

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22770052

研究課題名（和文） 全身獲得抵抗性の安定化に関わるカルモジュリンの解析

研究課題名（英文） Effects of SAR-inducible calmodulin or calmodulin-like genes on the crosstalk between SA-ABA signaling.

研究代表者

安田 美智子 (YASUDA MICHIKO)

独立行政法人理化学研究所・植物微生物共生機能研究チーム・研究員

研究者番号：30425649

研究成果の概要（和文）：

植物の全身獲得抵抗性はアブシジン酸を介する環境ストレス応答により抑制される。そこで、全身獲得抵抗性誘導時に環境ストレスの影響を受けるカルモジュリンの機能を解析した。SAR誘導時のカルモジュリン遺伝子の発現やカルモジュリン欠損株や過剰発現株における全身獲得抵抗性の誘導および環境ストレス応答性遺伝子の発現等を解析した結果、カルモジュリンが全身獲得抵抗性誘導経路の上流で機能していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Intracellular calcium signaling during plant-pathogen interactions are necessary for early events leading to local and systemic acquired resistance (SAR). Plants over-expressed Calmodulin gene (*AtCAMox*) constitutively exhibited disease resistance against virulent bacterial pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. The expression of SAR marker genes was elevated in *AtCAMox* compared with wild-type plants. These results suggest that *AtCAM* is a positive regulator of SA-dependent defense signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

 キーワード：シロイヌナズナ、カルモジュリン、全身獲得抵抗性、アブシジン酸、病害抵抗性、*PR* 遺伝子、クロストーク

1. 研究開始当初の背景

植物の全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance, SAR) は、植物独自の病害抵抗性であり、幅広い病原菌に効果を発揮するため、これまで盛んに研究が行われてきた。申請者は、「環境ストレス応答が SAR の誘導を抑制する」という新たな現象 (Yasuda et al., (2008) *The Plant Cell*, 20:1679-1692) を見出した。この現象に関わる因子を見出すため、環境ストレス応答に機能する植物ホルモン—アブシジン酸 (Abscisic acid, ABA) と SAR 誘導剤の共処理を行い、ABA 処理で発現が抑制される SAR 誘導性の遺伝子をシロイヌナズナのマイクロアレイを用いて解析した。その結果、カルシウムシグナル伝達に関与するカルモジュリン (Calmodulin, CAM) およびカルモジュリン様タンパク質 (CaM-like protein, CML) が複数選抜された。

カルシウムイオン (Ca^{2+}) は、細胞内のシグナル分子として様々な反応を細胞に引き起こす。CaM および CML は Ca^{2+} と結合することで活性化し、標的タンパク質に Ca^{2+} シグナルを伝達する重要な因子であることが知られている。活性化された CaM/CML はプロテインフォスファターゼ、プロテインキナーゼ、WRKY 転写因子、その他多くの CaM 結合タンパク質と結合してシグナルを活性化させる (McCormack et al. (2005) *Trends Plant Sci.* 10:383-389, Harper et al. (2004) *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:2263-288)。植物では、CaM は生長調節や様々なストレスシグナル応答に働いており、モデル植物であるシロイヌナズナでは CaM が 7 個、CaM 様タンパク質 (CML) が 50 個以上存在するが、病害ストレスにより誘導される CaM は CML42 と CML43 が報告されているのみである (Park et al. (2004) *Mol. Cells* 18: 207-213)。また、CaM の制御を受ける因子として Ca^{2+} /CaM 依存プロテインキナーゼ (CaMK) が明らかにされ、近年 CaMK が介在する多くの生理機能 (ミヤコグサの根粒形成・タバコのウイルス抵抗性等) の詳細が明らかにされてきている (Imaizumi et al. (2005) *Nature* 433:527-531, Yamakawa et al. (2007) *Plant Cell Physiol.* 48:414-423)。以上のように、CaM/CML が植物のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが明らかにされているが、現在までに SAR 誘導および ABA と SAR 誘導のクロストークに機能する CaM/CML は未だに明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、SAR 誘導と環境ストレス応答のクロストークに関与する CaM/CML を同定する。これらの遺伝子欠損変異株、過剰発現株におけるマーカー遺伝子の発現解析および耐病性試験等により、SAR 誘導における必要性、環境ストレス応答における機能、さらに、ABA シグナルによる SAR 抑制への関与を解析する。また、酵母の Two Hybrid 法を用いて、CaM/CML の標的因子を同定し、その機能について解析する。本研究では、これらの CaM のクロストークにおける機能を中心に解析することにより、SAR の誘導とその制御における細胞内 Ca^{2+} シグナルの役割を明らかにすることを目的とした研究を行う。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ野生株における CaM/CML 遺伝子の発現解析

モデル実験植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0) に SAR 誘導剤、ABA、SAR 誘導剤と ABA の共処理を行い、CaM/CML 遺伝子の発現を継時的に解析する。また、SAR 誘導経路に関連した変異株 (Col-0 background) にも同様の処理を行ない、SAR シグナル伝達に関連する因子が CaM/CML 遺伝子の発現に及ぼす影響を解析する。

(2) 遺伝子欠損変異株を用いた解析

ストックセンターから CaM 遺伝子欠損変異株を取り寄せ、ジェノタイプピングを行い、ホモ変異株を選抜する。シロイヌナズナに感染する罹病性病原菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 の接種試験を行い、病害抵抗性に及ぼす影響を解析する。また、Real-time PCR 法を用いて、SAR マーカー遺伝子の発現等を野生株と比較することで、CaM/CML 遺伝子の欠損が SAR 誘導に及ぼす影響を解析する。

(3) 過剰発現株を用いた解析

カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで CaM/CML 遺伝子を過剰発現させた植物を作製した。過剰発現株について、病害抵抗性、遺伝子発現等をベクターのみを導入したベクターコントロールと比較し、CaM が過剰発現したことによる病害抵抗性に及ぼす影響を解析する。

(4) 酵母 Two Hybrid システムを用いた CaM 相互作用因子の探索

酵母内で発現させるベイトベクターに CaM/CML を挿入した酵母を作製する。プレイベクターにシロイヌナズナの cDNA ライブラリを挿入し、接合により CaM と相互作用するシロイヌナズナの因子を探索する。ここで得られた CaM と相互作用することが推察される候補因子をリストアップして、cDNA 全長を挿入したプレイとの相互作用を確認する。得られた相互作用候補因子から、本研究で用いている CaM/CML の SAR 誘導時における機能を推察する。

4. 研究成果

(1)シロイヌナズナ野生株および NPR1 欠損株における CaM/CML 遺伝子の発現解析

マイクロアレイから選抜した CAM/CML 遺伝子の発現誘導をリアルタイム PCR で解析した結果、SAR 誘導により 30 分-2 時間で一過的な発現が誘導されるが、24 時間以降に再度発現が誘導されることが明らかとなった。SAR のシグナルが伝達されない *npr1* 変異株では、短時間での発現は認められたが、長時間での発現誘導は認められなかった。この結果から、カルモジュリン遺伝子の発現は NPR1 非依存的な短時間での誘導と NPR1 依存的な長時間での誘導の 2 段階の制御により発現を制御されている可能性が示唆された。また、ABA の前処理により、SAR 誘導剤処理後もこれらの CAM/CML 遺伝子の発現が誘導されないことを明らかにした。

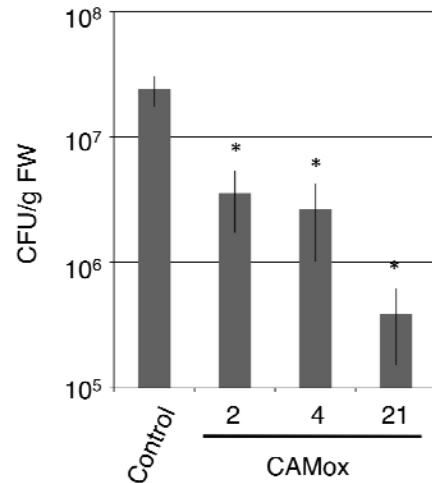
(2)CaM/CML 遺伝子欠損変異株における SAR 誘導

CaM/CML 遺伝子を単独で欠損させた株では、野生株に比べてわずかに SAR 誘導能が劣る株もあったが、全体的に SAR 誘導におよぼす遺伝子欠損の影響が少ないことを明らかにした。そこで、CAM/CML 多重変異株を交配により作製しているが、標的にしている CaM/CML 遺伝子が隣接していることもあり、非常に苦戦している。RNAi 株の作出も検討したが、着手出来ていない。これらの株が出来た際には、SAR 誘導に関与している可能性について検証する予定である。

(3)CAM 遺伝子過剰発現株における SAR 誘導

CAM 遺伝子の発現レベルが約 10 倍から 120 倍異なる T2 の CAM 遺伝子過剰発現株 (CAMox) を 3 ライン用いて、病原菌接種試験による病害抵抗性、抵抗性関連遺伝子の発

現、病害抵抗性に関連する植物ホルモン量を測定した。発現レベルが約 10 倍の CAMox では、抵抗性関連遺伝子の発現、植物ホルモン量に変化は認められなかったが、葉での病原菌増殖が抑制されたことから、病害抵抗性の増強効果が認められた。発現レベルが 120 倍の CAMox では、病害抵抗性の増強、抵抗性関連遺伝子の発現、およびサリチル酸の蓄積量の顕著な増加が認められた。これらの結果から、CAM が SAR 誘導経路の上流に機能している可能性が示唆された。(図 1)

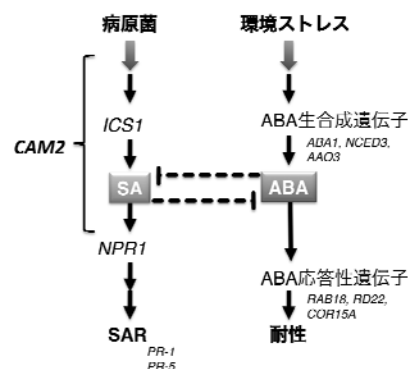


(図 1 CAMox における病害抵抗性誘導効果の解析)

(4) 酵母 Two Hybrid システムを用いた CaM 相互作用因子の探索

酵母 Two-hybrid システム (Dual Hunter, コスモバイオ) を用いて、CAM と相互作用する因子の探索を試みた。しかし、本システムではコントロールのプラスミドを使用した実験においても擬陽性となったため、他のシステムへの移行を検討中である。

CAM2の推定された機能



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0件)

[学会発表] (計4件)

- ① 富澤隆章、安田美智子、篠崎聰、仲下英雄「SA-ABA クロストークに関連するカルモジュリンの解析」植物化学調節学会第47回大会、2012年10月27-28日、山形
- ② 安田美智子、篠崎聰、仲下英雄「SA-ABA クロストークにおける WRKY18 の機能解析」植物化学調節学会第47回大会、2012年10月27-28日、山形
- ③ 村上英一、島周平、安田美智子、富澤隆章、仲下英雄「イネにおける JAZ タンパク質を介したジャスモン酸シグナル経路」植物化学調節学会第47回大会、2012年10月27-28日、山形
- ④ Michiko Yasuda, Junta Hirayama, Satoshi Shinozaki, Hideo Nakashita "Effects of colonization of a bacterial endophyte, Azospirillum sp. B510, on Disease resistance in Arabidopsis." XV International Congress of IS-MPMI, 2012, July 29-August 2, Kyoto, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 美智子 (YASUDA MICHIKO)

独立行政法人理化学研究所・植物微生物共生機能研究チーム・研究員

研究者番号：30425649

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし