

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780040

研究課題名（和文）R-Avr認識後の細胞間防御応答シグナルの解析

研究課題名（英文）Analysis of intercellular defense signals upon R-Avr recognition

研究代表者

別役 重之 (SHIGEYUKI BETSUYAKU)

東京大学・教養学部・特任助教

研究者番号：80588228

研究成果の概要（和文）：植物の強力な免疫反応である過敏感反応（HR）に伴う防御応答の誘導パターンを明らかにすることを目的に、防御応答マーカー遺伝子 *PR-1* と *SID2* のプロモーターレポーターシロイヌナズナ植物を構築し、HR誘導時の挙動解析を行った。その結果、同じ経路で働くと考えられていた両遺伝子は空間的に異なる制御を受けていることが示唆された。また、Avr誘導発現が可能な形質転換シロイヌナズナを作出し、局所的なHRを誘導出来ることが確認出来た。

研究成果の概要（英文）：Hypersensitive response (HR) is a strong immune response in plants. In order to define activation patterns of defense responses involved in hypersensitive response (HR), I have constructed promoter-reporter transgenic Arabidopsis plants of *PR-1* and *SID2* genes, respectively. Imaging analysis using these plants challenged with HR-triggering pathogen indicated that these two genes are differentially regulated in spatial aspects. In addition, I have constructed transgenic Arabidopsis plants carrying an inducible Avr gene upon stimuli. These plants enabled us to induce an artificial HR locally.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：感染生理、シロイヌナズナ、過敏感反応、防御応答、イメージング

1. 研究開始当初の背景

植物は微生物の侵略に備えて幾重もの防御システムを備えている。その中でも病原微生物の感染に対して最も強力な防御反応と考えられるものが、植物の免疫センサーである抵抗性(R)タンパク質が、対応する病原菌の非病原性(Avr)タンパク質を認識することで

誘導される過敏感反応(HR)である。HRは一般に急速かつ局所的なプログラム細胞死や抗菌物質の蓄積を伴い、その協調的な効果により病原体の封じ込めを行うと考えられている。農業においてもR遺伝子の利用は非常に有用であるが、その集約的な利用は実際の圃場では数年で抵抗性の崩壊を引き起こしてしまう。したがってR遺伝子のより効果

的な利用にはRタンパク質によるHR誘導の詳細な分子機構を明らかにすることが必要であると考えられる。

モデル植物であるシロイヌナズナを用いた耐病性研究は遺伝学的、分子生物学的、生化学的解析を中心に進んだが、R遺伝子やその機能発現に必要な *EDS1* や *NDR1* が単離されて 20 年近く経つにも関わらず Rタンパク質の機能発現や下流シグナリングに関しては未だ未知の点が多い。その原因としては、そこに關わる遺伝子群の冗長性や致死変異体等の影響による遺伝学的解析の限界も想定されるが、巨視的な遺伝学的スクリーニングや植物体全体からの抽出物では同定不能な局所的变化を検出できていない可能性が考えられる。実際、非親和性菌を感染させると、直接、菌と接触した細胞だけでなくその周辺の非接触細胞も細胞死を起こすが、これら2つの細胞死は異なる機構で起こることが申請者らの研究により示唆されている。一方で、その周縁では抗菌物質等の生産を行っていると考えられる細胞死を起こさない細胞群もある。Avr を認識した Rタンパク質による細胞死はプロトプラストを用いた Avr の一過的発現実験により、少なくとも細胞自律的に行われることが示されている。従って、次の大きな課題は、細胞死の細胞非自律的な周辺への伝播過程の理解である。これについては、Avr タンパク自身の細胞間の移動も考えられるが、活性酸素種 (ROS) やサリチル酸 (SA) が細胞間シグナルとして機能している可能性が強く示唆されている。実際、申請者らが報告した、ROS 生成や細胞死領域拡大を負に制御するロイシリンリッチリピート型受容体キナーゼ (LRR-RLK) BAK1(4) や、近年発表された SA による細胞死拡大を抑制するオートファジーなどがその可能性を支持する。しかし、一方で、ROS は HR 細胞死領域の拡大を抑制するという報告もあり、ROS や SA が Avr 認識細胞からの直接の細胞間シグナルかどうかは未だ不明である。また、病原体由来分子パターン (PAMPs) 認識により誘導される防御反応 (PTI) シグナルを植物体内で増幅するのに寄与する植物内生の Pep1-7 ペプチドやその受容体の PEPR1/2 の例のように、R タンパク質による細胞間シグナルにも植物内生のペプチドと LRR-RLK を介した防御反応の細胞間シグナルが機能している可能性も考えられる。さらに、HR 細胞死に付随する抗菌物質蓄積などの防御反応も含め、それらが一細胞で起きる時間的に前後した応答 (Avr 認識→防御反応→細胞死) であるのか、それとも異なる細胞で行われる応答 (Avr 認識→細胞死、周辺への細胞間シグナル→防御反応) であるのかさえ、これまでの研究手法では明確にされていない。したがって、上記のよう

な HR の細胞間シグナル同定のためにも、まず Avr-R 認識細胞から周辺細胞への細胞死や防御応答の伝播様式を組織、細胞レベルで詳細に解析することが非常に重要である。

2. 研究の目的

植物の抵抗性 (R) タンパク質が病原体由来の非病原性 (Avr) タンパク質を認識することで誘導される過敏感反応 (HR) は病原菌感染に対して非常に強力な防御応答であるが、R タンパク質活性化による下流シグナリングの詳細は未だ明らかではない。そこで、本研究では従来の植物耐病性研究とは視点を変え、HR に伴う防御応答の細胞間拡散様式を明らかにすることを目指す。そのために、まず各種防御応答遺伝子プロモーター活性のレポーター植物を構築し、その挙動解析を行う。また、一細胞レベル、組織レベルでの Avr タンパク質誘導発現系を構築し、従来の病原体接種実験では困難であった防御応答シグナル拡散様式を定量的に解析するための分子基盤を確立する。HR で誘導される細胞死や防御応答反応の周辺細胞への伝播様式を明らかとし、将来的な HR 誘導細胞間シグナル分子同定に向けた基盤整備を行う。

3. 研究の方法

(1) 防御応答遺伝子レポーター植物構築

本研究では、植物の防御応答に重要なサリチル酸に特に注目し、その合成に關わる酵素遺伝子 *SID2* およびサリチル酸応答性のマーカーとして知られる *PR-1* 遺伝子に關して、プロモーターレポーター形質転換植物を構築する。レポーターとしては、ライブイメージング系を構築できるように、傾向タンパク質 YFP を用い、また核局在シグナルを付加することで、各種プロモーターが活性化した細胞を容易に区別できるようにする。

(2) 防御応答拡散様式の解析

上記 (1) のプロモーターレポーター植物に、*Pseudomonas* 細菌などのシロイヌナズナ病原体接種を行い、HR 誘導過程における各種プロモーター活性の挙動解析を行う。

(3) Avr 誘導発現系の構築

病原体の持つ Avr タンパク質を一細胞レベル、組織レベルで誘導発現できる用な形質転換植物を作成する。Avr タンパク質としては、その機能解析が非常に進んでいる

Pseudomonas 細菌の AvrRpt2 を用い、組織レベルでの誘導にはエストラジオール、一細胞レベルでの誘導発現には熱ショック誘導型 Cre-Lox を介したモザイク発現系による擬似的な一細胞系を構築する。

4. 研究成果

(1) 防御応答遺伝子レポーター植物構築

植物防御応答に重要なサリチル酸シグナリングに関わる *SID2* および *PR-1* の両遺伝子に関して、核局在型 YFP を用いたプロモーターレポーター形質転換シロイヌナズナ植物をそれぞれ複数ライン作出した。

(2) 防御応答拡散様式の解析

上記プロモーターレポーター植物に対して、*Pseudomonas* 細菌を用いた接種実験を行って、蛍光実体顕微鏡下で系時的に観察した。その結果、両プロモーターは HR に伴い接種後 10-15 時間前後をピークに、一過的に活性が上昇することが確認された。これらは既報のノーザン解析等で明らかにされていた *SID2* 遺伝子や *PR-1* 遺伝子の発現キネティクスとほぼ同様であった。このことはこれらプロモーターレポーターが、これら遺伝子の挙動を信頼に足るレベルで再現しており、これらレポーター植物が HR の時空間的解析において有用な研究ツールとなることを示唆している。

また、空間的観点からは、*PR-1* プロモーターは HR に伴い、HR 死細胞領域の出現に先立ち、将来の HR 死領域の周縁部の数層に渡る細胞層でのみ活性化が見られるのに対し、*SID2* は *PR-1* プロモーター活性化層だけでなく、将来の HR 死領域内の細胞でも活性化が見られた。これまでの遺伝学的解析では、*SID2* 下流に *PR-1* が位置することになっていたが、本研究の成果により、HR 組織中の *SID2* 活性化細胞には、*PR-1* を活性化する細胞群としない細胞群が存在することが強く示唆された。これらの発見は HR 組織中でのサリチル酸の生産、分布、局在、移行、機能などに関して、更なる注意深い解析が必要なことを示しているといえる。

以上のことより、サリチル酸系という同一のシグナリング系においても組織中での活性化位置が遺伝子によって異なることから、HR 誘導時に誘導される多くの遺伝子群に関しても異なる時空間的パターンで活性化されている可能性が示唆された。このような「HR パターン」の形成機構を明らかにすることで、HR のサイズや強度を自由に操作出来るようになる可能性がある。そのために

は本研究で作出したプロモーターレポーターだけでなく、さらに多くの防御応答マーカー遺伝子に関して同様の解析を行うことでまず HR パターンの存在を明らかとし、その形成機構を探る試みを行っていきたいと考えている。

(3) Avr 誘導発現系

植物体において局所的な HR を誘導する系を構築するために、エストラジオール誘導型の AvrRpt2-GFP もしくは GFP を持つ形質転換シロイヌナズナをそれぞれ複数ライン作出した。これら植物にエストラジオール処理を行ったところ、*AvrRpt2-GFP* 遺伝子特異的に HR 様細胞死を検出することが出来た (*AvrRpt2-GFP* の蛍光は明瞭に観察出来なかった)。

また、熱ショック誘導型 Cre-Lox 系制御下で、熱ショック特異的に *AvrRpt2-GFP* もしくは GFP を誘導発現する形質転換シロイヌナズナをそれぞれ複数ライン作出した。これら植物を用いて、37°C、15 分間の熱ショックを与えたところ、GFP 植物ではモザイク状の GFP 発現が観察でき、また *AvrRpt2-GFP* 植物では GFP は観察出来なかったが、モザイク状の細胞死を検出することができ、擬似的な一細胞 HR 誘導系を構築出来たといえる。

これら形質転換植物を上記(2)のプロモーターレポーター植物や、既知の HR 関連変異体と併せて用いることで、将来的な HR に伴う防御応答の拡散様式、HR 形成過程の解析を行うことが可能になったといえる。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①別役重之・浦和博子・亀井保博・岡田清孝・福田裕穂、Toward understanding of spatial and temporal regulation of hypersensitive responses upon R-Avr recognition during plant immune response、IS-MPMI 2012 XV International Congress、2012 年 7 月 30 日、京都国際会館

②別役重之・浦和博子・亀井保博・岡田清孝・福田裕穂、シロイヌナズナにおける過敏感反応の時空間的制御機構解析に向けた分子ツールの構築、平成 24 年度日本植物病理学会関西部会、2012 年 9 月 28 日、とりぎん文化会館

[その他]
ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/seigyo/lab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

別役 重之 (SHIGEYUKI BETSUYAKU)

東京大学・教養学部・特任助教

研究者番号：80588228

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：