

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770042

研究課題名 (和文) 植物の環境適応・被食防衛に応答するカルシウム依存リン酸化・ユビキチン化制御機構

研究課題名 (英文) Regulation of Arabidopsis defense responses against herbivory and abiotic stresses by calcium-dependent protein phosphorylation and ubiquitination

研究代表者

有村 源一郎 (ARIMURA GENICHIRO)

京都大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60505329

研究成果の概要 (和文) : 食害や環境ストレスによって活性されるカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 (Calcium-Dependent Protein Kinase: CPK) とそれらの基質タンパク質に着目し、食害および高温ストレスに曝されたシロイヌナズナにおける遺伝子転写制御の分子機構の解明を試みた。CPK 変異体を用いた解析等により、CPK3 と CPK13 による基質タンパク質 (HsfB2a [転写因子] など) のリン酸化は防御遺伝子と熱ショック遺伝子の発現誘導において重要であり、これらの CPK はリン酸化する基質ターゲットを変化させ、様々なストレス環境下において多様な役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : We investigated the possible involvement of Arabidopsis Ca^{2+} -dependent protein kinases (CPKs) and their substrates in the herbivory- or abiotic stress-induced signaling network for the defense-related transcriptional machinery. We found that CPK-derived phosphorylation of a heat shock transcription factor (HsfB2a) promotes transcriptional activation in the defense response. Those CPKs are likely to contribute to a wide range of central signal transduction responses in plants, whereas their substrate targets are differently involved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：カルシウム、CPK、食害応答、シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

温暖化する自然環境での生態系が自立分散的に維持することが困難になりつつある中、それらの維持促進機構のメカニズムを根源から理解し、食糧政策と保全活動に発展させる必然性が高まっている。中でも、「植物-昆虫間相互作用の分子メカニズム」に関する基盤研究は、農薬に依存しない有機農法の開発および耕地生態系の保全活動の構築につながることを期待される。

これまでの先行研究により、害虫の食害によって植物はカルシウムイオン（初期シグナル伝達物質）を細胞質内に流入させ、防御応答に関わるシグナル伝達系を活性化することが示唆されてきたが、これらのカルシウムシグナルのダイナミクスが防御応答の下流に作用する分子機構について全く不明であった。

2. 研究の目的

「植物-昆虫間相互作用の分子メカニズム」を解明することで、これまでの農薬に依存した農業から脱却し、安全・安心な循環型の生産システムの構築につながることを期待される。本研究ではそれらのシステムの構築を目指した基盤研究を実施して、植物の被食防衛と環境適応の役割を担うカルシウム依存型のシグナル伝達機構の解明を試みた。本研究では特に、カルシウムにより活性化されるタンパク質リン酸化酵素（CPK）とそれらの基質タンパク質に着目することで、食害ストレスもしくは高温ストレスに曝されたシロイヌナズナのCPKリン酸化カスケードを介した防御遺伝子の転写制御機構の解明を試みた。これらの分子基盤に関する研究は、循環型の生産システムを構築するためのシーズとしての重要な役割を担う。

3. 研究の方法

シロイヌナズナの被食防御に関わるCPK遺伝子のT-DNA挿入変異体（SALK系統）をArabidopsis Stock Centersより取得した。本研究では、これらの変異体植物のストレス応答に関する分子解析実験とマクロ解析（インキュベーター内での操作実験）を段階的に実施した。分子解析実験として、リアルタイムPCR法によるCPK変異体の防御遺伝子（*PDF1.2*等）の発現解析を行い、ヨトウガ幼虫（*Spodoptera littoralis*）の食害応答の役割を担うCPKの同定を試みた。さらに、無細胞タンパク質合成系により作成されたシロイヌナズナ・タンパク質ライブラリーを利用し、CPKと相互作用する熱ショックタンパク質の転写制御因子（HSF）やATL2（E3 ubiquitin ligase）を含めた100種の基質タンパク質のスクリーニングを行った。また、CPKと基質タンパク質を一過的にタバコ葉に共発現するシステム（アグロインフィルトレーション法）を用いることで、CPKと基質タンパク質の共作用による*PDF1.2*プロモーターの転写制御について解析した。

マクロ解析として、シロイヌナズナ変異体植物上でのヨトウガ幼虫の成長率および高温処理したシロイヌナズナ変異体の耐熱性について調査した。

無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質解析および共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内カルシウムの測定は、澤崎達也准教授（愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター）とMassimo Maffei教授（トリノ大学（イタリア））とそれぞれ共同で行った。アグロインフィルトレーションアッセイは吉岡博文准教授（名古屋大学生命農学研究科）と実施した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ CPK 遺伝子の T-DNA 挿入変異体を用いて、ヨトウガ幼虫 (*S. littoralis*) に被食された変異体における防御遺伝子 (*PDF1.2*) の発現誘導について解析した。19系統の CPK 変異体および野生株の食害後の *PDF1.2* の発現量を定量した結果、CPK3 と CPK13 変異体における遺伝子発現が著しく抑制されていた (図1)。興味深いことに、これらの CPK 依存型の防御応答は植物ホルモン (ジャスモン酸、エチレン、アブシジン酸) に依存したシグナル伝達系とは独立して防御遺伝子を活性化することがわかった。さらに、*cpk3* 変異体では、食害によって活性化されるカルシウムの細胞内流入が促進されたことから、CPK3 はカルシウムホメオスタシスの役割も担うことが示唆された。

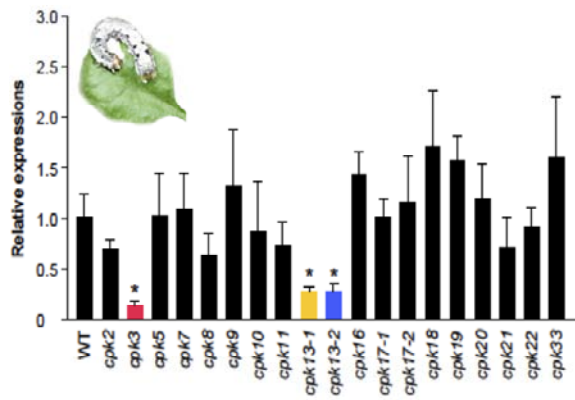


図1 食害応答が欠損したシロイヌナズナ CPK 変異体のスクリーニング

ヨトウガ幼虫に食害されたシロイヌナズナ野生株 (WT) および CPK 変異体の防御遺伝子 (*PDF1.2*) の発現解析を行った。

(2) 上記結果から CPK3 と CPK13 に着目し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作成された植物転写因子ライブラリーから防

御応答に関与する 100 種の転写因子を CPK の基質候補として選抜し、CPK によるリン酸化アッセイを実施した。その結果、CPK3/13 は HsfB2a などの 3 種の転写制御因子およびユビキチンリガーゼである ATL2 をリン酸化することが見出された (図2)。

(3) アグロインフィルトレーション法を用いて、タバコ葉に CPK3/13 と HsfB2a と一過的に共発現することで、CPK による HsfB2a のリン酸化は *PDF1.2* の転写制御に機能することが *in vivo* で示された。

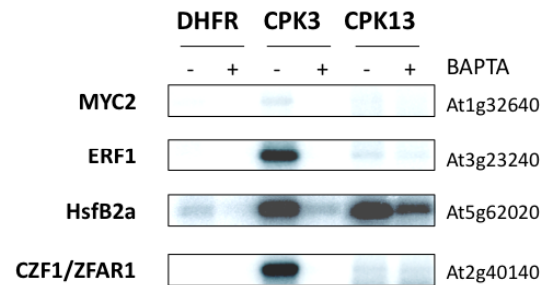


図2 無細胞タンパク質合成系を用いた CPK 基質タンパク質のスクリーニング
カルシウム拮抗剤 (BAPTA) を添加した場合 (+) と添加していない場合 (-) の CPK3/13 タンパク質による基質タンパク質のリン酸化アッセイを実施した。DHFR はコントロール。

(4) 高温ストレスに曝されたシロイヌナズナの熱ショックタンパク質 (HSP) 遺伝子の発現誘導および耐熱耐性においても CPK3/13 は重要な働きを担うことがわかった。これらの CPK はリン酸化する基質ターゲットを変化させ、様々な植物細胞応答に関わるシグナル伝達系に関与していることが考えられる。

今後は、防御遺伝子の転写制御機構に関わる制御モチーフの同定および CPK によるリン酸化と ATL によるユビキチン化制御機構の解明

を目指す。さらに、CPK と HSF と相互作用する新規因子を探索し、植物の防御応答の分子メカニズムの全貌の理解に努める意向である。

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 11 件)

- ① Nagamangala Kanchiswamy C., Muroi A., Maffei, M. E., Yoshioka T., Sawasaki T., Arimura G. (2010) Ca²⁺-dependent protein kinases and their substrate HsfB2a are differently involved in the heat response signaling pathway in Arabidopsis. Plant Biotechnology 27, 469-473、査読有
- ② Arimura G., Maffei M.E. (2010) Calcium and secondary CPK signaling in plants in response to herbivore attack. Biochemical and Biophysical Research Communications 400, 405-460、査読有
- ③ Arimura G., Sawasaki T. (2010) Arabidopsis CPK3 plays extensive roles in various biological and environmental responses. Plant Signaling & Behavior 5, 1263-1265、査読無
- ④ Arimura G., Shiojiri, K., Karban R. (2010) Acquired immunity to herbivory and allelopathy caused by airborne plant emissions. Phytochemistry 71, 1642-1649、査読有
- ⑤ Nagamangala Kanchiswamy C., 他 14 名、Arimura G. (2010) Regulation of Arabidopsis defense responses against *Spodoptera littoralis* by CPK mediated calcium signaling. BMC Plant Biology 10, 97、査読有
- ⑥ Arimura G., Matsui K., Takabayashi J. (2009) Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. Plant and Cell Physiology 50, 911-923、査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 発表者：有村源一郎
発表表題：無細胞タンパク質合成系を用いた植物のカルシウム依存リン酸化制御機構の解明
学会名：第 5 回無細胞生命科学研究会
年月日：2010 年 9 月 29 日～30 日

場所：岡山大学

- ② 発表者：Arimura G.
発表表題：Regulation of Arabidopsis defense responses against *Spodoptera littoralis* by CPK-mediated calcium signaling
学会名：Plant Biology 2010
年月日：2010 年 7 月 31 日～8 月 4 日
場所：モントリオール (カナダ)
- ③ 発表者：有村源一郎
発表表題：植物の環境適応・被害防衛に
応答するカルシウム依存リン酸化制御機
構
学会名：第 51 回日本植物生理学会年会
年月日：2010 年 3 月 18 日～21 日
場所：熊本大学

[図書] (計 1 件)

有村源一郎 (2010) 植物らのコミュニケーション 生き物たちのつづれ織り 第三巻、
京都大学グローバル COE プログラム 生物
の多様性と進化研究のための拠点形成 -
ゲノムから生態系まで一、発行、pp 127-131

[その他]

<http://www.ecology.kyoto-u.ac.jp/~garimura/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有村 源一郎 (ARIMURA GENICHIRO)
京都大学大学院理学研究科・グローバル
COE 准教授
研究者番号：60505329

(2) 連携研究者

澤崎 達也 (SAWASAKI TATSUYA)
愛媛大学無細胞生命科学工学研究
センター・准教授
研究者番号：50314969