

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07379

研究課題名(和文) 植物の病害抵抗性を支配するシグナル物質の活性化の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism of activation of signal compounds regulating resistance against pathogen in plants

研究代表者

松井 博和 (Hirokazu, Matsui)

北海道大学・農学研究院・名誉教授

研究者番号：90109504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物ではシグナル物質の多くは配糖化により不活性化され、加水分解により活性化される。本研究ではツベロン酸(TA)配糖体を加水分解するイネβ-グルコシダーゼTAGG2がサリチル酸グルコシド(SAG)にも高い活性を持つことに注目し、SAG分解に重要なアミノ酸残基を特定し、アポプラストへの局在を明らかにした。TAGG2過剰発現イネではTA量の増加は見られたが、SA量の明確な増加は見られなかった。いもち菌接種試験では、TAGG2過剰発現体において野生型よりも病斑形成が促進されることが明らかになった。シロイヌナズナホモログはSAGよりもラミナリオリゴ糖などオリゴ糖基質によく作用した。

研究成果の概要(英文)：In plants, physiologically active compounds are inactivated by glycosylation and activated by hydrolysis of glycosides. In this study, rice beta-glucosidase TAGG2, which has high activity towards both tuberonic acid (TA) beta-glucoside and salicylic acid beta-glucoside (SAG), was biochemically and physiologically characterized. Important amino acid residues involved in recognition of SAG were determined through site-directed mutagenesis, and localization of TAGG2 to apoplast was confirmed using transgenic rice expressing a fusion protein of GFP and TAGG2. In transgenic rice expressing TAGG2, over-accumulation of TA was observed but SA level was not changed significantly. Blast infection analysis suggested overexpression of the TAGG2 gene negatively regulated the resistance against pathogens. Homologous enzymes in Arabidopsis had high activity towards oligosaccharide substrates such as laminarioligosaccharide rather than SAG.

研究分野：応用生物化学

キーワード：β-グルコシダーゼ ツベロン酸 ジャスモン酸 サリチル酸 イネ シロイヌナズナ

## 1. 研究開始当初の背景

植物においてシグナル物質として働く化合物の多くは配糖化されることにより不活性化され、植物体内に蓄積される。このような配糖体は必要時に  $\beta$ -グルコシダーゼにより加水分解され、活性化される。一方、シロイヌナズナには 48、イネには 40 もの  $\beta$ -グルコシダーゼ様遺伝子が存在しており、配糖体と酵素の関係を結び付けることは困難である。我々は、植物の生長や病傷害ストレス応答を制御する植物ホルモン、ジャスモン酸の水酸化物ツベロン酸の配糖体 (TAG) を加水分解する 2 つのイネ  $\beta$ -グルコシダーゼアイソザイム TAGG1 と TAGG2 をイネ植物体から単離・同定した。これらのうち TAGG2 は TAG よりもむしろサリチル酸グルコシド (SAG) に高い加水分解活性を持つ。サリチル酸を配糖化する酵素は既に同定されているが、SAG 加水分解酵素は未知のため TAGG2 の SAG 分解酵素としての機能に興味を持たれた。興味深いことに TAGG1 と TAGG2 は明確に異なる基質特異性を持つが、アミノ酸配列は 85% 同一であり、局所的な構造の違いにより異なる基質特異性を持つと予想された。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の 4 点について明らかにすることを目的とした。1) SAG 加水分解におけるイネ TAGG2 の生理学的機能：TAGG2 遺伝子を過剰発現あるいは発現抑制したイネ形質転換体における SAG および SA の内生量の解析。細胞内・組織における TAGG2 の局在性の解析。2) イネ TAGG2 における SAG への高い活性に重要な構造因子：TAGG1 と TAGG2 のアミノ酸配列の比較に基づき、変異型 TAGG2 を作製・解析して SAG への高い特異性に重要なアミノ酸残基を特定。3) シロイヌナズナにおける SAG 加水分解酵素の決定：TAGG2 とアミノ酸配列の類似性が高いシロイヌナズナの  $\beta$ -グルコシダーゼの基質特異性を検討。4) SAG 加水分解酵素遺伝子を利用した植物の病害抵抗性の増強：SAG 加水分解酵素遺伝子を過剰発現させ、SA 内生量を増加させることで病害抵抗性の向上を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) TAGG2 変異酵素の解析

TAGG2 の結晶構造と TAGG1 と TAGG2 の配列の比較に基づき、基質結合部位に存在する TAGG2 の Trp181, Asn186 および His252 に注目し、それぞれ TAGG1 型の Leu, Ala および Asn に置換した変異酵素 W181L, N186A およ

び H252N を作製した。変異酵素は、野生型酵素と同様に *Phichia pastoris* による組換え酵素生産系を利用して生産し、Ni アフィニティークラムクロマトグラフィーにより精製し、解析に用いた。各変異酵素の各種基質に対する加水分解速度を測定し、ミカエリスメンテン式に回帰することで速度パラメータを決定した。SAG と TAG についてはそれぞれ有機合成により調製し、その他の配糖体、オリゴ糖については市販品を使用した。

### (2) シロイヌナズナにおける TAGG2 ホモログの解析

OsTAGG2 とアミノ酸配列同一性が高いシロイヌナズナ  $\beta$ -グルコシダーゼ様タンパク質 AtBGLU12, AtBGLU13, AtBGLU15, AtBGLU16 および AtBGLU17 の大腸菌組換えタンパク質を生産した。N 末端側にチオレドキシシタグと His タグを付加した組換えタンパク質を大腸菌 *Origami2(DE3)* を用いて生産し、Ni アフィニティークラムクロマトグラフィーにより精製した。各種基質に対する加水分解速度をミカエリスメンテン式に回帰し、速度パラメータを決定した。

### (3) TAGG2 の細胞内・組織局在性の解析

GUS を用いた組織局在性の解析では、TAGG2 遺伝子のプロモーター領域を GUS 遺伝子に連結したコンストラクトを作製した。イネゲノムより TAGG2 遺伝子の上流 2,000 bp の領域をプロモーター領域として PCR により増幅した。この増幅断片と GUS 遺伝子を連結し、pUBIN-ZH2 バイナリーベクター (Miki ら, 2004; Miki ら, 2005) にクローニングした。細胞内局在性の解析では、TAGG2 の C 末端側に GFP を連結させた融合タンパク質のコンストラクトを作製した。発現プラスミドには pUBIN-ZH2 バイナリーベクターを用いた。これらの発現プラスミドをアグロバクテリウムバクテリウムを介してイネ (ユキヒカリ) に導入し、ハイグロマイシン耐性に基づき形質転換体を選抜し、実験に用いた。

GUS 染色では、7 日間生育させた植物体を氷上で 15 分間 90% アセトンに浸漬した後、GUS 染色液 (100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 10 mM EDTA, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 0.1% Triton X-100, 0.5 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide) に浸漬し、減圧下に 2 時間保持することで反応液を植物試料に浸透させた。37°C の暗所で 2 日間反応させ、70% エタノール中にて試料に付着した反応液を洗浄し、脱色液 (エタノール/酢酸 = 6/1) 中にて脱色を行った。脱色した組織を実体顕微鏡および光学顕微鏡を用いて観察した。

GFP 蛍光の観察では、発芽させた TAGG2-GFP 過剰発現体および野生株 (播種後 3 日目) の主根の細胞を共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。原形質分離は、

40% マンニトール溶液を組織に添加することで誘導した。

#### (4)TAGG2 発現量を改変した形質転換イネの解析

TAGG2 過剰発現株の作製では TAGG2 をユビキチンプロモーター下流に連結して調製した。バイナリーベクター pUBIN-ZH2 を使用した。TAGG2 発現抑制には RNAi を利用した。すなわち、TAGG2 の 3'UTR 領域を含む約 300 bp の断片の増幅を pANDA バイナリーベクターへにクローニングした。調製したプラスミド DNA をアグロバクテリウムバクテリウムを介してイネ (ユキヒカリ) に導入した。得られた形質転換体における TAGG2 発現量を Smart Cycler II System (タカラバイオ) を用いたリアルタイム PCR により測定し、各形質転換体を評価した。

植物ホルモン量の定量を以下のように行った。人工気象器で 7 日間生育させた野生株、TAGG2 過剰発現株および発現抑制株を地上部と地下部に分けて採取し、植物ホルモン類の抽出と精製を行った。採取した植物材料を秤量した後、液体窒素中で凍結し、ハサミを用いて液体窒素中で粉砕した。エタノール 20 mL に浸漬し、4°C に 24 時間静置して植物ホルモン類を抽出した。内部標準溶液 20  $\mu$ L を加えた後、ろ紙でろ過して植物体を取り除き、減圧遠心濃縮器を用いて得られたろ液を減圧下で乾固させた。80%メタノール 2 mL を加えて乾固物を溶解し、全量を Bond Elut C18 cartridge column 1.5 mL (Agilent Technologies) に供した。容器を 80 % メタノール 2 mL で洗いこみ、洗浄液もカラムに供した。この洗浄を計 2 回行った。カートリッジカラムからの溶出液 (6 mL) を回収し、減圧遠心濃縮器を用いて減圧下で乾固させた。80% メタノール 100  $\mu$ L に溶解し、UPLC-MS/MS 分析用試料とした。植物ホルモン類は、UPLC-MS/MS (Acquity UPLC system, Waters および Micromass Quattro Premier tandem quadruple mass spectrometer, Waters) により定量した。カラムに Acquity ethylene-bridged (BEH) C18 column (1.7  $\mu$ m, 2.1 i.d.  $\times$  100 mm, Waters) を用い、カラム温度を 37°C とした。

いもち菌摂取試験を以下のように行った。イネ野生株、TAGG2 の過剰発現株および発現抑制株のそれぞれ第 5 葉を蓋付き容器内にて、水で浸したペーパータオルの上に敷き並べた。チップ (Corning) を葉の表面に押し付けて傷をつけながらいもち病菌胞子懸濁液 3  $\mu$ L を滴下した。蓋をした容器の上からアルミ箔をかぶせて遮光し、25°C の暗所に 24 時間保持して、いもち病を感染させた。その後、アルミ箔を外し 4 日間人工気象器内で培養した。人工気象器の設定は、温度 25°C、湿度 60%、光度 3.5 klux の連続光とした。培養後、イネの葉の表面をスキャナー (GT-X770; セイコーエプソン) を用いて、解像度 720 dpi で

スキャンし、罹病性病斑面積を ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health) を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1)TAGG2 変異酵素の解析

TAGG2 変異酵素 W181L, N186A および H252N を解析した。W181L と N186A の p-ニトロフェニル  $\beta$ -D-グルコシド (pNPG) に対する  $k_{cat}/K_m$  は野生型酵素 (WT) のそれぞれ 48% および 68% であったが、これらの TAG および SAG に対する活性は WT の 3% 以下であった。H252N では pNPG および TAG に対する  $k_{cat}/K_m$  が WT の 105% および 89% と WT に近い値であったが、SAG に対する  $k_{cat}/K_m$  は WT の 28% に低下した。これより His252 は TAGG2 において SAG への高活性に重要なアミノ酸残基の一つであると考えられた。

##### (2)シロイヌナズナにおける TAGG2 ホモログの解析

大腸菌により可溶性タンパク質として生産された組換え AtBGLU13, AtBGLU15 および AtBGLU16 の諸性質を調べた。2 mM pNPG に対する比活性は、AtBGLU13 が 3.07 U/mg, AtBGLU15 が 4.18 U/mg であったのに対し、AtBGLU16 は 0.076 U/mg と低値であった。組換え AtBGLU13, AtBGLU15 および AtBGLU16 はいずれも SAG 加水分解活性を示したが、この活性は低く、Bglu13 と Bglu15 はラミナトリオースに、Bglu16 はセロトリオースに最も高い活性を示した。

##### (3)TAGG2 の細胞内・組織局在性の解析

発芽後 7 日目の OsTAGG2::GUS 導入形質転換体の T3 植物体を用いて、GUS 染色を 37°C、暗所にて 2 日間行った。GUS 活性は、根、発芽した種子および葉鞘で観察されたが、葉身では観察されなかった (図 1)。葉鞘のうち維管束周辺の組織が顕著に染色されていた。

野生株および TAGG2-GFP 過剰発現株の T1 植物体を用いて、発芽直後の主根の細胞を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。野生株では、レーザー励起光 (波長 488 nm) の照射による蛍光は観察されなかったが、OsTAGG2-GFP 過剰発現株 (#5 と #8) では、細胞の縁に GFP 蛍光が観察された (図 2)。この GFP 蛍光が観察された部位は、細胞壁、細胞膜およびアポプラストが重なる部位であったので、これらを区別するため、40% マンニトール溶液を組織に添加し、原形質分離を誘導した。原形質分離により細胞膜が細胞壁から剥離した細胞において、GFP 蛍光は細胞壁上にのみ見られ、細胞膜や細胞壁と細胞膜との間隙には観察されなかった。

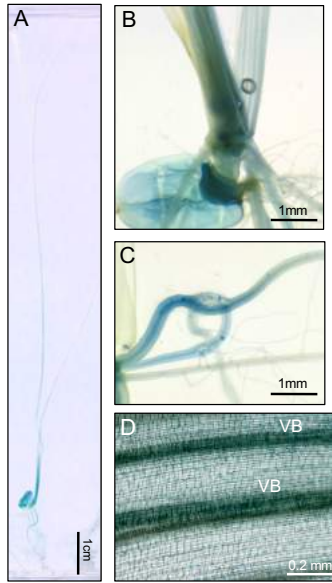


図 1.GUS 染色による TAGG2 の組織局在性の解析. (A) 全体図. (B) 種子と葉鞘. (C) 根部. (D) 維管束 (VB) 周辺組織.

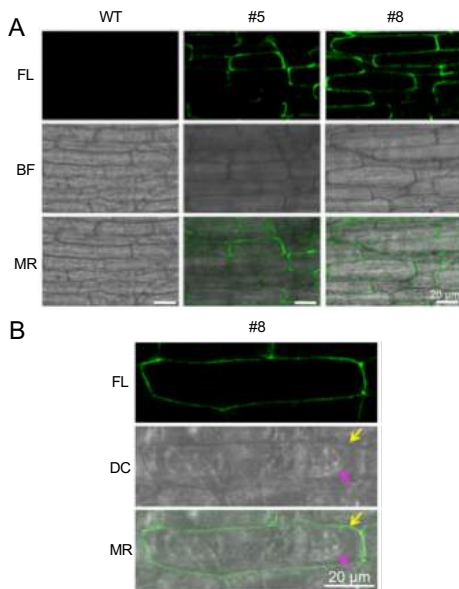


図 2.GFP 蛍光による TAGG2 の細胞内局在性の解析.(A)野生型と TAGG2-GFP 融合タンパク質を発現したイネ (#5 と #8 系統) の主根の GFP 蛍光. (B) #8 系統の主根細胞の原形質分離後の GFP 蛍光. 黄色矢印, 細胞壁; ピンク矢印, 原形質膜. FL, 蛍光; BF, 明視野; DC, 微分干渉観察; MR, 重ね合せ.

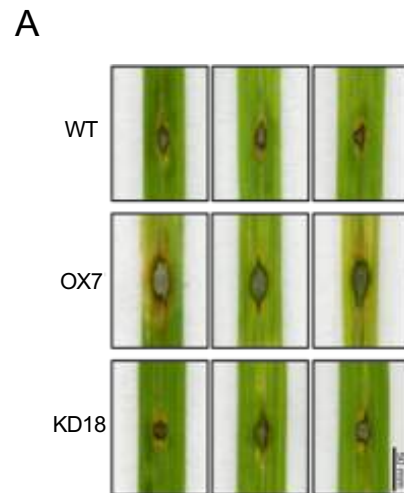
#### (4) TAGG2 発現量を改変した形質転換イネの解析

イネ野生株, TAGG2 過剰発現株の 3 系統 (OX1, OX7 および OX8) および発現抑制株の 3 系統 (KD7, KD18 および KD19) の TAGG2 発現量をリアルタイム PCR により定量した. 過剰発現株の 3 系統では, TAGG2 発現量はそれぞれ野生株の 12.2 倍, 4.9 倍および 1.6 倍であり, 発現抑制株の 3 系統ではそれぞれ 53%, 27% および 30% であった.

イネ野生株, TAGG2 過剰発現株および発現抑制株の SAG および TAG 加水分解活性を測定した. 過剰発現株の 3 系統の SAG 加水分解活性はそれぞれ野生株の 13.4 倍, 8.0 倍および 1.0 倍であり, 発現抑制株の 3 系統では, それぞれ 44%, 60% および 43% であった. TAG 加水分解活性は, 過剰発現株ではそれぞれ 21.6 倍, 13.7 倍および 0.93 倍であり, 発現抑制株ではそれぞれ 45%, 0.68% および 7.0% であった.

野生株, TAGG2 過剰発現株および発現抑制株の発芽後 7 日目の植物体の地上部および地下部の植物ホルモン類の内生量を定量した. 地上部における SA/SAG 比は, 野生株, 過剰発現株および発現抑制株で大きな差は見られなかった. 地下部における SA/SAG 比は, OX1 のみが有意に高かった. 地上部における TA 量は, OX1 と OX7 が有意に高く, OX8 が有意に低かった. それぞれ野生株の 7.2 倍, 5.9 倍および 0.51 倍であった. 一方, KD7, KD18 および KD19 では検出限界以下であった. TAG は, OX7, OX8, KD18 および KD19 で有意に高く, それぞれ野生株の 1.4 倍, 1.3 倍, 1.7 倍および 1.3 倍であった. OX1, OX7 および OX8 の TA/TAG 比はそれぞれ野生株の 6.5 倍, 4.4 および 0.41 倍であった. 地下部における TA 量は, OX1 および OX7 が有意に高く, それぞれ野生株の 8.1 倍と 5.5 倍であった. TAG 量は OX7 と KD18 が有意に高く, それぞれ野生株の 1.4 倍と 1.6 倍であった. TA/TAG 比は, OX1 と OX7 が有意に高く, それぞれ野生株の 8.2 倍と 4.3 倍であった.

イネ野生株, TAGG2 過剰発現株 (OX1 と OX7) および発現抑制株 (KD18 と KD19) に, いもち病菌を接種し, 接種後 5 日目の病斑面積を測定することで, 病害抵抗性を評価した (図 3). TAGG2 発現抑制株の病斑面積は, 野生株と有意な差は確認されなかったが, TAGG2 過剰発現株は, 野生株および発現抑制株と比較して有意に病斑面積が大きく, 1.6-1.7 倍であった.



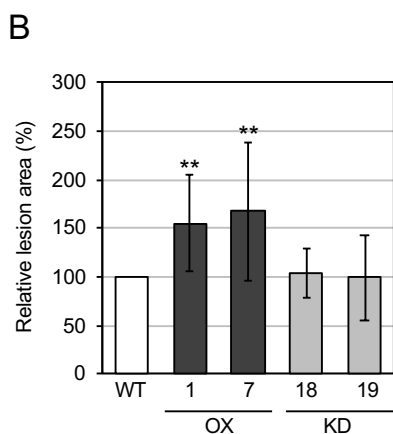


図 3. *TAGG2* 過剰発現体および発現抑制体におけるいもち菌感染における病斑面積の評価. (A) 病斑の様子. (B) 病斑面積の比較 ( $p < 0.01$ ,  $n = 12-24$ ).

## 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 1 件)

- Hua, Y., Ekkhara, W., Sansenya, S., Srisomsap, C., Roytakul, S., Saburi, W., Takeda, R., Matsuura, H., Mori, H., and Ketudat Cairns, J.R., Identification of rice Os4BGlu13 as a  $\beta$ -glucosidase which hydrolyzes gibberellin A4 1-O- $\beta$ -D-glucosyl ester, in addition to tuberonic acid glucoside and salicylic acid derivative glucosides. Arch. Biochem. Biophys., 583, 36-46 (2015) 査読有, DOI: 10.1016/j.abb.2015.07.021

〔学会発表〕 (計 1 件)

- 佐分利 亘, 菅原 好美, 谷口 沙希, 今井 亮三, 松井 博和, 森 春英, シロイヌナズナ  $\beta$ -グルコシダーゼアイソザイム BGlu13, Bglu15 および BGlu16 の基質特異性. 日本応用糖質科学会平成 29 年度大会. 日本大学 (藤沢) 2017 年 9 月 6 日.

〔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

北海道大学大学院農学研究院生物化学研究室ホームページ

<http://lab.agr.hokudai.ac.jp/biochem/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松井 博和 (MATSUI Hirokazu)

北海道大学大学院農学研究院・名誉教授

研究者番号：90109504

### (2)研究分担者

佐分利 亘 (SABURI Wataru)

北海道大学大学院農学研究院・助教

研究者番号：00598089