIP2a* にそれぞれ *RFP* および *GFP* を繋げることで、液胞膜と細胞膜を異なる蛍光色（赤と緑）で可視化する。膜融合が起これば、オレンジ色になるはずである。この系を利用し、感染細胞における膜の挙動を時間的、空間的なパターンでイメージングした。

(2) 細胞膜と液胞膜の融合が起こることにより、液胞内の分解酵素や抗菌物質を細胞間隙に放出し、細胞外の細菌を攻撃するのではないかと仮説を立てた。そこで、液胞移行シグナルを付加した *Venus* 蛍光タンパク質

(*SP-Venus-2SC*) をシロイヌナズナに発現させ、液胞内を *Venus* 蛍光で可視化した。感染にともなう *Venus* 蛍光の局在変化をリアルタイムで観察することにより、液胞内容物が細胞外に放出されるのかどうか、またその様子を生きた細胞で観察した。

(3) 生きたままの個体内の分子局在を観察する際には、蛍光分子や蛍光タンパク質を用いたものが主流である。しかし植部個体レベルでの蛍光イメージングを行う場合、自家蛍光が問題となる。また長時間観察においては光毒性や光感受性による応答のアーティファクトが無視できない。一方、励起光を必要としない生物発光イメージングは、蛍光に比べて暗いという理由から開発が遅れている。そこで、生物発光共鳴エネルギー移動

(*BRET*) による発光量増強を利用した生細胞、個体イメージングを試みた。

4. 研究成果

(1) 植物病原微生物の感染にともなう細胞内膜系の動態解析

Pst DC3000/*avrRpm1*の感染にともなう細胞内膜系の動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いてリアルタイムにイメージング解析を行った。液胞膜に局在するVam3タンパク質と細胞膜に局在するPIP2aタンパク質にそれぞれRFPおよびGFPを繋げることで、液胞膜と細胞膜を異なる蛍光で可視化し、感染細胞における膜の動態を時間的、空間的なパターンで解析した。*Pst* DC3000/*avrRpm1*を接種した葉の細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、接種後約3時間目において、GFP蛍光とRFP蛍光が共局在することが観察され、細胞膜と液胞膜が融合することを生きた細胞で示した(図1)

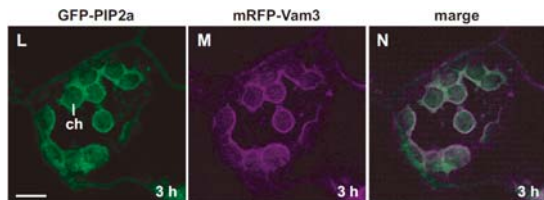


図1. GFP-PIP2aとmRFP-Vam3を発現するシロイヌナズナに*Pst* DC3000/*avrRpm1*を接種して3時間目の細胞。GFP蛍光とRFP蛍光が重なっている (Genes & Development 2009)。

(2) 感染にともなう液胞内容物の細胞外への分泌

植物は細菌などの外敵の侵入に備えて、細胞内の液胞に抗菌性物質を多量に蓄積している。一方、植物体内に侵入した細菌は細胞間隙で増殖し植物の生命を脅かす。これまで、植物がどのように細胞内の抗菌性物質を使って細胞外の細菌を攻撃しているかということは謎であった。本研究により、感染を受けた植物細胞が積極的に液胞膜と細胞膜を融合させることによって液胞内の抗菌性物質を細胞間隙に放出し、細菌を攻撃するメカニズムを明らかにした。SP-Venus-2SCを発現するシロイヌナズナを用いることにより、液胞内を可視化することに成功した。この植物に*Pst* DC3000/*avrRpm1*を接種すると、接種後3時間を過ぎた辺りから、液胞に加えて細胞間隙において蛍光が検出されはじめ、4.5時間目には細胞間隙において液胞内と同程度の強い蛍光が観察された(図3)。これは、もともと液胞に局在していたVenus蛍光タンパク質が、感染に伴って細胞間隙に放出された結果であると考えられる。また、免疫学的手法を用いて、

健全葉では液胞に局在する内在性のタンパク質分解酵素が、感染葉では細胞間隙にも存在することを確認した。

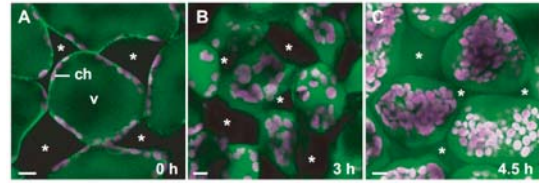


図3. SP-Venus-2SCを発現するシロイヌナズナの細胞。*Pst* DC3000/*avrRpm1*接種前の細胞(A)では、Venusの蛍光が液胞内のみで観察されるが、接種後4.5時間目の細胞(B)では、液胞内とともに細胞間隙においても観察される (Genes & Development 2009)。

(3) 植物におけるカスパーゼ-3活性を担う酵素の同定

植物のPCDに関与することが示唆されていたカスパーゼ-3様(DEVase)活性の実体がプロテアソームの $\beta 1$ サブユニット(PBA1)がもつ活性であることを明らかにした。プロテアソームの3つの触媒ユニットの中でも $\beta 1$ サブユニットはグルタミン酸(E)とアスパラギン酸(D)に対する基質特異性を示すことが知られている。シロイヌナズナのPBA1遺伝子のRNAi株を作出し、PBA1活性とDEVase活性を測定したところ、PBA1活性が低い個体ではDEVase活性も低く、両者の活性が相関していた(図2)。

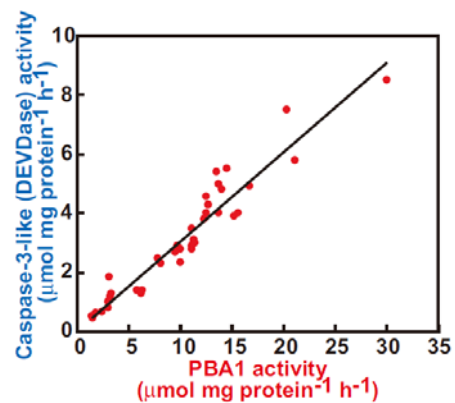


図3. PBA1のRNAi株におけるPBA1活性とDEVase活性。PBA1活性が低い個体ではDEVase活性も低く、両者の活性が相関している (Genes & Development 2009)。

(4) 植物感染細胞内Ca²⁺濃度のリアルタイム計測

発光観察は、励起光を必要とする蛍光観察とは異なり、自家蛍光が多くまた光毒性の影

響が出やすい植物個体内部のイメージングに適している。生物発光タンパク質から蛍光タンパク質への生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を利用したカルシウム指示薬 (BRAC) の開発に成功した。 *Pst* DC3000/*avrRpm1* を接種したシロイヌナズナの細胞内 Ca^{2+} 濃度のリアルタイムに計測したところ、感染にともなって細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がみられた (図 4)。発光観察は、励起光を必要とする蛍光観察とは異なり、自家蛍光が多くまた光毒性の影響が出やすい植物個体内部の生体イメージングに期待される。

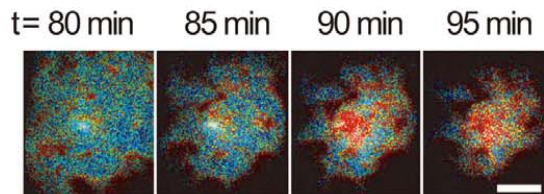


図 4. BRAC 蛍光指示薬を用いた植物感染細胞のカルシウムイメージング (PLoS One 2010)。

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 6 件)

① Noriyuki Hatsugai and Ikuko Hara-Nishimura, Two vacuole-mediated defense strategies-how do plants use vacuole against invading pathogens? *Plant Signaling Behavior*, 査読無, VOL.5, 2010, 1568-1570

② 初谷 紀幸, 西村 いくこ. 植物の細胞死を司る遺伝子-多彩なデスプロテアーゼ-, *化学と生物*, 査読無, 64巻, 2010, 68-74

③ 初谷 紀幸, 西村 いくこ. 液胞が導く植物免疫, *生物の化学 遺伝*, 査読無, 48巻, 2010, 734-736

④ Saito Kenta, Hatsugai Noriyuki, Horikawa Kazuki, Kobayashi Kentaro, Matsu-Ura Toru, Mikoshiba Katsuhiko and Nagai Takeharu.

., Auto luminescent genetically-encoded ratiometric indicator for real-time Ca^{2+} imaging at the single cell level. *PLoS One*, 査読有, VOL.5, 2010, e9935

⑤ Noriyuki Hatsugai, Shinji Iwasaki, Kentaro Tamura, Maki Kondo, Kentaro Fuji, Kimi Ogasawara, Mikio Nishimura, and Ikuko Hara-Nishimura. A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes & Development*, 査読有, VOL.23, 2009, 2496-2506

[学会発表] (計 9 件)

① 初谷 紀幸, 他 3 名, 植物の細胞死における ATP 動態の可視化. 第 52 回 日本植物生理学会年会. 2011. 3. 22, 仙台

② Noriyuki Hatsugai. Imaging of intracellular ATP dynamics during hypersensitive cell death in plant. *International Symposium on Photonic Bioimaging 2011*, 2011. 2. 10, Niseko.

③ Noriyuki Hatsugai et. al., Bacterial-induced hypersensitive cell death involves fusion of the vacuolar and plasma membranes. *Plant Biology 2010*, 2010. 8. 4, Montreal.

④ Noriyuki Hatsugai et. al., Involvement of membrane fusion between the vacuolar and plasma membranes in plant immunity against bacterial pathogens. *Perspective of Plant Science 2010*, 2010. 3. 27, Okazaki.

⑤ 初谷 紀幸, 他 7 名, 液胞膜と細胞膜の融合による植物の感染防御機構. 第 51 回 日本植物生理学会年会. 2010. 3. 20, 熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

初谷 紀幸 (HATSUGAI NORIYUKI)
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号：90456848

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

永井 健治 (NAGAI TAKEHARU)
北海道大学・電子科学研究所・教授
研究者番号：20311350