

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19112

研究課題名（和文）生物発光リアルタイム測定技術に基づく植物免疫研究の未踏領域への挑戦

研究課題名（英文）Challenge to the unexplored area of plant immunity research by using real-time bioluminescence monitoring technology

研究代表者

高野 義孝（Takano, Yoshitaka）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：80293918

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：PAMPsによって誘導される植物の免疫反応は共通性が高いと捉えられてきたが、近年の研究により、そこには明確な多様性があることが見出されている。本研究では、この謎に迫るため、nlp24によって活性化されるPAMP誘導免疫反応に欠損をしめすシロイヌナズナ変異体を生物発光リアルタイム測定法を用いてスクリーニングし、多数の変異体の単離に成功するとともに、一変異体についてはその原因遺伝子を同定した。また、BAK1に変異をもつ変異体にPAMPを処理し活性化する免疫応答を同測定法を用いて調査した結果、PAMP誘導免疫の間で違いが生じる分子メカニズムの一因に共受容体が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の研究により、PAMPsによって誘導される植物免疫反応には多様性があることが見出されていたが、その分子的背景はほとんど不明であった。この謎に迫ることを目的とする本研究の大きな特徴は、生物発光リアルタイム測定法を駆使する点である。まず、同法を用いる高効率スクリーニングにより、PAMP誘導免疫に関する多数のシロイヌナズナ変異体の単離に成功した点は、PAMP誘導免疫の多様性の分子基盤解明に向けて大きな前進である。また、本研究はPAMP誘導免疫間で違いが生じる分子機構の一因に共受容体BAK1が関与していることを示唆したが、この知見はBAK1の機能とPAMP誘導免疫の多様性を繋げる重要な発見である。

研究成果の概要（英文）：Via recognition of PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), higher plants activate PAMP-triggered immunity called PTI. The signaling pathways and subsequent immune responses in the PTI system was believed to be common, however, the recent studies suggested that there is a clear diversity in each PTI signaling and response. In this study, we screened Arabidopsis mutants defective in PTI triggered by a PAMP nlp24 by using real-time bioluminescence monitoring system. The screening successfully identified many Arabidopsis mutants and further studies identified a gene responsible for the phenotype of one mutant. We also compared the nlp24-triggered immune responses with immune responses triggered by a bacterial PAMP flg22 in the presence of a mutation for BAK1 encoding a coreceptor for PAMP receptors. The obtained results suggested a molecular link of BAK1 with a diversity in the PTI signaling and responses.

研究分野：植物病理学

キーワード：PAMP誘導免疫 生物発光リアルタイム測定技術 ルシフェラーゼ シロイヌナズナ MutMap

1. 研究開始当初の背景

高等植物は、病原菌特有の分子のパターン(pathogen-associated molecular patterns: PAMPs)を認識することにより、病原菌の存在を感知し、抵抗反応を活性化する。このPAMP誘導型の植物抵抗性(以下、PAMP誘導免疫)は、植物免疫システムの根幹を支える仕組みである。植物はまず(i)細胞膜に存在するパターン認識受容体と総称される受容体によって、各PAMPを認識し、それにより(ii)活性酸素の生成、MAPキナーゼカスケードと呼ばれるシグナル伝達経路の活性化などが起き、(iii)最終的には抗菌物質の生成を中心とした抗菌反応・抵抗反応が起こる。PAMP誘導免疫の研究は、シロイヌナズナを中心に進められ、特に細菌鞭毛の構成タンパク質であるフラジェリン内の22アミノ酸からなるPAMPであるflg22とその認識受容体FLS2の組み合わせによって活性化するPAMP誘導免疫の研究が先端を走っている。これまで、「PAMP誘導免疫においては、それぞれのPAMPの受容体こそ異なるが、受容体以降の下流の経路は非常に類似している」と考えられてきていた。しかし、研究代表者のグループは、異なる2種のPAMPであるflg22ペプチド(植物病原細菌由来)とnlp24ペプチド(植物病原糸状菌由来)に対するシロイヌナズナの反応を調査した結果、「PAMPによって活性化する抵抗反応は、認識されるPAMPによって大きく異なる」ことを発見した。糸状菌や卵菌が共通して有する分泌タンパク質NLP内の24アミノ酸(nlp24と命名)が、シロイヌナズナにおいてPAMPとして認識され、さらにnlp24の処理によってエチレン合成が急激に誘導されることが近年になり報告された。このエチレン合成はflg22ではほとんど誘導されない。さらに、研究代表者のグループはnlp24が誘導する活性酸素生成はflg22と比較して顕著に低いことを見出していた。このことは、これまでの考えとは異なり、同じシロイヌナズナの中でさえ、PAMP誘導免疫のメカニズムには明確な多様性があることを強く示している。しかし、このPAMP誘導免疫の多様性の背景はほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、発見したPAMP誘導免疫の多様性の背景にある分子機構を解明し、PAMP誘導免疫の多様性を分子レベルで実証することである。そして、この問題に取り組むために、本研究では「生物発光リアルタイム測定法」を駆使する。生物発光リアルタイム測定法は、遺伝子発現を生物発光として生きたままの細胞で連続的に自動測定することを可能にする技術である。本技術は、極めて高い感度・精度・時間分解能で遺伝子発現リアルタイム解析を実現できる強力な生命科学の研究手法である。この生物発光リアルタイム測定法を駆使し、PAMP誘導免疫の多様性を分子レベルで実証するための新しいタイプのシロイヌナズナ変異体(従来の方法では同定することが難しい)を同定・解析し、この変異体について、変異体原因遺伝子の迅速な同定を可能にする「MutMap法」(Abe et al. Nature Biotechnol, 2012)を適用する。さらに、上記のような順遺伝学的アプローチに加えて、nlp24受容体とflg22受容体のキメラ受容体を発現するシロイヌナズナなどを作成し、PAMP誘導免疫の多様性の分子的背景を解剖する。PAMP誘導免疫時のマーカー遺伝子発現については、生物発光リアルタイム測定法を用いた高解像度解析を実施する。

3. 研究の方法

(1) 生物発光リアルタイム測定法に基づくスクリーニングによる変異体の同定と解析
PAMP誘導免疫反応のマーカー遺伝子であるWRKY33遺伝子およびERF1遺伝子のプロモーターにルシフェラーゼ(LUC)遺伝子を連結したレポーター遺伝子(WRKY33pro:LUCレポーター、ERF1pro:LUCレポーター)を導入したシロイヌナズナを作成し、nlp24処理時の発光パターンに変化を示す変異体を自動化装置を用いたハイスループット型スクリーニングを実施して選抜した。次に選抜に成功した変異体と親株であるレポーターラインとの交配をおこなった。続いてF2集団の変異体表現型の分離比より単一遺伝子座の変異が原因であることが判明した場合、MutMap法により原因遺伝子の同定に着手した。

(2) nlp24受容体とflg22受容体のキメラ受容体を発現するシロイヌナズナの作出と解析
PAMPsの受容体が免疫応答の多様性にどのように影響を与えているのかを明らかにするため、nlp24の受容体RLP23とflg22の受容体FLS2について、そのキメラ受容体を有する形質転換植物の作出をおこなった。作成したキメラ受容体を発現する形質転換シロイヌナズナに対して性状解析を実施した。

(3) 生物発光リアルタイム測定法を用いた共受容体BAK1の解析
キメラ受容体の結果を受けて、RLP23およびFLS2と協働する共受容体BAK1に着目した。具体的には、WRKY33pro:LUCレポーター遺伝子を導入したシロイヌナズナにBAK1、BKK1遺伝子の変異を導入した変異株を作成し、生物発光リアルタイム測定法を用いた性状解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 生物発光リアルタイム測定法に基づくスクリーニングによるシロイヌナズナ変異体の同定と解析

ERF1pro:LUC レポーターラインに EMS 処理をおこない、nlp24 処理時の発光パターンに特異的に変化を示す変異体をスクリーニングし、32,256 個体のスクリーニングの結果、nlp24 処理時のパターンに特異的な変化を示す 16 変異体の同定に成功した。また、WRKY33pro:LUC レポーターラインに対しても EMS 処理をおこない、nlp24 処理時の発光パターンに変化を示す変異体をスクリーニングし、13,824 個体のスクリーニングの結果、nlp24 処理時のパターンに特異的な変化を示す 12 変異体の同定に成功した。得られた nlp24 処理時の免疫応答が低下する変異体シリーズについて、植物病原糸状菌の接種試験を実施した結果、そのうちのいくつかの変異体は植物病原糸状菌に対する罹病性が顕著に増大することを明らかにした。本結果は、LUC レポーター遺伝子を発現する植物に対する生物発光リアルタイム測定法を用いた高効率スクリーニングは、病害抵抗性変異体のスクリーニング法として有効であることを示唆した。さらに、一つの変異体については、MutMAP 法を用いてその原因遺伝子の確定を完了した。また、研究過程においてウリ類炭疽病菌の孢子懸濁液から調製した上清液が WRKY33pro:LUC レポーター遺伝子を活性化することを見出した。さらに上清液の処理により、シロイヌナズナが活性酸素を生成し、かつ、MAP キナーゼが活性化することを見出した。これらの結果より、本菌の上清液には PAMP が含まれていることが強く示唆された。*cerk1* 変異体を用いた解析より、上清液の主要 PAMP はキチンではなく、新規の因子であること強く示唆された。そこで、WRKY33pro:LUC レポーターラインで作出された EMS 変異集団を対して、上清液処理時の発光パターンに変化を示す変異体をスクリーニングし、13,068 個体のスクリーニングの結果、上清液処理時のパターンに変化を示す 16 変異体の同定に成功している。得られた変異体のうち、野生型生物発光レポーターラインよりも高い生物発光値を示す、すなわち、より高い防御応答を示す変異体に焦点を当て、その原因遺伝子の特定に成功した(図1)。また、非常に興味深いことに、本変異体は生育等に関しては野生型植物と同等である一方、植物病原糸状菌に対して抵抗性の増大を示した。これらの成果は植物の病害抵抗性研究における生物発光リアルタイム測定法の高い有効性を示すものである。

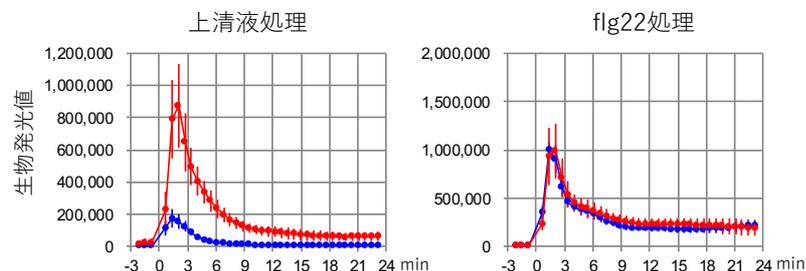


図1. 生物発光リアルタイム測定法を用いた孢子懸濁液の上清液への免疫応答が特異的に増強されるシロイヌナズナ変異体の単離。
青線はWRKY33pro:LUCレポーターライン野生型の発光値を示しており、赤線は上清液への免疫応答が増強される変異体の発光値を示す。

(2) nlp24 受容体と flg22 受容体のキメラ受容体を発現するシロイヌナズナの作出と解析

PAMP 受容体が PAMP 誘導免疫応答の多様性にどのように関与しているのかを明らかにするため、PAMP 受容体を構成する各ドメインを異なる PAMP 受容体のドメインと入れ替えたキメラ受容体を発現する形質転換シロイヌナズナを作出し、その性状解析を実施した。その結果、nlp24 受容体 RLP23 の細胞外ドメインに flg22 受容体 FLS2 のキナーゼドメインを結合したキメラ受容体タンパク質を発現するシロイヌナズナにおいて、nlp24 処理に対して活性酸素生成は検出されたが、その生成量は flg22 処理時と比較して減少した。本結果は、キメラ受容体は nlp24 を受容し、下流にシグナルを伝達することが可能であることを示した。しかしながら、本結果は、同時に受容体の構造の違いだけでは当該免疫応答に違いが生じるメカニズムを説明できないことを示唆した。

(3) 生物発光リアルタイム測定法を用いた共受容体 BAK1 の解析

キメラ受容体の結果に基づき、次に PAMP 認識時に RLP23 と FLS2 どちらも複合体を形成することが知られている共受容体 BAK1 および BKK1 に着目し、生物発光リアルタイム測定技術を駆使し、その詳細な解析を実施した。WRKY33pro:LUC レポーター遺伝子を有する野生型植物を背景に、*bak1* 変異体及び *bak1-5 bkk1* 変異体を作成した。その結果、flg22 が誘導する当該 LUC レポーターによる発光は *bak1-5* 変異及び *bak1-5 bkk1* 変異によって大幅に低下したのに対して、nlp24 が誘導する発光は、*bak1-5* 変異でわずかな低下しか見られなかった。興味深いことに、活性酸素生成に関しては flg22、nlp24 どちらの処理においても *bak1-5* 変異によってその生成は大幅にキャンセルされた。これらの結果は、FLS2 依存的な免疫応答には BAK1 が必須である一方、RLP23 依存的な免疫応答においては、BAK1 依存的な経路と BAK1 に非依存的な経路の二種類が存在することを強く示唆した。本結果より、nlp24 誘導免疫と flg22 誘導免疫の間で違いが生じる分子メカニズムの一因に共受容体 BAK1 が関与していると推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Singkaravanit Ogawa Suthitar, Kosaka Ayumi, Kitakura Saeko, Uchida Kotaro, Nishiuchi Takumi, Ono Erika, Fukunaga Satoshi, Takano Yoshitaka	4. 巻 108
2. 論文標題 Arabidopsis CURLY LEAF functions in leaf immunity against fungal pathogens by concomitantly repressing SEPALLATA3 and activating ORA59	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1005 ~ 1019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15488	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 Takano Yoshitaka, Inoue Yoshihiro, Zhang Ru, Singkaravanit-Ogawa Suthitar, Matsuo Hiroki, Ogawa Taiki, Jin Chujia	4. 巻 125
2. 論文標題 Nonhost resistance and effectors in interactions between Colletotrichum species and plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological and Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 101982 ~ 101982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pmpp.2023.101982	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田慶明・Singkaravanit-Ogawa Suthitar・峯彰・三瀬和之・高野義孝
2. 発表標題 異なる不適応型炭疽病菌を用いたシロイヌナズナの非宿主抵抗性の研究
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会関西部会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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