

機関番号：32660

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780041

研究課題名（和文）オートファジーを利用した耐病性イネ創出と、自然免疫能を強化する薬剤の開発

研究課題名（英文）Enhancement of defense response by autophagy modulation, and screening for discovering novel defense activators

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、細胞内物質輸送や分解システムが、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、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、および複数の防疫剤候補化合物の同定にも成功した。本システムは穀物に適用可能な新規防疫剤の効率的な選抜に利用出来ると期待される。併せて、イネよりオートファジー機能の欠損変異体の単離にも成功した。

研究成果の概要（英文）：Our studies revealed that plant immune responses are regulated by both membrane traffic and degradation system. We established the effective screening methods for novel defense activators by using ROS (reactive oxygen species) monitoring system in tobacco BY-2 cells, and found several candidates of defense activators. We believe that this system is useful for a new pesticide screening for many crops. We also identified several mutants of autophagy genes (*Osatgs*) in rice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

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、イネ、オートファジー、細胞内物流、自然免疫、防疫剤、培養細胞

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い多面的な役割を果たしている。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、植物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する可能性が報告された

が、植物自然免疫応答とオートファジーとの関係は未解明であった。

(2) 近年盛んに行われている、ケミカルバイオロジーを駆使した、植物への免疫能を強化する薬剤の大規模スクリーニングでは、多くの時間をかけて構造物質を単離しても、その植物に与える作用効果は初期段階では未解明の場合が殆どである。実際、現時点で報告されている防疫剤はベンズチアジゾール(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：ブイグット<日本農薬>)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) イネにおけるオートファジーを含めた細胞内物流システムと自然免疫応答調節機構の解明と、それを基盤にした、自然免疫能を抜本的に向上させた耐病性イネの創出を目指す。

(2) 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。自然免疫応答は、植物が本来有している抵抗性反応であり、未だ有望な防疫剤が存在していない、ジャガイモや大豆等の経済的メリットの高い植物にも共通して存在する防御応答機構である。自然免疫応答を増強することが可能になれば、多様な植物種において、複数の病原菌に対する抵抗性を上昇させることが可能であり、申請者の同定した化合物を処理することにより、環境への影響が大きい殺菌剤使用の低減が期待出来る。

3. 研究の方法

(1) イネにおけるオートファジー変異株を(*Osatgs*)、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。

(2) 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を目指すと共に、新規防疫剤候補化合物の同定を進める。

4. 研究成果

(1) 研究初年度(2009年度)から、イネにおける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、2010 年度において、複数の複数の *Osatgs* 変異株の同定に成功した。現在、研究試料確保のため、後代種子の取得を進めている。試料が確保出来次第、多様な病原菌を用いた、病害抵抗性の検定を行う予定である。

(2) 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。本スクリーニングの特徴として、①植物個体を利用したスクリーニングに比べて、化合物の細胞への浸潤性が高いことから、既存のスクリーニングにより除外されていた化合物に関しても網羅的に同定出来る、②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(図1、3)。本スクリーニング手法を用いることにより、複数の新規防疫剤候補の単離に成功した(図2)。現在、防疫剤スクリーニング法及び選抜化合物の防疫剤利用を骨格とする特許出願の準備(H23年度PCT出願予定)と共に、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。

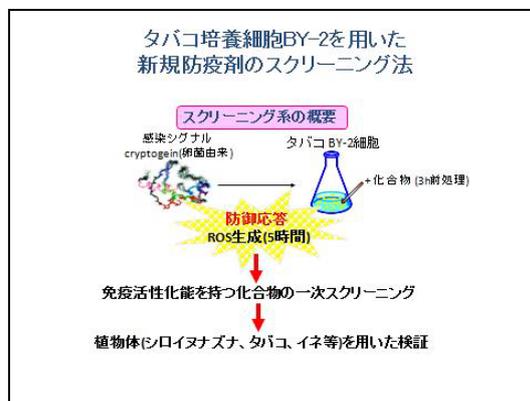


図1 スクリーニング手順

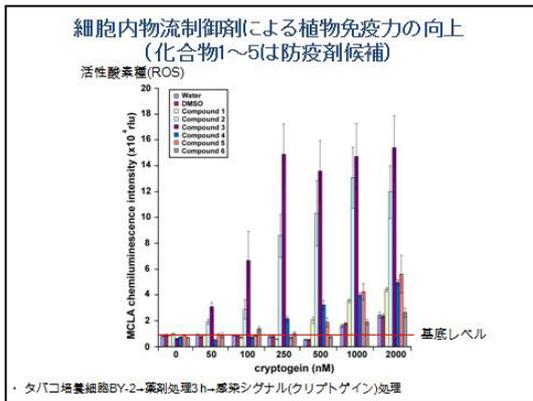


図2 選抜された防疫剤候補の一例

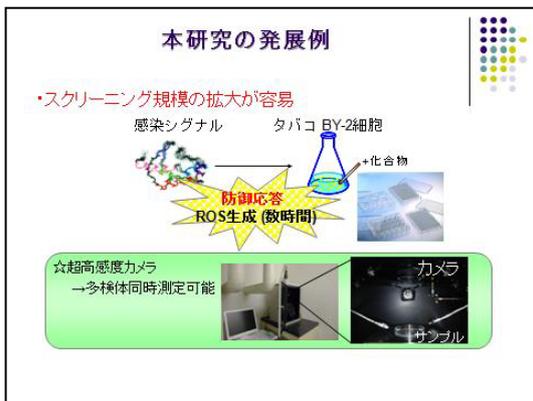


図3 研究の発展例

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3件)

- ① 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 卷、2010、678-692
- ② 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 卷、2010、1045-1047
- ③ 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、

[学会発表] (計5件)

- ① 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)
- ② 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)
- ③ 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)
- ④ 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)
- 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)

[図書] (計2件)

- ① 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
- ② 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.), 2011、427-436

[その他]

ホームページ等

<http://www.tus.ac.jp/tlo/new/pdf/100607.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)研究協力者

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 一朗 (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