

令和元年6月26日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15230

研究課題名(和文) 葉緑体の過敏感反応シグナル伝達活性化プラットフォーム機構の解明

研究課題名(英文) The function of chloroplasts as a platform activating signaling for hypersensitive response

研究代表者

関根 健太郎 (SEKINE, Ken-Taro)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：30574058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスに対する植物の抵抗性遺伝子が駆動する過敏感反応のシグナル伝達に関するタンパク質をプロテオーム解析ならびに順遺伝学的手法によって複数同定した。いずれも葉緑体の形成に関わる因子であり、過敏感反応のシグナル伝達系を活性化するために必要であると考えられた。同定されたタンパク質をコアとした葉緑体をプラットフォームとしたシグナル伝達ネットワークの存在を示す端緒を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ウイルス病害は、他の微生物病害と異なり、農薬による防除が難しく、植物の病害抵抗性機構を利用した新たな病害防除技術の開発が求められている。病害抵抗性機構における葉緑体の機能は未だ明らかになっていない部分が多く、ウイルス抵抗性の全容解明に向けて、本研究では、病害抵抗性に関するタンパク質として、葉緑体の形成に必要なタンパク質を複数同定することができ、抵抗性反応全容解明に向けた端緒を得た。

研究成果の概要(英文)：We identified several factors related to hypersensitive response in plant defense using proteomic analyses and forward genetic approaches. These factors involved in development of chloroplasts. And they are required for enhancing the signal transduction pathways in hypersensitive response. The identified proteins might be the major components which presents on chloroplasts as a platform for activating signal transduction pathways.

研究分野：植物病理学

キーワード：過敏感反応 ウイルス抵抗性 葉緑体 プロテオーム解析 変異体解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抵抗性タンパク質 (R) による非病原性タンパク質 (Avr) の認識から駆動される Effector triggered immunity は、植物の多様な病害抵抗性反応の中で最も強力な防御応答であり、分子機構の理解は、植物の免疫力を人為的に制御する新たな病害防除技術の開発を可能にする。現在、国内外の研究者により様々な植物から R タンパク質が単離され、機能解析が進められている。特に近年は、R, Avr 両タンパク質に相互作用する共役因子が同定され、これを介してシグナル伝達の活性化が誘起されると考えられている。

研究代表者は、トバモウイルス抵抗性遺伝子としてトウガラシ属植物の7種の L 遺伝子ファミリーとタバコの *N'* 遺伝子を単離している【Tomita et al. (2011) Mol. Plant-Microbe Interact. 24:108-117; Sekine et al. (2012) Mol. Plant-Microbe Interact. 25:1219-1229】。これらの R タンパク質は、トバモウイルスの外被タンパク質 (CP) を Avr として認識するが、各々認識できる CP の特異性が異なる。この特徴を生かして、認識特異性決定機構の解析を進めてきた。その中で、抵抗性反応が起こる場合には L と CP が複合体を形成していることを免疫共沈によって明らかにした。さらに、認識特異性及び抵抗性反応強度が、L-CP タンパク質間相互作用の親和性に依存することを明らかにした【H25-26 科研費若手研究(B)成果】。その過程で、CP との相互作用の親和性が弱まる L 変異体を作成した。また、これまでの研究で、L-CP 相互作用が起こる際に L 及び CP のコンフォメーションと細胞内局在性が変化する可能性を見出した。そこで、本研究課題で確立する「L-CP タンパク質間相互作用親和性の定量による L タンパク質複合体の細胞内動態の解析方法」に着想した。また、先行して酵母ツーハイブリット法を用いて得られた L の相互作用因子 THF1 は葉緑体局在性を持ち【Hamel et al. (2016) Plant Physiol. 171:658-674】、葉緑体は病害抵抗性機構のシグナル伝達を制御する場「プラットフォーム」として機能すると示唆される。このようなプラットフォームで機能する分子を複数同定することでシグナル伝達系の制御機構を詳細に理解できる。

L-CP 複合体構成因子には L-CP 間相互作用の親和性と正または負の相関を持つものが想定される。免疫共沈により L-CP タンパク質複合体が検出できたことと、CP との相互作用の親和性が異なる L の変異体を得られたという先行研究結果から、L-CP 相互作用の親和性の差異を利用して複合体構成因子を単離する発想に至った。

また、研究代表者は、シロイヌナズナのキュウリモザイク抵抗性遺伝子 *RCY1* の駆動する過敏感反応や脂肪酸代謝系遺伝子 *SSI2* の変異による自発的細胞死誘導という2つの異なる細胞死誘導実験系を有しており、これらの細胞死へ葉緑体がいかに関わるかを検証することで、その一般性を明らかにすることが可能である。

2. 研究の目的

本研究では、トウガラシ属のトバモウイルス抵抗性タンパク質 L と、その認識ターゲットのウイルス外被タンパク質の相互作用で誘導される過敏感反応をモデル材料として、ウイルス病害抵抗性シグナル伝達系の解明を目指す。先行結果から L タンパク質と相互作用する葉緑体局在性タンパク質 THF1 のシグナル伝達系への関与が示されており、病害抵抗性シグナル伝達系の制御プラットフォームとして葉緑体が機能を果たしているかについて、1) 葉緑体の形成阻害試験、2) 定量プロテオーム手法を用いたタンパク質複合体の細胞内の挙動の解析と構成因子の探索、という2つの方法で検証する。また、シロイヌナズナにおける *RCY1* 遺伝子が駆動するキュウリモザイクウイルス抵抗性および *ssi2* 遺伝子変異による自発的細胞死誘導も研究材料に加え、ウイルス抵抗性における葉緑体の関与について多角的に検証する。

3. 研究の方法

(1) 葉緑体の形成阻害試験

葉緑体の形成阻害により、トバモウイルス抵抗性シグナル伝達系における葉緑体の機能を解析する。*Nicotiana benthamiana* における TRV ベクターを用いた RNA サイレncing による遺伝子制御実験に加え、シロイヌナズナの変異体の作出、原因遺伝子の同定を行った。

(2) 定量プロテオーム手法を用いたタンパク質複合体の細胞内の挙動の解析と構成因子の探索

タンパク質間相互作用の親和性が異なる L と CP の様々な組合せを用いて、L をプローブとした免疫沈降物についてプロテオーム解析を行い、L-CP 間相互作用親和性の定量化手法を確立する。さらに L を恒常的に発現し、CP を薬剤により発現誘導する植物を用いて、細胞内の構成要素を可溶性・膜成分・葉緑体など遠心分離による分画を行い、L-CP 複合体の動態の経時的な変化を明らかにする。L または CP と相互作用するタンパク質群から、L-CP 間相互作用の親和性と正または負に相関する相互作用親和性を持つ新規共役因子を探索した。

4. 研究成果

(1) 葉緑体の形成阻害試験

植物のウイルスに対する抵抗性シグナル伝達系における葉緑体の役割を明らかにするために、葉緑体ができない *Nicotiana benthamiana* においてアグロバクテリウムを用いて L 遺伝子と ToMV を一過的に発現させた場合に、通常の植物に比べて、細胞死の広がりが遅延する傾向が認められた。細胞死誘導を増長するシグナルを活性化する働きを果たしているものと推察された。そこで、*Nicotiana benthamiana* を用いたデキサメタゾンで同調的な細胞死を誘発する植物を作出した。本植物は L³ 遺伝子を恒常的に発現する形質転換体にさらにデキサメタゾンで tomato mosaic virus (ToMV) の CP 遺伝子の発現を誘導することで、過敏反応を誘発できる(図1)。本植物に TRV ベクターを用いて葉緑体の形成を阻害する遺伝子ノックダウンにより、葉緑体ができない植物を作出して、デキサメタゾンを処理することで細胞死が起こるかどうかを検定したところ、細胞死が誘導された。細胞死誘導に対して葉緑体は必須ではない可能性が考えられた。当該植物は細胞死誘導に関わる因子を探索する上で非常に有用であり、そのために今後デキサメタゾンの処理方法を精査することが課題である。低濃度でのデキサメタゾン処理により弱い細胞死応答が起こる条件を探し、葉緑体ができない植物で改めて細胞死が起こるかどうかを検討する必要がある。

葉緑体の脂肪酸代謝シグナル伝達系シロイヌナズナ変異体 *ssi2* の基礎的防御機構を活性化する表現型を抑制する

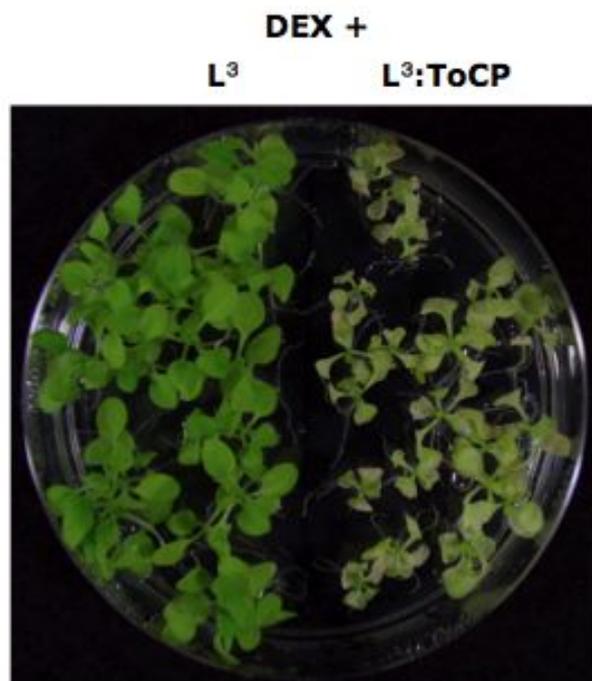


図1 デキサメタゾンで過敏反応を誘発する植物

復帰変異体である *rdc2* 変異体の特徴付け , および , 原因遺伝子の探索を行った . *rdc2* 変異体



wild-type (*RDC2*)

rdc2

は葉の葉脈を除く部分の緑色が薄い形態的特徴を有し , 葉緑体色素が野生型と比較して減少していた . この *rdc2* 変異体は *Pseudomonas syringae* pv. *tomato DC3000 AvrRpt2* に対する抵抗性が弱まっており , バクテリアの増殖量が優位に高くなっていた . 非親和性細菌接種に対して活性酸素種の蓄積が減少

図2 パラコートによる細胞死の誘導実験

少していた . さらに *rdc2* 変異体はパラコートに対して耐性を持つことから (図2) , 活性酸素種の生成に関与する変異を有することが予想された . マップベースクローニングによって原因遺伝子を探索したところ , 葉緑体に局在するクロロフィル A/B 結合タンパク質の 1 アミノ酸置換を伴う塩基置換を見出した . ネイティブな遺伝子を形質転換したところ退緑の表現型が失われる個体が得られ , 本遺伝子が原因遺伝子であることを確認した . 本変異体のウイルスに対する応答を調べたところ 親和性のウイルスに対する罹病性に大きく影響しないものと考えられた . 非親和性のウイルスの応答を調べるために , 交配によりキュウリモザイクウイルス抵抗性遺伝子 *RCY1* と *rdc2* 変異遺伝子を共にホモに持つ植物の作出を行った . しかし報告書作成時には , ウイルス接種試験が間に合わなかった . シロイヌナズナ-キュウリモザイクウイルスの研究を進めるにあたり , 新たな実験材料として , 新たにキュウリモザイクウイルス沖縄バナナ系統バナナ分離株 (CMV-0Bb) を単離し , 全長のゲノム配列を決定した . CMV-0Bb は , *RCY1* 抵抗性タンパク質に認識されず , 抵抗性遺伝子 *RCY1* を持つシロイヌナズナにおいても全身感染することを明らかにした . 加えて , 薬剤処理 (アミノ酸発酵副生液) により親和性の CMV の感染を抑制できることを示した . また , 様々な植物におけるウイルス感受性を比較解析した . その結果 , ズッキーニおよびニガウリは CMV-0Bb に対して懐死を伴う病徴を示し , ウイルスに対する感受性の異なる 2 品種を見いだすことができた . これらは植物ウイルス抵抗性研究の新たな材料となる . このズッキーニの 2 品種については , 葉の色が異なることから , 色素量を測定したところ , 葉緑体量が異なることが示唆された . 葉緑体が多い品種はウイルス感受性が低くなることから , 葉緑体のウイルスに対する過敏反応や抵抗性への関与が考えられ , 本材料は新たな研究材料として有望であると考えた . そこで交配を行い分離集団を作成した . 今後 , 接種試験を行い遺伝分析を実施する予定である . またニガウリにおいては , 分子生物学研究の基盤構築を目的として , 過敏反応時に発生するホルモンであるサリチル酸を処理した際の転写発現プロファイリングを次世代シーケンシングを活用して実施した . その結果 , サリチル酸誘導性防御関連遺伝子を新たに同定した . これによってトランスクリプトーム解析手法を確立できたため , さらにウイルス感染時の葉緑体の役割を明らかにするべく , シロイヌナズナの *RCY1* 過剰発現体および *rdc2* 変異体におけるトランスクリプトーム解析を行っている . *rdc2* においては , 葉緑体代謝に関わる遺伝子の発現変動が認められた . *RCY1* 過剰発現体においてはストレス誘導性の遺伝子の発現上昇が恒常的に起こっていることがわかった . これらは令和元年中に論文にまとめる予定である .

(2) 定量プロテオーム手法を用いたタンパク質複合体の細胞内の挙動の解析と構成因子の探索

分子生物学実験環境の整備に時間がかかり、当初予定のタンパク質実験が思うように進んでおらず、葉緑体のプロテオーム解析などには着手できなかった。琉球大学の共通の実験機器でプロテオーム解析の実験系を立ち上げた（ウイルスの外被タンパク質を検出することに成功した）が、以前、岩手大学で利用していた Orbitrap（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）の解析精度にははるかに劣ることが分かった。そこで、岩手大学の山下哲郎先生協力のもと、定量プロテオームの実験系構築を試みた。L-CP の実験系では思うようなデータが得られなかった一方、シロイヌナズナの RCY1 の蓄積量の高い形質転換体と低い形質転換体を用いて、RCY1 と相互作用するタンパク質を免疫共沈法並びにプロテオーム解析したところ、RABE1b タンパク質が RCY1 の蓄積量の高い場合のみ検出できた（図 3）。RABE1b の蓄積量をキュウリモザイクウイルスを感染させた時と通常時において定量プロテオーム解析を用いて比較することを試みた。実験精度に課題は残るものの、本タンパク質の蓄積量に優位な差は認められなかった。ウイルス感染後の時間など条件検討を進めていく。RABE1b をノックダウンすると葉が白色化することから、電子顕微鏡で調べたところ、葉緑体が形成できないことが明らかになった。今後は、RABE1b の過剰発現体における過敏反応の有無や、タンパク質の局在、機能などを明らかにしていく予定である。

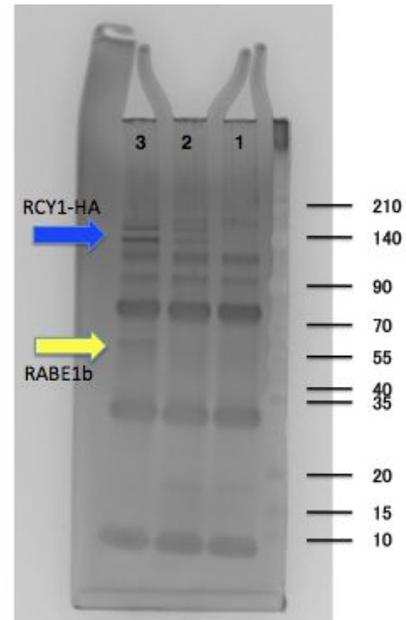


図 3 免疫共沈結果（SDS-PAGE）

(3) 全体のまとめ

ウイルスベクターを用いたジーンサイレンシング実験についても、遺伝子組換え植物実験環境の整備に時間がかかり、当初予定の通りには研究を実施できなかった。しかし、その一方で、葉緑体の機能欠損変異体については原因遺伝子が同定できたため、今後の新たな葉緑体の病害抵抗性シグナル伝達系における機能解析の研究材料として期待される。加えて、独自に新規ウイルス系統を単離したところ、病害抵抗性研究に有用な実験材料を得ることができた。シロイヌナズナの形質転換体の作出や、交配による目的遺伝子を持つ植物の作出など時間のかかる部分が多いため、今後過敏反応への葉緑体の機能について決定的な証拠を見出せるものと期待している。また、ウイルスのゲノム解析においてはバイオインフォマティクス技術を習得できたため、課題終了後も解析技術としてオミックスの活用を計画している。以上に加えて、独立形成支援によって遺伝子組換え実験のための機器類を揃えられたこと、研究補佐員を雇用できたため、大いに研究の進捗が図られた。新規ウイルスゲノムの全長決定などを通して、分子生物学実験を研究室所属学生に浸透することができたため、終了後は実験指導に割くエフォートを軽減できるものと期待される。以上のことから判断して、研究全体としてはおおむね順調に進展したと判断する。

〔学会発表〕(計 3 件)

関根健太郎, 富田麗子, 高安果穂, 内間樹里, 宇佐美瑠衣, 田場 聡
沖縄のバナナから分離したキュウリモザイクウイルス 2 分離株の分子生物学的比較
日本植物病理学会大会, 2019
Sekine K-T, Usami R, Tomita R, Takayasu K, Uchima J, Taba S
Molecular biological characterization of two strains of cucumber mosaic virus isolated
from banana plants in Okinawa.
2018 JSME annual meeting & 10th ASME, 2018
関根健太郎, 富田麗子, Kachroo P
基礎的防御を増強したシロイヌナズナ変異体 *ssi2* の復帰変異体 *rdc2*,
日本植物病理学会大会, 2018

〔その他〕

研究室ホームページ <http://www.agr.u-ryukyu.ac.jp/labos/phytopathology/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

Pradeep Kachroo, University of Kentucky, USA