

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19164

研究課題名（和文）植物免疫解明に向けたマイクロドメイン可視化プローブの開発

研究課題名（英文）Research on microdomain visualization probes to elucidate plant immunity

研究代表者

川合 真紀（Kawai-Yamada, Maki）

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：10332595

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：植物の病害応答に重要な役割を果たす、細胞膜上に点在するマイクロドメインの機能解明のため、その主要構成脂質をターゲットとした植物マイクロドメイン可視化プローブの開発を行った。植物ステロールに結合する可視化プローブGFP-D4Lを開発し、細胞膜上のマイクロドメイン構造の可視化に成功した。恒常的にGFP-D4Lを発現するシロイヌナズナ系統の作出も行き、病害応答時にマイクロドメインが特定の動態を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毎年、世界の作物の約15%が病害によって失われている。原因となる病原体と植物細胞の接点は細胞膜であるため、細胞膜には多数の免疫タンパク質が存在する。免疫タンパク質の多くは細胞膜マイクロドメインに局在するため、植物のマイクロドメインの機能解明は重要である。本研究では、植物マイクロドメインの可視化プローブを開発し、病害応答時におけるマイクロドメインの動態を解明した。マイクロドメイン機能の理解は、将来的にマイクロドメインの改変による耐病性を強化した作物の作出に繋がると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In order to examine the functions of microdomains scattered on the plasma membrane, which play an important role in plant disease response, we have developed plant microdomain visualization probes targeting their major constituent lipids. We developed a visualization probe, GFP-D4L, which binds to phytosterols, and succeeded in visualizing microdomain structures on the plasma membrane. We also generated an Arabidopsis line that constitutively expresses GFP-D4L and showed that the microdomain exhibits specific dynamics during disease response.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：マイクロドメイン ステロール 可視化プローブ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜は均一な構造ではなく、「マイクロドメイン」と呼ばれる小さく強固なスフィンゴ脂質・ステロール集積領域が点在している。マイクロドメインはタンパク質の足場となり、それらの相互作用や活性を制御することにより、病害応答を含めた様々な植物生理機能に關与する。マイクロドメインは外部刺激に応じて形態や挙動を変化させると考えられている。したがって、マイクロドメイン自身も病害応答時に適切な形態や挙動の変化を示すことにより、免疫タンパク質の挙動や活性を制御することが推察される。しかし、植物マイクロドメインの動態は、病害応答時に限らずこれまで観察されたことはない。この原因は、植物特有の脂質から形成されるマイクロドメイン可視化プローブが存在しないことである。このため、マイクロドメインが植物免疫においてどのように作用するか、その詳細なメカニズムは未解明であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、マイクロドメイン主要構成脂質であるスフィンゴ脂質、及びステロールをターゲットとした、植物マイクロドメインを特異的且つ容易に可視化するプローブを開発することを目的とした。可視化プローブの開発により、植物免疫におけるマイクロドメインの作用機序の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物スフィンゴ脂質をターゲットとしたマイクロドメイン可視化プローブの開発

Necrosis and ethylene-inducing peptide 1-like protein (NLP)は様々な病原菌が植物細胞を破壊するために分泌する毒性タンパク質である。NLPは植物スフィンゴ脂質の1種であるグルコシルイノシトールホスホセラミド(GIPC)と特異的に結合する。GIPCは植物スフィンゴ脂質の60%以上を占め、マイクロドメインに最も多く集積している脂質である。そこで、無毒化したNLPに蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を作製することにより、GIPCを標的とする植物マイクロドメイン可視化プローブの開発を試みた。

#### (2) 植物ステロールをターゲットとしたマイクロドメイン可視化プローブの開発

Perfringolysin O (PF0)はウエルシュ菌が産生する毒素で、コレステロールに結合するタンパク質である。PF0のドメイン4(D4)はコレステロール結合ドメインで、D4とGFPを融合させたGFP-D4は、コレステロールを主体とする動物のマイクロドメインを可視化することが可能である。しかし、植物にはコレステロールはほとんど存在しない上に、 $\beta$ -シトステロール等の植物特有のステロールにはPF0及びD4は結合しない。そこで、D4を植物ステロールに結合するように改変することにより、植物ステロールを標的とする植物マイクロドメイン可視化プローブの開発を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 植物スフィンゴ脂質をターゲットとしたマイクロドメイン可視化プローブの開発

##### 改変NLPの作製

NLPは毒性、及びGIPCとの結合に重要なアミノ酸は同定されているが、明確な毒性ドメインやGIPC結合ドメインは存在しない。GIPCへの結合能を保持したまま、無毒化したNLPを開発するため、まずNLPのN末端、またはC末端を欠損した断片タンパク質を複数種類作製した。大腸菌を用いることにより、それら断片タンパク質を大量発現させた。しかし、いずれの断片タンパク質も可溶化しなかったため、植物に対する毒性解析やGIPCとの結合解析を行うことができなかった。

そこで、NLPに変異を導入したタンパク質を複数種類作製し、大腸菌を用いた大量発現を行った。変異タンパク質はいずれも可溶化し、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することに成功した。*Nicotiana benthamiana*の葉を用いた毒性解析を行った結果、変異NLPの1つは野生型NLPと異なり、植物に対して毒性をもたないことを見出した。また、GIPCとの結合能を調べるため、カリフラワーから精製したGIPCを用いた結合解析を行った結果、上述した毒性をもたない変異NLPは野生型NLPと同等のGIPC結合能を保持していた。したがって、GIPCへ結合する毒性のない変異GIPCタンパク質の作製に成功し、これをmNLPと名付けた。

##### GFP-mNLPの作製

GIPCに結合する可視化プローブを開発するため、mNLPにGFPを融合させたGFP-mNLPを作製した。GFP-mNLPを大腸菌で大量発現させたところ、分解することなく可溶化させることに成功

した。アフィニティークロマトグラフィーにより精製した GFP-mNLP が GIPC との結合能をもつか、精製した GIPC との結合解析を行った。その結果、GFP なしの mNLP より結合能は低下するものの、GIPC に結合することが明らかになった。また、*Nicotiana benthamiana* の葉を用いた毒性解析により、GFP-mNLP も植物に対する毒性をもたないことを明らかにした。

#### 精製した GFP-mNLP の蛍光観察

GFP-mNLP が植物の細胞膜に結合し蛍光観察できるか調べるため、精製した GFP-mNLP を播種後 7 日のシロイヌナズナに処理し、子葉と根の細胞を観察した。その結果、子葉でも根でも細胞膜上に GFP 蛍光を観察することができたため、GFP-mNLP が細胞膜の GIPC に結合することにより、細胞膜を可視化できることが明らかになった。

#### 恒常的 GFP-mNLP 発現シロイヌナズナ系統の作出

病害応答など植物生理機能におけるマイクロドメインの機能を解明するためには、恒常的にマイクロドメインが可視化できる植物系統を作出、つまり GFP-mNLP を恒常的に発現する植物系統を作出することが必要である。GIPC は細胞膜の外葉（細胞外側）に偏在しているため、細胞外へ分泌させるシグナルペプチド（SP）を融合させた GFP-mNLP（SP-GFP-mNLP）を作製し、シロイヌナズナに導入した。しかし、発現させるプロモーターにかかわらず、T1 個体を選抜することはできなかった。GFP-mNLP を植物細胞内に大量に発現させると、植物がダメージを受ける可能性を考えている。

### (2) 植物ステロールをターゲットとしたマイクロドメイン可視化プローブの開発

#### 植物ステロールに結合する D4 の開発

植物特有のステロールに結合する D4 を作出するため、GFP-D4 に変異を導入した変異 GFP-D4 を複数種類作製した。それらが大腸菌を用いて大量発現させたところ、いずれも分解することなく可溶化に成功した。アフィニティークロマトグラフィーにより精製した変異タンパク質について、購入した $\beta$ -シトステロール等の植物ステロールとの結合性を調べたところ、GFP-D4L と名付けた変異タンパク質が最も結合能が高かった。したがって、以降は GFP-D4L を用いて解析を行った。

#### 精製した GFP-D4L の蛍光観察

GFP-D4L が植物の細胞膜に結合し蛍光観察できるか調べるため、精製した GFP-D4L を播種後 7 日のシロイヌナズナに処理し、子葉と根の細胞を観察した。その結果、子葉でも根でも細胞膜上に GFP 蛍光を観察することができたため、GFP-D4L が細胞膜のステロールに結合することにより、細胞膜を可視化できることが明らかになった。また、細胞膜上の詳細な局在を観察するために、細胞膜の蛍光観察に有用な全反射照明蛍光顕微鏡を用いた観察を行った。その結果、GFP-D4L は細胞膜上でドット状の構造に局在することが明らかとなり、マイクロドメインを可視化できることが示唆された。

#### 恒常的 GFP-D4L 発現シロイヌナズナ系統の作出

病害応答など植物生理機能におけるマイクロドメインの機能を解明するためには、恒常的にマイクロドメインが可視化できる植物系統を作出、つまり GFP-D4L を恒常的に発現する植物系統を作出することが必要である。ステロールは細胞膜の外葉（細胞外側）に偏在しているため、細胞外へ分泌させるシグナルペプチド（SP）を融合させた GFP-D4L（SP-GFP-D4L）を作製し、シロイヌナズナに導入した。SP-GFP-D4L を恒常的に発現するシロイヌナズナ形質転換系統が得られたため、播種後 7 日の子葉の観察を行った結果、GFP-D4L は細胞膜に局在し、また細胞膜表面のドット構造を観察することができた。ステロール合成阻害剤を処理した際には、細胞膜表面のドット構造に蛍光は観察されなかったため、GFP-D4L はステロール由来のマイクロドメインを可視化できることが明らかになった。

#### 病害応答時におけるマイクロドメイン動態の観察

病害応答時におけるマイクロドメインの動態を観察するため、病原性細菌のべん毛成分である flg22、及び病原性糸状菌の細胞壁成分であるキチンを GFP-D4L 発現シロイヌナズナ系統に対して処理し、細胞膜表面の蛍光観察を行った。未処理時には細胞膜上に均一に分布しているマイクロドメインが、flg22 及びキチン処理時には、細胞膜上でマイクロドメインが密集する領域と散在する領域に分かれ、不均一な分布を示した。また、flg22 及びキチン処理時には、ナノドメインのサイズも大きくなっており、病害応答時にナノドメインが特定の動態を示すことが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomomi Ukawa, Fumihiko Banno, Toshiki Ishikawa, Kota Kasahara, Yuuta Nishina, Rika Inoue, Keigo Tsujii, Masatoshi Yamaguchi, Takuya Takahashi, Yoichiro Fukao, Maki Kawai-Yamada, Minoru Nagano	4. 巻 -
2. 論文標題 Sphingolipids with 2-hydroxy fatty acids aid in plasma membrane nanodomain organization and oxidative burst	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiac134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagano Minoru, Ueda Haruko, Fukao Yoichiro, Kawai-Yamada Maki, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 15
2. 論文標題 Generation of Arabidopsis lines with a red fluorescent marker for endoplasmic reticulum using a tail-anchored protein cytochrome b5 -B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1790196 ~ 1790196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2020.1790196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jing Beibei, Ishikawa Toshiki, Soltis Nicole, Inada Noriko, Liang Yan, Murawska Gosia, Fang Lin, Andeberhan Fekadu, Pidatala Ramana, Yu Xiaolan, Baidoo Edward, Kawai Yamada Maki, Loque Dominique, Kliebenstein Daniel J., Dupree Paul, Mortimer Jenny C.	4. 巻 5
2. 論文標題 The Arabidopsis thaliana nucleotide sugar transporter GONST2 is a functional homolog of GONST1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Moore William M., Chan Candace, Ishikawa Toshiki, Rennie Emilie A., Wipf Heidi M.-L., Benites Veronica, Kawai-Yamada Maki, Mortimer Jenny C., Scheller Henrik V.	4. 巻 -
2. 論文標題 Reprogramming sphingolipid glycosylation is required for endosymbiont persistence in Medicago truncatula	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.03.067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hasi Rumana Yesmin, Miyagi Makoto, Morito Katsuya, Ishikawa Toshiki, Kawai-Yamada Maki, Imai Hiroyuki, Fukuta Tatsuya, Kogure Kentaro, Kanemaru Kaori, Hayashi Junji, Kawakami Ryushi, Tanaka Tamotsu	4. 巻 166
2. 論文標題 Glycosylinositol phosphoceramide-specific phospholipase D activity catalyzes transphosphatidylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 441 ~ 448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Masaya, Nagano Minoru, Jin Song, Miyagi Atsuko, Yamaguchi Masatoshi, Kawai-Yamada Maki, Ishikawa Toshiki	4. 巻 9
2. 論文標題 Plant-Unique cis/trans Isomerism of Long-Chain Base Unsaturation is Selectively Required for Aluminum Tolerance Resulting from Glucosylceramide-Dependent Plasma Membrane Fluidity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 19 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9010019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sechet J, Htwe S, Urbanowicz B, Agyeman A, Feng W, Ishikawa T, Dinneny J, Colomes M, Satish KK, Kawai-Yamada M, O'Neill M, Mortimer J	4. 巻 96
2. 論文標題 Suppressing Arabidopsis GGLT1 affects growth by reducing the L-galactose content and borate cross-linking of rhamnogalacturonan II	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1036-1050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 長野稔、小宮山梨菜、安井碧、松浦智哉、石川寿樹、竹中悠人、石水毅、川合真紀、深尾陽一朗
2. 発表標題 スフィンゴ脂質は低ホウ素条件下におけるシロイヌナズナの生長に関与する
3. 学会等名 第33回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤大和、川合真紀、石川寿樹
2. 発表標題 スフィンゴ脂質糖鎖の人工改変植物を用いた糖鎖型に特異的な機能の解析
3. 学会等名 第33回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田百々香、宮城敦子、石川寿樹、山口雅利、川合真紀、西田生郎
2. 発表標題 シロイヌナズナの生殖過程におけるホスファチジルコリン生合成の役割
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真田昇、宮城敦子、山口 雅利、川合真紀、石川寿樹
2. 発表標題 セラミド1-リン酸の高感度検出法を用いたスフィンゴ脂質糖鎖分解酵素活性の測定
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤大和、宮城敦子、山口雅利、川合真紀、石川寿樹
2. 発表標題 スフィンゴ脂質糖鎖改変シロイヌナズナの表現型の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦野薫、圓山恭之進、大島良美、坂本真吾、石川寿樹、佐藤繭子、豊岡公德、川合真紀、篠崎和子、篠崎一雄
2. 発表標題 植物のクチクラ形成を調節する乾燥応答ネットワークの解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 工藤大和、宮城敦子、山口雅利、川合真紀、石川寿樹
2. 発表標題 異種相補によるシロイヌナズナのスフィンゴ脂質糖鎖タイプに特異的な機能の解析
3. 学会等名 第62回植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦野薫、圓山恭之進、大島良美、坂本真吾、石川寿樹、川合真紀、佐藤繭子、豊岡公德、篠崎和子、篠崎一雄
2. 発表標題 植物のクチクラ形成を調節する乾燥応答ネットワークの解析
3. 学会等名 第62回植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川洋祐、石川寿樹、宮城敦子、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 コケ植物独自のスフィンゴ脂質構造を形成する長鎖塩基 8不飽和化酵素の機能解析
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤正弥、石川寿樹、長野稔、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 イネのアルミニウム耐性におけるスフィンゴ脂質cis/trans異性体の機能差異
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川寿樹、小野田瑞希、川合真紀
2. 発表標題 シロイヌナズナの種子特異的なスフィンゴ糖脂質は種子サイズの制御に関与する
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 寿樹, 川合 真紀
2. 発表標題 植物の環境適応においてスフィンゴ脂質の分子進化が果たした意義
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長野稔、宇川智水、伴野文彦、石川寿樹、山口雅利、深尾陽一朗、川合真紀
2. 発表標題 細胞膜を介した植物免疫制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長野稔、宇川智水、伴野文彦、石川寿樹、山口雅利、深尾陽一朗、川合真紀
2. 発表標題 スフィンゴ脂質の2-ヒドロキシル化が制御するシロイヌナズナ免疫システムの解析
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 A seed-specific glycosyl head of sphingolipids is associated with regulation of seed size in Arabidopsis
3. 学会等名 8th Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaya Sato, Toshiki Ishikawa, Minoru Nagano, Atsuko Miyagi, Yamaguchi Masatoshi, Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 8 cis-unsaturated glucosylceramides contribute to aluminum tolerance in rice
3. 学会等名 8th Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minoru Nagano, Yohann Boutte, Adiilah Mamode-Cassim, Maki Kawai-Yamada, Sebastien Mongrand
2. 発表標題 The Role of Sphingolipids in the Dynamics of Plasma Membrane in Plants
3. 学会等名 The 23ed International Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Imai, Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada, Makoto Miyagi, Tamotsu Tanaka
2. 発表標題 Identification of phytoceramide 1-phosphate and its producing enzyme in plants
3. 学会等名 The 23ed International Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minoru Nagano, Yohann Boutte, Adiiilah Mamode-Cassim, Maki Kawai-Yamada, Sebastien Mongrand
2. 発表標題 スフィンゴ脂質による植物細胞膜ダイナミクスの制御
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minoru Nagano, Yohann Boutte, Adiiilah Mamode-Cassim, Maki Kawai-Yamada, Sebastien Mongrand
2. 発表標題 植物の細胞膜動態におけるスフィンゴ脂質の役割
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長野 稔 (Nagano Minoru)  (80598251)	立命館大学・生命科学部・助教  (34315)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of California			
フランス	Universite de Bordeaux			