

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 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22370022

研究課題名（和文） 病害応答を制御する葉緑体シグナルの解明

研究課題名（英文） Chloroplast Signals regulating plant immune responses

研究代表者

椎名 隆 (SHIINA TAKASHI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10206039

研究成果の概要（和文）：

植物の免疫応答では、サリチル酸が局所および全身的な免疫応答を制御し、活性酸素種や一酸化窒素が重要な細胞内シグナル分子として働く。これらの免疫シグナル分子の合成には葉緑体が深く関わっている。しかし、植物免疫応答における葉緑体の役割は、これまでほとんど注目されていなかった。本研究では、植物免疫応答における葉緑体の役割を検証し、葉緑体 Ca^{2+} 結合タンパク質 CAS を介した新しい葉緑体免疫シグナルを発見した。

Salicylic acid acts as an endogenous signal that triggers local and systemic response in the plant immune system. Both reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) may play important roles in regulation of immune cell signal transductions. It should be noted that chloroplasts are involved in the production of these immune signals. However, a role for chloroplasts in plant immune system remains largely elusive. This study provides novel insights into chloroplastic control of plant immunity through a thylakoid-localized Ca^{2+} binding protein CAS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	10,900,000	3,270,000	14,170,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子・生理科学

キーワード：植物分子機能、葉緑体、 Ca^{2+} 、サリチル酸、感染防御、逆行性シグナル

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は、光合成器官であると同時に様々な代謝反応の場でもある。例えば、免疫シグナルとして局所的及び全身的免疫応答に関わるサリチル酸は、シロイヌナズナの場合、葉緑体内でシキミ酸からイソコリスミ酸を介して合成される。また、ROS や NO は、植物免疫応答において重要なシグナル分子と

して働くことが知られている。また、植物免疫応答の一つ過敏感細胞死では、葉緑体由来の ROS が細胞死の制御に必要なことが指摘されている。実際、葉緑体は ROS や NO の主要な生成場所として知られている。

しかし、葉緑体と植物免疫応答の関係に触れた先行研究はほとんどなく、サリチル酸合成の制御に葉緑体がどのように関わってい

るのか、植物免疫応答において、葉緑体での ROS や NO 生成がどのように制御されているのかなど、ほとんど分かっていなかった。一方、植物免疫応答が光環境依存であることを指摘する研究があり、葉緑体が免疫応答制御に関与する可能性も指摘されていたが、その実体は全く分かっていなかった。

葉緑体は原核生物であるシアノバクテリアが共生進化したオルガネラである。真核細胞では、Ca²⁺が細胞内シグナル分子として重要な働きをしているが、原核細胞の Ca²⁺シグナルの役割は限定的であると考えられている。一方、動物細胞のミトコンドリアでは、ミトコンドリア Ca²⁺濃度の上昇がアポトーシスを引き起こすことが知られている。しかし、ミトコンドリアと同じく共生オルガネラである葉緑体における Ca²⁺シグナルの実体もほとんど分かっていなかった。明暗に反応して葉緑体 Ca²⁺濃度の変動することを指摘する研究もあるが、その確認実験は行われていない。

2. 研究の目的

本研究は、植物免疫応答における葉緑体の役割を解明することを目的とした。葉緑体が病原体の感染を認識するのか？どのような機構で病原体の感染シグナルが細胞内にある葉緑体に伝達されるのか？さらに、葉緑体はどのように細胞質や核で起こる感染防御応答を制御するのか？これらの問題にたいして、分子生物学および細胞生物学的アプローチで、分子レベルでの解明を目指した。

また、原核細胞由来の葉緑体が、動物細胞のミトコンドリアと同じような Ca²⁺シグナルを生じるのか、生じるとしたらその役割は何か、を解明するのも本研究の重要な研究目的である。

3. 研究の方法

本研究は、主にシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を実験材料として行った。CAS 欠失変異体 (*cas-1*) は、T-DNA 挿入変異体を用いた。形質転換はアグロバクテリウム法で行った。Pseudomonas の感染実験はインフィルトレーション法によって行った。また、PAMP (flg22 およびキチン) の処理は、シャーレ中の 1/2MS 培地に植物体を浮かべ、培地に PAMP を投与することで行った。

Ca²⁺測定には葉緑体ストロマまたは細胞質にイクオリンをターゲットさせた形質転換シロイヌナズナを用いた。イクオリン発光はルミノメータを用いて解析した。

ホルモン分析は、LC-MS によって行った。

4. 研究成果

(1) 葉緑体 Ca²⁺シグナルのストレス応答

本研究では、Ca²⁺センサー発光タンパク質イクオリンを葉緑体ストロマにターゲットすることで、葉緑体内 Ca²⁺濃度測定を行った。まず、ストロマの Ca²⁺濃度が 0.1 μM の非常に低い濃度に保たれていることが分かった。これは、細胞質の遊離 Ca²⁺濃度と同じレベルであり、葉緑体内で Ca²⁺シグナルが生じる可能性が考えられた。そこで、光条件や病原体エリシター、各種ストレスに対する葉緑体内 Ca²⁺応答を測定し、細胞質 Ca²⁺シグナル応答と比較した。

まず、明所で育成していた植物を暗条件に移すと、数分のラグの後、十数分続く長いストロマ Ca²⁺濃度の上昇が確認された。これは、以前報告されていた、葉緑体 Ca²⁺濃度の光制御と同じ結果であった。さらに興味深いことに、病原体由来エリシターで、病原体関連分子パターン (PAMP) として知られるバクテリア鞭毛フラジェリンペプチド (flg22)、および真菌細胞壁特異成分キチンを葉に処理した所、植物体を暗所に移した時と同様に、数分のラグに引き続き、数十分続くゆっくりした Ca²⁺濃度の一過的上昇が観察された (図 1)。一方、環境ストレスにも応答してストロマ Ca²⁺濃度が変化することも見いだした。低温や塩ストレスに対しては、非常に早い小さな Ca²⁺濃度変化が観察された。一方、浸透圧ショックに対しては、2相性のゆっくりした Ca²⁺濃度変化が見られた。これらの結果は、葉緑体 Ca²⁺濃度がストレス特異的なダイナミックな濃度変化を起こすことを示している。PAMP 処理が数十分後に葉緑体の光合成パラメータを変化させることが知られており、そのタイムコースと一致する結果である。

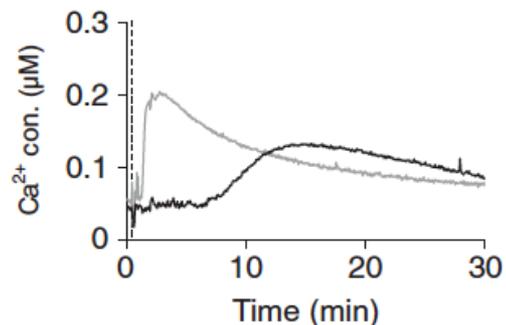


図 1 flg22 が誘導する細胞質 (グレー) および葉緑体ストロマ (黒) の Ca²⁺濃度変化

(2) 葉緑体 Ca²⁺シグナル発生機構

flg22 が誘導する葉緑体 Ca²⁺シグナルは、常に細胞質 Ca²⁺濃度変化に遅れて発生する。細胞質 Ca²⁺濃度上昇が葉緑体 Ca²⁺シグナルの発生を引き起こしている可能性を検証するために、Ca²⁺イオノフォア (イオノマイシン) を処理することで、葉緑体 Ca²⁺シグナルが生じることを見いだした。逆に、Ca²⁺キレータ

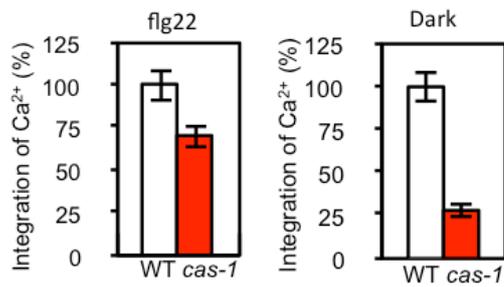


図2 flg22 および暗処理が誘導する葉緑体 Ca²⁺シグナルは CAS に依存する

BAPTA 処理は、細胞質および葉緑体いずれの Ca²⁺シグナルも阻害した。これらの結果は、PAMP はまず細胞質 Ca²⁺濃度上昇を引き起こし、細胞質 Ca²⁺が葉緑体 Ca²⁺シグナルを発生させていることが分かった。また、タンパク質リン酸化阻害剤は葉緑体 Ca²⁺シグナルの発生に部分的に関わっていることも明らかにした。一方、葉緑体における Ca²⁺輸送機構は全く分かっていない。本研究では、葉緑体チラコイド膜に局在する Ca²⁺結合タンパク質(CAS)に注目した。葉緑体 Ca²⁺シグナル形成への役割を検証したところ、CAS 欠失変異体では、葉緑体 Ca²⁺シグナルが約 3~7 割減少することが分かった (図2)。CAS はチラコイド膜からの Ca²⁺流出に関与している可能性が考えられる。

(3) CAS を介した植物免疫応答制御

flg22 などの PAMP に応答して葉緑体に一過的 Ca²⁺濃度変化が生じるという発見は、植物免疫応答に葉緑体の Ca²⁺センサータンパク質が関与する可能性を示唆する。そこで、チラコイド膜局在の Ca²⁺結合タンパク質 CAS に注目し、CAS 欠失変異体における各種免疫応答の評価を行った。その結果、CAS 欠失変異体では、感染させた *Pseudomonas* 菌の増殖抑制が抑制されていること、PAMP が誘導する気孔閉鎖、カロース誘導などの基本免疫応答も低下していること、さらに PR-1 や PR-2 などの免疫マーカー遺伝子発現が強く抑制されて

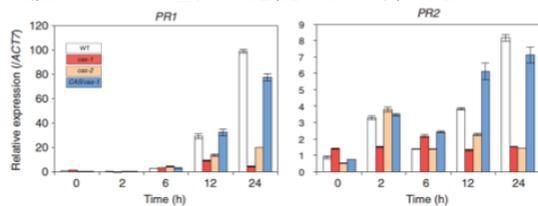


図3 CAS 変異体における PR 遺伝子発現 CAS 欠失変異体 (*cas-1*, *cas-2*) では、PR1 および PR2 遺伝子発現が抑制されている。CAS cDNA は、この変異を相補する。いることを明らかにした (図3)。このこと

は、葉緑体タンパク質 CAS が基礎的免疫応答の制御に関わっている可能性を強く示唆する。

また、エフェクターをもつ抵抗性の病原菌に対して、植物は局所的な過敏感細胞死によって抵抗することが知られている。CAS 欠失変異体における過敏感細胞死について検討した結果、CAS が過敏感細胞死の誘導に関与していることが分かった。CAS 欠失変異体では、過敏感細胞死に先だった ROS や NO 生成が抑制され、過敏感細胞死の誘導も遅れることが分かった。これらの結果から、葉緑体の Ca²⁺結合タンパク質 CAS が、基礎的免疫応答と過敏感細胞死の2つの免疫応答に共通して働く葉緑体因子であることが分かった。また、これらの研究から、葉緑体が植物免疫反応に重要な働きをしていることが明らかになった。

(4) CAS とサリチル酸誘導

気孔閉鎖や PR 遺伝子発現誘導などの基礎免疫応答および過敏感細胞死は、サリチル酸によって制御されている可能性がある。そこで、CAS 欠失変異体における植物ホルモン(サリチル酸、ジャスモン酸、ABA、IAA、サイトカイニン)の挙動の網羅的解析を行った。その結果、野生型植物では flg22 によってサリチル酸合成のみが誘導され、他のホルモンには顕著な影響が無いこと、CAS 欠失変異体では、サリチル酸誘導が大きく阻害されていることが分かった (図4)。従って、CAS 欠失変異体で見られた免疫応答の抑制の多くはサリチル酸合成抑制の結果であると考えられる。

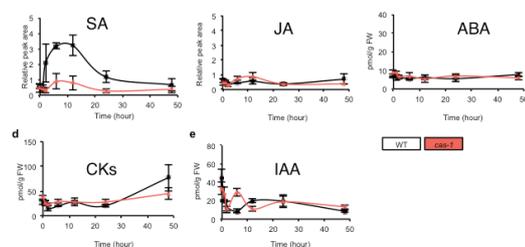


図4 野生型植物(黒)および CAS 欠失変異体 (*cas-1*; 赤)における flg22 に応答した植物ホルモン合成

一方、CAS に依存したサリチル酸合成の誘導機構を検証するため、サリチル酸合成に関係する遺伝子群の発現挙動を調べた所、ICS1、EDS5 などの発現が CAS 欠失変異体で大きく減少していることが分かった。ICS1 などのサリチル酸合成遺伝子は核ゲノムにコードされており、CAS 依存的に何らかの葉緑体免疫シグナルが発信され、これらの遺伝子発現を誘導している可能性が考えられた。

(5) 葉緑体免疫シグナル

続いて葉緑体免疫シグナルを同定するために、CAS 欠失変異体を用いたマイクロアレイ解析を行った。その結果、f1g22 によって基礎的抵抗性を誘導した植物において、1235 の CAS 依存遺伝子と、687 の CAS 欠失変異体で発現が上昇する遺伝子を同定した。興味深いことに、前者にはストレスや感染防御応答関連遺伝子が多く含まれ、後者には葉緑体にターゲットする光合成関連遺伝子が多く存在した。この結果は、CAS 依存の逆行性免疫シグナルにより防御関連遺伝子発現が促進され、光合成関連遺伝子発現が抑制されていることを示唆する。葉緑体免疫シグナルは、感染に伴った栄養生長モードから感染防御の緊急モードへの切り替えに関係しているのかもしれない。

続いて、1235 の CAS 依存遺伝子を詳しく調べた所、一重項酸素シグナル応答遺伝子群と大きく重なることが分かった。過酸化水素応答遺伝子群とのオーバーラップはあまり見られなかった。この結果から、葉緑体免疫シグナルは葉緑体由来の一重項酸素シグナルと深く関係し、CAS がシグナルの発生に関与している可能性が考えられる。

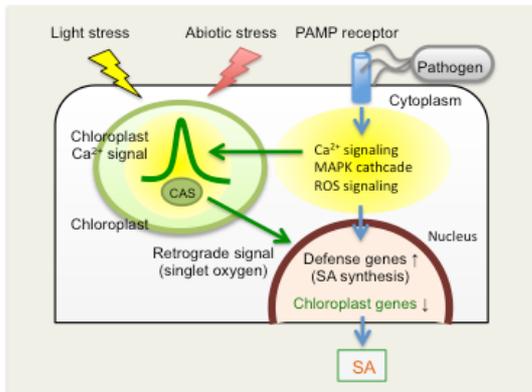


図5 CAS が関係する葉緑体免疫シグナル

(6) 植物免疫の光応答

ここまで明らかにしてきたように、葉緑体チラコイド膜の CAS が感染防御王という電子群の発現を活性化する一重項酸素シグナルと関係しているのなら、防御応答遺伝子群の発現が光に依存している可能性が考えられる。そこで、野生型植物を用い、f1g22 に対する防御応答遺伝子群の発現挙動を解析した。その結果、特にサリチル酸合成遺伝子群の発現が光に強く依存していることを見いだした。さらに光合成阻害剤を用いた実験から、この誘導に光合成が強く関わっていることも明らかにした。これらの結果から、サリチル酸合成遺伝子群の発現が光合成に強く依存しており、光合成を介して植物免疫が制御されていることが分かった。

(7) サリチル酸輸送体候補 EDS5 の包膜局在

EDS5 は MATE 型輸送体で、葉緑体からのサリチル酸輸送に関わっている可能性が指摘されている。しかし、実際の葉緑体内局在については分かっていなかった。本研究では、GFP 融合タンパク質の局在解析と葉緑体分画実験により、EDS5 が葉緑体包膜に局在するタンパク質であることを明らかにした。また、EDS5 の自己プロモータから EDS5-GFP 融合タンパク質を発現する形質転換細胞の解析から、EDS5 が主に表皮細胞の葉緑体に発現している可能性が示唆された。この結果は、EDS5 を介したサリチル酸合成が主に表皮細胞で行われている可能性を示唆する。

(EDS5p::EDS5-GFP)

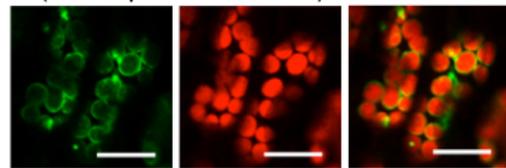


図6 EDS5 プロモータから発現させた EDS5-GFP 融合タンパク質は包膜に局在する
左: GFP 蛍光、中央: クロロフィル蛍光、右: マージ

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Yamasaki K, Motomura Y, Yagi Y, Nomura H, Kikuchi S, Nakai M, Shiina T. (2013) Chloroplast envelope localization of EDS5, an essential factor for salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* 18 doi:pii: e23603. (査読有り)
- ② Nakai Y, Nakahira Y, Sumida H, Takebayashi K, Nagasawa Y, Yamasaki K, Akiyama M, Ohme-Takagi M, Fujiwara S, Shiina T, Mitsuda N, Fukusaki E, Kubo Y, Sato MH. (2013) Vascular plant one-zinc-finger protein 1/2 transcription factors regulate abiotic and biotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2013 73, 761-75 doi: 10.1111/tpj.12069. (査読有り)
- ③ Asai S, Ichikawa T, Nomura H, Kobayashi M, Kamiyoshihara Y, Mori H, Kadota Y, Zipfel C, Jones JD, Yoshioka H. (2013) The Variable Domain of a Plant Calcium-dependent Protein Kinase (CDPK) Confers Subcellular Localization and Substrate Recognition for NADPH Oxidase. *J Biol Chem.* 288, 14332-40 doi:

- 10.1074/jbc.M112.448910. (査読有り)
- ④ Yagi Y, Ishizaki Y, Nakahira Y, Tozawa Y, Shiina T. (2012) Eukaryotic-type plastid nucleoid protein pTAC3 is essential for transcription by the bacterial-type plastid RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 7541-6 doi: 10.1073/pnas.1119403109. (査読有り)
- ⑤ Nomura H, Komori T, Uemura S, Kanda Y, Shimotani K, Nakai K, Furuichi T, Takebayashi K, Sugimoto T, Sano S, Suwastika IN, Fukusaki E, Yoshioka H. Nakahira Y, Shiina T. (2012) Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis*. *Nat Commun.* 26;3:926. doi: 10.1038/ncomms1926. (査読有り)
- ⑥ Koeda S, Hosokawa M, Kang BC, Tanaka C, Choi D, Sano S, Shiina T. Doi M, Yazawa S. (2012) Defense response of a pepper cultivar cv. Sy-2 is induced at temperatures below 24°C. *J Plant Res.* 125, 137-45 <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10265-011-0414-1> (査読有り)
- ⑦ Bang WY, Chen J, Jeong IS, Kim SW, Kim CW, Jung HS, Lee KH, Kweon HS, Yoko I, Shiina T. Bahk JD. (2012) Functional characterization of ObgC in ribosome biogenesis during chloroplast development. *Plant J.* 71, 122-34doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04976.x. (査読有り)
- ⑧ Yagi Y, Shiina T. (2012) Evolutionary aspects of plastid proteins involved in transcription: The transcription of a tiny genome is mediated by a complicated machinery. *Transcription.* 3, 1-5 <http://www.landesbioscience.com/journals/transcription/article/21810/?noca che=1659960848> (査読有り)
- ⑨ Kobayashi M, Yoshioka M, Asai S, Nomura H, Kuchimura K, Mori H, Doke N, Yoshioka H. (2012) StCDPK5 confers resistance to late blight pathogen but increases susceptibility to early blight pathogen in potato via reactive oxygen species burst. *New Phytol.* 196, 223-37 doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04226.x. (査読有り)
- ⑩ Sugimoto T, Bamba T, Izumi Y, Nomura H, Shiina T. Fukusaki E. (2011) Use of ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with nozzle-skimmer fragmentation for comprehensive quantitative analysis of secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *J Sep Sci.* 34, 3587-96 doi: 10.1002/jssc.201100552. (査読有り)
- ⑪ Im CH, Hwang SM, Son YS, Heo JB, Bang WY, Suwastika IN, Shiina T. Bahk JD. (2011) Nuclear/nucleolar GTPase 2 proteins as a subfamily of YlqF/YawG GTPases function in pre-60S ribosomal subunit maturation of mono- and dicotyledonous plants. *J Biol Chem.* 286, 8620-3 doi: 10.1074/jbc.M110.200816. (査読有り)
- ⑫ Hasegawa M, Shiina T. Terazima M, Kumazaki S. (2010) Selective excitation of photosystems in chloroplasts inside plant leaves observed by near-infrared laser-based fluorescence spectral microscopy. *Plant Cell Physiol.* 51, 225-38. doi: 10.1093/pcp/pcp182. (査読有り)
- [学会発表] (計 35 件)
- ① Takashi Shiina Chloroplast Ca²⁺ and Plant Immunity 3rd International Symposium on Chloroplast Genomics and Genetic Engineering (招待講演) 2013 年 5 月
- ② 椎名隆 植物の細胞内シグナル伝達系と共生オルガネラ 第 54 回植物生理学会 (シンポジウム) 2013 年 3 月
- ③ Takashi Shiina 29th IPSR International Symposium and 5th Symposium on Plant Sciences (招待講演) 2013 年 2 月
- ④ 椎名隆, 野村 裕也 葉緑体 Ca²⁺シグナリングと植物のストレス・感染防御応答 日本植物学会第 75 回大会 (シンポジウム) 2011 年 9 月
- ⑤ 椎名隆, 野村 裕也 植物免疫応答における Ca²⁺シグナルと CAS の役割 日本植物学会第 74 回大会 (シンポジウム) 2010 年 9 月
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
椎名 隆 (SHIINA TAKASHI)
京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号: 10206039
- (2) 研究分担者

吉岡 博文(YOSHIOKA HIROFUMI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：30240245