

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 3 月 23 日現在

機関番号：33923

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18560

研究課題名(和文) 高等植物の病原菌感染応答を支えるCa²⁺・ROSネットワークの分子機構研究課題名(英文) Molecular mechanism of Ca²⁺-ROS network in plant immune responses

研究代表者

古市 卓也 (Furuichi, Takuya)

名古屋経済大学・人間生活科学部管理栄養学科・教授

研究者番号：80436998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：病原菌の感染は枯死、生産性および品質の低下をもたらすため、その防止および軽減は農作物生産において最も重要な課題のひとつである。本研究では、植物が病原菌を認識した際に動因される初発応答であるCa²⁺シグナルとROSシグナル、その相互作用として機能するCa²⁺・ROSネットワークの動態について、新たな測定系を開発するとともに、その計測を行なった。シロイヌナズナを用いた解析の結果、病原菌感染に關与するCa²⁺シグナルが先んじて生じるROSシグナルにより動因されることを示す直接的な結果が得られた。また、このCa²⁺シグナルの動因を担う遺伝子として、3つの候補遺伝子を同定するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然界には多種多様な植物病原菌が存在し、植物はこれに抵抗し、自らを守るためのシステムを有する。植物が病原菌を認識した際に動因される初発応答として、Ca²⁺シグナルとROSシグナルが動員されるが、どちらが先んじて起こるのか、その順位と関連性については未だ明らかではなかった。本研究では、我々が新たに開発した発光プローブおよび2波長検出器を用いることで、Ca²⁺シグナルとROSシグナルの同時計測を行うことにより、病原菌感染に關与するCa²⁺シグナルが先んじて生じるROSシグナルにより動因されることを示す直接的な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Infection with pathogens leads withering, reduction of productivity and quality, so its prevention and alleviation is one of the most important issues in agriculture. In this study, we analyzed Ca²⁺ signal and ROS signal, which is the initial response driven by plants when they recognize pathogenic bacteria, and the dynamics of Ca²⁺・ROS network functioning by their interaction.

Analysis using *Arabidopsis thaliana* resulted in a direct result indicating that the Ca²⁺ signal involved in the pathogenic response is driven by the ROS signal generated ahead of time. In addition, we have newly identified three genes responsible for pathogen-related Ca²⁺ signal.

研究分野：植物生理学

キーワード：細胞シグナル 病原菌感染応答 植物

1. 研究開始当初の背景

病原菌の感染は枯死、生産性および品質の低下をもたらすため、その防止および軽減は農作物生産において最も重要な課題のひとつである。植物の細胞において、その生育環境からの外的ストレスは主に細胞膜上の受容体によって認識されたのち、細胞質カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_c$) 変化を中心とした化学シグナルに変換される。これにより細胞内の酵素活性制御、遺伝子発現制御を行うことで、細胞は受容したストレスに応じた適応反応を示す。 $[Ca^{2+}]_c$ は定常状態において非常に低く保たれており、ストレスによる Ca^{2+} 透過チャネルの活性化は非常に大きな $[Ca^{2+}]_c$ 上昇 (Ca^{2+} シグナル) を引き起こす。病原菌感染シグナル分子であるエリシターは、速やかに Ca^{2+} シグナルを動因することが報告されている。また、近年の研究成果より、 Ca^{2+} シグナルは細胞質のみならず葉緑体やミトコンドリアなどのオルガネラ内、また細胞-オルガネラ間のコミュニケーションにおいても極めて重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。

活性酸素種 (ROS) は DNA の損傷や細胞死を誘導する毒性物質として古典的に知られているが、近年の研究から細胞内 ROS 濃度 ($[ROS]_c$) 上昇 = ROS シグナルが細胞の分裂や分化、細胞内オルガネラ間のコミュニケーションに於いて極めて重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。興味深いことに、高等植物においては、気孔の閉鎖や病原ストレス応答の初期過程に關与する Ca^{2+} シグナルの動因には細胞膜上の膜電位依存型 Ca^{2+} 透過チャネルの活性化に先んじて ROS 生成が起こることが推定されている。また、細胞膜上で活性酸素種生成を行う NADPH oxidase の活性化には Ca^{2+} の結合が必要であることが報告されている。このような Ca^{2+} シグナルと ROS シグナルの相互作用、すなわち Ca^{2+} ・ROS ネットワークは、植物の病原菌感染応答のみならず、

気孔の閉鎖を誘導する Ca^{2+} オシレーションの生成や細胞内シグナルのフィードバック、さらには細胞間・器官間での情報伝播において主要な役割を果たしていると考えられている (総説: Jeandroz *et al.*, 2013 *Plant Physiol.* 163: 459-470, Steinhorst and Kudla 2013 *Plant Physiol.* 163: 471-485.)。しかしながら、その分子機構については未だ明らかにされていない点が多い。その最大の原因は、植物細胞における $[ROS]_c$ 上昇 (ROS シグナル) をリアルタイム検出する実験手法が確立されていなかった為である。

この課題を解決するため、我々は先行研究において、発光二枚貝由来の ROS 応答性発光タンパク質をコードする人工遺伝子を作成し、出芽酵母を用いて細胞質 ROS プロブとして実用化するとともに、構造改変した発光基質を用いることで発光波長の重なりを解消し、分光ルミノメーターを開発することで、 Ca^{2+} シグナル、ROS シグナルを同時計測するシステムを構築した。

2. 研究の目的

Ca^{2+} シグナル・ROS シグナルの同時計測を行うことは、高等植物の細胞内シグナル伝達における Ca^{2+} -ROS ネットワークの分子機構解明に向けた最も有効なアプローチである。本研究では、病原菌感染シグナル分子であるエリシターに反応した Ca^{2+} シグナル・ROS シグナルの個別、同時計測を野生型シロイヌナズナのほか、各種の遺伝子破壊株を用いて計測するための遺伝子発現ベクターおよび発光強度計測系を構築し、病原菌感染応答に關与する新たな遺伝子を同定する。また、個体レベルでのイメージング計測系を構築することにより、全身応答システムへの關与についても明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

研究試料にはモデル植物であるシロイヌ

ナズナ植物体およびタバコ培養細胞を用い、 Ca^{2+} シグナルの計測にはオワンクラゲ由来の Ca^{2+} 応答性発光タンパク質であるエクオリン、ROS シグナルの計測には上述の発光二枚貝由来の ROS 応答性発光タンパク質をそれぞれ細胞質特異的に発現する遺伝子組換え植物を試料として、ルミノメーターを用いて発光強度のリアルタイム計測を行なった。先行研究において我々は、これらを共発現する遺伝子組換え植物を作出、選抜して用いたが、植物体内における還元反応により、ROS 応答性発光タンパク質の発光基質酸化型セレンテラジンがエクオリンの発光基質である還元型セレンテラジンへと遷移することで分光計測に支障をきたしたことから、ROS 応答性発光タンパク質を単独発現する遺伝子組換え植物を新たに作出し、選抜して用いることとした。また、既に 35S プロモーター導入が行われている遺伝子組換え株での発現効率を高めるため、UBQ10 プロモーター下流にエクオリンまたは ROS レポーター遺伝子を導入したベクターを構築した。 Ca^{2+} シグナル・ROS シグナルの同時計測を行う際には、マイクロテック・ニチオン株式会社（船橋市）と共同開発した 2 波長分光ルミノメーターを用い、それぞれの幼植物または切り取り葉を 1 つずつ同一のキュベットにいれて、実験に用いた。超高濃度 CO_2 環境下での植物栽培にはセンサー付きレギュレータを取り付けた小型インキュベーターを用い、網羅的遺伝子発現解析にはマイクロアレイ法を用いた。

4. 研究成果

シロイヌナズナ植物体を用いた研究では、病原菌感染シグナル分子(エリシター)である flg22 を投与した際の Ca^{2+} シグナル、ROS シグナルについて、それぞれ計測を行なった。シロイヌナズナ の場合においては、 Flg22 投与後速やかに ROS シグナルにピークが見られ、その減衰後においても定常状態よりも高い

状態が維持された。 flg22 に応答した Ca^{2+} シグナルが NADPH oxidase 阻害剤である DPI によって抑制されることから、 Ca^{2+} 透過チャネルの活性化に引き続いて Ca^{2+} シグナルが細胞膜上の NADPH oxidase を活性化することで細胞外に ROS が生成し、周囲の細胞における ROS 感受性の Ca^{2+} 透過チャネルを活性化することでその情報を伝播すると考えられてきた。本計測では Ca^{2+} シグナルに先んじてピークに達する ROS シグナル(細胞内での ROS 濃度上昇)が検出されており、 Ca^{2+} -ROS ネットワークの複雑性、双方向性について、新たな知見を得ることができた。

鍵遺伝子の探索を目的としていくつかの遺伝子破壊株について解析したところ、ある Ca^{2+} 透過チャネルの破壊株においてシグナルの低下が見出された。本研究と並行して、我々は国際宇宙ステーション (ISS) での農作物生産を目的として、ヒトが生活する閉鎖環境である ISS に特有の超高濃度 CO_2 (3000-6000 ppm) が植物の生育、遺伝子発現に及ぼす影響を解析している。超高濃度 CO_2 環境では培地 pH の低下、酸化ストレスの影響が懸念されることから、抗酸化物質の蓄積が起こり、病原抵抗性にも変化が見られるものと考えられた。そこで超高濃度 CO_2 環境下において栽培したシロイヌナズナ幼植物を試料として、抗酸化活性および flg22 に応答した Ca^{2+} シグナルの計測を行なった。まず抽出液の抗酸化活性を調べたところ、通常大気で栽培した対照区の 2 倍程度の抗酸化活性が見られた。しかしながら Ca^{2+} シグナルの強度には有意な差は見られなかったことから、抗酸化物質の蓄積は病原菌感受性には影響しないものと考えられた。極めて興味深いことに、上述の Ca^{2+} 透過チャネル破壊株における flg22 応答性 Ca^{2+} シグナルは超高濃度 CO_2 環境下で栽培することにより、野生型と同程度まで亢進した。そこで網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、超高濃度 CO_2 環境下で栽

培した際にはこの Ca²⁺透過チャネル破壊株で特異的に、病原菌感染応答に関与するレセプターキナーゼ、転写因子それぞれ1つずつの発現が亢進することが明らかになった。その分子機構については未だ明らかでない点が多いものの、最適化を進めることで CO₂ 処理という極めて安価かつ簡便な手法を通じた、新たな免疫賦活法を確立することができるかもしれない。

病原菌感染応答と同様に、Ca²⁺-ROS ネットワークがその初発応答に関与する生理応答として、重力感知機構が挙げられる。本課題で作成した UBQ10:エクオリンベクターや計測手法を用いることにより、シロイヌナズナ機械刺激受容チャネルである MCA1 が重力刺激応答性 Ca²⁺シグナルの動因に寄与すること、すなわち植物における重力センサーの分子実体のひとつであることを明らかにすることができた。この例が示すように、本研究において開発した発現ベクター、発光強度計測系などの研究リソースは今後、幅広い目的での応用が期待される。

タバコ培養細胞を用いた研究では、病原菌エリシターであるクリプトゲインに対する応答および浸透圧ストレス応答について、Ca²⁺シグナルおよび ROS シグナルの計測を行った。クリプトゲインに対する応答では Ca²⁺シグナルの動因に引き続いて細胞外 ROS の生成が起こることが報告されている。しかしながら、細胞内 ROS 濃度はクリプトゲイン添加直後から定常状態よりも高い状態に遷移したものの、Ca²⁺シグナルの後に起こる細胞外 ROS 生成に同期する顕著なピークは見られなかったことから、その細胞質への流入（オートクリン作用）はあまり起こらないものと考えられた。また、低浸透圧に対する応答では Ca²⁺シグナルおよび ROS シグナルがほぼ同時に動因されていた。ここでの細胞質における ROS 生成を担う酵素や分子機構の解明には至らなかったものの、両者が協調して動因され

ること、そのタイムスケールについては一端を明らかにすることができたと考えられる。

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 2 件)

Nakano, M., Furuichi, T., Sokabe, M., Iida, H. and Tatsumi, H. (2021) The gravistimulation-induced very slow Ca²⁺ increase in Arabidopsis seedlings requires MCA1, a Ca²⁺-permeable mechanosensitive channel. *Sci Rep* 11, 227; <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80733-z>

Takahashi, K., Takahashi, H., Furuichi, T., Toyota, M., Furutani-Seiki, M., Kobayashi, T., Watanabe-Takano, H., Shinohara, M., Numaga-Tomita, T., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A. and Naruse, K. (2021) Gravity sensing in plant and animal cells. *npj Microgravity* 7, 2. <https://doi.org/10.1038/s41526-020-0130-8>

[学会発表] (計 7 件)

古市卓也、中野正貴、豊田正嗣、矢野幸子、笠原春夫、鎌田源司、飯田秀利、曾我部正博、辰巳仁史 (2016) 植物の重力感知・適応におけるカルシウムシグナルの役割, 日本宇宙生物科学会第 30 回大会

Tatsumi, H., Nakano, M., Toyota, M., Iida, H., Sokabe, M and Furuichi, T. (2016) Increase in the Cytoplasmic Free Calcium Ion Concentration in

Response to Changes in the Gravity Vector in Arabidopsis Seedling., 11th Asian Microgravity Symposium (AMS2016)(招待講演) (国際学会)

Furuichi, T. (2017) Impact of Environmental Stresses in International Space Station (ISS) on Plant Growth and Developments., 第58回日本植物生理学会年会

Furuichi, T., Nakano, M. and Tatsumi, H. Role of mechanosensitive channel in gravity sensing and responses against environmental stresses in ISS. PSB2017, Jun. 2017, Matsue, Japan.

古市卓也(2018) 国際宇宙ステーションにおける超高濃度 CO₂ 環境が植物の成長と発育に及ぼす影響 日本植物生理学会第59回大会, 平成30年3月, 札幌

古市卓也、松波志帆、加藤彩、中澤映李、長尾由依、藤田博子 (2019) 国際宇宙ステーションにおける超高濃度 CO₂ 環境下での植物の生育改善. 第60回日本植物生理学会年会, 平成31年3月, 名古屋

Furuichi, T., Nakano, M, Matsunami, S., Kato, A., Nakazawa, E., Nagao, Y., Fujita, H., Iida, H. and Tatsumi, H. Molecular mechanisms of plant growth and development in the ISS, a closed environment under microgravity. The 40th Annual Meeting of International Society for Gravitational Physiology (ISGP) and Space Life Science and Medicine Meeting, May. 2019, Nagoya, Japan

〔図書〕(計 2 件)

Toyota, M. *, Furuichi, T. * and Iida, H. (2018) Molecular Mechanisms of Mechanosensing and

Mechanotransduction. *In*: Plant Biomechanics. (Eds. Geitmann, A. and Gril, J.) Springer, 375-397.

*Equally contributed.

Furuichi, T., Nakano, M., Matsunami, S., Kato, A., Nakazawa, E., Nagao, Y., Fujita, H., Iida, H. and Tatsumi, H. (2020) Molecular mechanisms of plant growth and development in the ISS, a closed environment under microgravity. *In*: Proceedings of the 2019 ISGP(International Society of Gravitational Physiology) Meeting. (Ed. Marc-Antoine Custaud) Frontiers Media SA, 39-41.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古市 卓也 (Furuichi, Takuya)

名古屋経済大学・人間生活科学部・教授

研究者番号: 80436998