

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：32660

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21200067

研究課題名（和文）植物の感染防御における新奇オートファジー制御機構の解明とその応用

研究課題名（英文）Functional analyses of novel autophagy system in immune responses

## 研究代表者

来須 孝光（KURUSU TAKAMITSU）

東京理科大学・総合研究機構・プロジェクト研究員

研究者番号：50422499

研究成果の概要（和文）：本研究により、細胞内物流や分解系が、植物免疫を制御することを突き止めた。また、タバコ培養細胞 BY-2 株を利用したオートファジー可視化系により、植物の感染防御応答過程において、オートファジーがダイナミックに変動することが判明した。併せて、イネよりオートファジー機能の欠損変異体を単離し、機能解析を進めた。その結果、複数の生殖発達過程において、オートファジーが重要な役割を果たす新規知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Our studies revealed that plant immune responses were regulated by both membrane traffic and degradation system. We also established the real-time monitoring system of autophagy in tobacco BY-2 cells as well as rice, and found the dynamic changes of autophagy during the induction of immune responses in plant cells. In addition, we identified several autophagy mutants (*Osatgs*) from rice, and functional analyses of mutants revealed that autophagy plays critical roles in during reproductive development in rice. We believe that these findings are useful for improving stress resistance in many crops.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2011年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
総計	20,500,000	6,150,000	26,650,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：病害抵抗性、環境応答、オートファジー、細胞内物流、生殖、イネ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーはユビキチンプロテアソームと並ぶ生物の代表的な分解経路であると同時に、動物においてはアポトーシスに代表される自然免疫や抗原提示等の免疫系全般にも関与しており、タンパク質代謝だけではなく多面的な役割も果たしている。それにも関わらず、植物においてはオートファ

ジーの制御機構および生理作用に関する一連の研究が哺乳動物や酵母に比べて著しく遅れている。シロイヌナズナに代表される植物 Atg 因子群(オートファジー実行因子)の解析から実行過程の研究は進みつつあるが、生理作用に関する知見は乏しい。近年、シロイヌナズナのウイルス感染に伴う細胞死の制御にオートファジーが関与し、その過程で、

植物ホルモンであるサリチル酸が重要な役割を果たすことが報告された。しかしながら、感染時におけるオートファジー動態、多様な生物種における感染防御応答とオートファジーとの関係は未解明な部分が多い。

(2) 哺乳動物を初めとして、多くの生物種でオートファジーは生活環に必須で、胚発生や、生殖細胞におけるミトコンドリアの分解等に重要な役割を持つことも報告されている。シロイヌナズナの遺伝学的解析から、植物のオートファジーは栄養飢餓応答、老化、サリチル酸応答等に関与することが明らかにされたが、シロイヌナズナ *atg* 変異体の多くは生活環に支障はなく、発生過程や変態・分化に伴う組織再編性への直接的な影響は報告されていない。併せて、イネを含めた穀物配偶子の発達に始まる受精過程、およびその後の種子発達は、農業上重要であることは明白であるものの、その機構は未解明な部分が多い。

(3) 現時点で報告されている防疫剤はベンゾチアジアゾール(BTH)やプロベナゾール(PBZ)等少数であり、市場への実用化レベルに耐えうる防疫剤は、薬価毒性等の影響もあり、イネに対するいもち病菌抵抗剤のプロベナゾール(商品名:オリゼメート<明治製菓>)やチアジニル(商品名:ブイゲット<日本農薬>)等、極少数のみである。一方、耐病性を指標にした既存スクリーニングにより単離された、防疫剤の免疫機構における作用点に関しては、ほぼ全てが植物ホルモンであるサリチル酸(SA)シグナルを介した全身獲得抵抗性(Systemic acquired resistance; SAR)機構の増強に帰着しており、殺生菌(necrotrophic pathogen)に代表されるような広範な病原菌に対して抵抗性を示す防疫剤の報告は少数である。

## 2. 研究の目的

(1) オートファジー制御の上流シグナル伝達系の解明、およびオートファジーを含む細胞内物流制御を基盤にした作物の自然免疫やストレス増強技術の開発を目指す。

(2) オートファジーが栄養の供給源としての役割を有していることを踏まえ、農業上重要でありながら、未解明な部分が多いイネ種子の形成及び発達過程に関与する新規栄養供給源としてのオートファジー機構の役割を明らかにする。

(3) タバコ培養細胞 BY-2 株は、SAR において重要な役割を果たす SA の合成能が低下した特殊な細胞株である。そこで、タバコ培養細胞 BY-2 を利用した、効率的な新規防疫剤

創出のためのスクリーニング法の開発及び改良を目指すとともに、既存防疫剤とは作用機構の異なる候補化合物の同定を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) イネにおけるオートファジー変異株を、複数の変異ライブラリー(ミュータントパネル、T-DNA タグライン)より同定し、感染防御応答との関連性を耐病性検定等により検証。併せて、オートファジー制御候補因子の 1 つである  $Ca^{2+}$  制御型リン酸化酵素(0sCIPK15)によるカルシウム/リン酸化によるオートファジー制御機構について、遺伝学および生化学的側面から検証。

(2) 植物細胞における簡便なオートファジー可視化システムの構築及び、感染防御誘導時におけるオートファジー動態の観察。

(3) イネオートファジー変異株を利用し、組織/形態学・遺伝学的側面から生活環における表現型を検証。

(4) タバコ培養細胞 BY-2 を利用し、病原菌の感染シグナルにより誘導される、自然免疫応答の 1 つである活性酸素種(ROS)生成量を指標にした定量的且つ効率的なスクリーニング技術の確立。

## 4. 研究成果

(1) BY-2 株を用いて YFP-ATG8a を利用したオートファジーの可視化実験系を構築し、卵菌由来のエリシターであるクリプトゲインによる感染防御応答誘導過程における、オートファジーの動態を解析した。解析の結果、クリプトゲイン処理数分以内に、オートファゴソームの急速な減少が観察され、クリプトゲインによるオートファゴソーム形成抑制の可能性が示唆された。また、オートファゴソーム形成の抑制には、クリプトゲインの継続的なシグナル認識が必要であった。一方で、各種オートファジー実行経路の阻害剤を用いた薬理的の結果、オートファジーが自然免疫応答過程において重要な役割を果たす可能性が示唆された。現在、この現象の一般性を解析すると共に、オートファジー抑制機構と、クリプトゲインによって誘導されるタンパク質リン酸化やイオンフラックス等の初期応答との関係について、各種阻害剤を用いた薬理的解析を進めている。

(2) イネにおける非常に定量性の高いオートファジー可視化系の構築を進めた。その結果、オートファジー可視化マーカーである GFP-ATG8 タンパク質を発現させた形質転換イネを作出し、蛍光イメージングによる定量系の構築に成功した。また 0sATG5 抗体を用

い、OsATG5-OsATG12 複合体量を指標にした定量系の構築にも成功した。現在、本手法を用い、OsCIPK15 の  $\text{Ca}^{2+}$ /リン酸化を介したオートファジー制御機構の解析を進めている。

(2) 研究初年度(2009年度)から、イネのオートファジー変異株の同定を目指し、レトロトランスポゾン *Tos17* によるミュータントパネルや T-DNA タグラインから、PCR スクリーニングによる変異体選抜を進めた。その結果、複数の *Osatgs* 変異株の同定に成功した。予備的ながら、いもち病菌を含めた耐病性検定の結果、病害抵抗性の低下が観察された。現在更なる解析を進めている。

(3) 同定したオートファジー変異株を用い、GFP-ATG8 タンパク質によるオートファジー過程の可視化解析、電子顕微鏡観察、ATG タンパク質結合の生化学的解析等の結果、変異株ではオートファジーが完全に欠損していることが明らかになった。生活環を通してこの変異株の表現型を観察した結果、シロイヌナズナの変異株と同様に栄養飢餓時における成長不良が見られたが、それと同時に、変異体では生殖過程において、明瞭な不稔形質を示した。オートファジーの生殖過程における機能は、シロイヌナズナその他を含めて、これまで植物では全く報告されていない新規の現象である。現在、オートファジーの植物生殖過程における新規役割の解明を進めている。

(4) タバコ BY-2 細胞を利用し、感染シグナルタンパク質であるクリプトゲインにより誘導される ROS 生成量を指標とした、効率的な植物防疫剤のスクリーニング手法の改良を進めた。マイクロプレート及び多検体の同時測定が可能なルミノメーターを用いることにより、非常に効率的、且つ定量的な防疫剤スクリーニング法の確立に成功した。本法を 1 次スクリーニング系として適用し、選抜化合物を、植物個体を利用した耐病性検定(2 次スクリーニング)と組み合わせることで、飛躍的なスクリーニング効率の向上が可能である(H23 年度 PCT 出願済)。現在、化合物ライブラリーからの、防疫剤候補のスクリーニングを進めると共に、同定化合物の免疫増強過程における新規作用機構の解明を進めている。

#### 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 11 件)

- ① 来須孝光、飯田秀利、朽津和幸、Roles of a putative mechanosensitive plasma

membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel OsmCAL in generation of reactive oxygen species and hypo-osmotic signaling in rice、*Plant Signaling & Behavior*、査読有、2012、*In press*

- ② 来須孝光、山中拓哉、中野正貴、瀧口彬子、小笠原よう子、林晃之、飯田和子、花俣繁、篠崎一雄、飯田秀利、朽津和幸、Involvement of the putative  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable mechanosensitive channels, NtMCA1 and NtMCA2, in  $\text{Ca}^{2+}$  uptake,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cell proliferation and mechanical stress-induced gene expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells、*Journal of Plant Research*、査読有、2012、*In press*
- ③ 朽津和幸、濱田晴康、来須孝光、植物の免疫制御における情報素子とシグナルネットワーク、量子論から見る情報と生命の研究 2011、査読無、2012、102-107
- ④ 濱田晴康\*、来須孝光\*(\*Co-first authors)、大熊英治、能鹿島央司、清塚正弘、小谷野智子、杉山淑美、岡田憲典、古賀仁一郎、佐治光、宮尾安藝雄、廣近洋彦、山根久和、村田芳行、朽津和幸、Regulation of a proteinaceous elicitor-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx and production of phytoalexins by a putative voltage-gated cation channel, OStPC1, in cultured rice cells、*The Journal of Biological Chemistry*、査読有、287 巻、2012、9931-9939、DOI:10.1074/jbc.M111.337659
- ⑤ 来須孝光、西川大輔、山崎友香里、後藤真理子、中野正貴、濱田晴康、山中拓哉、飯田和子、中川祐子、佐治光、篠崎一雄、飯田秀利、朽津和幸、Plasma membrane protein OsmCAL is involved in regulation of hypo-osmotic shock-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice cells、*BMC Plant Biology*、査読有、12 巻、2012、e11、DOI:10.1186/1471-2229-12-11
- ⑥ 来須孝光、朽津和幸、植物の免疫力を高め病気に強くする、理大科学フォーラム、査読有、328 巻、2011、15-17
- ⑦ 来須孝光、濱田晴康、杉山淑美、矢柄寿一、門田康弘、古市卓也、林晃之、梅村賢司、小松節子、宮尾安藝雄、廣近洋彦、朽津和幸、Negative feedback regulation of microbe-associated molecular pattern-induced cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transients by protein phosphorylation、査読有、124 巻、2011、415-424、DOI:10.1007/s10265-010-0388-4

- ⑧ 桧垣匠、来須孝光、馳澤盛一郎、朽津和幸、Dynamic intracellular reorganization of cytoskeletons and the vacuole in defense responses and hypersensitive cell death, *Journal of Plant Research*, 査読有、124 巻、2011、315-324、  
DOI:10.1007/s10265-011-0408-z
- ⑨ 来須孝光、朽津和幸、植物の免疫制御機構～情報素子としてのカルシウムイオンの役割～、理大科学フォーラム、査読有、322 巻、2011、44-49
- ⑩ 来須孝光、濱田晴康、花俣繁、朽津和幸、Roles of calcineurin B-like protein-interacting protein kinases in plant innate immunity in rice, *Plant Signaling & Behavior*, 査読有、5 巻、2010、1045-1047、  
DOI:10.4161/psb.5.8.12407
- ⑪ 来須孝光、濱田淳平、能鹿島央司、北川陽一郎、清塚正弘、高橋章、花俣繁、大野良子、林晃之、岡田憲典、古賀仁一郎、廣近洋彦、山根久和、朽津和幸、Regulation of microbe-associated molecular pattern-induced hypersensitive cell death, phytoalexin production and defense gene expression by calcineurin B-like protein-interacting protein kinases, OsCIPK14/15, in rice cultured cells, *Plant Physiology*, 査読有、153 巻、2010、678-692、  
DOI:10.1104/pp.109.151852

[学会発表] (計 9 件)

- ① 来須孝光、タバコ培養細胞BY-2 の cryptogein誘導性感染防御応答におけるS型陰イオンチャネルSLAC1 の機能解析、第53回植物生理学会年会、2012年3月16日、京都産業大学(京都)
- ② 来須孝光、植物に生殖・受精におけるオートファジーの新たな役割、第4回領域会議(動植物アロ認証)、2012年1月11日、筑波大学(茨城)
- ③ 来須孝光、植物におけるオートファジーの多面的な生理機能の解析、RNA科学総合研究センター公開シンポジウム、2011年7月11日、東京理科大学(千葉)
- ④ 来須孝光、イネにおけるオートファジー機構の役割、2011年度細胞周期セミナー、2011年6月17日、かんぼの宿山代(福井)
- ⑤ 来須孝光、植物の感染防御応答におけるオートファジー動態の解析、第6回オートファジー研究会、2011年1月13日、ヤマハリゾートつま恋(静岡)
- ⑥ 来須孝光、イネ培養細胞の自然免疫応答

におけるカルシウム制御型プロテインキナーゼ OsCIPK14/15 の機能解析、イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ2010、2010年7月2日、つくば国際会議場(茨城)

- ⑦ 来須孝光、細胞内物流システムを介した植物免疫の新規制御機構、～植物免疫増強と抗菌能を併せ持つ防疫剤の創出に向けて～、JST Innovation Bridge東京理科大学研究シーズ発表会、2010年3月16日、秋葉原ダイビル(東京)、<招待講演>
- ⑧ 来須孝光、植物免疫の新規制御機構～植物免疫賦活効果と抗菌活性を併せ持つ防疫剤の創出を目指して～、東京理科大学 SCITEC CLUBセミナー、2009年11月13日、森戸記念館(東京)、<招待講演>
- ⑨ 来須孝光、DYNAMICS OF AUTOPHAGY DURING PATHOGENIC SIGNAL-TRIGGERED IMMUNE RESPONSES IN TOBACCO BY-2 CELLS、International Symposium on Autophagy、2009年9月26日、大津プリンスホテル(滋賀)

[図書] (計 2 件)

- ① 来須孝光、朽津和幸、World Scientific、Signaling network of environmental sensing and adaptation in plants: key roles of calcium ion. In: *QUANTUM BIO-INFORMATICS IV From Quantum Information to Bio-Informatics*. (Edited by Accardi, L., Freudenberg, W., Ohya, M.)、査読有、2011、427-436
- ② 濱田晴康、来須孝光、朽津和幸、共立出版、植物のシグナル伝達-分子と応答-「植物の防御応答におけるカルシウムシグナリング」、2010、105-112

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: METHOD OF SCREENING FOR PLANT DEFENSE ACTIVATORS, PLANT DEFENSE ACTIVATORS, AND METHOD OF ENHANCING IMMUNE RESPONSE

発明者: 来須孝光、朽津和幸

権利者: 東京理科大学

種類: PCT

番号: JP2011/068585

出願年月日: 2011年8月10日

国内外の別: アメリカ仮出願から PCT 出願、現在 34 条補正予定、移行国は、日本、アメリカ、EU など予定

[その他]

ホームページ等

- ① <http://www.tus.ac.jp/tlo/new/pdf/100>

- [607.pdf](#)  
② <http://www.tus.ac.jp/tlo/new/pdf/120216.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

来須 孝光 (KURUSU TAKAMITSU)  
東京理科大学・総合研究機構・プロジェクト研究員  
研究者番号：50422499

(2) 連携研究者

朽津 和幸 (KUCHITSU KAZUYUKI)  
東京理科大学・理工学部・教授  
研究者番号：50211884  
高橋 章 (TAKAHASHI AKIRA)  
独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学研究領域耐病性研究ユニット・研究員  
研究者番号：20414914  
光原 一郎 (MITSUHARA ICHIRO)  
独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学研究領域植物微生物間相互作用研究ユニット・研究員  
研究者番号：80370683