

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03772

研究課題名(和文) MAPキナーゼセンサーによる植物免疫シグナルの可視化

研究課題名(英文) Visualization of MAP kinase activity by a biosensor in plant immune responses

研究代表者

吉岡 博文 (Yoshioka, Hirofumi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30240245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物免疫には、PTI (Pattern-triggered immunity)とETI (Effector-triggered immunity) による2段階の免疫応答が存在する。いずれもMAPキナーゼが重要な役割を果たしている。申請者は、時空間的に細胞・組織レベルでMAPキナーゼ活性動向をモニターするバイオセンサーの開発に着手した。本研究では、集団協調的な生体防御機構の実態を理解することを目的とし、病原菌の感染に応答したMAPキナーゼ活性を可視化することによって、PTIおよびETIにおける新たなシグナルネットワークの発掘を可能にする先駆的モデル系を提示する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生きた細胞でのMAPキナーゼ活性の時空間的観察は、従来の生化学的手法では不可能であったが、バイオセンサーを用いることにより、集団協調的な植物免疫シグナル伝達をライブイメージングすることが可能となる。本研究で得られる成果は、MAPキナーゼによる基礎抵抗性や免疫細胞死の制御機構を提供するのみでなく、新たな植物免疫誘導剤の開発に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：In plant immunity, there are two sequential immune responses, PTI (Pattern-triggered immunity) and ETI (Effector-triggered immunity). In both cases, MAP kinases play an important role in the immune responses. The applicant has started the development of a biosensor that spatiotemporally monitors MAP kinase activity at the cell and tissue levels. The purpose of this study is to understand the actual state of population-coordinated biological defense mechanism, and by visualizing MAP kinase activity in response to pathogen infection, it is possible to discover new signal networks in PTI and ETI, presenting a pioneering model system.

研究分野：植物免疫学

キーワード：植物免疫シグナル MAPキナーゼ バイオセンサー

## 1. 研究開始当初の背景

植物独自の免疫システムは、2つの段階に分けることができる。1つは、病原微生物由来分子パターン (PAMPs) を認識して発揮する基礎抵抗性である (PTI)。一方、病原菌は、病原性因子としてエフェクターを生産し、PAMPs による基礎抵抗性を抑制することで感染できる能力を獲得した。これに対抗し、植物はエフェクターを認識する抵抗性 (R) タンパク質を発達させて、強固な過敏感反応 (HR) 細胞死を引き起こし、病原菌を封じ込めることに成功したと考えられる (ETI)。これらの免疫反応には、いずれの場合においても MAPK カスケードが重要な役割を担っている。

ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の MAPKK (MEK2) の恒常活性型酵素 (MEK2<sup>DD</sup>) を植物内で発現させると、MAPK である SIPK が活性化され、活性酸素・活性窒素の生産、HR 細胞死が誘導される。申請者は、SIPK の基質として NbWRKY8 転写因子を同定した。NbWRKY8 は D ドメインを介して SIPK と結合し、62、67、79、86、98 番目のセリン残基 (SP クラスタ) がリン酸化されることを明らかにした。さらに、SP クラスタを有する WRKY の中で、NbWRKY7, 8, 9, 11, 12, 14 の疑似リン酸化変異体を発現させると細胞死が誘導された。NbWRKY8 が MAPK によってリン酸化されると、ファイトアレキシン (PA) の合成遺伝子である HMGR やエチレン合成遺伝子である ACS を制御し、一方で NbWRKY7, 8, 9, 11 が重複して ROS 生産遺伝子である *NbRBOHB* を活性化することが明らかになった。

平成 26 年度に採択された基盤研究 B 「MAP キナーゼの基質 WRKY 型転写因子による植物免疫機構の解明」において、各種 NbWRKY の下流遺伝子を網羅的に探索し、細胞死を誘導する NbWRKY8 および NbWRKY14 の下流で共通に誘導される遺伝子を絞り込んだ結果、転写因子、レセプターに加え、防御、レドックスなどに関与する 27 の遺伝子が見いだされた。この植物の生体防御機構は被感染細胞のみで発揮されるのではなく、隣接細胞が協調して実行される。しかし、感染現場での MAPK-WRKY 系路の活性化動態は不明である。本研究では、時空間的に細胞・組織レベルで MAPK 活性動向をモニターするバイオセンサー駆使し、実際に病原菌が感染した細胞およびその周辺細胞による集団協調的な生体防御機構の実態を理解することによって、PTI および ETI における免疫シグナル伝達機構の分子基盤を構築することを目的とする。

## 2. 研究の目的

NbWRKY8 の SP クラスタは、SIPK によりリン酸化される。この反応には D ドメインを介した SIPK との結合が必要であり、適切なリン酸化を保証していることを明らかにした。この知見を利用し、SIPK 活性をモニターするバイオセンサーの開発に世界で初めて成功した。本バイオセンサーは、2種の蛍光タンパク質、リン酸化セリン認識ドメイン (Pin1 WW)、NbWRKY8 由来の D ドメインと隣接した SP クラスタで構成される。SP クラスタがリン酸化されると、WW ドメインがそれに結合することで、センサータンパク質の構造が変化し、蛍光タンパク質が近接する。この状態で蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer : FRET) が起こり、異なる波長の蛍光として観察される。シグナルペプチドを付加することで細胞質基質と核に局在する 2つのバイオセンサーを作製する。

① これら 2つのセンサータンパク質を、シロイヌナズナおよびモデル植物であるベンサミアナタバコに導入する。

② 得られたモニター植物に、各種病原菌を接種し、PTI や ETI における SIPK 活性を時空間的に解析する。

将来的には、センサー培養細胞を用いてケミカルライブラリーをスクリーニングする。細胞死を起こさないレベルで SIPK 活性を誘導する環境にやさしい農薬である免疫誘導剤 (抵抗性誘導剤、プラントアクティベーター) を開発する予定である。

## 3. 研究の方法

### (1) MAPK センサーの構築

pEAQ-HT バイナリーベクターに NbWRKY8 由来の D ドメインと SP クラスタ、ヒト遺伝子由来のリン酸化セリン認識ドメイン (Pin1 WW)、そして mVenus (YFP) と mCerulean (CFP) を連結したコンストラクト (バイオセンサー) を 35S プロモーターの下流に挿入した。また、エフェクターとして、恒常活性型 MEK2<sup>DD</sup> や非活性型 MEK2<sup>KR</sup> をもう一つの 35S プロモーターの下流に挿入した。本遺伝子をベンサミアナタバコ葉にアグロインフィルタレーション法により一過的に導入し、FRET 蛍光強度を測定し、センサー構造の最適化を図った。

### (2) モニター植物の作出

平成 29 年度は、シロイヌナズナと、モデル植物であるベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) にセンサー遺伝子を導入した組換え植物を作出し、導入遺伝子が安定してタンパク質を高蓄積させる個体を獲得する。ベンサミアナタバコは、ウイルスベクターを用いた迅速な

遺伝子のサイレンシングが可能であり、Avr エフェクター遺伝子と対応する抵抗性遺伝子をアグロバクテリウムを用いて一過的に導入することができる。

バイオセンサーには WW ドメインを用いることから、導入されたセンサータンパク質は核内に転送される。一方、センサーの C 末端に核外輸送シグナル (NES) を付加することにより、センサータンパク質を細胞質基質にとどめることができる。バイオセンサー構築には、抽出効率を考慮して NES を付加したものをを用いたが、これら 2 つのバイオセンサーによって、細胞質基質や核で MAPK 活性の動態をモニターすることができる。

### (3) FRET 観察

得られたベンサミアナモニター植物に、ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) を接種し、感染現場を FRET 蛍光顕微鏡あるいは大学に共通器機として設置してある共焦点レーザー顕微鏡で解析する。同様にバイオセンサーを導入したシロイヌナズナに、アブラナ科炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*) を接種して FRET 蛍光を観察する。さらに、ジャガイモ疫病菌に対する抵抗性遺伝子である *Rpi-blb2* を形質転換したベンサミアナタバコに対応する疫病菌のエフェクター *Avrblb2* 遺伝子を有するジャガイモ疫病を接種し、ETI における SIPK 活性を時空間的に解析する。

これら一連の実験により、感染組織における MAPK 活性の時空間的動態、さらに免疫シグナルの細胞間移行についての基本情報を得ることができる。また、適宜ウイルス誘導型ジーンサイレンシング法 (VIGS) を用いて、細胞内・細胞間における MAPK 活性化に対する既知のシグナル伝達因子の影響も併せて調べることができる。

## 4. 研究成果

### (1) MAPK センサーの最適化

WRKY8 の領域に含まれる周辺配列の長さを変え、最終的に 100 以上のパターンを検討した (図 1)。マイクロプレートリーダーを用いて FRET 蛍光 (YFP/CFP) の強度を測定したところ、MEK2<sup>KR</sup> (非活性型) に対する MEK2<sup>DD</sup> (活性型) での値が 1.56 倍を示す構造が得られた。実用レベルのバイオセンサーには、1.3 倍以上のシグナルの増加が望ましいとされる。実際に、このコンストラクトを一過的にベンサミアナタバコに導入したところ、免疫シグナルに応答して FRET 蛍光が観察された。以上のように、MAPK センサーを開発することに成功した。

次にセンサーの基質特異性について調べた。SIPK と WIPK を活性化する MEK2<sup>DD</sup>、SIPK、WIPK の恒常活性型変異体である SIPK<sup>CAY</sup>、WIPK<sup>CAE</sup>、さらに免疫応答に関与していることが知られている NTF6 についてもその活性型 NTF6<sup>CAY</sup> を作製した。これら活性型酵素遺伝子と *NbWRKY8* 遺伝子を発現させ、ベンサミアナ葉に導入し、粗抽出液を調製した。*NbWRKY8* の SP クラスタ内でのリン酸化レベルを各抗リン酸化セリンペプチド抗体で確認したところ、86 番目のセリンは SIPK により特に強くリン酸化されることがわかった (図 2)。この結果より、86 番目のセリン以外の SP クラスタ内のセリンはアラニンに置換した。

実際に植物にバイオセンサーを導入する場合、導入遺伝子が安定し、タンパク質が高蓄積することが重要である。そこで、最終的なセンサー遺伝子は、次のように構築した。ターミネーターには植物の HSP90 の配列を用いた。YFP のコドンを書換えることで CFP との配列の重複を避け、さらに HSP90 ターミネーターの採用によって、一過的な発現系においてはセンサータンパク質の高蓄積が確認された。また、pGreen ベクターはゲノム内に多コピー導入されないことが示されており、複数コピー導入による遺伝子のサイレンシングを回避することが期待される。また、センサーの C 末端に核外輸送シグナル (NES) を付加した。このバイオセンサーによって、細胞質基質で MAPK 活性の動態をモニターすることができる。最終的に、NES を付加したバイオセンサーを導入したシロイヌナズナとベンサミアナタバコのモニター植物を得ることができた。

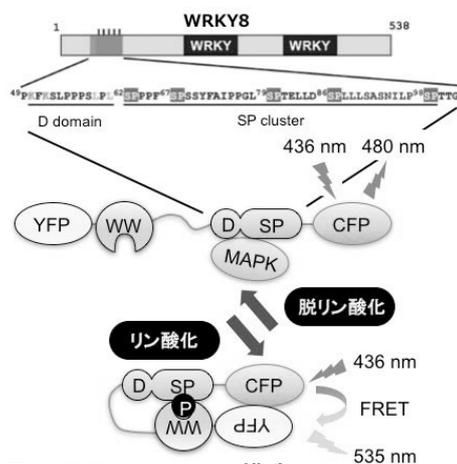


図 1 MAPK センサーの構造

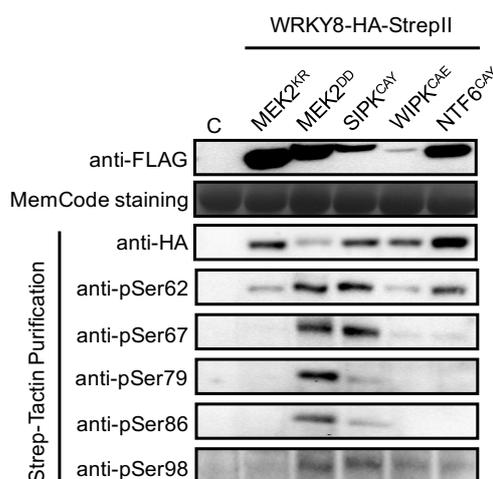
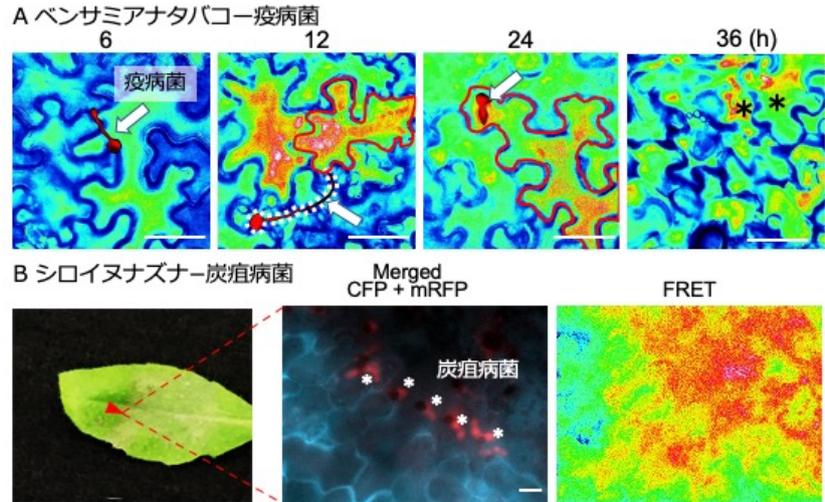


図 2 WRKY8 の SP クラスタ内のリン酸化状況

WRKY8 の SP クラスタ内のリン酸化状況を回避することが期待される。また、センサーの C 末端に核外輸送シグナル (NES) を付加した。このバイオセンサーによって、細胞質基質で MAPK 活性の動態をモニターすることができる。最終的に、NES を付加したバイオセンサーを導入したシロイヌナズナとベンサミアナタバコのモニター植物を得ることができた。

## (2) 病原菌シグナルに対する MAPK 活性動向

ここでは、ジャガイモ疫病菌に対する抵抗性遺伝子である *Rpi-blb2* を形質転換したベンサミアナタバコに対応する疫病菌のエフェクター *Avrblb2* 遺伝子を有するジャガイモ疫病菌を接種し、ETI における SIPK 活性を時空間的に解析する目的で、MAPK センサーを細胞質型のセンサーをアグロインフィルタレーション法によって一過的にベンサミアナタバコに導入し、RFP でラベルしたジャガイモ疫病菌を接種した (図 3 A)。ジャガイモ疫病菌は本来ジャガイモの病原菌であるが、本分離株はベンサミアナタバコに感染することができる。蛍光顕微鏡下で感染現場を観察した結果、接種 12 時間後において被侵入細胞および隣接細胞において、激しい FRET 蛍光が認められた (図 3 A)。24 時間後になると FRET 蛍光が減衰し、36 時間経過すると周辺細胞も含めて細胞死が認められた。一方、シロイヌナズナに MAPK センサーを形質転換し、アブラナ科炭疽病菌を接種した (図 3 B)。接種 3 日後において、いくつかの炭疽病菌が侵入した細胞および周辺細胞において FRET 蛍光が観察された。このように、MAPK センサーを用いることによって細胞間免疫シグナル伝達が観察可能となった。



**図 3** バイオセンサーによる MAPK 活性化シグナルの可視化

A, *Rpi-blb2* を導入したベンサミアナ葉に RFP ラベルしたジャガイモ疫病菌を接種すると、12 時間後に内部菌糸の周辺および隣接細胞に FRET 蛍光 (FRET/CFP) が観察された。赤で囲われた細胞は被侵入細胞を示す。アスタリスクは HR 細胞死を起こした細胞を示す。Bars = 50  $\mu$ m  
B, シロイヌナズナに RFP ラベルしたアブラナ科炭疽病菌を接種し、2 日後に観察下結果、被侵入細胞および周辺細胞において FRET 蛍光が確認された。Bars = 50  $\mu$ m

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshioka, M., Adachi, I., Sato, Y., Doke, N., Kondo, T. and Yoshioka, H.	4. 巻 20
2. 論文標題 RNAi of sesquiterpene cyclase gene for phytoalexin production impairs in pre- and postinvasive resistance to potato blight pathogens.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 907-922.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mpp.12802	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 鳴坂義弘・鳴坂真理・吉岡博文・吉岡美樹・谷口伸治・石川美友紀・紀岡雄三・野口勝憲	4. 巻 73
2. 論文標題 植物を元気にして病気を防ぐ 植物活力剤によるイチゴの病害抑制技術	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 植物防疫	6. 最初と最後の頁 684-688.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kobayashi, Y., Fukuzawa, N., Hyodo, A., Kim, H., Mashiyama, S., Ogihara, T., Yoshioka, H., Matsuura, H., Masuta, C., Matsumura, T. and Takeshita, M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of salicylic acid glucosyltransferase in balancing growth and defence for optimum plant fitness.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 429-442.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mpp.12906	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 Yamauchi, T., Yoshioka, M., Fukazawa, A., Mori, H., Nishizawa, N.K., Tsutsumi, N., Yoshioka, H. and Nakazono, M.	4. 巻 29
2. 論文標題 An NADPH oxidase RBOH functions in rice roots during lysigenous aerenchyma formation under oxygen-deficient conditions.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Cell	6. 最初と最後の頁 775-790.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1105/tpc.16.00976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 安達広明・吉岡博文	4. 巻 55
2. 論文標題 植物免疫における活性酸素生成誘導のしくみー植物はいかにして病原菌から身を護るのか？	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 590-592.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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19件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 岡本深太・小川尊也・稲田太一・安達広明・吉岡美樹・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 ROS免疫シグナルを介在するROSセンサータンパク質のプロテオーム解析
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川尊也・岡本深太・稲田太一・安達広明・吉岡美樹・杉浦大輔・吉岡博文
2. 発表標題 植物免疫応答における葉緑体のROSシグナルは葉緑体の核への凝集に関連する
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡美樹・安達広明・石濱伸明・鳴坂真理・鳴坂義弘・高野義孝・吉岡博文
2. 発表標題 シロイヌナズナMAPKセンサー植物を用いた免疫MAPKの時空間的活性動態
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田啓一朗・高橋来人・千賀紀尚・安達広明・石濱伸明・吉岡美樹・近藤竜彦・吉岡博文
2. 発表標題 咀嚼昆虫の食害に対するMAPKの時空間的活性動態における薬理学的研究
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川尊也・岡本溪太・稲田太一・安達広明・吉岡美樹・杉浦大輔・森 仁志・三宅親弘・吉岡博文
2. 発表標題 植物免疫における葉緑体ROSバーストは、フェレドキシンに還元力が蓄積することで誘導される
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉岡美樹・山口公志・吉村智美・野元美佳・多田安臣・山内卓樹・石井陽大・中園幹生・川崎 努・吉岡博文
2. 発表標題 イネのRB0HIを介したROS生成に おけるRLCK185とCDPKによる相 加的効果
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本溪太・小川尊也・稲田太一・安達広明・吉岡美樹・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 植物免疫シグナルを介在するROS センサータンパク質は抵抗性を正に制御する
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中達己・安達広明・吉岡美樹・荒川花子・別役重之・多田安臣・鳴坂真理・鳴坂義弘・吉岡博文
2. 発表標題 サリチル酸とジャスモン酸シグナルの活性化および拮抗作用を可視化するバイオセンサーの構築
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩田啓一朗・高橋来人・千賀紀尚・安達広明・石濱伸明・關 光・村中俊哉・吉岡美樹・近藤竜彦・吉岡博文
2. 発表標題 ニジュウヤホシテントウの経口成分に由来するソラニン・チャコニンは植物の免疫反応を誘導する
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshioka, H., Adachi, H., Ishihama, N., Belhaj, K., Takano, Y., Kamoun, S., Sato, M. and Yoshioka, M.
2. 発表標題 WRKYs phosphorylated by MAPK regulate chloroplast-mediated ROS burst in plant immunity
3. 学会等名 International Congress of Plant Pathology (ICPP) 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshioka, H
2. 発表標題 Plant immunity mediated by MAPK-WRKY phosphorylation pathway
3. 学会等名 2018 International Symposium on Agricultural Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川尊也・安達広明・吉岡美樹・杉浦大輔・吉岡博文
2. 発表標題 植物免疫応答における光合成活性抑制は葉緑体のROS生産を誘導する
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川尊也・安達広明・吉岡美樹・杉浦大輔・吉岡博文
2. 発表標題 細胞死に連動する植物免疫応答では葉緑体の ROS 生産が誘導される
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田啓一朗・高橋来人・千賀紀尚・安達広明・石濱伸明・吉岡美樹・近藤竜彦・吉岡博文
2. 発表標題 ニジユウヤホシテントウの食害による MAPK 活性の時空間的動態
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達広明、石濱伸明、吉岡美樹、鳴坂真理、鳴坂義弘、吉岡博文
2. 発表標題 免疫応答においてMAPK活性を可視化するバイオセンサーの開発
3. 学会等名 平成29年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安達広明、石濱伸明、吉岡美樹、鳴坂真理、鳴坂義弘、吉岡博文
2. 発表標題 FRET biosensor for plant immune MAPK in <i>Nicotiana benthamiana</i>
3. 学会等名 14th Solanaceae and 3rd Cucurbitaceae Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 稲田太一・安達広明・吉岡美樹・吉岡博文
2. 発表標題 免疫応答におけるROSセンサータンパク質の関与
3. 学会等名 平成29年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 稲田太一・吉岡美樹・安達広明・吉岡博文
2. 発表標題 植物免疫応答におけるROSセンサータンパク質はROS蓄積を制御する
3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡博文・安達広明・吉岡美樹
2. 発表標題 Plant immune MAPK-WRKY phosphorylation pathway regulates NADPH oxidase and chloroplast-mediated ROS bursts
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 形質転換植物	発明者 吉岡博文、安達広明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-021831	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 MAPキナーゼバイオセンサー	発明者 吉岡博文	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-038994	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

植物免疫学研究室 <a href="http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/%7ebio4283/index.html">http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/%7ebio4283/index.html</a>
---

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