

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23770050

研究課題名(和文) ERボディを利用した植物の耐病性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of Plant Pathogen Resistance Supported by the ER Body

研究代表者

山田 健志(YAMADA KENJI)

基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・助教

研究者番号：00360339

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナには、ER ボディと名付けた小胞体由来の構造物が出る。傷害により ER ボディが誘導されることから、ER ボディは虫害や病害に対する防御のための構造物であると考えられた。ER ボディ内には、新規タンパク質である NAI2 と β グルコシダーゼである PYK10 が蓄積し、ER ボディ膜には膜貫通タンパク質である MEB1、MEB2 が蓄積する。そこで、本研究ではこれらのタンパク質の役割を調べた。その結果、NAI2 と PYK10 は ER ボディ形成に働くこと、MEB1、MEB2 は鉄・マンガンを送ることが明らかとなった。植物の耐病性獲得に関わる ER ボディ形成の仕組みが明らかになるとともに、ER ボディが金属イオンストレスに対する抵抗性に関わる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) body is an ER derived structure that is accumulated in *Arabidopsis thaliana*. ER body is involved in plant defense system against insect and pathogen attack, since wound treatment induced ER bodies. Two soluble proteins NAI2 and PYK10, and two integral membrane proteins MEB1 and MEB2 are accumulated specifically in ER bodies, but their functions were obscure. I found that NAI2 and PYK10 are responsible for the ER body formation. MEB1 and MEB2 have iron/manganese transport activity, suggesting that ER body is involved in the metal stress resistance. These findings unveiled unique mechanisms for ER body formation and function in plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：小胞体、ERボディ、シロイヌナズナ、 β グルコシダーゼ、金属イオン輸送体、病原菌、オルガネラ、膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナ実生の表皮細胞に小胞体由来の細長いオルガネラが形成されることを発見し、ER ボディと名付けた。ER ボディには β グルコシダーゼ、PYK10 が大量に蓄積すること、ER ボディの成分、NAI2 が ER ボディ形成と PYK10 の大量蓄積に必須であること、bHLH 型転写制御因子、NAI1 が PYK10 遺伝子と NAI2

遺伝子の発現に必要であることを明らかにしてきた。さらに、ER ボディの形成には NAI2 の発現で十分である。これらの研究から、植物は分泌タンパク質の合成の場としてとらえられてきた小胞体から、全く新しい機能、すなわち生体防御としてのタンパク質の大量蓄積機構を誘導するという驚くべき能力をもつことがわかり、研究代表者の研究グループが世

界に先んじて報告した。一方、近年になり、オルガネラの動態と防御応答の関連が注目されつつある。研究代表者は、ER ボディが病原菌の感染とともに消費され、数が減少するという現象を見いだしている。PYK10 は酸性で活性化するという予備的な実験結果も得ており、PYK10 が酸性オルガネラである液胞へ選択的に輸送されたために、ER ボディが消失したと考えられた。このことは、固定化されていると思われていた植物の小胞輸送系が環境に応じてダイナミックに変動しうることを示していた。ER ボディ形成と消失に関わる因子の詳細な分子機構の解明が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ER ボディ形成や機能の鍵となる ER ボディ内腔タンパク質や ER ボディ膜タンパク質の働きを明らかにし、さらに PYK10 の再輸送に伴うと考えられる ER ボディの消失機構を明らかにすることで、ER ボディを利用した病虫害抵抗性の発達過程を調べることである。一般に、小胞体で凝集したタンパク質は小胞体ストレス応答を誘導し、さらに小胞体特異的なタンパク質分解機構により分解される。ところが、ER ボディは PYK10 を凝集し大量蓄積するために発達した。そこで、ER ボディ形成因子である NAI2 が小胞体ストレス応答を抑え、PYK10 の蓄積を実現している可能性を調べるとともに、NAI2 と ER ボディ成分や小胞体ストレス応答因子との相互作用を調べ、ER ボディ形成に関わる巧妙な仕組みを明らかにする。さらに、PYK10 の局在の変化や ER ボディの消失を促す因子を同定することにより、植物がもつ防御応答による物質輸送系のダイナミックな変動を理解する。ER ボディ欠損変異体の病虫害に対する抵抗性を調べることで ER ボディが病虫害に関与することを直接示すと同時に、ER ボディをもたない植物に ER ボディ合成に関わる遺伝子を導入し、ER ボディが実際に耐病性獲得機構として有効であることを示す。

3. 研究の方法

(1)ER ボディの新規膜タンパク質、MEB1、MEB2 の機能解析

データベースの解析より、MEMBRANE OF ER BODY 1 (MEB1)、MEB2 が、ER ボディの膜タンパク質である可能性が考えられた。さらに MEB1、MEB2 のホモログとして AT4G27870 が見つかった。MEB1、MEB2、AT4G27870 タンパク質の機能を調べるため、これらの遺伝子の単独及び、二重、三重ノックアウト株を作成し、

ER ボディの形態変化を観察する。MEB1 と AT4G27870 は隣同士の遺伝子であるために、遺伝子特異的な artificial micro RNA (amiRNA)を用いたノックダウン株の作成を行う。MEB1、MEB2 と NAI2 との結合を免疫沈降などの方法により調べ ER ボディ膜形成の仕組みを明らかにする。

(2)ER ボディ形成における NAI2 タンパク質の機能解析

パーティクルガンを用いた遺伝子導入法により、ER ボディを持たないタバコ (*Nicotiana tabacum*) 培養細胞に NAI2 遺伝子を PYK10 遺伝子とともに導入し、ER ボディが形成されるかどうかを調べる。PYK10 以外にも、小胞体でアグリゲートを形成するプロテアーゼ (SH-EP)や貯蔵タンパク質 (12S グロブリン) と NAI2 を過剰発現し、ER ボディ形成能を調べる。NAI2 と PYK10 の部分領域を発現させ、ER ボディ形成に必要な領域を同定する。

(3)ER ボディ消失に関わる因子の単離

ER ボディは菌の接種とともに速やかに消失するが、植物が菌体に触れる前に ER ボディが消失する。このことから、植物は菌が放出する物質を認識して PYK10 の輸送を変化させていると考えられた。この機構に迫るため、菌側の因子をクロマトグラフィーを用いて分離、同定する。

(4)ER ボディ欠損変異体の病虫害抵抗性の解析

ER ボディの機能を調べるために、ER ボディを形成しない *nai1*、*nai2* 変異体や ER ボディに局在する β グルコシダーゼの欠損株である *pyk10* 変異体、ER ボディ膜タンパク質の欠損株である *meb1* *meb2* 二重変異体を用いて、病原菌や虫害に対する ER ボディ欠損変異体の応答を調べる。

4. 研究成果

(1)ER ボディの新規膜タンパク質、MEB1、MEB2 の機能解析

データベースを用いた ER ボディ関連遺伝子の共発現解析より、*MEB1*、*MEB2* 遺伝子がシロイヌナズナにおける新しい ER ボディの膜タンパク質をコードする遺伝子の候補として見つかった。*MEB1*、*MEB2* 遺伝子のホモログとして、*AT4G27870* 遺伝子を見つけた。*MEB1*、*MEB2* 遺伝子の発現は ER ボディが形成されない *nai1* 変異体では野生株と比較して減少していることが明らかとなった。このことから、*MEB1*、*MEB2* は ER ボディの機能に関わ

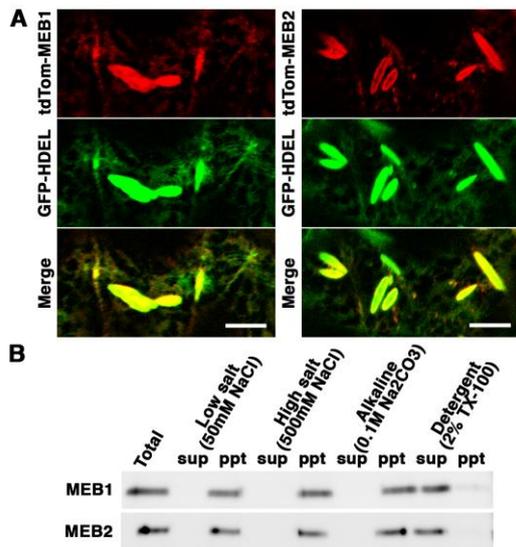


図 1. MEB1, MEB2 は ER ボディの膜貫通型タンパク質である。
 A. tdTom-MEB1, tdTom-MEB2 の共焦点蛍光顕微鏡像. ER ボディを GFP で可視化した植物に tdTom-MEB1 または tdTom-MEB2 を一過的に発現させた. スケールバーは 10 μ m.
 B. ER ボディを含む抽出液を低塩濃度, 高塩濃度, アルカリ性または界面活性剤入り緩衝液で処理し, 可溶性画分 (sup) と膜画分 (ppt) に分け, 抗 MEB1 または抗 MEB2 抗体でイムノブロットを行った.

る遺伝子であることが示唆された。
 MEB1, MEB2 タンパク質の局在を調べるために, 蛍光タンパク質, tdTOM との融合タンパク質, tdTOM-MEB1, tdTOM-MEB2 の局在を調べたところ, これらのタンパク質は ER ボディの膜に局在した(図 1 A). MEB1, MEB2 特異的な抗体を作成し, ER ボディ画分を用いて MEB1, MEB2 の可溶化を調べたところ, これらのタンパク質は, 界面活性剤処理でのみ可溶化され, 膜貫通型タンパク質であることが明らかとなった(図 1 B). これらの結果から, MEB1, MEB2 は ER ボディの膜貫通型タンパク質であることがわかった.

MEB1, MEB2 は酵母の鉄・マンガン輸送体である CCC1 と弱い相同性がある. そこで, 酵母の *ccc1* 変異体を用い, MEB1, MEB2 に鉄・マンガン輸送能があるかを調べた. *ccc1* 変異体は硫酸鉄を含む培地では生育できない. しかし, MEB1 または MEB2 を発現させることで, *ccc1* 変異体は硫酸鉄を含む培地で生育できるようになった(図 2 A). 一方, *ccc1* 変異体は塩化マンガンを含む培地では増殖が悪いが, MEB1 または MEB2 を発現させることで増殖が向上した.(図 2 B). このことから, MEB1, MEB2 は酵母の *ccc1* 変異を相補することが明らかとなり, MEB1, MEB2 は鉄・マンガン輸送能をもつことが示唆された.

MEB1, MEB2 の植物での機能を調べるために, それぞれの遺伝子に T-DNA が挿入された

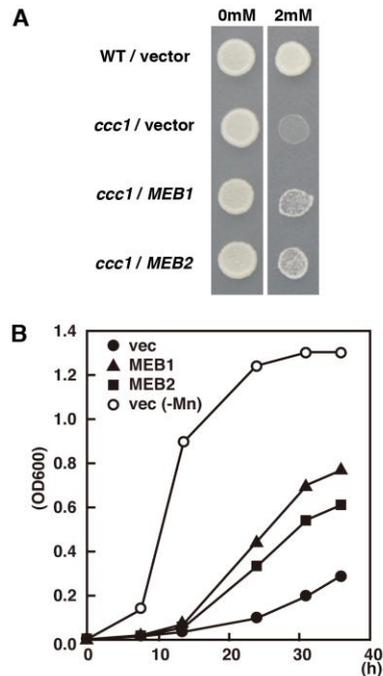


図 2. 酵母を用いた MEB1, MEB2 タンパク質の機能解析。
 A. MEB1, MEB2 は酵母 *ccc1* 変異体の鉄感受性を抑える. 上から野生株, *ccc1* 変異体, MEB1 を発現させた *ccc1* 変異体, MEB2 を発現させた *ccc1* 変異体を 0mM あるいは 2mM の硫酸第一鉄を含む SD 固形培地で生育させた.
 B. MEB1, MEB2 は酵母 *ccc1* 変異体のマンガン感受性を抑える. *ccc1* 変異体 (●), MEB1 を発現させた *ccc1* 変異体 (▲), MEB2 を発現させた *ccc1* 変異体 (■) を 15mM の塩化マンガンを含む SD 液体培地で生育させ, 細胞増殖を 600nm の吸光度で測定した. ○は塩化マンガンを含まない液体培地で生育させた *ccc1* 変異体の細胞増殖を示す.

meb1, meb2 変異体を単離し, 二重変異体株, *meb1 meb2* を作成した. さらに, *AT4G27870* 遺伝子の発現を抑える *amiR* を *meb1 meb2* 二重変異体に導入し, *meb1 meb2 at4g27870* 三重変異体を作成した. これらの変異体の ER ボディ形成と PYK10 の蓄積を調べたところ, 変異体と野生株ではほとんど差が見られなかった. これらのことから, MEB1, MEB2 の欠損による ER ボディ膜の成分変化は ER ボディの形態にはほとんど影響しないことが明らかとなった.

(2) ER ボディ形成における NAI2 タンパク質の機能

ER ボディの成分である NAI2 や PYK10 の変異により ER ボディの形成に異常がおきることから, NAI2 と PYK10 が ER ボディ形成の実行因子として働くことが示唆された. そこで, *NAI2, PYK10* 遺伝子を, ER ボディが形成されないタバコ培養細胞に導入したところ, ER ボディが形成された. このことから, NAI2 と PYK10 は ER ボディの形成に十分である因子で

あることがわかった。

(3) ER ボディ消失に関わる因子の単離

GFPでERボディを可視化した植物に病原菌である *Fusarium oxysporum* の抽出液を処理したところ、ER ボディが消失した。細胞が死んで ER ボディの蛍光が消失することが考えられたため、ヨウ化プロビジウム染色によって、細胞の生死を判定したところ、ER ボディが消失している細胞は生きていることがわかった。このことから、細胞が死ぬことによって受動的に ER ボディが消失するのではなく、生きている細胞で積極的に ER ボディが消失していることが明らかとなった。

(4) ER ボディ欠損変異体の病虫害抵抗性の解析

ER ボディの機能を調べるために、*nai1*, *nai2*, *pyk10*, *meb1* *meb2* 変異体における病原菌の感染効率を調べた。*Alternaria brassicicola*, *Fusarium oxysporum*, *Phythium sylvaticum*, *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* の感染効率を調べたが、野生株と変異体において大きな差は見られず、これらの病原菌に対する抵抗性には ER ボディが関わらないと思われた。

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4件)

① S. Cui, Y. Fukao, S. Mano, K. Yamada, M. Hayashi, M. Nishimura
Proteomic analysis reveals that the Rab GTPase RabE1c is involved in the degradation of the peroxisomal protein receptor PEX7 (Peroxin7).

J. Biol. Chem. (2013) 288(8): 6014-6023.
(査読有)

② K. Yamada, A. J. Nagano, M. Nishina, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura
Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins.

Plant Physiol. (2013) 161(1): 108-120.
(査読有)

③ M. Nakayama, Y. Kaneko, Y. Miyazawa, N. Fujii, N. Higashitani, S. Wada, H. Ishida, K. Yoshimoto, K. Shirasu, K. Yamada, M. Nishimura, H. Takahashi
A possible involvement of autophagy in amyloplast degradation in columella cells during hydrotropic response of *Arabidopsis* roots.

Planta (2012) 236(4): 999-1012. (査読有)

④ K. Yamada, I. Hara-Nishimura, M.

Nishimura

Unique defense strategy by the endoplasmic reticulum body in plants.

Plant Cell Physiol. (2011) 52(12): 2039-2049. (査読有)

[学会発表] (計3件)

① 山田健志, 永野惇, 仁科桃子, 西村いくこ, 西村幹夫

ER ボディ特異的な二つの膜タンパク質 (MEB1, MEB2) の解析

第53回日本植物生理学会年会, 京都産業大学, 京都, 2012年3月16-18日

② 山田健志, 永野惇, 仁科桃子, 西村いくこ, 西村幹夫

ER ボディ成分による小胞体ドメインの分化が ER ボディ形成を誘導する

第84回日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 京都, 2011年9月21-24日

③ K. Yamada, A. J. Nagano, M. Nishina, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura

Differentiation of endoplasmic reticulum by ER-body luminal and membrane proteins on ER body formation

Plant Biology 2011 (ASPP 2011 Annual Meeting), Minneapolis Convention Center, Minneapolis, USA, August 6-10, 2011

[その他]

ホームページ等

「シロイヌナズナのERボディに特異的な膜タンパク質を同定」

<http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2012/12/13.html>

「小胞体のダイナミズムの解析」

<http://www.nibb.ac.jp/celmech/jp/Words/ERbody.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健志 (YAMADA KENJI)

基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・助教

研究者番号: 00360339

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: