

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440153

研究課題名(和文)シロイヌナズナの内生ペプチドエリシターによる耐塩性向上のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of enhanced salinity tolerance by an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの23アミノ酸ペプチドAtPep1の前駆タンパク質AtproPep1の過剰発現体では、塩ストレス耐性が向上している。本研究では、NaClストレスをかけた過剰発現体においてAtproPep1タンパク質量が増加すること、AtproPep1をプロセッシングすると予想された2つのメタカスペーゼ遺伝子の発現量およびNa⁺排出に関わるSOS遺伝子の発現量が顕著に増加していることが分かった。また、植物体内のNa⁺蓄積量が低く保たれていることから、NaClストレス下で多くのAtPep1が発生することにより、Na⁺排出機構が活性化される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of enhanced salinity tolerance in Arabidopsis thaliana overexpressing AtproPep1, a precursor protein of 23-amino acid peptide AtPep1. Amount of AtproPep1 protein in overexpression lines was increased in response to NaCl treatment. Expression of 2 metacaspase genes and SOS genes, which were predicted to process AtproPep1 and important for Na⁺ exclusion from the cells, respectively, were higher in the overexpression lines than in WT. Since Na⁺ content was kept lower in the overexpression lines under NaCl stress, we are speculating that promotion of AtPep1 generation by NaCl treatment in the AtproPep1 overexpression lines led to activation of Na⁺ exclusion from cells, which are directly related to enhanced salt tolerance.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：plant peptide elicitor DAMP 耐塩性 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

(1) シロイヌナズナの AtPep1 は、92 アミノ酸からなる前駆タンパク質の C 末端に存在する 23 アミノ酸のペプチドであり、その遺伝子発現は病原菌感染や植物の防御応答に関わるホルモン (ジャスモン酸、サリチル酸、エチレン) および、AtPep1 自身によって誘導される。AtPep1 前駆体タンパク質を過剰発現させたシロイヌナズナでは根腐れ病菌への耐性が観察され、AtPep1 を前処理した野生体シロイヌナズナではトマト斑葉細菌病菌の増殖が抑えられる。これらの結果から申請者は、AtPep1 により活性化されるシグナル伝達経路が、病原細菌のエリシターによって活性化されるシグナル伝達経路とオーバーラップしていることを示し、AtPep が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に働く内生ペプチドエリシター (または DAMP: Danger-associated molecular pattern) であると考えてきた。

(2) これまでの多くの研究から病原菌感染や害虫による摂食などの生物ストレスに対する植物の応答機構と、乾燥や塩、光などの非生物ストレスに対する応答機構がクロストークしていることが示されている。申請者らは、AtPep1 を過剰発現させたシロイヌナズナが、塩ストレスに対して野生体に比べて高い耐性を持つことを見出し、AtPep1 が生物ストレス応答と非生物ストレス応答の両方に作用することを発見した。

(3) 定量的 RT-PCR により塩ストレス応答性遺伝子の発現量を調べたところ、AtPep1 過剰発現体の地上部では、塩ストレス応答のマーカー遺伝子である *DREB2A* や *RD29B* などが塩ストレスによって誘導されないことが分かった。このことから、AtPep1 過剰発現体では塩処理前にすでに順化の状態にあるか、より素早く適応していることが考えられた。しかし、AtPep1 が植物の細胞にどのように作用して耐塩性を高めているのか、明らかとなっていないかった。

2. 研究の目的

本研究では、耐塩性に直接かかわる出口の現象と、AtPep1 の切り出しから始まる入口のシグナル伝達経路の両側から研究を進め、AtPep1 が誘導する病害抵抗性反応と耐塩性反応を比較することで、シロイヌナズナの両

反応における AtPep1 の役割を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) 植物体内の Na⁺ の測定および可視化
短日条件、土で 4 週間生育させたシロイヌナズナに 250 mM の NaCl 溶液を根から与え、地上部の Na⁺ 含量を ICP-MS によって測定した。根の Na⁺ 含量の違いを明らかにするために、液体培養したシロイヌナズナ実生に NaCl 処理すると同時に Na⁺ と結合すると蛍光を発する CoroNa™ Green-AM を与え、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

(2) ウェスタンブロットティング

Na⁺ 排出ポンプである SOS1 と HA タグとの融合タンパク質 (SOS1-HA) を発現する形質転換シロイヌナズナを入手し、AtPep1 処理後の SOS1-HA の活性化 (リン酸化) を抗 HA タグ抗体を用いたウェスタンブロットティングによって試みた。また、AtproPep1 過剰発現体における塩処理後の AtproPep1 量の変動を、抗 AtPep1 抗体を用いたウェスタンブロットティングにより調べた

(3) 根の伸長阻害アッセイ

垂直に立てた培地上に野生体および AtproPep1 過剰発現体を無菌播種し、AtPep1 および NaCl 存在下での根の伸長量を測定した。

(4) 塩処理によって発現量が上昇するメタカスパーゼの特定と T-DNA 挿入変異体の取得
前駆タンパク質 AtproPep1 をプロセッシングする候補酵素としてメタカスパーゼが挙げられている。シロイヌナズナに存在する 9 つのメタカスパーゼ遺伝子について、AtPROEP1 とその受容体である AtPEPR1 と AtPEPR2 と同じ発現パターンを有するものを、公開されているマイクロアレイデータベースを利用して特定した。また、メタカスパーゼ遺伝子の T-DNA 挿入変異体を TAIR (The Arabidopsis Information Resources) よりそれぞれ 2 系統ずつ取得した。現在ホモ系統の選抜を行っている。

(5) 定量的 RT-PCR

野生体および AtproPep1 過剰発現体を NaCl 処理、あるいは AtPep1 処理した後、総 RNA を抽出し、逆転写反応を行い、Na⁺ 排出に関わる遺伝子 (SOS1-3) および (4) で特定したメタカスパーゼ遺伝子の発現量の変化を SYBR green

を用いたリアルタイム PCR により調べた。

(6) 組換えメタカスパーゼの作製

AtproPep1 を切断する候補メタカスパーゼ遺伝子を、低温によるタンパク質誘導が可能な pCold II ベクターに組み込み、発現用大腸菌 BL21 に導入した。

4. 研究成果

(1) これまでの研究で、AtproPep1 過剰発現シロイヌナズナにおいて塩処理後の耐塩性遺伝子の上昇が抑えられていたことから、地上部が塩ストレスに晒されていない可能性が示されていた。土で育てた植物に NaCl を与えた後、地上部の Na⁺濃度を ICP-MS によって測定した。その結果、野生体に比べて地上部の Na⁺の蓄積量が AtproPep1 過剰発現体において約半分にまで減少していること、AtPep1 の受容体である AtPEPR1 と AtPEPR2 の二重変異体では、野生体よりも多くの Na⁺を蓄積していることが明らかとなった(図1)。従って、耐塩性遺伝子の発現誘導が AtproPep1 過剰発現体で抑制されたのは、Na⁺の蓄積量の低下によることが示された。

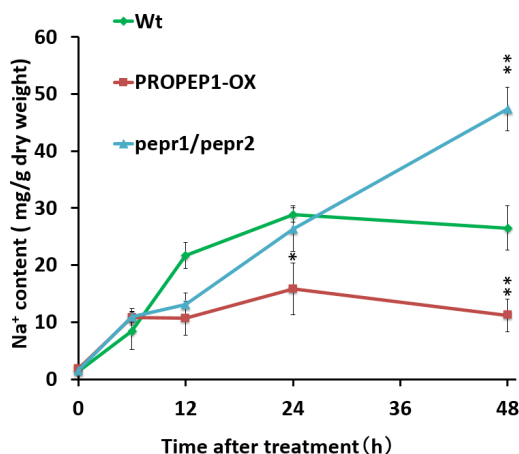


図1. ICP-MS による地上部の Na⁺ 含量の測定結果

(2) 根における Na⁺の蓄積量の違いを明らかにするために、細胞内の Na⁺を可視化する試薬 CoronaTM Green-AM を NaCl 処理とともに液体培養したシロイヌナズナ実生に与え、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、地上部と同様に根でも細胞内の Na⁺蓄積量が AtproPep1 過剰発現体で顕著に減少していることが分かった(図2)。

(3) 細胞内への Na⁺蓄積を減少させる要因として、細胞外への Na⁺の排出機能[SOS (salt overly sensitive) 経路]が向上しているこ

とが考えられる。塩ストレス条件下での

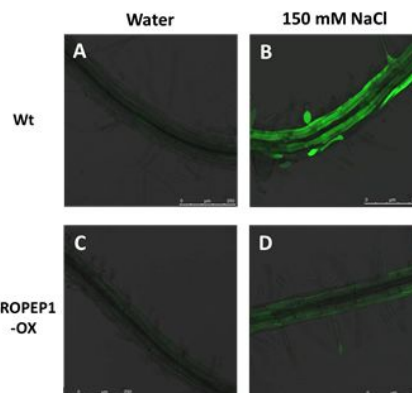


図2. Corona Green による根の Na⁺蓄積量の可視化

SOS1-3 の遺伝子発現量を野生体と AtproPep1 過剰発現体で定量的 RT-PCR により比較したところ、SOS1-3 の遺伝子発現量が非ストレス条件下でも過剰発現体で高くなっていること、塩処理により野生体に比べて早く強く誘導されることが示された(図3)。本実験については、現在再現性の確認を行っている。

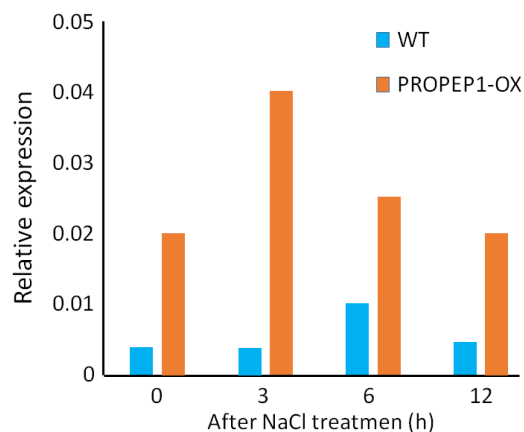


図3. SOS1 遺伝子の ACT5 遺伝子に対する相対的発現量

(4) Na⁺排出ポンプである SOS1 はタンパク質レベルでの活性化が重要と報告されている。そこで SOS1 と HA タグとの融合タンパク質(SOS1-HA)を発現する形質転換シロイヌナズナを入手し、AtPep1 処理後の SOS1-HA の活性化(リン酸化)を抗 HA タグ抗体を用いたウェスタンブロットングによって試みた。しかし、現在のところ抗 HA タグ抗体による SOS1 の検出ができておらず、本実験については継続中である。

(5) AtproPep1 過剰発現体において、AtproPep1 タンパク質の量が、塩処理によって影響を受けているか調べるために、根への塩処理後にタンパク質を抽出し、抗 AtPep1 抗体を用いたウェスタンブロットングにより

検出した。その結果、CaMV35S プロモーターによる過剰発現にもかかわらず、AtproPep1 タンパク質が塩処理により増加していることが分かった。このことから、AtproPep1 が、塩処理により翻訳時あるいは翻訳後に調節されていることが示唆された (図 4)。

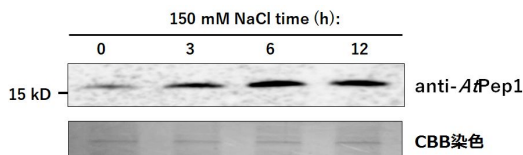


図 4 . AtproPep1 過剰発現体における塩処理後の AtproPep1 タンパク質の変動

(6) AtPep1 はその処理により根の伸長阻害を引き起こすが、単なる AtproPep1 の過剰発現のみでは観察されない。しかし、少量 (10nM) の AtPep1 の投与により WT に比べて著しく根の伸長が阻害されることを見出した (図 5)。加えて、塩処理による根の伸長阻害も野生体に比べて AtproPep1 過剰発現体では著しい (図 6)。従って、少量の AtPep1 処理と塩ストレスによって AtproPep1 から AtPep1 の切り出し、あるいは細胞外への放出が誘導されることが示唆された。

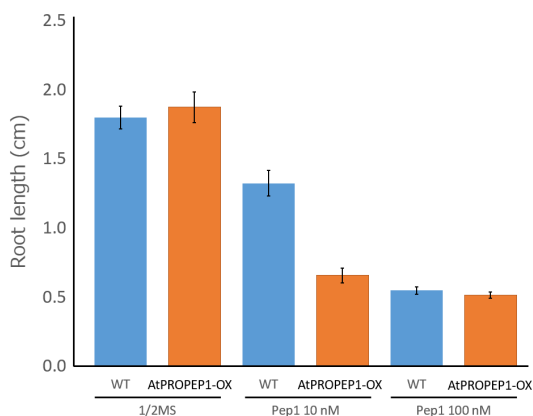


図 5 . AtPep1 処理による根の伸長抑制

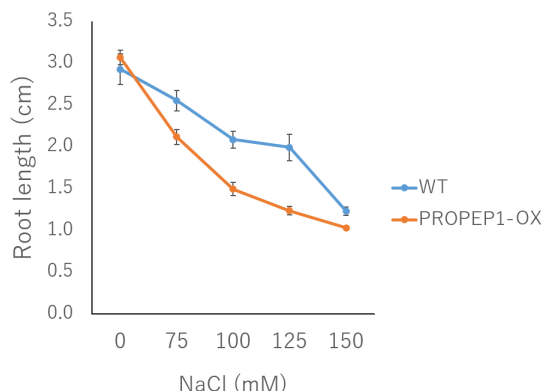


図 6 . 塩処理による根の伸長抑制

(7) AtproPep1 から AtPep1 のプロセッシング酵素の候補としてメタカスパーゼが挙げられている。シロイヌナズナに存在する 9 つのメタカスパーゼから、*AtPROPEP1* 及び *AtPEPR1*、*AtPEPR2* と共発現している *AtMC5* と *AtMC7* をマイクアレイデータベースの解析により選抜した。根における *AtMC5* と *AtMC7* の NaCl 処理に対する発現量の変動を、定量的 RT-PCR により解析したところ、*AtMC7* が顕著に *AtPROPEP1* 過剰発現体で発現量が高く、かつ塩処理によって急激に発現量が上昇することが明らかとなった。*AtMC5* については、過剰発現体で発現量は高かったものの、塩処理による発現誘導については良くわからなかった (図 7)。本実験については現在再現性の確認を行っている。

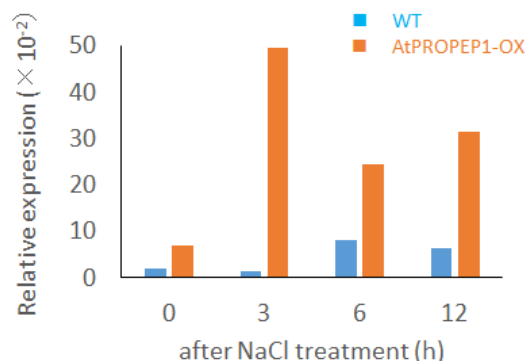


図 7 . *AtMC7* 遺伝子の *ACT5* 遺伝子に対する相対的発現量

(8) *AtMC5* および *AtMC7* が AtproPep1 をプロセッシングするか検証するため、大腸菌による組換えタンパク質の作製を行っている。*AtMC5* と *AtMC7* を 6xHis タグとの融合タンパク質として発現させるために、pCold II ベクターに制限酵素認識部位を利用して組み込み、発現用大腸菌 BL21DE3 株に導入した。現在発現の条件検討を行っている。発現させたタンパク質は、アフィニティ精製を行った後、in vitro での切断アッセイに使用する。なお、組換え AtproPep1 の発現系はすでに確立している。

(9) *AtMC5* と *AtMC7* による AtproPep1 の切断の可能性を in vivo で調べるために、*AtMC5* と *AtMC7* の T-DNA 挿入変異体をそれぞれ 2 系統ずつ入手し、ホモ系統の選抜を行っている。選抜でき次第、AtproPep1 の切断や、塩ストレス条件下での応答に影響を与えるか調べていきたい。

(10) まとめ

本研究から得られた結果より、AtproPep1の過剰発現体では、NaCl 処理によってAtproPep1 からの AtPep1 の切断が促進され、その結果、 Na^+ 排出ポンプである SOS1 の活性化が起こり、塩ストレス時の Na^+ 濃度を低く抑えることができる可能性が示唆された。このような仮説を証明するためには、SOS1 のタンパク質レベルでの活性化（リン酸化）や、AtproPep1 の AtMC5 と AtMC7 による切断など直接的な証明が必要である。また、AtPep1 受容後から SOS1 の活性化に至るシグナル伝達経路も不明であり、引き続き取り組んでいきたい。

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 1 件)

村上雄平、道満剛平、渡辺敏裕、増田清、藤野介延、山口夕、塩ストレス応答における *AtPROPEP1* 過剰発現の影響、日本植物細胞分子生物学会年会、2016 年 9 月 1~3 日、信州大学上田キャンパス（長野県上田市）

〔図書〕(計 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(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

村上 雄平 (MURAKAMI, Yuhei)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・学生

藤井 健太 (FUJII, Kenta)
大阪府立大学・生命環境科学域・学生