

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710226

研究課題名 (和文) ランダムライブラリより見出した活性ペプチドを分子プローブとした植物免疫機構の解明

研究課題名 (英文) Investigation of plant immune system using a novel elicitor peptide using as a chemical probe, which was identified from random peptide libraries

研究代表者

宮下 正弘 (MIYASHITA MASAHIRO)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80324664

研究成果の概要 (和文)：植物は病原体から身を守る免疫システムを有している。本研究では、ランダムライブラリより見出した、植物免疫活性化ペプチド (PIP-1) の詳細な免疫誘導機構の解明、ならびに受容体の同定に向けた標識体の合成を行った。まず、PIP-1 の植物細胞による分解と防御応答の関係を調べたところ、植物は短時間と長時間の刺激を区別して応答していることが示唆された。また、放射性標識体を得るために、C 末端残基を Cys に置換し、側鎖チオール基とマレイミド基との反応を利用した間接的ヨウ素化を試みた結果、本類縁体は活性を保持したことから、標識体として使用できることが分かった。

研究成果の概要 (英文)：Plants defend themselves using an innate immune system, which is activated in response to a variety of elicitor molecules. Previously, we discovered a novel elicitor peptide (YGIHTH-amide, PIP-1) from a combinatorial random library. In this study, we first evaluated the effect of degradation of PIP-1 on defense responses and found that continuous activation is required for phytoalexin biosynthesis. Next, we synthesized a PIP-1 analog, in which the His⁶ residue is substituted with Cys, to obtain a labeled analog for characterization of its receptor. Modification at the Cys residue using iodophenylmaleimide had no effect on activity, indicating that this analog can be used as a radiolabeled ligand.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

農作物の安定供給に貢献してきた農薬は、食糧危機を回避するため今後も必須であるが、一方ではさらに安全で環境負荷の低い農薬が強く求められている。このような状況で、植物の免疫機構を人為的に活性化する病害防除法が注目されている。植物は病原体の感染から身を守るための防御能力を潜在的に備えており、病原体由来の物質を認識するこ

とによって防御反応を開始する。したがって、防御反応を引き起こす物質は、人為的に植物の防御能力を高める「植物免疫活性化剤」として用いることが可能である。植物免疫活性化剤は他の有益な生物の生態系には影響をほとんど与えず、環境に対する負荷が極めて小さい。また、病原菌が薬剤に対する抵抗性を獲得する可能性が低いという利点がある。これまでに実用化された数種の薬剤は、いず

れも高い病害防除効果を示しており、この分野の発展が期待されているが、植物の防御反応機構については不明な点が多いこともあり、その効率的な探索は困難なものとなっている。

植物の防御機構、特に植物の病原体認識に関わる物質（エリシター）についての研究は国内外において古くから精力的に行われてきた。近年、細菌の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリン、ならびにその一部配列から成るペプチドが、幅広い植物に防御反応を引き起こす非特異的エリシターとして同定された。フラジェリンの受容体およびシグナル伝達経路が明らかにされた結果、これらがほ乳類における自然免疫と類似した受容機構であることが示され、その後の植物免疫研究を進展させるきっかけとなった。このような免疫機構に関わると考えられる受容体タンパク質が植物に多数存在することが、シロイヌナズナのゲノム情報から予想されており、これらを作用標的として新たな植物免疫活性化剤を開発することが可能である。植物免疫活性化剤の開発を行うにあたって、エリシター分子をもとに設計することがまず第一に考えられるが、これまでに見出されたエリシターは、タンパク質、多糖類など分子量の大きなものが多く、比較的小さいペプチドでも分子量は 1000 を超える。そのため、これらのエリシター分子をリード化合物として用いることは難しく、実用化へ向けた研究が進みにくい原因の一つとなっている。

植物の免疫機構の研究は、上述したようにフラジェリンペプチドの発見以降に急速に進んだ。この理由の一つとして、このエリシターが「ペプチド」であったことが挙げられる。ペプチドは合成が容易であるため、様々な生化学実験のための標識化を簡単に行うことができ、作用機構研究を迅速に進めることが可能である。またペプチドには、活性化化合物探索のためにコンビナトリアル化学（コンビケム）手法によるランダムライブラリを容易に作製できる利点もある。コンビケムは、迅速に新規活性化化合物を探索するための有力な手段の一つで、膨大な種類の化合物ライブラリを一挙に合成し、効率的なスクリーニング法により活性化化合物を見出す方法である。医薬品開発では必須技術であるが、植物・農学分野での応用例は少ない。

我々のグループでは、植物の防御反応を誘導する新規物質の探索を目的とした、ペプチドライブラリの効率的なスクリーニング法をこれまでに開発した。本手法は、防御反応の一つである過酸化水素の発生を指標とし、コンビケム手法によって作製したライブラリから、活性ペプチドを効率的に検出するものである。このスクリーニング法を用いることによって、ランダムペプチドライブラリか

ら、防御反応を誘導する新規活性ペプチドを見出すことに成功した。このペプチド（PIP-1 と命名）は、既知ペプチド・タンパク質とは相同性のない 6 残基の配列で構成され、防御誘導活性を持つペプチドとしては最も短いものである。PIP-1 は分子量が小さいため、植物免疫活性化剤のリード化合物として役立つものと考えられる。また、このペプチドの作用機構を明らかにすることによって、これを標的とした高活性な薬剤の探索が容易になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、見いだされたPIP-1について、さらに詳細な植物免疫活性化機構の解明、ならびに受容体の同定に向けて、主に以下の2つの点に着目して実験を進めた。

(1) PIP-1 は、植物に対して過酸化水素の発生ならびにファイトアレキシンであるカプシジオールの生成を誘導するが、それぞれに必要な PIP-1 の濃度には違いがあり、後者はより高濃度の処理を必要とすることが示された。そこで、この要因を明らかにすることを目的として、PIP-1 の植物による分解と防御応答との関係について調べた。

(2) PIP-1 の作用は細胞膜上の受容体を介して引き起こされていることが予想された。そこで、PIP-1 の鏡像類縁体を合成することにより、細胞膜などへの物理的な作用ではなく、受容体タンパク質であることを推定するとともに、受容体の同定に向けた標識体の設計・合成を行った。

3. 研究の方法

(1) PIP-1 の分解物の同定と定量
PIP-1 をタバコ懸濁細胞に処理した後、経時的に培地を LC/MS 分析に供し、PIP-1 関連成分の変動を定量的に調べた。

(2) PIP-1 類縁体の合成
ペプチドは Fmoc 固相法によって合成し、HPLC を用いて精製した。ヨウ素化フェニルマレイミドは文献に従って合成した。

(3) 防御応答の測定
植物の防御応答の 1 つである過酸化水素の発生を指標として、PIP-1 類縁体の活性を定量的に評価した。測定にはタバコ懸濁細胞を用いた。

4. 研究成果

(1) PIP-1 (図 1) をタバコ細胞に処理し、経時的に培地中の PIP-1 分解物の変動を調べた。その結果、PIP-1 は植物細胞による分解反応を受けて C-末端残基から順次切断され、

1 時間後に PIP-1 の量は半分程度にまで減少し、3 時間後にはほぼ消失していることが明らかとなった。このことから、分解によって PIP-1 の作用が長時間持続できないことが、ファイトアレキシン生成の誘導に高濃度の PIP-1 処理が必要である要因と考えられた。そこで、PIP-1 を 10 μM の濃度で 1 回処理した場合と、1 μM の濃度で 3 時間にわたって一定間隔で 10 回処理した場合のカブシジオール生成誘導活性を比較した。その結果、1 回のみ処理した場合は、カブシジオールの生成が確認されなかったが、10 回与え続けた場合は効果が認められた。このことから、PIP-1 のファイトアレキシン生成の誘導には、少なくとも 3 時間程度の継続的な作用が必要であることが判明した。つまり、植物は防御応答において、短時間の刺激と長時間の刺激を区別しており、感染の危険度に応じて異なる応答を示すことが示唆された。また、分解を受けにくい類縁体を合成することによって、低濃度でもファイトアレキシン生成を誘導することが可能であることが示唆された。

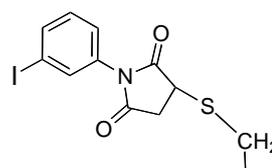
Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-NH₂

図 1 植物免疫活性化ペプチド PIP-1 の配列

(2) PIP-1 の作用が細胞膜上の受容体タンパク質を介して引き起こされているかどうかについて明らかにするため、PIP-1 のすべての残基を D 体アミノ酸で置換した鏡像類縁体を合成し、その活性を測定した。その結果、この類縁体には活性が認められなかった。このことから、PIP-1 の活性は、抗菌性ペプチド等で見られるような細胞膜への物理的作用によるものではなく、キラリティーを認識する受容体タンパク質を介したものであることが示唆された。

続いて、受容体を検出・同定する上で必要となる放射性ラベル体の合成を想定し、この PIP-1 へのヨウ素導入を検討した。まず、N 末端の Tyr 残基にヨウ素を導入したところ、活性が著しく低下した。また、この Tyr 残基の α アミノ基に、Bolton-Hunter 試薬によって *p*-hydroxyphenylpropionic acid を縮合させたところ、これも大きな活性低下を引き起こした。これらのことから、N 末端 Tyr 残基へのヨウ素導入は難しいことが明らかとなった。そこで、構造変換による活性への影響がほとんどないことが分かっている C 末端 His 残基への導入を検討した。His の側鎖構造に特異的にヨウ素を直接導入することは難しいため、これを Cys に置換し、側鎖チオール基とマレイミド基との反応を利用した間接的なヨウ素化を試みた。まず、Cys へ置換し

た結果、この類縁体は高活性を維持した。さらに、ヨウ素化フェニルマレイミドを合成し、これを [Cys⁶]PIP-1 に導入した。その結果、この類縁体 (図 2) は高い活性を保持した。このことから、本類縁体は放射性ラベル体として使用できることが分かり、PIP-1 の受容体の存在を確認する実験が可能となった。また、この部位に樹脂ビーズと連結するためのリンカーを導入することによって、受容体単離のためのアフィニティークロマトグラフィー担体を作成できることも分かった。今後、PIP-1 の受容体の探索を進めることによって、植物の免疫機構の解明につながることを期待される。



Tyr-Gly-Ile-His-Thr-Cys-NH₂

図 2 [IPM-Cys⁶]PIP-1 の構造

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)

[学会発表] (計 6 件)

① 菰田依里子, 上坊史晃, 宮下正弘, 宮川恒, エリシターペプチド PIP-1 の分解性と植物防御応答との関係. 日本農薬学会第 36 回大会, 2011 年 3 月 18 日, 玉川大学 (東京都町田市)

② Eriko Komoda, Yuji Ono, Masahiro Miyashita, Hisashi Miyagawa, Investigation of plant defense responses induced by the novel elicitor peptide, PIP-1. 5th international peptide symposium, 2010 年 12 月 5 日, 京都国際会館 (京都市)

③ Masahiro Miyashita, Screening for peptides active against insect and plant from natural and synthetic libraries. The Commemorative International Symposium for the 50th Anniversary of KSABC, 2010 年 8 月 25 日, Hotel Hyundai Gyeongju (Korea)

④ 小野友慈, 菰田依里子, 宮下正弘, 宮川恒, 新規エリシターペプチドの植物における防御応答誘導機構. 日本農薬学会第 35 回大会, 2010 年 5 月 30 日, 北海道大学 (北海

道札幌市)

◎宮下正弘, 植物および昆虫生理活性を有するペプチド類の生物有機化学的研究, 日本農薬学会第35回大会, 2010年5月28日, 北海道大学(北海道札幌市)

◎菰田依里子, 小野友慈, 宮下正弘, 宮川恒, 新規エリシターペプチドの受容体探索にむけたラベル体の合成. 日本農芸化学会2010年度大会, 2010年3月28日, 東京大学(東京都目黒区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 正弘 (MIYASHITA MASAHIRO)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号: 80324664

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし