

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14860

研究課題名(和文) NOを介した新規な過敏感細胞死誘導機構の解明

研究課題名(英文) Hypersensitive cell death via nitric oxide

研究代表者

川北 一人 (Kawakita, Kazuhito)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：90186065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物の防御応答として生成した一酸化窒素(NO)の機能を理解するために、NOの直接的な標的分子を特定することを試みている。これまでに植物の病原菌感染防御応答時に生成するNOが関与する生体物質修飾機構として、主にタンパク質のニトロソ化が解析されてきた。本研究課題では感染防御応答時の植物体中の活性窒素生成と核酸のニトロ化について検討した。その結果、植物の病原菌感染防御応答時には活性酸素の生成量および8-ニトログアニンの存在量が増大し、核酸のニトロ化が進行することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate roles of nitric oxide in plant defense system, nitric oxide targeting molecules in host plant cells have been identified. So far, nitrosylated-proteins as molecular modification mechanisms in host plant cells attacked by the plant pathogens has been identified mainly. In this study, we investigated DNA nitration in plant defense against pathogen attacks.

研究分野：植物病理学

キーワード：一酸化窒素 ニトロ化 ジャガイモ ベンサムアナタバコ 感染防御応答 植物

## 1. 研究開始当初の背景

植物の感染防御において、活性酸素種、特にスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) 生成は初期応答の典型であり、動的な抵抗反応の始動と統御機能において重要な意味を持つことを明らかにしてきた。その研究を進める過程で、 $O_2^-$  生成が関与しない応答反応も存在することがわかってきた。例えば、 $O_2^-$  生成だけでは典型的な感染応答反応である過敏感細胞死を誘導しない。そこで別の活性酸素分子の関与を想定し、一酸化窒素 (NO) に着目するに至った。NO が低分子性抗菌物質(ファイトアレキシン)の生成を引き起こすことを 1996 年に申請者らが報告し、以後 NO が植物の感染防御応答時に生成すること、その NO が複数の応答反応の誘導に関与することを示している。NO は反応性に富むラジカル分子であり、形態形成、成熟過程、気孔の閉鎖、休眠の抑制、アブシジン酸処理や傷害などのストレスに対する応答といった様々な植物の生理現象に、NO は深く関わっている。

NO の関与する修飾機構にタンパク質の S-ニトロソ化がある。タンパク質のシステイン残基は反応性に富むチオール基を有し、ジスルフィド結合を介したタンパク質のフォールディングに関与することや活性中心として機能することが知られている。近年、植物における S-ニトロソ化やその制御因子についての報告がなされ、当該研究室でもジャガイモ植物とその疫病菌の系において、S-ニトロソ化タンパク質の網羅的検索を行い、NO 標的ニトロソ化タンパク質の解析を行っている。また、NO と  $O_2^-$  との反応物であるパーオキシナイトライト (ONOO $^-$ ) は、タンパク質に含まれるチロシン残基のニトロ化を引き起こす。当該研究室でも防御応答における ONOO $^-$  の標的タンパク質の同定を試みている。しかしこれまでのいずれの研究においても、ニトロ化や S-ニトロソ化の主たる標的分子はタンパク質であり、他の生体分子は標的と見なされてこなかった。ヌクレオチドを含む核酸の修飾機構を視野に入れた本研究は、NO 研究の新たな展開をもたらすことが期待される。

## 2. 研究の目的

植物の感染防御応答における一酸化窒素 (NO) 生成の機能解析の一環として、NO の直接的な標的分子の探索を目指している。

これまでに当該研究室では、ジャガイモ植物とその疫病菌の系において、ニトロ化や S-ニトロソ化の標的タンパク質の探索とそれらの機能について解析を行ってきた。本研究では、NO およびパーオキシナイトライト (ONOO $^-$ ) の直接的な標的分子として、核酸分子、特に 8-ニトログアニンおよびその関連物質の検出とシグナル伝達における機能解析を行うことを目的とする。その研究成果により、新たな過敏感細胞死誘導に至るシグナル伝達機構解明の端緒が得られることが期待される。

## 3. 研究の方法

供試植物材料としてジャガイモ (塊茎ディスクおよび懸濁培養細胞) と、一部解析のモデル系としてベンサミアナタバコ植物を用いた。ジャガイモ塊茎組織には品種さやかを用いて塊茎ディスクを作成した。懸濁培養細胞には同品種の塊茎由来の培養細胞を用いた。これらジャガイモ由来試料には DW または疫病菌由来の細胞壁成分エリシター (HWC) を処理した。ベンサミアナタバコには本葉 6 葉期の第 4 本葉に DW または INF1 エリシターを接種した。

核酸のニトロ化の指標となる 8-ニトログアニンの測定では、上記植物体を破碎し、遠心分離した上清を測定試料とした。8-ニトログアニンの定量は ELISA 法に基づく市販キットを用いて、吸光プレートリーダーにより測定した。

NO と ONOO $^-$  の検出については、NO 蛍光プローブ (DAF2-DA) およびパーオキシナイトライト (ONOO $^-$ ) の蛍光プローブ (NisPY-3) をそれぞれ用いて、蛍光プレートリーダーを用いて NO と ONOO $^-$  の検出を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 供試植物材料の検討

当該研究課題の遂行に適する供試植物材料の選抜を試みた。ジャガイモ塊茎ディスク、ジャガイモ懸濁培養細胞とベンサミアナタバコ葉を用いた。対象区を DW 処理とし、ベンサミアナタバコ葉には INF1 エリシター、ジャガイモ塊茎組織には HWC を処理し、経時的に供試試料を回収し、市販の定量キットを用いて核酸のニトロ化の標的分子となることが予想される 8-ニトログアニンの定量を行ったところ、ベンサミア

ナタバコ葉およびジャガイモ塊茎ディスクにおいて、DW 処理区に比べ、エリシター処理区で 8-ニトログアニンの含量の増加が認められた(図)。一方、ジャガイモ懸濁培養細胞ではこのような傾向は認められなかった。懸濁細胞の培養条件・エリシター処理条件のさらなる検討が必要である。このことから、本研究では以降の試験にジャガイモ塊茎ディスクおよびベンサミアナタバコ葉を用いた。

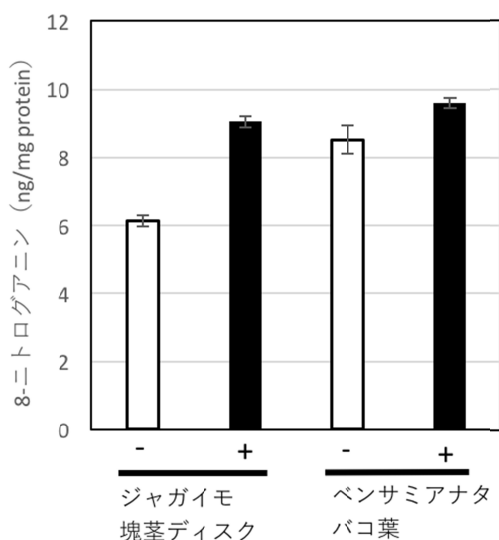


図 ジャガイモ塊茎ディスクおよびベンサミアナタバコを用いた 8-ニトログアニンの測定。-は DW 処理、+はエリシター処理を示す。

(2) 活性窒素と 8-ニトログアニンの検出  
NO 蛍光プローブ(DAF2-DA)および ONOO<sup>-</sup> の蛍光プローブ(NiSPY-3)を用いて蛍光プレートリーダーによる NO と ONOO<sup>-</sup> の検出を試みたところ、ベンサミアナタバコ葉とジャガイモ塊茎組織試料いずれにおいても水処理区に比べ、エリシター処理区で NO と ONOO<sup>-</sup> 生成量が増大した。また、市販の定量キットを用いて核酸のニトロ化の指標となる 8-ニトログアニンの定量を行ったところ、いずれの供試植物においても DW 処理区に比べ、エリシター処理区で 8-ニトログアニンの含量が増加した。これらのことから、エリシター処理により、植物体内での活性窒素生成が促進され、核酸塩基グアニンがニトロ化の標的となることが示唆された。

8-ニトログアニンは哺乳類においてウイルス感染、細菌感染、炎症性疾患、癌等で

のニトロ化亢進時の酸化ストレスマーカーとして知られているが(引用文献)、本研究結果から、植物体では病原菌に対する防御応答時に核酸のニトロ化の標的分子として、8-ニトログアニンが蓄積することが示唆された。

#### < 引用文献 >

Ohshima, Hiroshi, Tomohiro Sawa, and Takaaki Akaike. "8-nitroguanine, a product of nitrative DNA damage caused by reactive nitrogen species: formation, occurrence, and implications in inflammation and carcinogenesis. *Antioxidants & redox signaling* 8.5-6 (2006): 1033-1045.

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

佐藤育男・長谷部量紀・千葉壮太郎・竹本大吾・川北一人  
トマト萎凋病菌の異化型亜硝酸還元酵素と植物病原性、日本 NO 学会、2018 年 5 月、京都

長谷部量紀、千葉壮太郎、竹本大吾、川北一人、佐藤育男、Denitrification of a soil-born phytopathogenic fungus is involved in its pathogenicity、16th International Symposium on Microbial Ecology、2016 年 8 月、Canada

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

川北一人 (KAWAKITA, Kazuhito)

研究者番号：90186065

### (2)研究分担者

佐藤 育男 (SATO, Ikuo)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：70743102

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )