

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660293

研究課題名(和文) NADPHオキシダーゼ活性の可視化による植物免疫機構の解明

研究課題名(英文) Visualization of NADPH oxidase activity in plant immunity

研究代表者

吉岡 博文 (Yoshioka, Hirofumi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30240245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：急激な活性酸素種(ROS)は、植物免疫応答に重要なシグナルとして機能する。植物のNADPHオキシダーゼであるRBOHのN末端側が、カルシウム依存性プロテインキナーゼ(CDPK)により直接リン酸化されて活性化される。本研究では、RBOHのリン酸化動態を可視化するバイオセンサーを作製し、病原菌が感染した細胞でRBOH活性を時空間的に観察することを目的とした。本センサーは、リン酸化に反応して蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が起こるように設計されている。センサー構造の最適化を試みたが、FRETに基づく十分な蛍光強度が得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) are important signaling molecules in plant immunity. Plant NADPH oxidase is termed as respiratory burst oxidase homologue (RBOH). Previously, we found that a calcium-dependent protein kinase (CDPK) activates RBOH by direct phosphorylation of the N-terminal region. Here, we tried to optimize a biosensor to spatio-temporally monitor phosphorylation of the RBOH by CDPKs. However, we could not obtain fine construct of the sensor to generate enough intensity of fluorescence based on fluorescence resonance energy transfer (FRET).

研究分野：植物免疫学

キーワード：バイオセンサー 植物免疫 活性酸素 NADPHオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種 (ROS) の生成は、主に原形質膜に存在する NADPH オキシダーゼである RBOH (respiratory burst oxidase homolog) によって引き起こされる ()。RBOH は、転写レベルに加え、翻訳後修飾により活性調節されることが知られていた。申請者は、ジャガイモ StRBOHB の N 末端側に存在する 82 番目および 97 番目のセリン残基のリン酸化が活性化に必要であり、疫病菌の接種やエリシター処理により少なくとも Ser82 がリン酸化されることを見いだした ()。さらに、カルシウム依存性プロテインキナーゼである StCDPK5 が、Ser82 および Ser97 を *in vivo* でリン酸化することを世界に先駆けて報告してきた ()。その後、シロイヌナズナにおいても RBOH がリン酸化されること、複数の CDPK が RBOH の活性調節に関わることが相次いで報告された ()。しかし、CDPK による RBOH のリン酸化を実際にイメージングした例はない。RBOH のリン酸化をモニターするバイオセンサーを作製して植物細胞に導入することにより、世界で初めてライブ画像によりリン酸化状態の動態を一細胞レベルで明らかにできる。本研究により、RBOH 活性化に関わるシグナルの分子基盤を構築する。

2. 研究の目的

植物は病原菌の攻撃にตอบสนองして急激な ROS の生成を引き起こす。この反応は ROS バーストと呼ばれ、過敏反応において重要な役割を果たす。ROS バーストは、NADPH オキシダーゼである RBOH によって引き起こされる。これまでに、RBOH の N 末端側が、カルシウム依存性プロテインキナーゼ (CDPK) により直接リン酸化されて活性化されることを発見した。本研究では、RBOH のリン酸化状態の動態を一細胞レベルで明らかにできるバイオセンサーを構築し、新たなシグナルネットワークの発掘を可能にする先駆的モデルを提示する。

3. 研究の方法

(1) StRBOHB の 82 番目のリン酸化セリン残基は、他の RBOH メンバーにも共通に存在する CDPK のリン酸化モチーフを含んでいる。本研究では、申請者がこれまで取り組んできたジャガイモの StRBOHB あるいは NbRBOHB を用いる。まず、バイナリーベクターにエフェクターとして働く恒常活性型変異体 StCDPK5-CA と非活性型の StCDPK5-CA-K/M を 35S プロモーターの下流に挿入する。StRBOHB 由来の N 末端側断片、リン酸化セリン認識ドメイン、そして 2 種類の蛍光タンパク質として、mVenus (YFP) と mCerulean (CFP) を連結したコンス

トラクト (バイオセンサー) をもう一方の 35S プロモーターの下流に挿入する。

FRET の強度には、2 種の蛍光タンパク質間の距離と角度が重要であることが知られている。より反応の安定した高感度なバイオセンサーを得るには、リン酸化に依存して生体内で 2 種の蛍光タンパク質が理想的な配置をとる構造を探索する必要がある。そこで、StRBOHB の N 末端側でリン酸化ペプチド抗体 (抗 pSer82 抗体) により検出される 82 番目のセリンを含み、*in vitro* でリン酸化が確認されている RBOH 断片を作成し、その周辺配列の長さを検討する。このバイナリーベクターを、アグロインフィルタレーション法によってベンサミアナに導入して発現させる。葉組織から粗抽出液を調製し、マルチプレートリーダーを用いて FRET 蛍光 (YFP/CFP) の強度を測定し、効率よく FRET 反応が起こるコンストラクトを作製する。

(2) バイオセンサーをベンサミアナ、ジャガイモに導入し、蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡で解析する。これらの実験により、病害シグナルにตอบสนองした RBOH の活性化を時空間的に解析する。

4. 研究成果

植物は、病原菌の攻撃にตอบสนองして急激な ROS の生成を引き起こす ()。この免疫反応は ROS バーストと呼ばれ、過敏反応において重要な役割を果たすことが知られている。ROS バーストは、主に NADPH オキシダーゼである RBOH によって引き起こされる。これまでに、RBOH の N 末端側が、CDPK により直接リン酸化されて活性化されることを見出した ()。本研究では、RBOH のリン酸化動態を可視化するバイオセンサーを作製し、病原菌が感染した細胞で RBOH 活性を時空間的に観察することで、ROS の新たなシグナルネットワークの発掘を可能にする先駆的モデルを提示することを目的とした。

本センサーは、CDPK による基質タンパク質のリン酸化にตอบสนองし、2 種の隣接した蛍光タンパク質間で FRET が起こるように構成されている。蛍光タンパク質である YFP と CFP による FRET の強度は、YFP と CFP 間の距離と角度が重要であり、RBOH のリン酸化に依存して生体内で理想的な配置をとる構造を模索する必要がある。そこで、平成 26 年度は、サイズの異なる様々な RBOHB の N 末端断片を調製し、FRET コンストラクトに導入して蛍光強度の最適化を試みた。FRET 強度比 (ON/OFF) については、1.3 以上であることが実用レベルのセンサーの目安とされる。しかし、今回この数値を上回る蛍光強度は得られなかった。

<引用文献>

Kobayashi, M., Kawakita, K., Maeshima, M., Doke, N. and Yoshioka, H. (2006) Subcellular

localization of Strboh proteins and NADPH-dependent O₂⁻-generating activity in potato tuber tissues. **J. Exp. Bot.** 57, 1373-1379.

Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N. and Yoshioka, H. (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. **Plant Cell** 19, 1065-1080.

Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.H. and Sheen, J. (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. **Nature** 464, 418-422.

Gao, X., Chen, X., Lin, W., Chen, S., Lu, D., Niu, Y., Li, L., Cheng, C., McCormack, M., Sheen, J., Shan, L. and He, P. (2013) Bifurcation of *Arabidopsis* NLR immune signaling via Ca²⁺-dependent protein kinases. **PLoS Pathog.** 9, e1003127.

Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D.G. and Doke, N. (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. **Plant Cell** 15, 706-718.

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 5件)

Adachi, H. and Yoshioka, H. (2015) Kinase-mediated orchestration of NADPH oxidase in plant immunity. **Brief. Funct. Genomics** (in press)
doi: 10.1093/bfgp/elv004

吉岡博文・安達広明・石濱伸明・中野孝明・白石佑太郎・宮川典子・野村裕也・吉岡美樹・浅井秀太 (2015) リン酸化反応が制御する ROS バーストの分子機構. 日本植物病理学会報, 81, 1-8.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath/81/1/81_1/_article/-char/ja/

Bellin, D., Asai, S., Delledonne, M. and Yoshioka, H. (2013) Nitric oxide as a mediator for defense responses. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 26, 271-277.
doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0214-CR.

Mase, K., Ishihama, N., Mori, H., Takahashi, H., Kaminaka, H., Kodama, M. and Yoshioka, H. (2013) Ethylene responsive AP2/ERF transcription factor MACD1 participates in phytotoxin-triggered programmed cell death. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 26, 868-879.
doi.org/10.1094/MPMI-10-12-0253-R.

Asai, S., Ichikawa, T., Nomura, H., Kobayashi, M., Kamiyoshihara, Y., Mori, H., Kadota, Y., Zipfel, C., Jones, J.D.G. and 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, 14332-14340.
doi: 10.1074/jbc.M112.448910.

[学会発表](計 10件)

吉岡美樹・山口公志・藤原正幸・吉村智美・川崎 努・吉岡博文 (2015.3.28) イネ OsRLCK185 による NADPH オキシダーゼのリン酸化活性化機構. 平成 27 年度日本植物病理学会大会, 明治大学, 東京

吉岡博文 (2014.10.24) ナス科植物の免疫応答における活性酸素の生成機構. 11 回日本ナス科コンソシアム年会, 名古屋大学坂田・平田ホール, 名古屋

Shiraishi, Y., Yoshioka, M., Adachi, H. and Yoshioka, H. (2014.6.6) Multiple CDPKs regulate ETI-ROS burst by NADPH oxidase. Poster, XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Rhodes Palace Hotel, Greece

白石佑太郎・吉岡美樹・安達広明・山口公志・川崎 努・吉岡博文 (2014.6.2) CDPK および RLCK が NADPH オキシダーゼを介した ROS バーストを制御する. 平成 26 年度日本植物病理学会大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌市

吉岡博文 (2014.5.16) 植物免疫におけるラジカル生産制御とその役割. 第 14 回日本 NO 学会学術集会, ホテルニューオータニ佐賀, 佐賀市

吉岡美樹・白石佑太郎・山口公志・川崎努・吉岡博文 (2013.9.26) イネの OsRLCK185 は NADPH オキシダーゼである OsRBOHI を介して活性酸素生成を誘導する. 平成 25 年度日本植物病理学会関西支部会, 岡山大学創立 50 周年記念館, 岡山市

白石佑太郎・吉岡美樹・安達広明・吉岡博文 (2013.9.26) リン酸化修飾による

NADPH オキシダーゼの活性化には複数の CDPK が関与する。平成 25 年度日本植物病理学会関西西部会，岡山大学創立 50 周年記念館，岡山市

吉岡博文・安達広明・石濱伸明・中野孝明・白石佑太郎・宮川典子・野村裕也・吉岡美樹・浅井秀太 (2013.8.19) タンパク質のリン酸化による ROS パーストの分子機構。平成 25 年度植物感染生理談話会，口頭発表，北陸粟津温泉 法師，石川県

吉岡博文・安達広明・白石佑太郎・中野孝明・宮川典子・浅井秀太・川崎 努・吉岡美樹 (2013.7.10) リン酸化による植物 NADPH オキシダーゼの制御機構。第 24 回日本生体防御学会学術総会，くまもと森都心プラザ，熊本市

Yoshioka, H., Asai, S., Nomura, H., Kobayashi, H., Nakano, H., Adachi, H., Ishihama, N. and Yoshioka, M. (2013.4.8) Protein phosphorylation confers ROS burst via NADPH oxidase. Keystone Symposia "Plant Immunity: Pathways and Translation". Oral Presentation, Big Sky, Montana, USA

〔図書〕(計 2 件)

Ishihama, N., Adachi, H., Yoshioka, M. and Yoshioka, H. (2014) In vivo phosphorylation of WRKY transcription factor by MAPK. "Plant MAP Kinases: Methods and Protocols", *In Methods in Molecular Biology*, Vol. 1171, (Komis, G. and Šamaj, J. eds) Springer/Humana Press, NY, pp. 171-181.

吉岡博文・安達広明・石濱伸明・中野孝明・白石佑太郎・宮川典子・野村裕也・吉岡美樹・浅井秀太 (2013) タンパク質のリン酸化による ROS パーストの分子機構。植物-微生物相互作用とピオトロフ感染。古賀博則・森 正之・田中栄爾・高原浩之編，日本植物病理学会，東京，48, 105-114.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/%7ebio4283/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 博文 (Yoshioka Hirofumi)
名古屋大学・生命農学研究科・准教授
研究者番号：30240245

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし