

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24114009

研究課題名(和文)細胞外情報処理空間における細胞間・生物間情報伝達機構の解析

研究課題名(英文)Analyses of intracellular signaling in plant

研究代表者

澤 進一郎(Sawa, Shinichiro)

熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・教授

研究者番号：00315748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 101,600,000円

研究成果の概要(和文)：物理的刺激や、病原菌・害虫感染などの外界からの刺激や、主に核内で起こる内的な発生プログラムに従って生じた局所的なシグナルを、植物がどのように解釈・統合し、器官・個体レベルでの生長制御に繋げていくのか、その分子機構は殆どわかっていなかった。そこで本研究では、細胞壁を、細胞間・生物間でおこる様々な情報のやりとりを仲介・統合する機能を持った細胞外機能空間と捉え、その植物の成長制御における役割を明らかにする。そのため、植物感染性線虫の感染機構を対象とした植物病害と、植物メリステムの活性制御に関わる内生プログラムという、異なる刺激が関わる、植物の生長制御に重要なシグナルに関わる分子機構の解明を行った。

研究成果の概要(英文)：Plant cell wall is regarded as not only a dynamic structure responsible for the regulation of plant growth and differentiation, but as an intelligent system capable of processing information from the environment. To date, we do not understand the molecular mechanisms that render the cell wall capable of mediating information processing and self-regulation.

In this research, we examined importance of plant cell wall function in the aspect of plant parasitic nematode infection mechanisms and of regulation of plant meristem. We have identified nematode attractant. Further, we have also found many nematode effector protein and plant factors responsible for nematode infection to plants. On the other hand, we have identified downstream of CLE peptides as a signaling molecule which regulate plant meristem activity. Further, CUC signaling pathway was also examined.

研究分野：植物分子遺伝発生学

キーワード：シロイヌナズナ 細胞外 細胞壁 ペプチド 植物感染性線虫

1. 研究開始当初の背景

異種生物間には、捕食-被捕食関係、共生関係、寄生-被寄生関係などのような複雑多岐にわたる関係でつながっており、これらの関係の中で生態系が成立している。生物間相互作用の研究は生物学の中でも最も本質的な問題の一つであるが、その中でも特に多細胞動植物の相互作用は生物進化学的研究にもつながる重要なテーマとなり得る。これまでに、生態学的に訪花昆虫と顕花植物を材料とする送粉研究がなされ、進化学的側面からも注目されてきた。また、農業分野でも害虫と作物という観点で、防虫を目的とした研究が数多くなされてきている。しかし、分子レベルでの動植物相互作用に関する解析がほとんど無いのが現状であった。

本研究では、年間数十兆円の農業被害をもたらす植物感染性線虫を用いて、細胞外インテリジェント空間が果たす役割に注目し、植物への線虫感染過程に関する分子遺伝学的研究を行った。実験材料として、主にシロイヌナズナとサツマイモネコブセンチュウを用い、キタネコブセンチュウも用いることでセンチュウ感染の分子機構における一般性の検証も行った。

センチュウが植物に感染する際、様々なイフェクタータンパク質を植物細胞に注入し、植物細胞を再分化させ、自分の食細胞として利用することが明らかとなっている。また、このイフェクタータンパク質にはCLEペプチドホルモンが含まれていると考えられている。CLE遺伝子は全ての植物がもち、植物体内では発生過程を通じて、幹細胞の活性制御を担っているが、動物界では唯一、植物感染性線虫のみが、植物からの水平移動によりCLE遺伝子を獲得したとも考えられ

ている。一方、我々は、植物側のCLE受容体を既に2つ単離、報告しており、CLE受容体の突然変異体は線虫感染に耐性を示すことも明らかにしてきた。

そこで、本研究では、CLE遺伝子を中心に、異種生物間相互作用の研究を行った。そのなかで、全ての植物細胞を取り囲む細胞外マトリクスである細胞壁を、細胞間・生物間でおこる様々な情報のやりとりを仲介・統合する機能を持った細胞外インテリジェント空間と捉え、その空間の、異種生物間相互作用(線虫感染過程)と、その後の成長制御における役割について調査した。そのために、植物病害と内生プログラムという異なる刺激が関わる、植物の生長制御に重要な分裂組織の活性調節をアウトプットとした現象をモデル系とし、新規の解析概念、解析手法の確立と、それを基にした細胞外インテリジェンスの機能解明を目指した。

2. 研究の目的

細胞外空間を舞台とした線虫感染機構について、線虫が植物に誘引される機構(誘引物質の単離・解析)を行う事を目的とした。線虫が植物に誘引された後、植物体内侵入するが、侵入後に、どのように感染細胞まで到達するのか、また、感染過程において植物細胞内でどのようなシグナル伝達系が機能するかについて、解析することを目的とした。さらに、その線虫による植物シグナルの篡奪の一方で、植物がどのように防御応答を示すのか、さらに、線虫感染による植物細胞再分化、成長制御がどのように起こるのか、という一連の過程において全体的な理解を得るために、それぞれのステップにおいて、網羅的解析を行う事を目的とした。突然変異体を用いた分子遺伝学、線虫のイフェクタータンパク質のプロテオミクス、誘引物質探索のためのケミカルスクリーニング、突然変異体のゲノム解析を含めたオーム解析を駆使し、多次元

解析を行い、生物間相互作用の一端を明らかにする事も目標とした。

3. 研究の方法

実験材料として、モデル植物であり分子解析のリソースがそろっているシロイヌナズナを用いた。シロイヌナズナの植物体では、遺伝子操作、突然変異体の利用などを容易に行う事ができる。また、ダイズやトマトも一部利用した。

生物間相互作用の多細胞動物としては、サツマイモネコブセンチュウを主に用い、シスト線虫など、その他の線虫も比較のために一部用いた。

研究内容として、以下のように、大きく2つの課題に分けて、解析を行った。

1 ; 線虫感染過程と防御応答の解析

まず、線虫感染時の植物防御応答に関する解析を行った。さらに、線虫誘引物質の探索を行った。一方、線虫感染後、植物細胞内での線虫感染シグナルの解析も行った。これらの解析に関して、植物個体を用いた分子遺伝学的解析・生化学的解析・細胞性伝導学的解析を行った。

2 ; 内生プログラムに応じた分裂組織の活性調節機構

この研究のために、まず、CLEペプチドホルモンを中心とした細胞間情報伝達機構の解析を行った。さらに、幹細胞形成機構の解明のために、CUC 遺伝子の解析も行った。

4. 研究成果

1 ; 線虫感染過程と防御応答:

エフェクター蛋白質を利用した感染防御機構の解析;最初に、エフェクター因子のプロテオーム解析を行った。このことにより、15 個の候補を得た。

また、プロテオームにより得られた線虫側の因子 MSP7 を過剰発現すると、植物細胞において、免疫応答に関わる遺伝子発現が抑制

されることが明らかとなった。このことから、MSP7 が、植物免疫を抑制し、線虫の感染を促進させていることが示唆される。

さらに、エフェクター因子の MJD15 は、酵母ツーハイブリッド法により、植物の MAPKKK と結合することが明らかとなった。MAPKKK である ANP1, ANP2 は、MJD15 と相互作用するだけで無く、突然変異体は、線虫感染時に形成される巨大細胞の形成不全を起こすことがわかった。さらに、ANP1, ANP2 の下流因子と考えられている MKK6 (MAPKK), MPK4 (MAPK), MAP65-3 も、突然変異体では巨大細胞の形成不全を起こした。これらのことから、線虫のエフェクター因子 MJD15 は、植物の MAPK カスケードを利用して、巨大細胞の形成を制御していることが示唆された。

植物が分泌する線虫誘引物質の解析;シロイヌナズナの種皮細胞壁成分である、種子ムシゲルに線虫誘引活性があることが明らかとなった。特に多糖が線虫誘引に必須である事が明らかとなった。細胞壁が線虫感染のインターフェースとなり、細胞壁成分が、植物-動物のシグナルになっていることを明らかにした。

一方、ケミカルライブラリースクリーニングにより、約 6000 種の化合物をスクリーニングした。本スクリーニングには、PF-127 ゲルを用いて、線虫誘引活性を評価した。アミノプロピルアミノ基を持つ化合物に線虫誘引活性が有ることを明らかにした。

さらに、直接的に線虫が植物の根を認識するために利用している根の誘引物質を同定するために、ダイズなどを用いて、根端部から水抽出物を準備し、PF-127 ゲルによる誘引活性の評価を行い、精製を開始した。現在、誘引物質の同定には至っていないが、その化学的性質は明らかとなった。

2 ; 内生プログラムに応じた分裂組織の活性調節機構:

CLE ペプチドのシグナル伝達系の解析 ;
 CLE ペプチド耐性変異体の原因遺伝子として
 PUB4 (Kinoshita et al., Development), BAM1
 (Shimizu et al., New Phytologists), AGB1
 (Ishida et al., EMBO rep.) を報告した。
 また、現在、細胞質型キナーゼをコードする
 CLEN3 を単離し、解析を継続中である。さら
 に、シロイヌナズナに 32 個ある CLE 遺伝子
 の突然変異体の表現型を観察するために、全
 ての CLE 遺伝子の突然変異体を、CRISPR 法を
 用いて作成した。このことにより、cle3 突然
 変異体では、線虫感染抵抗性を示すことが明
 らかとなった。その受容体と考えられる clv1
 は、やはり線虫感染抵抗性を示すため、
 CLE3-CLV1 シグナル伝達系は、線虫感染効率
 を成業することが示唆された。また、CLV1 遺
 伝子発現は根ではほとんど無く、感染が進む
 に従って、mRNA 発現量は減少することもわか
 った。一方で、茎頂分裂組織の CLV1 遺伝子
 発現は維持されていた。これらのことから、
 根で線虫感染を認識した植物が CLE3 を発現
 し、システムックに、根から茎頂部に異動し、
 茎頂部の CLV1 がそれを受容し、さらに、茎
 頂部から根へと二次シグナルが異動し、根で
 の線虫感染効率を制御することが示唆され
 た。

CUC 遺伝子の解析 ; シュートの幹細胞形
 成に働く転写因子 CUC1・CUC2・CUC3 につい
 て、主要な標的遺伝子である *STM* との相互作
 用を明らかにするとともに、心皮の形成や花
 序分裂組織、花茎の形成など様々な発生場
 面における多様な役割を明らかにした。また、
 心皮の後天的融合過程における接着面の原
 表皮細胞の形態解析から、融合に伴う遺伝子
 発現の変化と細胞壁成分の特徴を明らかに
 した。

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 31 件 : 全て査読有り)

1. Takagi, D., Amako, K., Hashiguchi, M., Fukaki, H., Ishizaki, K., Goh T., Fukao, Y., Sano, R., Kurata, T., Demura, T., Sawa, S., and Miyake C. (2017) Chloroplastic ATP synthase builds up proton motive force for preventing reactive oxygen species production in photosystemI. Plant J. In Press.
2. Li, B., Kamiya, T., Kalmbach, L., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Shigenobu S., Sawa, S., Danku, J., Salt, D., Geldner, N., and Fujiwara, T. (2017) Role of LOTR1 in nutrient transport through organization of spatial distribution of root endodermal barriers. Curr. Biol. 27, 758-765
3. Tong, W., Imai, A., Shigenobu S., Yamaguchi, K., Hasebe, M., Sawa, S., Motose, H., and Takahashi, T. (2016) Polyamine resistance is increased by mutations in a nitrate transporter gene NRT1.3 (AtNPF6.4) in Arabidopsis thaliana. Frontiers in Plant Sci. 7.834.
4. Bowman, J. L., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M. A., Berger, F., Dolan, L., Haseloff, J., Ishizaki, K., Kyozuka, J., Lin, S., Nagasaki, H., Nakagami, H., Nakajima, K., Nakamura, Y., Ohashi-Ito, K., Sawa, S., Shimamura, M., Solano, R., Tsukaya, H., Ueda, T., Watanabe, Y., Yamato, K. T., Zachgo, S. and Kohchi, T. (2016) The naming of names: guidelines for gene nomenclature in Marchantia. Plant Cell Physiol. 57, 257-261.
5. Yamaguchi, Y., Ishida, T., and Sawa, S. (2016) CLE peptides and their signaling pathways in plant development. J. Exp. Bot. 67, 4813-4826.
6. Hasegawa, J., Sakamoto, Y., Nakagami, S., Aida, M., Sawa, S., and Matsunaga, S. (2016) Three-dimensional Imaging of Plant Organs Using a Simple and Rapid Transparency Technique. Plant Cell Physiol. 57, 462-472.
7. Teh, O. K., Hatsugai, N., Tamura, K., Fuji, K., Tabata, R., Yamaguchi, K., Shingenobu, S., Yamada, M., Hasebe, M., Sawa, S., Shimada, T. & Hara-Nishimura, I. . BEACH-domain proteins act together in a cascade to mediate vacuolar protein trafficking and disease resistance in arabidopsis. Molecular Plant. 8, 389-398. 10.1016/j.molp.2014.11.015
8. Hida, H., Nishiyama, H., Sawa, S., Higashiyama, T., Arata, H. (2015) Chemotaxis assay of plant-parasitic nematodes on a gel-filled microchannel

- device. *Sensors and Actuators B* 221,1483-1491
9. Shimizu, N., Ishida, T., Yamada, M., Shigenobu, S., Tabata, R., Kinoshita, A., Yamaguchi, K., Hasebe, M., Mitsumasu, K., and Sawa, S. (2015) BAM 1 and RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 constitute a signaling pathway and modulate CLE peptide triggered growth inhibition in Arabidopsis root. *New Phytologists* 208, 1104-1113.
 10. Kinoshita, A., Seo, M., Kamiya, Y., and Sawa, S. (2015) Mystery in genetics: PUB4 gives a clue to the complex mechanism of CLV signaling pathway in the shoot apical meristem *Plant Signaling & Behavior* 10:6, e1028707
 11. Nishiyama, H., Ngan, B. T., Nagakami, S., Ejima, C., Ishida, T., and Sawa, S. (2015) Protocol of root-knot nematode culture by hydroponic system and nematode inoculation to Arabidopsis. *Nematological research*, 45, 45-50.
 12. Kinoshita, A., Hove, C.A., Tabata, R., Yamada, M., Shimizu, N., Ishida, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Takebayashi, Y., Iuchi, S., Kobayashi, M., Kurata, T., Wada, T., Seo, M., Hasebe, M., Bilou, I., Fukuda, H., Scheres, B., Heidstra, R., and Sawa, S. (2015) A plant U-box protein, PUB4, regulates asymmetric cell division and cell proliferation in the root meristem. *Development* 142, 444-453.
 13. Mitsumasu, K., Nishiyama, H., Nakagami, S., Kanemaru, Y. and Sawa, S. (2015) Molecular mechanisms of parasitism of plant-parasitic nematodes at apoplast. *Jap. J. Pesticide Sci.*, 40, 44-51
 14. Motomitsu A., Ishida, T., and Sawa, S. (2015) Function and molecular mechanisms of peptide function in plant. *Essays in biochemistry*. 58, 115-131.
 15. Ferjani, A. Hanai, K., Gunji, S., Maeda, S., Sawa, S., and Tsukaya, H. (2015) Balanced cell proliferation and expansion is essential for flowering stem growth control. *Plant Signaling & Behavior*. 10:3, e992755
 16. Maeda, S., Gunji, S., Hanai, K., Hirano, T., Kazama, Y., Ohbayashi, T., Abe, T., Sawa, S., Tsukaya, H., and Ferjani, A. (2014) The Conflict between Cell Proliferation and Expansion Primarily Affects Stem Organogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. 55, 1994-2007
 17. Ishida, T., Tabata, R., Yamada, M., Aida, M., Mitsumasu, K., Fujiwara, M., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Higuchi, M., Tsuji, H., Shimamoto, K., Hasebe, M., Fukuda, H., and Sawa, S. (2014) Heterotrimeric G proteins control stem cell proliferation through CLAVATA signaling in Arabidopsis. *EMBO rep*. 15.1202-1209
 18. Nishiyama, H., Nakagami, S., Todaka, A., Arita, T., Ishida, T., and Sawa, S. (2014) Light-dependent green gall formation induced by *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 16, 889-893
 19. Bidadi, H., Matsuoka, K., Sage-Ono, K., Fukushima, J., Pitaksaringkarn, W., Asahina, M., Yamaguchi, S., Sawa, S., Fukuda, H, Matsubayashi, Y., Ono, M., Satoh, S. (2014) CLE6 expression recovers gibberellin deficiency to promote shoot growth in Arabidopsis. *Plant J*. 78, 241-252.
 20. Araya, T., Miyamoto, M., Mibowo, J., Suzuki, A., Kojima, S., Tsuchiya, Y. N., Sawa, S., Fukuda, H., Wiren, N., Takahashi, H. (2014) CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 2029-2034
 21. Tabata, R., and Sawa, S. (2014) The small secreted peptides in plant development. *Frontiers in Plant Sci.* 04 July; doi: 10.3389/fpls.2014.00311.
 22. Tabata, R. and Sawa, S. (2014) Maturation processes and structures of secreted peptides in plants. (2014) *Frontiers in Plant Science* 04 July; doi: 10.3389/fpls.2014.00311.
 23. Tominaga-Wada, R., Nukumizu, Y., Wada, T., Sawa, S., and Tetsumura, T. (2013) CLAVATA3-like genes are differentially expressed in grape vine (*Vitis vinifera*) tissues. *Journal of Plant Physiology*. 170, 1379-1383.
 24. Tamaki, T., Betsuyaku, S., Hamasaki, R., Fujiwara, M., Fukao, Y., Fukuda, H., and Sawa, S. (2013) CLE19 peptide activity is regulated by SUPPRESSOR OF LLP1 1-mediated C-terminal processing in endosomes in Arabidopsis. *Plant J*. 6, 970-981
 25. Jewaria, P. K., Hara, T., Tanaka, H., Kondo, T., Betsuyaku, S., Sawa, S., Sakagami, Y., Aimoto S. and Kakimoto, T. (2013) Differential Effects of Peptides Stomagen, EPF1, and EPF2 on Activation of the MAP Kinase MPK6 and the SPCH Protein Level. *Plant Cell Physiol*. 54, 1253-1262

26. Tabata, R., Kamiya, T., Shigenobu S., Yamaguchi K., Yamada, M., Hasebe, M., Fujiwara, T., and Sawa, S. (2013) Identification of an EMS-induced causal mutation in a gene required for boron-mediated root development by low-coverage genome re-sequencing in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*. 8. e22534
27. Replogle, A., Wang, J., Paolillo, V., Smeda, J., Kinoshita, A., Durbak, A., Tax, F., Wang, X., Sawa, S., and Mitchum, M. G. (2013) Synergistic Interaction of CLAVATA1, CLAVATA2, and RECEPTOR-1 LIKE PROTEIN2 KINASE 2 in Cyst Nematode Parasitism of Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact*. 26. 87-96
28. Miyawaki, K., Tabata, R., and Sawa, S. (2013) Evolutionarily conserved CLE peptide signaling in plant development, symbiosis, and parasitism. *Curr. Opin. Plant Biol*. 16. 598- 606.
29. Yamada, M., and Sawa, S. (2013) The function of CLE and other plant peptide hormones in root development. *Curr. Opin. Plant Biol*. 16. 1-6.
30. Ejima, C, Uwatoko, T, Ngan, B. T., Honda, H., Shimizu, N., Kiyohara, S., Hamasaki, R., and Sawa, S. (2012) SNPs of CLAVATA receptors in tomato, in a context of rootknot nematode infection. *Nematological Research*. 2. 35-40
31. Kiyohara, S., and Sawa, S. (2012) The role of CLE peptides in Arabidopsis development and nematode parasitism. *Plant Cell Physiol*. 53. 1989-1999

[学会発表](計13件)

1. 2017.3.18 澤進一郎 “植物感染性線虫の誘引物質の探索” 日本農芸化学会 2017年度大会 京都女子大
2. 2017.3.20 澤進一郎 “植物感染性線虫の感染過程における細胞壁成分の機能と役割” 第58回日本植物生理学会年 鹿児島大
3. 2016.8.29 “EFC7 and EFC15 of *Meloidogyne incognita* are responsible for infection steps in Arabidopsis” 32nd Symposium European Society of Nematologists, Porto, Portugal
4. 2016.6.22 “SOL1 and other peptidases are responsible for CLE peptide processing mechanisms” 22nd International Conference on Plant Growth Substances, Tront, Canada
5. 2015.3.19 澤進一郎 “線虫感染過程における CLAVATA シグナル伝達系の関与”

- 第56回日本植物生理学会年会 岩手大
6. 2014.3.15 澤進一郎 “植物感染性線虫の感染分子機構の解析” 日本農薬学会 京都大
7. 2014.3.19 澤進一郎 “線虫感染過程における CLAVATA シグナル伝達系の関与” 第55回日本植物生理学会年会 富山大
8. 2014.5.30 SAWA “Comprehensive genetic analysis of CLV3 downstream pathway in Arabidopsis.” 第47回日本発生生物学会 WINC AICHI
9. 2014.9.16 澤進一郎 “ネコブセンチュウの誘引物質の解析” 2014年度日本線虫学会大会 文科省研究交流センター
10. 2013.7.30 S.SAWA “Analysis of CLE peptide signaling in Arabidopsis thaliana” 21ST Conference of the International Plant Growth Substances Association Vancouver, Canada
11. 2013.4.12 澤進一郎 “シロイヌナズナの幹細胞活性を規定する CLV3 ペプチドホルモンシグナル伝達因子の順遺伝学による網羅的探索” 日本生化学会大会 パシフィコ横浜
12. 2013.12.4 澤進一郎 “CLE peptide-LRR-RLK 型受容体による根の伸長制御機構の解析” 第36回日本分子生物学会年会 神戸
13. 2012.9.16 澤進一郎 “細胞外インテリジェント空間における細胞間・生体間情報伝達機構の解析” シンポジウム「植物の細胞外インテリジェントシステム」という新しい概念 日本植物学会第76回大会 兵庫県立大

[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

<http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/~sawa/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤進一郎 (SAWA SHINICHIRO)

熊本大学大学院先端科学研究部(理)・教授

研究者番号: 00315748

(2)研究分担者

相田光宏 (AIDA MITSUHIRO)

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号: 90311787

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし