

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02984

研究課題名(和文) 活性酸素の受容体による柔軟な植物免疫誘導機構の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of flexible plant immunity by receptors for reactive oxygen species

研究代表者

吉岡 博文 (Yoshioka, Hirofumi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30240245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：質膜のRBOHによってROSバーストが誘導される。ROSは防御応答のマーカーとして観察されているが、その作用機構はわかっていない。ROSセンサーと反応してジスルフィド結合を形成する酵母のYAP1のC末端断片を予め原形質膜に局在させることによって、ROSセンサータンパク質をYAP1結合タンパク質として精製し、多岐に渡る102のROSセンサー候補を得た。これら候補の中で、NbGLRのリコンビナントタンパク質を作製してH₂O₂で処理した後、スルフェニル化されるシステイン残基に結合するBTDで化学ラベルし、特異的抗体を用いて標的システイン残基の*in vitro*でのスルフェニル化を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ROSの作用機構を標的タンパク質の酸化による構造変化に基づいて明らかにする試みであり、植物免疫の実態を突き止めることができるものと考えられる。作物生産においては、殺菌性農薬に依存して生産量を確保しているが、環境負荷に懸念が持たれている。このような状況において、作物に免疫を付与する免疫誘導剤の開発が急務である。本研究で得られる成果は、ROSによる抵抗性や免疫細胞死の制御機構を提供するのみでなく、新たな植物免疫誘導剤の開発に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：ROS bursts are induced by RBOH in the plasma membrane. ROS has been observed as a marker of defense response, but its mechanism of action is not known. ROS sensor protein was purified as a YAP1-binding protein. A wide variety of 102 ROS sensor candidates were obtained. Among these candidates, the recombinant protein of NbGLR was treated with H₂O₂, then the protein was chemically labeled with a BTD that binds to the sulfenylated cysteine residue. The sulfenylation of the target cysteine residue was confirmed *in vitro* using a specific antibody.

研究分野：植物免疫学

キーワード：活性酸素種 ROSセンサー 植物免疫

1. 研究開始当初の背景

植物免疫反応は、Pattern-triggered immunity (PTI) とそれに続く Effector-triggered immunity (ETI) とで構成される。PTI、ETI のいずれにおいても、原形質膜の NADPH オキシダーゼ、RBOH (respiratory burst oxidase homolog) によって活性酸素種 (ROS ; $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}) が誘導される。このように、植物は病原菌の分子パターンに続いてエフェクターを認識し、二段階の免疫応答を始動する。いずれにおいても、RBOH によって急激な ROS の生成反応である ROS バーストが誘導される。PTI を誘導する *flg22* では、弱い一過的な ROS バーストが誘導される。一方、ジャガイモの抵抗性受容体である *Rpi-blb2* と疫病菌のエフェクターである *Avrblb2* を発現させると、ETI が始動して MAPK-WRKY 系路が活性化し、連続的で激しい ROS バーストと細胞死が誘導される。

ROS バーストは PTI では弱く、ETI ではより激しく起こり、免疫細胞死に重要な役割を果たす。第 RTI と ETI とでは異なる遺伝子や反応が誘導されるが、同じ ROS に起因する応答であり、その機構は未詳である。ROS である H_2O_2 は、そのセンサータンパク質のシステインのチオール基 (-SH) を酸化し (-SOH ; スルフェン酸)、分子内または分子間でジスルフィド結合 (-S-S-) を形成する。あるいは、スルフェン酸が還元型グルタチオン (GSH) と反応して S-グルタチオン化 (-S-SG) することによって ROS センサータンパク質の構造を変化させ、様々な細胞応答を引き起こすことが知られている (図 1)。

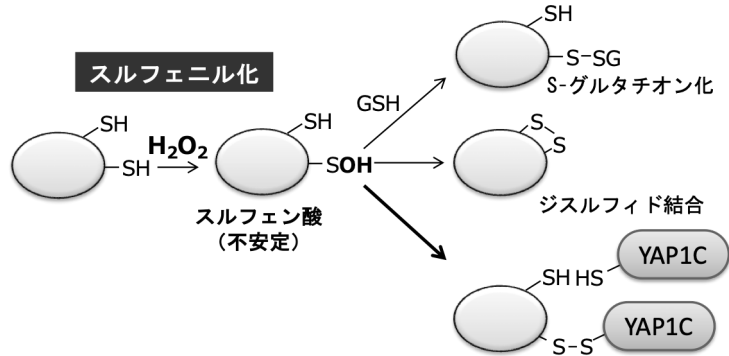


図 1 ROS センサーの酸化と YAP1C による阻害

あるいは、スルフェン酸が還元型グルタチオン (GSH) と反応して S-グルタチオン化 (-S-SG) することによって ROS センサータンパク質の構造を変化させ、様々な細胞応答を引き起こすことが知られている (図 1)。ROS はそのセンサータンパク質を酸化することによって構造を変化させ、様々な細胞応答を引き起こすと考えられている。しかし、植物免疫応答に関与する ROS センサーについては未開拓である。

2. 研究の目的

本研究では、ROS センサーと結合する酵母の YAP1 を用いることによって、PTI と ETI における ROS センサータンパク質を精製する系を思考した。植物免疫応答の鍵を握る ROS センサータンパク質を網羅的に探索し、機能を明らかにすることで ROS による免疫統御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ROS センサーを獲得する目的で、原形質膜局在タグを付加した 16aa-YAP1C タンパク質をベンサミアナタバコ葉に一過的に発現させる。その後、*flg22*-PTI および *agro-infiltration* 法によって *Rpi-blb2*/*Avrblb2*-ETI を誘導し、16aa-YAP1C をタグによる 2 段階精製法によってアフィニティー精製する。還元剤である DTT によってジスルフィド結合を切断して、ROS センサータンパク質を得る。*flg22* 処理、未処理、さらに *Rpi-blb2* を導入、未導入の葉から精製した標的タンパク質を Isobaric Tag でそれぞれ標識し、iTRAQ 法によって LC-MS/MS 解析する (図 2)。この方法では、2 段階目の MS 解析で標識したタンパク質の質量に変化をもたらすことができるため、すべてのサンプルを混合して定量的なプロテオーム解析が可能となる (図 2)。

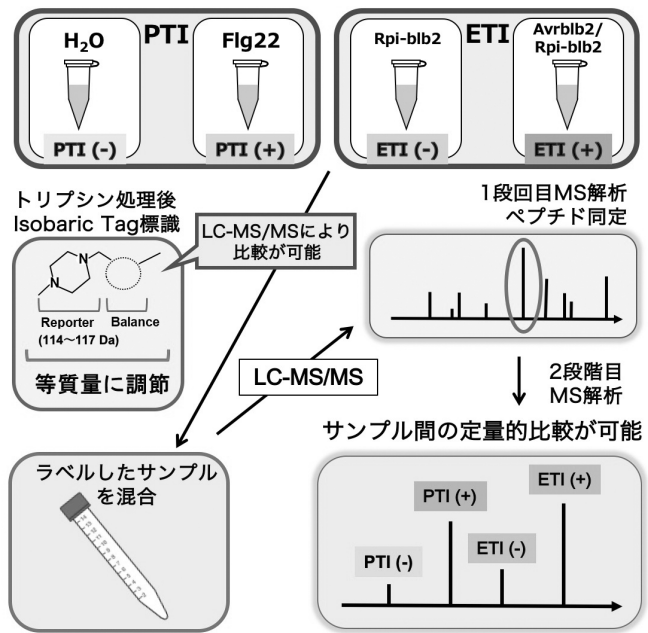


図 2 iTRAQ 法による ROS センサータンパク質の定量的プロテオーム解析

4. 研究成果

ROS は、植物免疫応答を局部的、全身的に伝える重要なシグナル分子であると認識され、世界中で免疫マーカーとして認識されているが、その作用機構はわかっていない。そこで、ROS の生産酵素である RBOH をサイレンシングしたベンサミアナタバコ葉をスルフェニル化されたシステイン残基に結合する dimedone で処理し、後に flg22 による PTI-ROS バーストと Rpi-blb2/Avrblb2 による ETI-ROS バーストをそれぞれ誘導して電気泳動した。その後、抗 dimedone 抗体を用いて RBOH に依存したタンパク質のスルフェニル化について調べた。その結果、多くのタンパク質が PTI と ETI においてスルフェニル化されることを確認した (図3)。これらの結果は、免疫応答における RBOH 依存的な ROS センサーの重要性を示しているものと思われた。

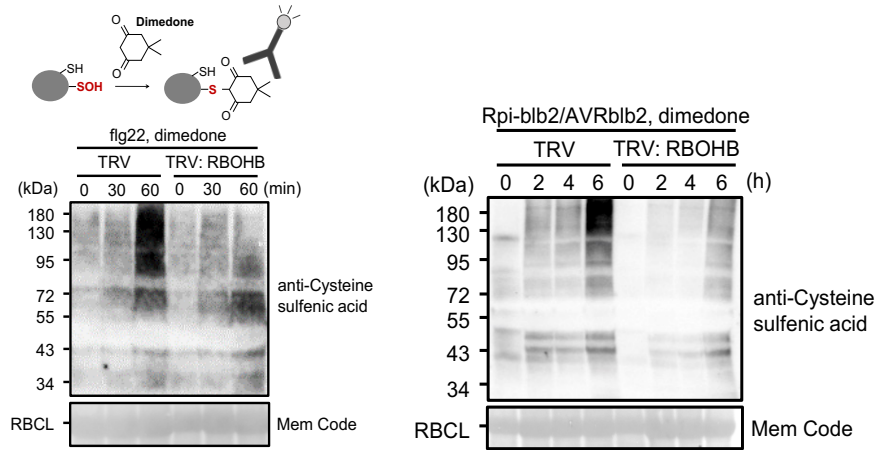


図3 dimedone による ROS センサーの確認
PTI と ETI において、RBOH に依存したスルフェニル化が確認された。

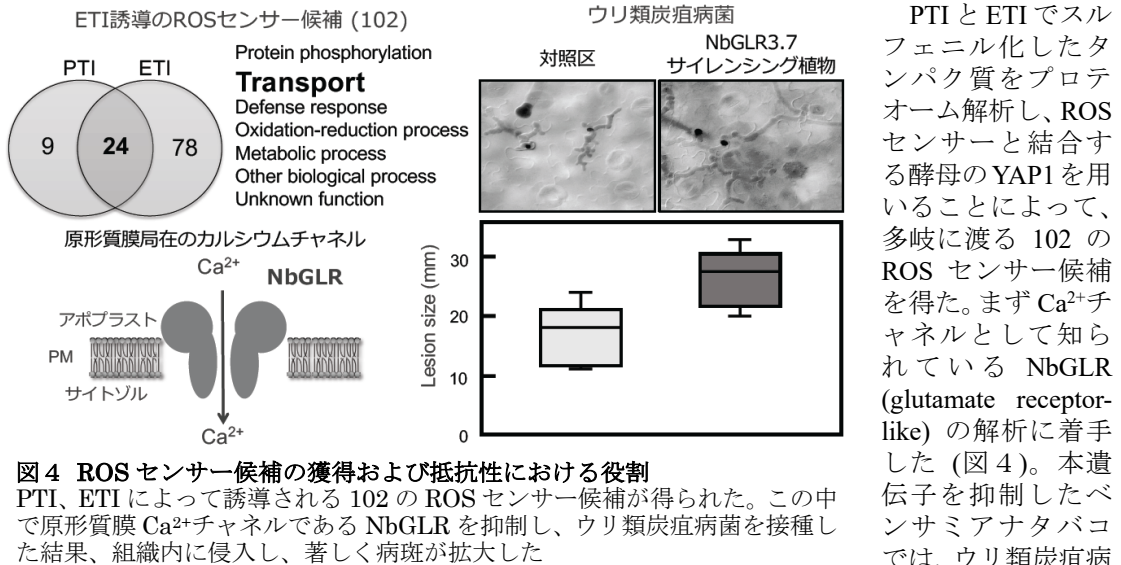


図4 ROS センサー候補の獲得および抵抗性における役割
PTI、ETI によって誘導される 102 の ROS センサー候補が得られた。この中で原形質膜 Ca²⁺チャネルである NbGLR を抑制し、ウリ類炭疽病菌を接種した結果、組織内に侵入し、著しく病斑が拡大した

なるため、免疫応答を正に制御することが明らかとなった (図4)。NbGLR のリコンビナントタンパク質を H₂O₂ で処理した後、dimedone に比べ 100 倍以上の強度でスルフェニル化されるシステイン残基に結合する BTD (benzothiazine-based probe) で化学ラベルし、抗体を用いて標的システイン残基の *in vitro* でのスルフェニル化を確認した (図5)。この結果は、NbGLR が ROS センサーとして機能する可能性を示している。

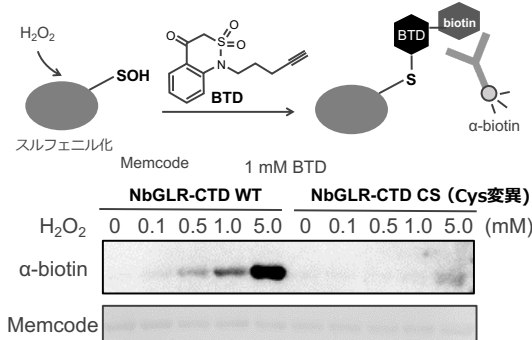


図5 BTD 用いた NbGLR のスルフェニル化の確認

ROS センサー候補の NbGLR の C 末端を合成し、スルフェン酸に BTD を結合させ、クリック反応によってビオチン付加反応を行った。その後、抗ビオチン抗体を用いてスルフェニル化を確認した。その結果、NbGLR-CTD WT では H₂O₂ の濃度に依存してバンドが確認されたが、変異体 NbGLR-CTD CS ではこれらのバンドが消失した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hino, Y., Inada, T., Yoshioka, M. and Yoshioka, H.	4. 巻 4
2. 論文標題 NADPH oxidase-mediated sulfenylation of cysteine derivatives regulates plant immunity.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 erae111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erae111	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 Li, J., Ishii, T., Yoshioka, M., Hino, Y., Nomoto, M., Tada, Y., Yoshioka, H., Takahashi, H., Yamauchi, T. and Nakazono, M.	4. 巻 6
2. 論文標題 CDPK5 and CDPK13 play key roles in acclimation to low oxygen through the control of RBOHmediated ROS production in rice.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 kiae293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiae293	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 吉岡博文・日野雄太・岡本溪太・稲田太一・小川尊也・安達広明・吉岡美樹	4. 巻 57
2. 論文標題 活性酸素シグナルによる植物免疫応答の分子機構．植物感染生理学研究の未来．	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 感染生理談話会論文集	6. 最初と最後の頁 65-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Hirofumi Yoshioka, Yuta Hino, Keiichiro Iwata, Takaya Ogawa, Miki Yoshioka, Nobuaki Ishihama, Hiroaki Adachi	4. 巻 125
2. 論文標題 Dynamics of plant immune MAPK activity and ROS signaling in response to invaders	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological and Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 102000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pmpp.2023.102000	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 Chikami, Y., Kawaguchi, H., Suzuki, T., Yoshioka, H., Sato, Y., Yaginuma, T. and Niimi, T.	4. 巻 94
2. 論文標題 Oral RNAi of diap1 results in rapid reduction of damage to potatoes in <i>Henosepilachna vigintioctopunctata</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pest Science	6. 最初と最後の頁 505-515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10340-020-01276-w	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 吉岡博文・吉岡美樹・鳴坂義弘・鳴坂真理・大高剛史・上田真澄	4. 巻 5
2. 論文標題 ナノ粒子による植物免疫システムの誘導と病害防除戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 75-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kobayashi, Y., Fukuzawa, N., Hyodo, A., Kim, H., Mashiyama, S., Ogihara, T., Yoshioka, H., Matsuura, H., Masuta, C., Matsumura, T. and Takeshita, M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of salicylic acid glucosyltransferase in balancing growth and defence for optimum plant fitness.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 429-442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.12906	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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 日野雄太・矢田充洋・白石佑太郎・吉岡美樹・吉岡博文
2. 発表標題 ベンサミアナタバコのCDPK は RBOH の転写調節および翻訳後修飾を介してETI-ROS パーストを制御する
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 吉岡美樹・安達広明・石濱伸明・鈴木孝征・吉岡博文
2. 発表標題 病原菌誘導性プロモーターによってWRKY8転写因子を発現させたジャガイモにおけるRNA-seq 解析
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 林優介・吉岡美樹・日野雄太・安達広明・高野義孝・別役重之・鳴坂真理・鳴坂義弘・吉岡博文
2. 発表標題 病原菌感染および傷害や食害に応答したベンサミアナタバコでSA/JA シグナルの時空間的な活性動態
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 吉岡博文・日野雄太・岡本溪太・稲田太一・小川尊也・安達広明・吉岡美樹
2. 発表標題 活性酸素シグナルによる植物免疫応答の分子機構
3. 学会等名 令和5年度植物感染生理談話会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日野雄太・稲田太一・吉岡美樹・吉岡博文
2. 発表標題 RBOHに依存したROSバーストによるタンパク質のスルフェニル化は植物免疫応答を制御する
3. 学会等名 令和5年度植物感染生理談話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日野雄太・矢田充弘・白石祐太郎・吉岡美樹・吉岡博文
2. 発表標題 ベンサミアナタバコのCDPKsは転写調節および翻訳後修飾を介してRBOH由来のROS生産を誘導する
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松吉紀佳・日野雄太・岡本溪太・稲田太一・吉岡美樹・森仁志・吉岡博文
2. 発表標題 ベンサミアナタバコのROSセンサー候補タンパク質CIPKはRBOHの活性調節に関与する
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuta Hino, Keita Okamoto, Taichi Inada, Miki Yoshioka, Tatsuhiko Kondo, Hitoshi Mori and Hirofumi Yoshioka
2. 発表標題 NbGLR3.7, a candidate of ROS sensor protein, positively regulates plant immune responses in a target cys-teine-dependent manner
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirofumi Yoshioka, Yuta Hino, Kenichiro Iwata, Hiroaki Adachi, Nobuaki Ishihama and Miki Yoshioka
2. 発表標題 Dynamics of plant immune MAPK activity in response to pathogen and insect attacks
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日野雄太・岡本溪太・稲田太一・吉岡美樹・近藤竜彦・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 ROSは植物免疫に関わるROSセンサータンパク質候補 NbGLRの標的システインを酸化する
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirofumi Yoshioka, Yuta Hino, Keita Okamoto, Taichi Inada, Tatsuhiko Kondo, Hitoshi Mori and Miki Yoshioka
2. 発表標題 Mining of ROS sensor proteins that positively regulate plant immune responses
3. 学会等名 The 12th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Hino, Keita Okamoto, Taichi Inada, Miki Yoshioka, Tatsuhiko Kondo, Hitoshi Mori, Hirofumi Yoshioka
2. 発表標題 Proteomic screening and functional analysis of plant immune ROS sensors: NbGLR positively regulates plant immune responses
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日野雄太・岡本溪太・稲田太一・吉岡美樹・吉岡博文
2. 発表標題 過硫化システイン (Cys-SSH) および多硫化システイン (Cys-SSnH, n = 1) は植物免疫応答におけるROSシグナルを介在する
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日野雄太・岡本溪太・稲田太一・吉岡美樹・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 ROSセンサータンパク質は植物病原糸状菌に対する抵抗性を正に制御する
3. 学会等名 植物微生物研究会 第30回研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日野雄太・岡本溪太・稲田太一・吉岡美樹・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 Mining for ROS sensor proteins involved in plant immune response
3. 学会等名 The Institute of Plant Science and Resources (IPSR), International Plant Web Forum 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日野雄太・岡本溪太・稲田太一・吉岡美樹・森 仁志・吉岡博文
2. 発表標題 ROS センサータンパク質の候補である GLR は植物免疫応答に関与する
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉岡美樹・田中達己・尾中南海・荒川花子・別役重之・多田安臣・鳴坂真理・鳴坂義弘・上田真澄・大高剛史・安達広明・吉岡博文
2. 発表標題 サリチル酸とジャスモン酸シグナルの拮抗作用を反映するバイオセンサーの構築
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ナノ粒子を用いた農薬送達システムによる革新的植物免疫プライミング技術の開発
https://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20201109_agr1.pdf

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