

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570056

研究課題名(和文)植物のグルタミン酸受容体は気孔閉鎖シグナリングとして機能し得るか？

研究課題名(英文) Does plant glutamate receptor function as a signaling molecules in stomatal closure?

研究代表者

吉田 理一郎 (Yoshida, Riichiro)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：70301786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアミノ酸の一つであるグルタミン酸が、高等植物の気孔閉鎖および病原体に対する抵抗性遺伝子の発現誘導に關与することを生理、遺伝、分子生物学的なアプローチから明らかにした。グルタミン酸による気孔閉鎖は、1)グルタミン酸受容体遺伝子GLR3.5、2)カルシウムシグナル、を介することが明らかにされた。また、病原抵抗性遺伝子(PR-1)の発現誘導に關しては、グルタミン酸による内生サリチル酸量の上昇、また、サリチル酸合成系遺伝子の発現誘導に起因することが明らかにされた。グルタミン酸は動物の神経伝達シグナルとして機能するが、今回の研究成果は植物と動物間におけるシグナルの進化的共通性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Using physiological, genetic and molecular approaches, we have shown that amino acid glutamate (Glu) plays as a signaling molecule in both stomatal closure and the expression of pathogen resistant gene in higher plants. Glu dependent stomatal closure required Glu receptor gene GLR3.5 and calcium signaling. Glu induced the expression of PR-1 gene and this induction was mainly due to an increased level of endogenous salicylic acid (SA) and up-regulation of the SA biosynthetic gene expression. These results strongly supported the functional Glu signaling in higher plants and also provoked some evolutionary commonalities in cellular signaling conserved between plants and mammals.

研究分野：環境応答

キーワード：シグナル伝達 気孔 アミノ酸 植物ホルモン 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

申請者は、アミノ酸であるグルタミン酸 (Glu) およびグリシン (Gly) が植物の Glu 受容体 (GLR) を介し、孔辺細胞の閉鎖を促すことをモデル植物のシロイヌナズナおよびソラマメを用いて明らかにしてきた。Glu は動物の記憶・学習を司る重要な神経伝達物質であるが、植物でのシグナルとしての機能に関する知見は乏しい。動物と類似の構造を持った GLR がシロイヌナズナを始めとした様々な植物種で同定されていることは、植物が実際に Glu や他のアミノ酸をシグナルとして利用することを裏付けているが、各々の GLR の機能、生理形質への寄与については多くの解決すべき課題が残されている。

孔辺細胞は植物シグナル伝達研究の強力なツールであり、本研究計画ではこの系を用いて植物の Glu シグナル伝達機構の解明を目指した。計画を進行する上で、申請者は、GLR を介した Glu シグナルが気孔閉鎖に関与することを以下の研究成果から明らかにしていた。

ア) Glu が孔辺細胞内の Ca^{2+} 量を増加させた (Glu 受容体の Ca^{2+} チャンネル特性を反映)、イ) Glu 受容体のアンタゴニストが抑制的に、アゴニストが相加的に Glu 依存性の気孔応答に作用した。

ウ) シロイヌナズナ *GLR3.5* および *GLR3.7* の遺伝子破壊系統 *glr3.5*、*glr3.7* が Glu 依存性の気孔閉鎖に非感受性を示した。

また、Glu は病原菌感染時にアポプラストから細胞外に放出されること (Vatsa et al. *Biochimie* 2011)、*PR* 遺伝子等の病害抵抗性遺伝子の発現を誘導すること (Chen et al. *Amino Acids* 2010) が報告されており、病原菌感染における気孔閉鎖シグナルとの接点も注目される。申請者は GLR を介した Glu シグナル伝達機構を解明し、収穫後の植物体の鮮度保持、抗菌作用等の応用研究に繋げるための新たな足掛かりを得たいと考えた。

2. 研究の目的

申請者は、Glu および Gly が、気孔閉鎖の重要なシグナルとして機能すること、また、そのシグナルが特定の Glu 受容体遺伝子を介することを見出していた。本研究は、Glu 受容体から下流のシグナル伝達機構をシロイヌナズナの孔辺細胞の系を用いて明らかにし、収穫後の農産物の鮮度保持、食中毒となる原因菌の気孔感染防除等への応用展開へ向けた基盤研究を確立することを目的とした。

具体的な研究項目として、

- 1) Glu 受容体の遺伝子破壊系統を用いたシグナル伝達経路の機能解析
- 2) 病原菌感染応答シグナルとの相互作用
- 3) 収穫後の農産物の鮮度保持および抗菌効果へ向けた応用研究

を計画した。

3. 研究の方法

本研究では、以下の研究内容を計画した。

- 1) シロイヌナズナ *GLR3.5* および *GLR3.7* を介した Glu シグナル伝達機構の解明
- 2) Glu シグナルによる病害抵抗性機構の誘導と病原菌の気孔感染防御
- 3) 人為的な気孔閉鎖制御による植物体の鮮度保持、抗菌機能付与と効果の検討

具体的には、以下の研究を計画した。

- 1) シロイヌナズナ *GLR3.5* および *GLR3.7* を介した Glu シグナル伝達機構の解明
・既に取得済みの T-DNA 挿入変異体 *glr3.5* および *glr3.7* を用いて、Glu シグナル特異性の更なる追求と、下流のシグナル因子の探索を行う。

- a) *glr3.5;glr3.7* 二重変異体におけるアミノ酸応答と細胞内 Ca^{2+} レベルの変化
二重変異体によりアミノ酸応答における相加的効果を検証する。上記変異体は現在作製中にある。また、既に Yellow *cameleon 3.6* (YC3.6) の過剰発現系統を用いた FRET 法により、Glu が孔辺細胞内の Ca^{2+} レベルを上昇させることを明らかにしている。二重変異体に YC3.6 遺伝子を交配により導入した系統を作製し、注目する GLR が受容体として細胞内 Ca^{2+} レベルの上昇に寄与するかを検証する。

- b) 光応答シグナルとの関連性
GLR は光応答に関与することが Glu 受容体のアンタゴニストを用いた研究から明らかにされている (Lam et al. *Nature* 1998)、光シグナル伝達のハブおよびゲートリングとして機能する *COP1* および *ELF3* の変異体では暗所での気孔閉鎖が抑制される (Mao et al. *PNAS* 2005; Kinoshita et al. *Curr Biol* 2011)、GLR シグナルと光シグナルとのクロストークを模索する上で、これら変異体におけるアミノ酸応答、また、*glr* 変異体における光応答を調査する。

- c) GLR 下流におけるタンパク質リン酸化の関与

SnRK2 プロテインキナーゼの一つである *SRK2E/OST1/SnRK2.6* の機能欠損変異体では、Glu による気孔閉鎖が抑制されることを明らかにしている。そこで、*glr3.5*、*glr3.7* を含め様々な情報伝達因子の変異体でアミノ酸による活性化をゲル内リン酸化法により調査する。また、動物では Glu 受容体の下流に MAP キナーゼが機能すること (Rao et al. *TRENDS in Neuro* 2007)、食中毒原因菌のサルモネラ菌が植物の MAP キナーゼを活性化すること (Schikora et al. *PLoS One* 2008) が報告されている。本研究においてもアミノ酸による MAP キナーゼの活性化を特異的抗体等を用いて調査する。

- d) GLR3.5、GLR3.7 の細胞質側 (C 末端) に結合するタンパク質の検索
動物の Glu 受容体では、PSD-95 というアンカータンパク質が細胞質側に結合し、下流へのシグナルを調節することが知られている (Sattler *et al.* Science 1999)。そこで、GLR3.5 および GLR3.7 の機能調節に関わる因子を探索するため、両タンパク質の細胞質側に結合するタンパク質を酵母ツーハイブリッド法により検索する。

2) アミノ酸シグナルによる病害抵抗性機構の誘導と病原菌の気孔感染防御

・Glu および Gly により病害抵抗性遺伝子 *PR1* の発現が誘導されることを明らかにしていた。この現象がサリチル酸 (SA) の合成もしくは感受性の増加に起因するか、また、注目する GLR を介するかを調査する。

- a) アミノ酸による病害抵抗性遺伝子の発現変化
Glu および Gly 投与による病害抵抗性遺伝子の発現特性 (濃度依存性、経時変化等) を詳細に調査する。
- b) SA 感受性および合成の変異体におけるアミノ酸応答
SA 非感受性変異体 (*npr1* 等)、SA 合成変異体 (*ndr1*, *pad4*, *eds5*, *sid2* 等) における気孔閉鎖のアミノ酸応答を調査する。
- c) アミノ酸による内生 SA 量の変化
Glu および Gly による内生 SA 量の変化を葉、表皮、培養細胞を用いて定量、測定する。
- d) *glr3.5*, *glr3.7* 変異体における病害抵抗性誘導の変化
GLR 遺伝子機能欠損変異体において、アミノ酸による病害抵抗性遺伝子の発現、内生 SA 量の変化を調査する。

3) 気孔閉鎖制御による植物体の鮮度保持、抗菌機能効果の検討

・外生的に投与したアミノ酸による植物体からの水分損失の抑制、耐病性の付与、また、葉の表面に付着した細菌の組織内部への侵入阻止効果を確認する。

- a) アミノ酸による植物体の水分保持効果
Glu、Gly 処理による気孔閉鎖が植物体からの水分の損失に寄与するかを検証する。
- b) アミノ酸による細菌の気孔侵入阻止効果
Glu、Gly 処理が大腸菌等の気孔侵入阻止に寄与するかをゲノム DNA を鋳型とした定量 PCR 法により確認する。また、GFP を発現させた大腸菌を作製し、気孔への侵入を視覚的にモニタリングする系を確立する。

上記 a)、b) とともに野生型と *glr3.5* および *glr3.7* 変異体を用いて比較、検討を行う。

4. 研究成果

本研究ではアミノ酸の一つであるグルタミ

ン酸が、高等植物の気孔閉鎖および病原体に対する抵抗性遺伝子の発現誘導に關与することを生理、遺伝、分子生物学的なアプローチから明らかにした。

本研究を進行する上で、関連するシロイヌナズナグルタミン酸受容体遺伝子 *GLR3.5* および *GLR3.7* について、双方の遺伝子の二重変異体を作成することを目的としていた。これら 2 つの受容体遺伝子は、共に第 2 染色体に座乗しているが、残念ながらタンデムに位置することが判明した (*GLR3.5*: At2g32390, *GLR3.7*: At2g32400)。よって、T-DNA 挿入二重変異体は、作成が困難であることが判明した。そこで、本研究では、*GLR3.5* について深く追求することとした。

GLR3.5 が孔辺細胞内で発現しているか否かを確認するため、シロイヌナズナ野生型コロンビア系統の葉より、孔辺細胞のプロトプラストを採取し、その cDNA を作成した。その cDNA を利用し、*GLR3.5* の発現を RT-PCR により確認したところ、その発現が明確に確認することができた。また、*GLR3.7* についても同様の解析を行い、その孔辺細胞内での発現が確認された。

Glu による病害抵抗性遺伝子 *PR1* の発現誘導に関しては、Glu 濃度依存性があることを定量 PCR 法により明らかにした。更にこの反応に SA を介するか否かが重要な検討項目であったが、SA 欠損変異体である *sid2* および SA 非感受性変異体である *npr1* を用いて詳細な解析を行った。その結果、*sid2*, *npr1* 変異体共に、Glu による *PR1* 遺伝子の発現誘導が顕著に抑制されることが明らかにされた。これらの結果は、Glu が内生の SA 量を上げ、そのシグナルが *PR1* 遺伝子の発現上昇に寄与することを示唆するものである。Glu および Gly による *PR1* 遺伝子の発現はトマトでも同様に認められたことから、この現象が高等植物において普遍性を持つ可能性が示唆される。トマトにおいては、Glu 処理の葉に細胞死と見られる褐変斑が認められた。この現象はシロイヌナズナでは見られなかったことから、トマト特異的と推測される。

上記の結果から、Glu による気孔閉鎖に關しても SA が關与する可能性が浮上した。そこで、*sid2* および *npr1* 変異体を用いて、Glu による気孔閉鎖を調査したところ、両変異体ともに Glu に対して非感受性を示した。これらの結果は、Glu による気孔閉鎖が内生 SA の上昇が起因するものと推測された。

Glu による気孔閉鎖には、ABA シグナル伝達因子でタンパク質リン酸化酵素である *SRK2E/OST1/SnRK2.6* も關与することを T-DNA 挿入変異体を用いて明らかにしてきたが、本研究では野生型ランズバーグ由来で点突然変異体の *ost1-2* についても解析を行った。その結果、*ost1-2* も Glu に対する気孔閉鎖に非感受性を示したことから、確実にこの遺伝子が Glu シグナル伝達に關与することが証明された。

そこで、SRK2E/OST1/SnRK2.6 と SA との相互作用についても模索を行った。T-DNA 挿入変異体である *srk2e* および *ost1-2* 双方に SA を処理したところ、両変異体ともに SA による気孔閉鎖に非感受性を示した。

これらの結果は、SRK2E/OST1/SnRK2.6 が SA シグナル伝達にも関与することを示唆するものである。そこで、SRK2E/OST1/SnRK2.6 と SA シグナル伝達の中心因子である NPR1 とが細胞内で複合体を形成するかを BiFC 法により検討したところ、両者は核内で複合体を形成する結果を得た。最近の研究では、SRK2E/OST1/SnRK2.6 は ABA シグナル因子以外のシグナル因子とも相互作用する可能性が指摘されている。その点で今回得られた結果は非常に新規性が高く、今後、更なる発展が期待される。

Glu による気孔閉鎖および病害抵抗性遺伝子の発現誘導に SA レベルの上昇が関与するという知見が得られたが、Glu が SA 合成系遺伝子である *ICS1* の発現誘導に関わるかについて調査を行った。その結果、Glu は *PR1* の発現誘導よりも早い時間帯で *ICS1* の発現を一過的に上昇することが明らかとされた。Glu が *ICS1* の発現をどのように調節するかが今後の重要な課題である。

また、この過程に Glu 受容体が関与するかを把握するため、グルタミン酸受容体アンタゴニストである AP5 および DNQX を用いた解析を行った。その結果、これら 2 つのアンタゴニストは、Glu による *PR1* の発現を抑制することが明らかにされた。一方、Glu 受容体のアゴニストである D-Ser についても同様な解析を行ったが、予想に反してアンタゴニストと同様な効果を示した。動物では、アゴニストがアンタゴニストのように機能する場合があることから（パーシャルアゴニスト）、今後の発展が期待される。Glu 受容体による関与については、機能欠損変異体を用いることが期待されるが、*PR1* 遺伝子発現解析においては、他のシグナル因子と同様、冗長性を考慮する必要がある。複数の *GLR* 遺伝子が多面的に作用する可能性が考えられることから、解析には多重変異体の作出が必要とされる。今後、変異体を作成し、詳細な解析を進めていきたい。

Glu、Gly 以外のアミノ酸においても、*PR1* 遺伝子の発現誘導の有無を検討しており、プロリン、セリン、システインにその効果が確認された。システインによる効果は顕著であり、Glu の約 20 倍程度の誘導活性が認められた。更にシステインを処理した葉に、細胞死と見られる褐変斑が認められた。

Glu による気孔閉鎖には、タンパク質リン酸化が必要であることをタンパク質リン酸化酵素阻害剤である K252a および staurosporine を用いて明らかにした。更に、EGTA や LaCl_3 を用いた解析により、この気孔閉鎖には Ca^{2+} が必要であることが明らかにされていたが、今回、カルシウム依存性プロテ

インキナーゼの一つである CPK6 が Glu シグナル伝達カスケードとして機能することを T-DNA 挿入変異体 *cpk6* を用いて明らかにした。更に、陰イオンチャネルである SLAC1 の機能欠損変異体も Glu による気孔閉鎖に非感受性を示した。

光シグナル伝達因子である ELF3 について、その機能欠損変異体 *elf3-1* を用いて Glu による気孔閉鎖応答を調査した。その結果、*elf3-1* 変異体は Glu に対して非感受性を示した。この変異体は暗所下での気孔閉鎖に対しても非感受性を示すことから、Glu が暗所下における気孔閉鎖シグナルに関与する可能性が推測された。そこで、*glr3.5* 変異体における暗所下での気孔閉鎖を調査したが、野生型と同様の応答を示した。Glu は暗所から明所における気孔開口に関しても阻害効果を示すことが明らかにされた。

残念ながら本研究では応用的な研究に対して多くの時間を確保することができなかったが、外生的な Glu および Gly の投与が植物体からの水分損失を防ぐ効果があることがシロイヌナズナを用いた解析から明らかにされた。特に根からこれらのアミノ酸を取り込ませることが効果的であり、Glu は 10 μM の ABA と同等、Gly はそれ以上に気孔を閉鎖する効果が認められた。Glu と比較して Gly は高濃度でも人体への影響が低く、将来的に収穫後の農産物の鮮度保持として応用するための基礎が得られたと考えている。

Glu は動物の神経伝達シグナルとして重要な機能を果たしているが、その中心として作用する Glu 受容体 (*iGluR*) が植物のゲノムにも存在することが 2000 年代から進められたゲノムプロジェクトにより、多くの植物種で明らかにされた。しかしながら、植物体で Glu 受容体が実際に機能するか、また、どのような生理現象に作用するかについてはこれまで詳細に明らかにされていなかった。しかしながら、ここ数年、急速にその機能解析に関する報告が増加している。本研究にて得られた成果は、植物と動物間におけるシグナル伝達因子の進化的共通性を気孔閉鎖、SA シグナル伝達の機能面から具体的な形で証明し、この分野の研究に対する将来的な問題提起をすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

・ Yoshida R, Kamizono N, Shichiri Y, Shimatani T, Miyata F, Iwai S, Possible Roles of Glutamate Receptor-like Genes in Guard Cell Signaling, 日本植物生理学会, 2012 年 3 月 京都産業大学(京都).

・ 吉田理一郎, 鶴田寿彦, 岩井純夫, グルタミン酸を介した遺伝子発現および気孔閉鎖

応答に関わるシグナル伝達，日本植物学会，
2013年9月 北海道大学(札幌)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 理一郎 (RIICHIRO YOSHIDA)
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号：70301786

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし