

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：34204

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15844

研究課題名(和文) OsCPK8を介したイネの過敏感細胞死誘導機構

研究課題名(英文) Induction of hypersensitive response cell death by OsCPK8

研究代表者

平井 洋行 (HIRAI, HIROYUKI)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・プロジェクト特任助教

研究者番号：70748847

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)：本研究課題では、イネ過敏感細胞死誘導機構の解明を目的としている。イネ過敏感細胞死の情報伝達因子であるOsCPK8のリン酸化標的タンパク質の同定を試みたところ、イネ過敏感細胞死誘導に関わる転写因子OsNAC4を同定することができた。次に、過敏感細胞死誘導時OsNAC4の下流に存在する因子の同定を試みたところ、核の断片化を制御する因子としてIRENを、細胞膜透過性の喪失に関わる因子としてOsHSP90、Caleosin様タンパク質(ESP1)、3-ketoacyl-CoA synthase様タンパク質(Fat)を新たに同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物免疫の中でも強力な免疫反応である過敏感細胞死の分子機構は不明な点が多かった。本研究は、この植物の過敏感細胞死分子機構についてイネを用いて解明を試みた。本研究において、OsCPK8の下流に存在するイネ過敏感細胞死関連因子として、OsNAC4・IREN・OsHSP90・ESP1・Fat遺伝子の5因子を同定した。この発見はイネ過敏感細胞死の更なる解明への足掛かりとなるものであると共に、他の植物の過敏感細胞死分子機構の解明に一役買えるものでもある。さらに、過敏感細胞死の分子機構が解明されれば、関連因子を標的とした新規農薬やゲノム編集技術による新規病害抵抗性品種の作出につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Hypersensitive (HR) cell death with DNA degradation and loss of plasma membrane integrity is one of the programmed cell deaths of plants. We previously identified that phosphorylated protein OsCPK8 was signal transduction factor for inducing HR cell death in rice. However, downstream of OsCPK8 in rice HR cell death still unknown. To identify rice HR cell death-related genes downstream of OsCPK8, We performed transcriptome analysis during rice HR cell death using RNA-seq. Four genes were identified as HR cell death-related genes. Among the four genes, IREN gene which encodes a plant nuclease controls DNA degradation. The remaining three genes, OsHSP90, ESP1 and Fat genes are associated with loss of plasma membrane integrity.

研究分野：OsNAC4

キーワード：OsNAC4 OsCPK8 過敏感細胞死

1. 研究開始当初の背景

植物はその植物に対して非病原性となる病原細菌を認識し、植物プログラム細胞死の一つである過敏感細胞死という強力な免疫反応を誘導する。過敏感細胞死の誘導は病原細菌の針状の構造体であるタイプ III 分泌装置を介して植物細胞内に直接分泌されるエフェクタータンパク質を認識することから始まる。エフェクタータンパク質とは、1種類の病原細菌から複数種類分泌され、植物の免疫や代謝経路などを阻害するなど多種多様な機能をもつ攻撃物質である。一方、植物はこのエフェクタータンパク質を認識するために、R 遺伝子産物と総称されるタンパク質をコードしている R 遺伝子群を進化させてきた。もし、植物が分泌されたエフェクタータンパク質に対応する R 遺伝子を有していた場合、植物はその R 遺伝子産物でエフェクタータンパク質を認識し過敏感細胞死を誘導する。これまでに、世界中の研究者によって様々な病原細菌-植物の組合せからエフェクタータンパク質とそれに対応する R 遺伝子が同定されてきた。しかし、R 遺伝子産物でエフェクタータンパク質を認識した後の情報はほとんどない。

これまでに研究代表者は、イネとイネに対して非病原性の細菌を用いて過敏感細胞死誘導を制御する因子の単離同定を進めてきた。その結果、カルシウムイオン依存性タンパク質キナーゼ 8 (OsCPK8) を過敏感細胞死の情報伝達因子として同定することができた。通常細胞膜に存在する OsCPK8 は過敏感細胞死誘導時に細胞膜から切り離され、タンパク質のリン酸化を介して過敏感細胞死を正に制御している。また、過敏感細胞死誘導を正に制御する転写因子として OsNAC4 も同定した。OsNAC4 は過敏感細胞死誘導時に、核外でリン酸化され核へと移行し、下流の様々な遺伝子発現を調節する。このように、イネの過敏感細胞死誘導を制御する重要な因子を同定することはできているが、過敏感細胞死誘導の情報伝達経路と実行因子などを詳細に解明するところまでは至っていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、OsCPK8 から OsNAC4 までの過敏感細胞死誘導機構における情報伝達経路の解明と OsNAC4 が直接および間接的に発現を制御している遺伝子を明らかにする。具体的には、過敏感細胞死誘導時の OsCPK8 が OsNAC4 をリン酸化するか調べる。また、OsNAC4 以外の OsCPK8 のリン酸化標的候補タンパク質も探索する。候補タンパク質が得られた場合は、得られたタンパク質が過敏感細胞死誘導に関連するか、および OsCPK8 によってリン酸化されるか調べる。加えて、OsNAC4 によって直接および間接的に転写発現が制御される遺伝子も明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 過敏感細胞死誘導時の OsCPK8 による OsNAC4 のリン酸化解析

OsCPK8 はリン酸化依存的に過敏感細胞死を誘導するため、OsCPK8 の下流にはリン酸化される標的タンパク質が存在する。先行研究により、OsCPK8 は OsNAC4 と相互作用することが明らかとなっているため、まずは OsNAC4 が OsCPK8 のリン酸化標的タンパク質か調べる。方法としては、フォスタグテクノロジーを用いて *in vitro* で OsNAC4 が OsCPK8 によってリン酸化されるか調べる。次に、生体内で過敏感細胞死誘導時に OsNAC4 が OsCPK8 によってリン酸化されるか調べる。野生株と OsCPK8 遺伝子破壊株 (*oscpk8*) のイネ培養細胞に非病原性細菌を接種し、経時的に培養細胞を回収する。回収した培養細胞から核タンパク質を抽出後、これらのタンパク質に対して抗 OsNAC4 抗体を用いた免疫沈降を行う。免疫沈降後のサンプルに対して抗リン酸化アミノ酸抗体を用いたウエスタンブロット解析を行い、過敏感細胞死誘導時に OsCPK8 によって OsNAC4 がリン酸化されるか調べる。

(2) OsCPK8 と相互作用するタンパク質の探索

OsNAC4 が OsCPK8 のリン酸化標的タンパク質ではない可能性もあるため、新たに OsCPK8 と相互作用するタンパク質の探索も行う。方法は、BIO-ID 法を用いる予定である。BIO-ID 法とは、相互作用相手を見つけたいタンパク質の下流にビオチンリガーゼを融合させたタンパク質を利用する方法である。目的タンパク質に融合させたビオチンリガーゼにより、目的タンパク質と相互作用する相手がビオチン化されるため、ビオチン化されたタンパク質を回収し、プロテオーム解析を介して相互作用タンパク質の同定を行うというものである。今回は、OsCPK8 の下流にビオチンリガーゼを融合させたタンパク質を安定的に高発現するイネ培養細胞を用いて解析するつもりである。OsCPK8 と相互作用するタンパク質が得られた場合、このタンパク質が過敏感細胞死誘導に関与するか調べ、関与する場合は OsCPK8 によってリン酸化されるか調べる。

(3) OsNAC4 によって直接および間接的に転写発現が制御される遺伝子の同定

まず、抗 OsNAC4 抗体を用いた Chip-seq 解析を行い、過敏感細胞死誘導時に OsNAC4 がイネゲノムのどこに結合しているか調べる。次に、過敏感細胞死誘導時に OsNAC4 によって転写発現が

制御されている遺伝子を、イネ野生株と OsNAC4 発現抑制株のイネ培養細胞を用いた RNA-seq 解析を行うことで明らかにする。最後に、Chip-seq と RNA-seq 解析の結果を併用することで、OsNAC4 が直接転写を制御している遺伝子と間接的に制御している遺伝子を明らかにしたいと考えている。また、OsNAC4 によって制御されるいくつかの遺伝子については、過敏感細胞死誘導に関与するか調べる。

4. 研究成果

本研究課題では、イネ過敏感細胞死の誘導を正に制御している情報伝達因子 OsCPK8 から転写因子 OsNAC4 への情報伝達経路の解明と、OsNAC4 がどのような遺伝子の発現を制御しているかについて解明することを目的としている。

(1)これまでの研究結果から、OsNAC4 が OsCPK8 のリン酸化標的タンパク質の候補として挙げられていた。そこで、OsNAC4 が OsCPK8 のリン酸化標的タンパク質であるかフォスタグテクノロジーを用いた *in vitro* リン酸化実験で調べた。その結果、OsNAC4 は OsCPK8 によってリン酸化されることが明らかとなった。以上のことから、OsCPK8 のリン酸化標的タンパク質は OsNAC4 であることがわかり、イネ過敏感細胞死の情報伝達系路が明らかとなった。一方、当該研究を始めた時は、OsCPK8 のリン酸化標的タンパク質が OsNAC4 ではない可能性もあった。そのため、ピオチンリガーゼを用いた BIO-ID 法を用いて OsCPK8 の新規リン酸化標的候補タンパク質の探索も計画していた。そのため、BIO-ID 法を行う際に必要となる OsCPK8 の下流にピオチンリガーゼを融合させたタンパク質を安定的に高発現するイネ形質転換培養細胞の構築も試みた。アグロバクテリウム法を用いて目的の遺伝子をイネのカルスに導入し、ハイグロマイシン選抜を経て、目的の遺伝子が導入されたイネ形質転換培養細胞を 2 ライン取得した。次に、これらのイネ形質転換培養細胞から total RNA を抽出し、BirA 領域を標的としたリアルタイム RT-PCR で発現解析を行なった。その結果、2 ラインのイネ形質転換培養細胞は OsCPK8-BirA 遺伝子を高発現していることが明らかとなった。

(2)過敏感細胞死誘導時、転写因子 OsNAC4 によって発現制御されている遺伝子の同定を試みた。まず、OsNAC4 発現抑制培養細胞の作製を行い、OsNAC4 の発現量を調べたところ、野生株と比べて OsNAC4 の発現量が 10%以下まで抑えられた形質転換培養細胞を得ることができた。しかし、コロナ禍の影響もあり、この培養細胞を用いて Chip-seq や RNA-seq を行うことはできなかった。そのため、OsCPK8 の下流に存在することが明らかとなっている 2,308 個の遺伝子の中から過敏感細胞死誘導時特異的に発現が誘導されている遺伝子を抽出した。その結果、139 個の遺伝子を抽出することができた。これらの遺伝子の中には、エンド型のヌクレアーゼをコードする IREN 遺伝子や小胞体局在型の分子シャペロンをコードしている OsHSP90 遺伝子が存在した。そこで、これらの遺伝子をイネプロトプラストに過剰発現させたところ、エンド型のヌクレアーゼをコードする IREN 遺伝子を発現させた場合は核 DNA の断片化が、OsHSP90 遺伝子の場合は細胞膜透過性の喪失がそれぞれ認められた。次に、これら遺伝子の上流 2k bp をルシフェラーゼ遺伝子の upstream に連結させたレポータープラスミドをそれぞれ作製し、OsNAC4 を過剰発現させるためのプラスミドと同時にイネプロトプラストに導入した。その結果、両レポータープラスミドを導入したプロトプラストとルシフェラーゼ由来の発光は認められなかった。以上のことから、OsNAC4 の下流にエンド型ヌクレアーゼをコードする IREN 遺伝子と OsHSP90 遺伝子は存在するが、OsNAC4 はこれらの遺伝子発現を直接制御していないことが明らかとなった。

(3)OsHSP90 が介する細胞膜透過性喪失機構について研究を行なった。OsHSP90 の下流に存在する因子を同定するため、OsNAC4-RNAi 培養細胞を用いて RNA-seq 解析を行なった。その結果、過敏感細胞死誘導時に OsNAC4 によって発現が正に制御される遺伝子を 142 個抽出することができ、この中の 5 個の遺伝子については OsCPK8 の下流にも存在していた。そこで、この 5 遺伝子をイネプロトプラストに導入し、それぞれのタンパク質を過剰発現させたところ、Caleosin 様タンパク質をコードしている ESP1 遺伝子、3-ketoacyl-CoA synthase 様タンパク質をコードしている Fat 遺伝子を導入した場合に細胞膜透過性の喪失が認められた。次に、ESP1・Fat タンパク質と OsHSP90 が相互作用するか調べたところ、どちらのタンパク質も小胞体において OsHSP90 と相互作用することが明らかとなった。最後に、ESP1 および Fat タンパク質を過剰発現させた場合に認められる細胞膜透過性の喪失が、HSP90 の機能阻害剤であるゲルダナマイシンを加えた場合に認められなくなるか調べたところ、ESP1 及び Fat タンパク質過剰発現による細胞膜透過性の喪失どちらも認められなかった。以上のことから、OsHSP90 の下流に ESP1 と Fat タンパク質が存在することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murakami Takahiko, Katsuragi Yuya, Hirai Hiroyuki, Wataya Koki, Kondo Machiko, Che Fang-Sik	4. 巻 86
2. 論文標題 Distribution of flagellin CD2-1, flg22, and flg11-28 recognition systems in plant species and regulation of plant immune responses through these recognition systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 490 ~ 501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac007	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 Nakamura Minami, Kondo Machiko, Suzuki Aika, Hirai Hiroyuki, Che Fang-Sik	4. 巻 12
2. 論文標題 Novel Effector RHIFs Identified From Acidovorax avenae Strains N1141 and K1 Play Different Roles in Host and Non-host Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 716738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.716738	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神村麻友、糸井直人、平井洋行、蔡晃植
2. 発表標題 カルシウム依存性プロテインキナーゼOsCPK8を介したイネ過敏感細胞死の誘導機構
3. 学会等名 植物化学調節学会第54回大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------