

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：33702

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870423

研究課題名(和文)テトラピロール中間体による植物免疫制御機構の解明

研究課題名(英文)Role of tetrapyrrole intermediates in plant immunity.

## 研究代表者

野村 裕也(Nomura, Hironari)

岐阜女子大学・家政学部・助教

研究者番号：00547028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：5-アミノレブリン酸(ALA)はテトラピロール代謝経路の前駆体で、ALAを植物に投与するとテトラピロール代謝経路を昂進させる働きを持つ。さらに、ALAは、植物のバイオマス向上や光合成能力の向上をもたらす、低温・塩といった環境ストレスへの耐性を強化する効果を持つ。本研究では、ALAが植物の免疫応答の強化にも効果を持つかどうかを検討した。免疫応答の過程で生じるカロースやグルコシノレート類代謝物の蓄積については明確な効果を確認することができなかったが、それに関わる種々の遺伝子発現調節には効果を持つことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：5-aminolevulinic acid (ALA) is a key precursor in the biosynthesis of tetrapyrroles in plants. Feeding ALA to plants can induce an excess accumulation of some porphyrins. In addition, ALA has some effects on increasing biomass and photosynthetic activity, and enhancing stress tolerance such as cold and salt in agriculture. I attempted whether ALA has the effect on enhancing plant immune response in *Arabidopsis thaliana* as a model. As a result, I found that several genes involved in immune response were induced in the presence of ALA, and different gene expression patterns were observed.

研究分野：植物生理学

キーワード：プラントアクチベーター 植物免疫

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 葉緑体は、外界の環境変化を敏感に察知して適切な機能や構造へと変化させる。このような劇的な変化には、核ゲノムにコードされた葉緑体遺伝子群を調節しなければならない。その役目を葉緑体由来のシグナル(プラスチドシグナル)が担っている。プラスチドシグナルは、葉緑体自身の機能制御だけに留まらず、植物細胞のストレス応答にも重要な役割を果たす。

(2) プラスチドシグナルは、葉緑体内の代謝変動によって生じる。プラスチドシグナルの生成部位の1つとして知られるテトラピロール代謝経路は、その代謝物の変動によって多種多様なプラスチドシグナルを生成する。*flu* 変異体は、テトラピロール代謝経路の中間体である protochlorophyllide を大量に蓄積する変異体である。この植物体に強光を照射すると活性酸素種の1つである $^1O_2$ を生成し、それがプラスチドシグナルとなって核の遺伝子発現を制御する。

また、*gun (genome uncoupled)5* 変異体は、本経路の触媒酵素の1つである Mg-chelatase の活性を失った変異体である。この植物体は、Mg-chelatase の代謝物である Mg-ProtoIX が減少する。その結果、プラスチドシグナルを欠失し、核の遺伝子発現を適切に制御できなくなる。

(3) 5-アミノレブリン酸 (ALA) は、テトラピロール代謝経路の前駆体の1つで、ALA を植物に投与するとテトラピロール代謝経路を昂進させる効果を持つと言われている。

(4) ALA 投与の植物への効果は、農業作物においてよく調べられている。ALA を植物に投与するとバイオマスの向上や光合成能力の向上をもたらす。また、ALA をあらかじめ投与しておくことで、低温・塩といった環境ストレスへの耐性を強化する効果を持つ。しかしながら、植物の免疫応答に対する効果はほとんど調べられていない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、植物への ALA 投与によって、植物の免疫応答の“強化”および“補完”することができるかどうかを評価することである。そのため、以下の(2)~(4)の項目の研究をおこなう。

(2) 本研究では、遺伝情報が豊富な実験植物であるシロイヌナズナを使用する。しかしながら、これまでの研究において、シロイヌナズナにおける ALA の効果を評価した例はほとんどない。そこで、シロイヌナズナの生体

重量への効果を指標として、ALA の植物への投与方法を検討する。

(3) シロイヌナズナに対して ALA による免疫応答の強化に効果があるかどうかを検討する。バクテリア鞭毛由来のペプチド(*flg22*)を使用し、植物の免疫応答を誘起する。実験区として、未処理区、ALA 投与区、*flg22* 投与区、ALA + *flg22* 投与区を設定し、実験をおこなう。ALA は、*flg22* 投与の1日前に投与しておき、テトラピロール代謝経路を昂進させる。

免疫応答の強化の指標として、免疫応答のマーカー遺伝子である *Pathogenesis-related PR1* および *5* の遺伝子に着目する。また、免疫応答の生理的指標として、カロース量およびグルコシノレート量の変化を測定する。

(4) シロイヌナズナに対して ALA による免疫応答の補完に効果があるかどうかを検討する。この補完効果を検討するにあたり、葉緑体局在タンパク質である CAS の欠損変異体 (*cas* 変異体)を使用する。*cas* 変異体は、*flg22* によって誘起される *PR1* 遺伝子発現上昇やカロース蓄積量といった免疫応答が不全となる変異体である。CAS は葉緑体チラコイド膜に局在する  $Ca^{2+}$  センサータンパク質で、光化学系電子伝達の制御に関わるタンパク質と言われている。そのため、テトラピロール代謝経路の制御には、直接的には関連はないものと考えられる。ALA を投与することで、*cas* 変異体の免疫応答不全を補完することができるかどうかを検討する。この補完効果の検討についての実験区および実験内容は、研究の目的(3)と同様におこなう。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物の育成

1/2 MS + 10mM MES (pH6.0) 寒天培地に、滅菌したシロイヌナズナの種子を播種し、温度 22℃、光周期 16 時間明期 / 8 時間暗期、光強度 100~110  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 、湿度 45~55%で生育した。

### (2) 植物体への ALA 投与方法の検討

寒天培地中への ALA 投与  
1/2 MS + 10mM MES (pH6.0) 寒天培地上でシロイヌナズナを 1 週間生育したのち、100  $\mu\text{M}$  ALA を含む 1/2 MS + 10mM MES (pH6.0) 寒天培地に移植した。

### 緩衝液中での ALA 浸潤法

1/2 MS + 10mM MES (pH6.0) 寒天培地上でシロイヌナズナを 1 週間生育したのち、その幼苗を 100  $\mu\text{M}$  ALA を含む 10mM MES (pH6.0) 緩衝液中に 1 日間、浸潤させた。

生体重量の測定には、ALA 溶液に浸潤後、1/2 MS + 10mM MES (pH6.0) 寒天培地上で 2 週間生育させた。

### (3) 免疫応答の観察

植物体を、5  $\mu\text{M}$  flg22 を含む 10mM MES (pH6.0) 緩衝液中 24 時間、処理し、免疫応答を観察した。

### (4) 遺伝子発現解析

リアルタイム PCR を用いて (Roche 社製 LightCycler) 目的の遺伝子の発現量を測定した。

### (5) カロース測定

測定対象の植物体の重量を測定し、その後、80%エタノールによってクロロフィル色素を脱色した。1M NaOH 液体中で植物体を破碎し、その上澄みを回収した。回収した上澄みに 0.1%アニリンブルーを倍量添加し、中和したのちカロースの検出に用いた。測定は蛍光分光光度計を使用し、励起波長 355nm、検出波長 485nm においてカロース量を測定した。

検量線作成には、標準試薬としてカードラン (1,3-グルカン) を使用した。

### (6) グルコシノレート測定

グルコシノレート測定には、グルコース C-テストワコー (wako 社製) を使用した。測定対象の植物体の重量を測定し、その後、蒸留水中で植物体を破碎した。破碎後 10 分間室温で静置することで、内生のグルコシノレートとミロシナーゼを反応させ、グルコースを遊離した。その反応液に 100%エタノールを等量添加し反応を停止した。その上澄みを回収しグルコース C-テストワコーの方法に沿ってグルコース量の測定をおこなった (測定区)。

また、内生グルコース量を測定するために、破碎後すぐに 100%エタノールを添加した処理区を用意し対照区とした。測定区から対照区で定量した量を差し引き、正味のグルコシノレート由来のグルコース量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ALA 投与による個体重量への効果

ALA の植物体への効果は、イネやペチュニアといった農業作物や観賞用植物においてよく調べられている。その効果として、個体重量の増加、光合成活性の上昇、クロロフィル含量の増加といった成長に関わる効果と、耐寒性、耐塩性の上昇といったストレス応答の強化がみられる。しかしながら、実験植物のシロイヌナズナへの生体への効果については、ほとんど調べられていない。

これまでの農業作物等を使った個体重量増加をもたらす ALA の投与方法は、数日間隔で断続的に投与するか、もしくは灌水によって継続的に投与する条件が多く見られる。そこで、1/2 MS + 10mM MES (pH6.0) 寒天培地上で 1 週間生育したシロイヌナズナ幼苗を、10  $\mu\text{M}$  および 100  $\mu\text{M}$  ALA を含む 1/2 MS + 10mM

MES (pH6.0) 寒天培地上に移植して 2 週間生育した。しかしながら、ALA 添加による個体重量への効果は確認できなかった。

分子レベルでの研究においては、シロイヌナズナ幼苗に ALA を投与すると、その代謝物であるテトラピロール化合物の蓄積が促進されることが知られている。その投与方法は、ALA を含む緩衝液に一晩浸漬するものである。その方法を参照し、1/2 MS + 10mM MES (pH6.0) 寒天培地上で 1 週間生育したシロイヌナズナ幼苗を、10  $\mu\text{M}$  および 100  $\mu\text{M}$  ALA を含む 10mM MES (pH6.0) に 1 日間浸漬した。その後、1/2 MS + 10mM MES (pH6.0) 寒天培地上に移植して 2 週間生育した。その結果、100  $\mu\text{M}$  ALA の条件においてわずかではあるが個体重量の増加を確認することができた。しかしながら、明確な有意な差は見られなかった。そのため、本研究でおこなった浸漬法による ALA 投与は、シロイヌナズナ固体重量増加への効果は少ないと考えられ、今後さらなる検討が必要である。

### (2) ALA 投与による免疫応答の強化

シロイヌナズナ幼苗に 10 mM ALA を投与すると、テトラピロール化合物のプロトクロロフィリドが大量に蓄積する。この物質は、flv 変異体における  $^1\text{O}_2$  生成のもととなる物質で、プラスチドシグナル生成に関わると考えられている。しかしながら、高濃度の ALA をシロイヌナズナ幼苗に投与すると、しばらくすると白化して枯死する。恐らくは、ALA 自体の光増感性の作用か、protochlorophyllide といったポルフィリン環構造の化合物蓄積によって過剰な活性酸素種が生成し、枯死したものと考えられる。本研究では、ALA 投与による免疫応答を強化することが目的であるため、枯死しないが、効果のある濃度を検討する必要がある。

(1) の研究結果において、有意な差は見られなかったが個体重量の増加にわずかに効果のあった 100  $\mu\text{M}$  を含め、500  $\mu\text{M}$ 、1000  $\mu\text{M}$  ALA を含む 10mM MES (pH6.0) 緩衝液にシロイヌナズナ幼苗を 1 日間浸漬した。実験的に ALA を植物に投与する場合は、光障害を避けるため暗条件でおこなう。本研究では、より生育環境に近い条件に念頭に置き、16 時間明期 / 8 時間暗期の光周期条件で投与した。各濃度の ALA を投与した結果、1 日後には 500  $\mu\text{M}$  および 1000  $\mu\text{M}$  の濃度において、植物体の枯死が確認された。そのため、ALA 濃度を 100  $\mu\text{M}$  として以下の実験をおこなった。

シロイヌナズナ幼苗を 100  $\mu\text{M}$  ALA を含む 10mM MES (pH6.0) 緩衝液に 1 日間浸漬し、その後、5  $\mu\text{M}$  flg22 を 1 日間処理した。まず、免疫応答のマーカー遺伝子である PR1 および PR5 の遺伝子発現解析をおこなった。PR1、PR5 とともに ALA による発現誘導の強化を確認する

ことができた(図1)。しかしながら、免疫応答の生理的指標の1つであるカロースの蓄積量を測定したところ、ALA + flg22 においては、flg22 のみの処理での蓄積量と比べて差異は見られなかった。

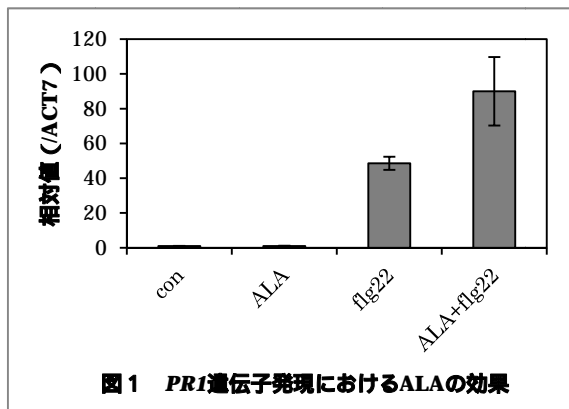


図1 PR1遺伝子発現におけるALAの効果

カロース蓄積に関わるとされるインドール系グルコシノレート代謝経路について調べた。この代謝経路は、抗菌性化合物(ファイトアレキシン)の合成にも関与する経路としても知られている。まず、この代謝に関わる遺伝子群の発現解析をおこなった。この代謝経路の既知の主要遺伝子である *CYP79B2*, *CYP83B1*, *AtST5a* などについて調べたところ、一部の遺伝子においては、ALA 投与による効果が見られたが、全体的に flg22 単独処理との大きな差は見られなかった。同様に、グルコシノレート類化合物の総代謝物量について測定したが、ALA 投与による効果は見られなかった。

これらの結果をまとめると、ALA 投与によって *PR1* や一部のグルコシノレート代謝関連遺伝子群の発現上昇への効果は確認することができたが、カロースやグルコシノレート類の代謝物増加への効果はないものと考えられる。現在、ALA の投与方法の検討を踏まえ、他の免疫応答反応への影響について検討している。

### (3) ALA 投与による免疫応答の補完

ALA 投与による免疫応答の強化については、明確な効果を確認することができなかった。1つの原因として、免疫応答の反応が飽和しているため、それ以上の強化の効果が表れにくかった可能性も考えられる。そこで、免疫応答が不全となった *cas* 変異体を使用する。ALA 投与による不全となった免疫応答を補完することができるか、以下の研究をもとに解析した。

シロイヌナズナ *cas* 変異体の幼苗を 100  $\mu$ M ALA を含む 10mM MES (pH6.0) 緩衝液に 1 日間浸漬し、その後、5  $\mu$ M flg22 を 1 日間処理した。免疫応答のマーカー遺伝子である *PR1* および *PR5* の遺伝子発現解析をおこなった。*cas* 変異体においては、ALA 投与条件におい

ても *PR1*, *PR5* ともに発現上昇を確認することができなかった。さらに、免疫応答の生理的指標の1つであるカロース量の測定においても補完効果は確認することができなかった。

インドール系グルコシノレート代謝経路に関わる遺伝子群の発現解析をおこなった。この遺伝子群のうち、*CYP79B2* などは、*cas* 変異体において、ALA 投与によって flg22 処理による発現上昇が野生型と同程度まで回復した(図2)。つまり、ALA 投与による遺伝子発現量の補完を確認することができた。このような補完効果が見られた遺伝子は、ALA 単独投与においても発現上昇が確認された。つまり、グルコシノレート代謝経路に関わる遺伝子群は、ALA 投与によって相加的な効果をもたらすものと考えられる。しかしながら、グルコシノレート類化合物の総代謝物量を測定したが、ALA 投与による効果は見られなかった。

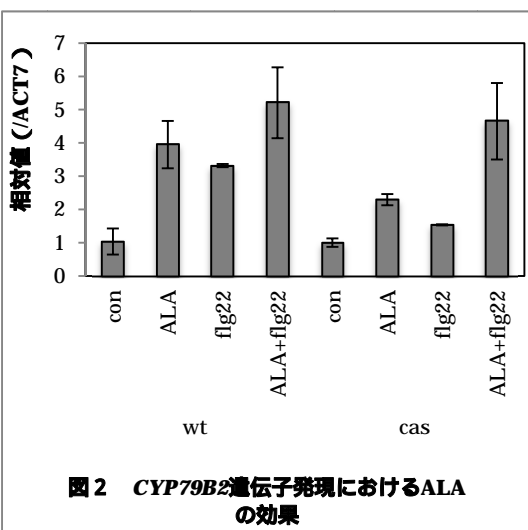


図2 CYP79B2遺伝子発現におけるALAの効果

これらの結果をまとめると、ALA 投与によってグルコシノレート代謝関連遺伝子群の発現上昇への効果は確認することができたが、カロースやグルコシノレート類の代謝物増加への効果は見られなかった。現在、グルコシノレート類の詳細な代謝物解析をおこなっている。

### 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2件)

Sano S, Aoyama M, Nakai K, Shimotani K, Yamasaki K, Sato MH, Tojo D, Suwastika IN, Nomura H and Shiina T.

Light-dependent expression of flg22-induced defense genes in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 5:531. (査読有り)

Nomura H and Shiina T.

Calcium signaling in plant endosymbiotic organelles: mechanism and role in physiology. *Molecular Plant* **7**:1094-1104.  
( 査読有り )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

金丸 研吾、小西 真帆、寺下 和輝、段 塵、  
三宅 みちる、野村 裕也、齊藤 優、藤本 尚  
則、渡邊 繁幸、宇野 知秀、山形 裕士  
植物における ALA 膜輸送体の探索と機能解  
析 2015年度農芸化学会 2015年3月 岡山

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

野村 裕也 ( NOMURA HIRONARI )

岐阜女子大学・家政学部・助教

研究者番号：00547028