

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770036

研究課題名(和文)シロイヌナズナ内在性ペプチドエリシターの細胞外への放出機構の解明

研究課題名(英文)Possibility of active secretion of Arabidopsis endogenous peptide elicitor

研究代表者

山口 夕(Yamaguchi, Yube)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：60335487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナのAtPep1は、感染細胞から何らかの方法で放出され、周囲の細胞へその情報を伝達していると考えられている。本研究では、AtPepの放出機構を明らかにするために、AtPep1過剰発現体を用いて、前駆体タンパク質とペプチドの抗体での検出を試みた。AtPep1過剰発現体は、感染などのストレスがかかっていない生育条件でも、植物ホルモンのバランスが変化しており、生きた細胞からの放出されていることが示唆された。また、細胞死を伴わない条件でAtPep1が機能している可能性を探るために、様々な生育条件で育てた結果、AtPep1過剰発現体が塩ストレスに対する耐性が向上していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Arabidopsis AtPep1, an endogenous peptide elicitor, is thought to be somehow released from infected cells and induce defense responses. To examine how Atpep1 is released from cells, we generated AtPep1 overexpression lines and tried to detect AtPep1 by antibody. AtPep1 overexpression lines showed shifted balance in plant hormones even under no stress growth conditions. Therefore it is possible that AtPep1 is release actively from living cells. We also grew AtPep1-overexpression lines under various stress conditions to see clear evidence for active release, and found that these lines were more tolerate to high salinity environment.

研究分野：植物生理学

キーワード：内生ペプチドエリシター シロイヌナズナ 分泌 耐塩性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) シロイヌナズナの AtPeps は、23 アミノ酸から成るペプチドで、AtPep1 ~ AtPep7 まで存在する。Atpep1 をシロイヌナズナに外生的に与えたり、前駆タンパク質である *ATPROPEP1* を過剰に発現させると、防御応答を引き起こし、いくつかの病原体の感染に対して抵抗性を向上させる。そのため、AtPep1 は内生ペプチドエリシターと考えられている。

(2) AtPep1 は、細胞膜上に存在する2つの受容体 AtPEPR1 と AtPEPR2 によって認識され、シグナル伝達を開始することによって防御応答の上昇が認められる。つまり、AtPep1 は細胞外へ一度放出された後に、細胞の外側から作用する。これらのことから、我々は、AtPep-AtPEPR による病害抵抗性反応の誘導は、侵入してきた少量の病原微生物のエリシターを認識した後に、そのシグナルを増幅させるためであると考えていた。

(3) AtPep1 が細胞外から作用することは明らかであるが、AtPep1 の前駆タンパク質 AtPROPEP1 には典型的な N 末端の分泌シグナルは存在していないため、生きた細胞から能動的に分泌されているのか、病原菌感染によって破壊された細胞から漏れ出ているのかは分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、AtPep1 の検出・定量方法を確立し、細胞外への放出が細胞死によるものなのか、生きている細胞からの積極的な分泌によるものなのか明らかにし、AtPep1 の細胞外への放出量がどのような条件（例えば病原菌感染時など）で変動するのか調べる。放出が細胞死と関連が無い場合は、リーダーレス分泌機構が AtPep1 の分泌に関わっている可能性を検討する。細胞死による放出が示唆された場合には、病原体の違い（腐生性か寄生性か）による抵抗性の違いが細胞死量と放出ペプチド量に比例しているか、あるいは昆虫の食害による細胞破壊の場合にどう関係してくるのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 培地のアルカリ化アッセイ

シロイヌナズナの形質転換に用いる AtPROPEP1 と FLAG タグの融合タンパク質が機

能を保持しているか、大腸菌で組換えタンパク質を作製し、シロイヌナズナの培養細胞に与えて、培地の pH を測定した。

### (2) 形質転換体の作製

AtPROPEP1 及び AtPROPEP1 と FLAG タグの融合タンパク質を過剰に発現するシロイヌナズナとタバコ BY2 細胞を作製した。

### (3) AtPep1 が機能する処理条件の探索

病原菌感染では細胞がダメージを受ける可能性が大きく、AtPep1 の細胞外への放出が能動的な放出であるか、細胞破壊による放出であるか区別することは難しい。そこでより細胞へのダメージが少ないと考えられる処理（ジャスモン酸、エリシター、塩）を行うことによって、AtPep1 の量や生育の違いが見られるか調べた

### (4) アポプラストタンパク質の抽出と検出

タバコ BY2 培養細胞とシロイヌナズナの形質転換体を用いて、アポプラスト溶液を回収して HPLC によって分析した。タバコ BY2 培養細胞及びシロイヌナズナの液体培養では培地を回収し、シロイヌナズナ葉からは減圧と遠心によって切断面から回収した。

### (5) 塩ストレス処理による細胞の観察

AtPEPR1 および AtPEPR2 のプロモーター領域と GUS 遺伝子の融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを用いて、塩ストレス条件下での AtPep1 作用部位を特定した。また、塩ストレス条件下での死細胞の存在をエバンスブルー染色により観察した。

### (6) 塩ストレス応答遺伝子の発現量の変化の比較

AtPROPEP1 過剰発現株で見られた耐塩性の向上について詳しく調べるために、塩ストレス応答遺伝子についてその発現量の変化を定量的 RT-PCR で解析した。

### (7) 植物ホルモンの定量

AtPROPEP1 過剰発現株で見られた耐塩性の向上が、植物ホルモンのバランスの変化によって起きている可能性を調べるために、シロイヌナズナの植物ホルモン含量を LC-MS-MS によって定量した。

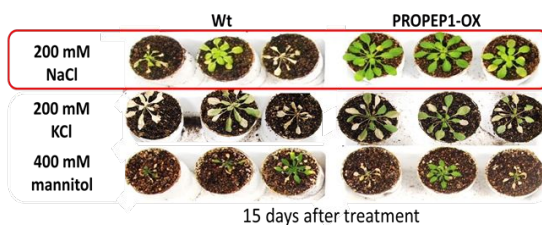
## 4. 研究成果

(1) 大腸菌で作製し、精製した AtPROPEP1 と FLAG タグの融合タンパク質を、シロイヌ

ナズナの懸濁培養細胞に与えたところ、培地の pH が上昇した。従って FLAG タグを融合させても AtPep1 の機能に変化がないことが確認できた。また、成熟ペプチドを与えなくても前駆体を与えるだけで応答が見られたことから、細胞外でプロセッシングを受けて成熟する可能性が示唆された。

(2) *AtPROPEP1* および *AtPROPEP1* と FLAG の融合遺伝子を導入したシロイヌナズナをアグロバクテリウム法により作製した。抗 AtPep1 抗体と抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、どちらの形質転換体でも目的の前駆タンパク質ができていることが確認できた。また、前駆タンパク質の検出には抗 FLAG 抗体が、AtPep1 の検出には抗 AtPep1 抗体の方が良い傾向にあった。

(3) 病原菌感染によらず AtPep1 が最大限に放出されている条件を見つけるために、ジャスモン酸、エリシター、NaCl を野生型シロイヌナズナと形質転換体に与え、表現型の違いを観察した結果、形質転換シロイヌナズナが塩処理に対して耐性が向上していることを見出した。この耐性は、NaCl 処理時のみに見られ、マンニトールや KCl 処理では見られなかったので、Na<sup>+</sup>イオン特異的な現象であることが分かった。

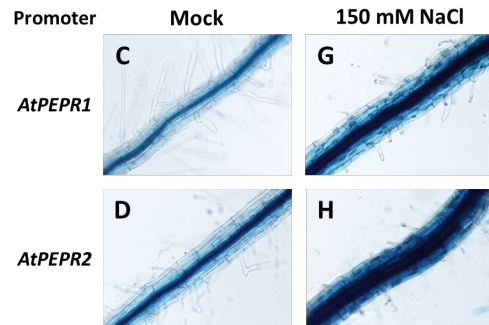


(4) 細胞外へ放出された AtPep1 を検出するために、培地あるいはアポプラスト溶液を回収し、簡易精製の後、ウェスタンブロッティングおよび HPLC による検出を試みたが、現在のところ検出には至っていない。より局所的な応答の可能性もあるので、アポプラスト溶液の回収部位や、精製・濃縮方法の検討が今後必要である。

(5) 細胞の観察

AtPep1 の作用部位を特定するために、*AtPEPR1* および *AtPEPR2* のプロモーターと GUS 遺伝子の融合遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを用いて、GUS 染色を行った。その結果、*AtPEPR1* と *AtPEPR2* のどちらも根の維管束で発現していることが分かった。特

に根では、塩ストレス処理により発現部位が中心柱全体に広がること明らかとなった。従って、AtPep1 はこれらの周辺細胞（組織）から放出され、中心柱で機能することが示唆された。



塩ストレスで細胞が破壊される結果 AtPep1 が放出されるのかを検証するために、エバンスブルー染色により、死んだ細胞の存在を顕微鏡で観察した。使用した実験条件では、顕著な細胞死は今のところ認められていない。

(6) 本実験で新たに発見された AtPep1 と耐塩性の関係をより明らかにするために、塩ストレス応答のマーカー遺伝子の発現量を、野生型シロイヌナズナと AtPep1 過剰発現株の地上部で比較した。その結果、過剰発現株では、通常見られるマーカー遺伝子の発現誘導が起こっていない、あるいは顕著に抑制されていることが分かった。このことは、地上部に塩ストレスが伝わっていない可能性を示唆している。

(7) 塩ストレス応答は、アブシシン酸などの植物ホルモンが関与しているとされている。そこで、*AtPROPEP1* の過剰発現によってホルモンバランスが変化して、塩ストレス応答に影響を与えている可能性がある。そこで、植物ホルモンの量的変化を調べたところ、通常の栽培条件では形質転換体でジャスモン酸とジャスモン酸イソロイシン含量が野生型に比べて明らかに高かった。このことは、外部からのストレスが無い条件でも AtPep1 の効果が見られるというこれまでの報告を一致するものであり、細胞死が伴わなくても AtPep1 が細胞外に放出されているという仮説を支持するものである。しかし、塩処理後の変動にははっきりとした傾向はつかめず、AtPep1 と植物ホルモンと耐塩性の関係については、よく分からなかった。

(8) まとめ

当初の目的であった AtPep1 のアポプラストからの検出と細胞からの放出機構について、完全には達成できなかったが、本実験の研究成果により細胞から能動的に AtPep1 が放出されている可能性がより高まった。また、本研究を進めている過程で、新たに AtPep1 が耐塩性に影響を及ぼすことを見出した。

今後、アポプラストからの AtPep1 の検出方法の確立を続けていくとともに、AtPep1 の放出にタンパク質のリーダーレス分泌機構が関与するかどうか、塩処理時に阻害剤などを用いることで、検証していきたい。

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 3 件)

A study on salt stress tolerance conferred by a endogenous elicitor in Arabidopsis、道満剛平、渡辺敏裕、藤野介延、山口夕、2013 年度日本植物生理学会年会 2014 年 3 月 20 日、富山大学(富山県富山市)

道満剛平、渡辺敏裕、藤野介延、山口夕、植物の内生ペプチドエリシターによる耐塩性付与、2013 年度日本育種学会・日本作物学会北海道談話会、2013 年 12 月 7 日、酪農学園大学(北海道江別市)

道満剛平、藤野介延、山口夕、シロイヌナズナ内生ペプチドエリシターの塩ストレスへの関与、2013 年度日本植物細胞分子生物学会年会、2013 年 9 月 10 日、北海道大学(北海道札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 夕(YAMAGUCHI, Yube)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：60335487

(4)研究協力者

道満 剛平(DOMAN, Kohei)

北海道大学大学院・農学院・学生

藤野介延(FUJINO, Kaien)

北海道大学大学院・農学研究院・准教授

研究者番号：80229020