

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370023
 研究課題名（和文） カルシウムチャネルを介した植物のストレス応答・増殖・死制御ネットワークの分子機構
 研究課題名（英文） Calcium ion-mediated signaling network regulating stress responses in plants.
 研究代表者
 朽津 和幸（KUCHITSU KAZUYUKI）
 東京理科大学・理工学部応用生物科学科・教授
 研究者番号：50211884

研究成果の概要：

イネ培養細胞の細胞質内カルシウムイオン濃度変化や活性酸素種(ROS)生成のリアルタイム測定系を確立し、植物のストレス応答情報伝達ネットワークの分子機構の解明を進めた。植物病原菌由来のシグナル分子を認識し、プログラム細胞死を含む感染防御応答を誘導する初期過程では、ROS 生成や MAP キナーゼの活性化に先立ち、細胞質のカルシウムイオン濃度が上昇することが明らかとなり、この過程の上流、下流での制御機構と、機能する複数の因子を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
年度			
総計	139,000,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：植物分子生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：カルシウムチャネル・イネ・感染防御応答・カルシウムイオン濃度・
 機械刺激受容・プロテインキナーゼ・活性酸素種・エリシター

1. 研究開始当初の背景

植物のストレス応答・増殖・死制御におけるシグナル伝達ネットワークにおいて、多くの受容体からのシグナルが、細胞質における Ca^{2+} 濃度変化の時間的空間的パターンの情報にいったん集約されると考えられるが、こうしたシグナルの特異性を識別し、仕分けする機構は全く未解明であった。その最大の理由は、 Ca^{2+} 濃度変化の時間的空間的パターンを形成・制御すると考えられる細胞膜や細胞内膜系に存在する Ca^{2+} チャネルの分子の実体とその機能の研究が、動物と比べて著しく遅れている点にあった。電位依存性 Ca^{2+} チャネルは、哺乳動物の主要なファミリーと類似の因

子が植物のゲノム中に存在せず、機械刺激受容性 Ca^{2+} チャネルと共に、分子の実体はほぼ全く未解明だった。

2. 研究の目的

植物のストレス応答・増殖・死制御のシグナル伝達ネットワークにおいて、 Ca^{2+} チャネルは中心的役割を担うと考えられるが、その分子機構はほとんど未解明である。本研究は、植物体、培養細胞の Ca^{2+} チャネル候補因子の突然変異株を用いて、ストレス応答等の過程における細胞質 Ca^{2+} 濃度変化と下流の反応系との因果関係を解析し、植物の Ca^{2+} シグナル伝達ネットワークの分子機構の解明を目指す

した。

3. 研究の方法

イネの野生型株や、Ca²⁺チャネル候補因子機能破壊株、発現抑制株にアポエクオリン遺伝子を導入し、培養細胞、植物体の、細胞質Ca²⁺濃度と活性酸素種(ROS)の非破壊モニタリング系を確立した。感染防御応答、環境ストレス応答シグナル伝達系におけるCa²⁺チャネルの役割分担の解析を進めた。

4. 研究成果

エリシターシグナルの受容後 1 分以内に、感染防御応答に特異的なタンパク質リン酸化反応を介した制御系により、Ca²⁺動員が負のフィードバック制御を受ける可能性が示された。一方、タンパク質性エリシターTvXにより誘導される過敏感細胞死は、電位依存性Ca²⁺チャネル候補OsTPC1 の機能破壊株(*Ostpc1*)において顕著に抑制された。そこで*Ostpc1* 株の[Ca²⁺]_{cyt}測定系を確立し解析した結果、OsTPC1 がTvX誘導性Ca²⁺動員に関与する可能性が示唆された。

機械刺激に応答したCa²⁺動員の制御候補因子OsMCA1を同定した。OsMCA1は、酵母の機械刺激作動性Ca²⁺チャネル候補Mid1の変異株を部分的に相補した。*OsMCA1*の発現は、植物体の広範な組織で見られた。*OsMCA1*発現抑制株では生育遅延、穂軸の短化等の表現型が見られた。*OsMCA1*発現抑制株の[Ca²⁺]_{cyt}測定系を確立し、種々の刺激に対するCa²⁺動態の変化を解析した。低浸透圧刺激により細胞膜を介した細胞質へのCa²⁺流入を含む細胞質への一過性のCa²⁺動員の抑制が見られた。

光合成等に伴い活性酸素種(ROS)の発生が不可避であるため、植物はさまざまなROSの消去系を発達させて来たが、一方で植物はNADPH oxidaseなどROSを積極的に発生させる酵素を持ち、その活性を時空間的に厳密に制御している。本研究の過程で、ROSの積極的生成がCa²⁺とリン酸化により相乗的に制御されていることを明らかにした。現在、多種のisoformの特性の網羅的な解析を進めている。ROS生成とCa²⁺動員は相互依存的な制御を受け、一種のシグナルネットワークを形成していることが明らかとなった。

イネの2種のプロテインキナーゼ*OsCIPK14/15*は、エリシター処理により急速に発現が誘導されるが、*Ostpc1*破壊株では発現誘導が顕著に抑制された。*OsCIPK14/15*は、FISLモチーフを介してCa²⁺センサータンパク質OsCBL4と強く相互作用した。*RNAi*法による*OsCIPK14/15*発現抑制株では、TvXにより誘導される過敏感細胞死、*PBZ1*等の防御遺伝子の発現誘導などの応答は顕著に抑制さ

れた。逆に*OsCIPK14/15*過剰発現株では、TvX誘導性の過敏感細胞死が亢進された。こうした結果は、イネの感染防御応答やプログラム細胞死の制御において、細胞質Ca²⁺濃度変化の下流でCa²⁺制御型プロテインキナーゼ*OsCIPK14/15*が関与する可能性を示唆する。

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 8 件)

- (1) Higaki, T., Kadota, Y., Goh, T., Hayashi, T., Kutsuna, N., Sano, T., Hasezawa, S., Kuchitsu, K. (2008) Vacuolar and cytoskeletal dynamics during elicitor-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells. *Plant Signaling & Behavior* 3(9): 700-703
- (2) Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., Dolan, L. (2008) Local Positive Feedback Regulation Determines Cell Shape in Root Hair Cells. *Science* 319(5867): 1241-1244
- (3) Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., Hishinuma, H., Senzaki, E., Yamagoe, S., Nagata, K., Nara, M., Suzuki, K., Tanokura, M., Kuchitsu, K. (2008) Synergistic Activation of Arabidopsis NADPH Oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283: 8885-8892.
- (4) Higaki, T., Goh, T., Hayashi, T., Kutsuna, N., Kadota, Y., Hasezawa, S., Sano, T., Kuchitsu, K. Elicitor-induced cytoskeletal rearrangement relates to vacuolar dynamics and execution of cell death: *in vivo* imaging of hypersensitive cell death in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 48(10): 1414-1425
- (5) Oda, A., Amikura, K., Kuchitsu, K., Ishikawa, M. (2008) Phosphoric acid-assisted constant relative humidity chambers utilized for controlled deterioration of rice seeds *Seed Science & Technology* 36: 699-709
- (6) Saito, R., Kuchitsu, K., Ozeki, Y., Nakayama, M. (2007) Spatiotemporal metabolic regulation of anthocyanin and its related compounds during development of marginal picotee petals in *Petunia hybrida* (Solanaceae). *J. Plant Res.* 120(4): 563-566
- (7) 武田征士、賀屋秀隆、Liam Dolan、朽津和幸 (2008) 植物のストレス応答・形態形成における活性酸素種生成酵素NADPH oxidaseのCa²⁺を介した活性化メカニズム *細胞工学* 27(6): 600-602
- (8) 来須孝光、林晃之、朽津和幸 (2007) 植物のストレス応答情報伝達におけるカルシ

ウムイオンの役割とその動員の分子機構
植物の生長調節 42(2): 121-129

[学会発表] (計 22 件)

- (1) 山中拓哉、瀧口彬子、中野正貴、三木悠意、林晃之、飯田秀利、来須孝光、**朽津和幸** タバコBY-2細胞におけるCa²⁺流入関連因子NtMCA1とNtMCA2のCa²⁺取込み能に関する解析 第50回日本植物生理学会年会
- (2) 木村幸恵、菱沼悠、先崎栄里子、河原崎朋子、路川真貴、賀屋秀隆、**朽津和幸** シロイヌナズナの活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼ AtrbohF のCa²⁺とリン酸化を介した活性制御 BMB2008(日本分子生物学会・日本生化学会合同大会) **招待講演**
- (3) **朽津和幸**、来須孝光、濱田晴康、北川陽一郎、木村幸恵、賀屋秀隆 植物の生体防御・プログラム細胞死の制御とCa²⁺・活性酸素シグナル BMB2008(日本分子生物学会・日本生化学会合同大会) **招待講演**
- (4) **Kuchitsu, K.**, Ogasawara, Y., Kimura, S., Hiraoka, G., Hishinuma, H., Senzaki, E., Kurusu, T., Yumoto, F., Tanokura, M., Takeda, S., Dolan, L., Kaya, H. Ca²⁺-ROS Signaling Network Regulating Stress Responses, Innate Immunity Ca²⁺ and Development. XI th France-Japan Workshop on Plant Sciences 2008
- (5) **朽津和幸**、来須孝光、濱田晴康、木村幸恵、賀屋秀隆 Ca²⁺シグナル・活性酸素シグナルの制御とクロストーク 日本植物学会第72回大会 **招待講演**
- (6) 先崎栄里子、木村幸恵、菱沼悠、賀屋秀隆、**朽津和幸** シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素AtrbohDのCa²⁺による活性化機構の解析 日本植物学会第72回大会
- (7) 北川陽一郎、濱田晴康、濱田淳平、山本崇史、来須孝光、**朽津和幸** イネの感染防御応答におけるCa²⁺制御型プロテインキナーゼ OsCIPK14/15の機能解析 日本植物学会第72回大会
- (8) 濱田晴康、来須孝光、杉山淑美、岩崎洋平、能鹿島央司、宮尾安藝雄、廣近洋彦、**朽津和幸** イネの培養細胞の感染防御応答に伴うCa²⁺動因制御機構の解析 日本植物学会第72回大会
- (9) **Kuchitsu, K.** Ca²⁺-ROS Signaling Network Regulating Stress Responses, Innate Immunity and Development Frontiers of Plant Science in the 21st Century
- (10) **Kuchitsu, K.** Ca²⁺-ROS signaling network regulating stress responses, programmed cell death and development in plants. Plant Neurobiology 2008 **招待講演**
- (11) 西川大輔、後藤真理子、来須孝光、山中拓哉、櫻井康博、中川祐子、片桐健、飯田和子、篠崎一雄、飯田秀利、**朽津和幸** イネのCa²⁺流入制御因子候補OsMCA1の単離とストレス応答における機能解析第49回日本植物生理学会年会
- (12) 木村幸恵、菱沼悠、先崎栄里子、湯本史明、永田宏次、田之倉優、賀屋秀隆、**朽津和幸** 活性酸素種生成に關与するシロイヌナズナAtrbohDの活性化制御における分子内相互作用の解析 第49回日本植物生理学会年会
- (13) 能鹿島央司、来須孝光、清塚正弘、岡田憲典、古賀仁一郎、長村吉晃、宮尾安藝雄、廣近洋彦、山根久和、**朽津和幸** タンパク質性エリシターにより誘導されるイネ培養細胞の感染防御応答におけるCa²⁺シグナル伝達系関連因子の機能解析: ジテルペン型ファイトアレキシンの生合成を中心に 第49回日本植物生理学会年会
- (14) **Kuchitsu, K.**, Kurusu, T., Hayashi, T., Kadota, Y. Roles and the signaling pathways of putative voltage-gated Ca²⁺ channels in regulation of innate immunity and programmed cell death in plants. 第20回内藤コンファレンス「自然免疫の医学・生物学 [III]」 **招待講演**
- (15) 来須孝光、北川陽一郎、濱田淳平、**朽津和幸** イネの感染防御応答に關与するCa²⁺制御型プロテインキナーゼ(CIPK)の生化学的解析 日本植物学会第71回大会
- (16) 北川陽一郎、来須孝光、濱田淳平、**朽津和幸** イネのエリシター誘導性Ca²⁺制御型プロテインキナーゼ (CIPK) の単離と機能解析 日本植物学会第71回大会
- (17) 塚田慧美、林 晃之、三木悠意、門田康弘、**朽津和幸** タバコ培養細胞BY-2の酸化ストレス応答におけるTPCファミリーCa²⁺チャネルの機能解析 日本植物学会第71回大会
- (18) 濱田晴康、来須孝光、杉山淑美、岩崎洋

平、能鹿島央司、宮尾安藝雄、廣近洋彦、
渋谷直人、**朽津和幸** アポエクオリン
発現培養細胞を用いたイネのストレス
誘導性Ca²⁺動員制御機構の解析 日本
植物学会第71回大会

- (19) 林 晃之、本間洋平、新井 修、門田康弘、
濱本 宏、**朽津和幸** 植物病原菌由来の
タンパク質性エリシターにより誘導さ
れるタバコ実生の成長抑制における細
胞質Ca²⁺動態変化の役割 日本植物学
会第71回大会
- (20) 菱沼 悠、小笠原よう子、平岡吾朗、木
村幸恵、先崎栄里子、湯本史明、賀屋秀
隆、永田宏次、田之倉優、**朽津和幸** 異
種発現系を用いたシロイヌナズナ
NADPH オキシダーゼAtrbohDの活性制
御機構の解析 日本植物学会第71回大
会
- (21) 西川大輔、来須孝光、櫻井康博、濱田淳
平、中川祐子、片桐 健、飯田和子、篠
崎一雄、飯田秀利、**朽津和幸** イネの
Ca²⁺流入制御因子候補OsMCA1の単離
と機能解析 日本植物学会第71回大会
- (22) **Kuchitsu, K.**, Kurusu, T., Kadota, Y.,
Hayashi, T. Roles of the TPC Family
Voltage-Gated Ca²⁺ Channel and
Downstream Protein Kinase Cascade in the
Regulation of Innate Immunity, Oxidative
Stress Responses and Programmed Cell
Death. *XIV International Workshop on
Plant Membrane Biology* Valencia, Spain
2007.6.27

[図書] (計2件)

- (1) **朽津和幸** (2009) 駒嶺 穆 総編集
植物ゲノム科学辞典 朝倉書店
pp.1-406
- (2) **朽津和幸** (2007) 植物の生体防御 鈴木
和男 監修 「生体防御医学事典」 朝倉書
店 pp. 240-245

6. 研究組織

(1)研究代表者

朽津 和幸 (KUCHITSU KAZUYUKI)
東京理科大学・理工学部応用生物科学科・
教授
研究者番号：5 0 2 1 1 8 8 4

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし