

研究報告書

「細胞挙動の解析から構成的に理解するその集合体としての植物過敏反応誘導機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 別役 重之

1. 研究のねらい

植物の持つ耐病性機構の中でも最も強力で効果的なものは過敏反応(HR)である。HR は、植物免疫センサーである抵抗性(R)タンパク質が病原菌由来の非病原性エフェクター(Avr)タンパク質を特異的に認識することで誘導され、局所的なプログラム細胞死や防御応答遺伝子群の発現を伴う。HR 誘導機構解明は植物の生存戦略解明や農業への応用のためにも非常に重要であり、これまでも主に遺伝学的、生化学的に数多くの研究が行われてきたが、いまだ不明な点が多い。

そもそもHRとは植物細胞が病原体感染を認識した場所で一過的に起きる、時間的・空間的なダイナミクスを内包する事象である。実際、HR を起こした組織中の細胞の状態は一様ではなく、死細胞、生細胞が混在している。また、感染部位を中心とした細胞死領域周縁部にのみ、防御応答関連遺伝子の活性化が見られることが多く報告されており、HR 組織では Avr 認識細胞を中心とした何らかの極性に対してそこに位置する細胞の状態が一定の秩序をもって決定されている。しかし、主に HR を起こした組織や個体全体からの抽出物を用いて行われてきたこれまでの研究ではこのような植物免疫反応場とも言える「場」の形成機構に関する知見はほとんど得られておらず、この植物免疫反応場における極性形成機構の解明は、HR 誘導機構全体像の解明に向けた新しい切り口になり得る。

そこで本研究においては、HR という現象を HR 組織中の細胞タイプごとの相互作用として捉え、組織レベルではなく個々の細胞の挙動に注目した細胞レベルからのアプローチを行う。植物防御応答を可視化して”HR 細胞タイプ”を分類し、セルソーター等を用いて細胞タイプ毎に経時的な組織内局在および遺伝子発現プロファイルを解析する。これら情報を元に、既知の各種防御応答変異体を用いてそれら原因遺伝子の HR 空間的制御機構における役割を明らかにする。また、赤外線レーザー照射システム IR-LEGO を用いて標的一細胞での Avr 誘導発現による最小単位での HR 再構成実験系を構築し、一細胞での R-Avr 認識がその周辺細胞に細胞死や防御応答を誘導するのかどうかを実験的に検証する。イメージングと再構成系によって病原体感染実験では困難であった HR 細胞間シグナル伝播パターンの定量的解析を行い、これまで漠然とした定性的評価法しかなかった HR を再定義する。さらに、観測データをもとに HR 誘導過程を数理モデル化し、そのモデルと HR 再構成実験系を用いて、HR 誘導システムの構成的理解を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、モデル植物シロイヌナズナを用いて時空間的な観点から HR という植物免疫

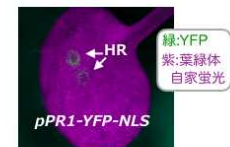
応答場の形成機構に迫ることを目的とした。具体的には以下の研究を行った。

- 1) 防御応答に関与する遺伝子群の活性化パターンを植物個体中で可視化し、その動態を定量的に追跡できる実験系を構築して詳細な解析を行うことで HR に伴う植物免疫反応場の細胞タイプを定義する。
- 2) 植物免疫反応場に対する既知の防御応答変異体の影響を解析することにより、植物免疫反応場の形成機構に迫ろうとした。
- 3) 標的一細胞での Avr 誘導発現による最小単位での HR 再構成実験系を構築し、プロモーターレポーターと組み合わせ、HR シグナル伝播機構を定量的に解析する
- 4) 上記 1)および 2)のデータをもとに時空間的な HR 誘導機構を数理モデル化し、3)の再構成系での検証を通してモデルを最適化し、HR という現象を理解する。

(2) 詳細

1) 防御応答可視化系の構築と HR 組織における細胞タイプ定義

およそ 40 種の植物防御応答に関わる遺伝子群に関してプロモーターレポーター植物を作成した。特に、植物免疫応答に重要である植物ホルモンであるサリチル酸(SA)に関係する遺伝子群(合成酵素、下流 SA 応答性マーカー遺伝子など)には特に注目した。また、ここではルシフェリンが SA アナログとして機能し、植物防御応答を誘導するという報告があったことから、核局在型 YFP を用いた。核局在型 YFP を用いることで、プロモーター活性化細胞一つ一つを区別でき、かつ、植物イメージングで問題になる自家蛍光との区別も容易になった。さらに、様々な条件検討を経て、HR を誘導する細菌を接種することで、免疫反応時におけるこれらプロモーター活性の時空間的動態を解析することができるライブイメージングシステムを構築した。本システムは、「生きたままの植物葉で各種プロモーター活性を観測できる」という点で画期的である。これにより様々な防御応答関連プロモーター活性の時空間的動態を捉えることが可能となり、構築した各種プロモーターレポーター植物を用いて HR 誘導時のプロモーター活性化パターンを解析したところ、プロモーター毎に様々な時空間的活性化パターンを示すことが見出された(図 1)。しかし、細かな違いはあるにせよ、それら各プロモーターの活性化パターンとそれら遺伝子の既知の機能とを照らし合わせた結果、HR 組織においては、感染領域を中心とした SA 活性化領域とその外周部の領域というように、大きく二つの領域に機能的に分類されることが見出された。



40種ほどの防御応答関連遺伝子のプロモーターレポーター植物を作成

生きた状態の病原体感染植物葉で1細胞レベルでの防御応答時空間的動態の解析が可能となった。

図1. プロモーターレポーター植物

また、本イメージング系は非切断葉でのイメージングを目指したために電動制御の実体顕微鏡をベースに構築したが、その解像度では 1 細胞レベルでの詳細な定量的観測は非常に困難である。そこで、非切断葉を用いた高解像度でのイメージング系確立を目指し、さきがけの増額支援を受け共焦点ユニットを導入し、現在、高解像度イメージング系をセットアップ中である。

当初、各細胞タイプを分類したのち、代表的なプロモーターレポーターを用いて、蛍光を指標にセルソーターを用いて各タイプの細胞を分取し、細胞タイプごとのマイクロアレイ解

析を行い、HR 遺伝子発現マップを構築する予定であったが、上記の外周部において植物の傷害応答に関わるホルモンであるジャスモン酸(JA)経路の活性化が見出されたため、細胞をバラバラにするという刺激が混入する当初の手法は不適だと考えられ、細胞タイプごとのマイクロアレイ解析は断念した。現在、代替手法を各種検討中である。

2) 植物免疫反応場の形成機構

〈HR における SA 濃度勾配の検証〉

HR において防御応答が秩序立って感染細胞周辺部のみに誘導される機構としては、植物ホルモンである SA が感染細胞で合成されることで、感染細胞を中心とした SA 濃度勾配が形成され、その濃度に応じて細胞死、防御関連遺伝子発現、といった異なる細胞応答が誘導されるという、モルフォゲン濃度勾配による形態形成を説明するフレンチフラッグモデルのような仮説が提唱されていた。そこで、1)で構築したイメージング系を用いてまずこの仮説を検証することから植物免疫反応場の形成機構に迫ろうと考えた。SA 応答性防御応答のマーカーとして広く用いられている *PR1* 遺伝子のプロモーター(*pPR1*)レポーターの HR 誘導時の時空間的動態を解析したところ、感染細胞(その後プログラム細胞死を起こす領域)とその周辺数細胞でのみ、一過的な *pPR1* 活性の上昇が見出された(図1)。特にプログラム細胞死領域に接する生細胞群で強い活性が見られた。そこで、細胞死を起こす直前に *pPR1* 活性化領域と非活性化領域の組織をサンプリングし解析したところ、*pPR1* 活性化領域のみで SA が大量に蓄積し、その周縁部の *pPR1* 非活性化領域ではほとんど蓄積してないことが明らかとなり、SA は感染細胞を中心として非常に急峻な濃度勾配を形成して蓄積することが示唆された。

〈HR における SA の役割〉

SA の役割を遺伝学的に解析したところ、SA を蓄積しないような変異体(*NahG*)では *pPR1* 活性やプログラム細胞死が見られず、SA 蓄積レベルが減少した変異体(*sid2*)では細胞死誘導が遅れ、*pPR1* 活性が細胞死領域に接したごく狭い生細胞領域のみで弱く長時間見られることが明らかとなり、HR 時の SA の高濃度蓄積が、広範囲での強く一過的な防御応答誘導に必要なことがわかった。

〈細胞間 SA シグナル伝播機構〉

さらに、*pPR1* レポーター植物に高濃度 SA を部分投与したところ、まず非投与部分において、投与領域に近接した部分から始まる *pPR1* 活性の波が誘導され、その後、投与部でも *pPR1* 活性が上昇することがわかった。この非投与部での *pPR1* 活性の波は SA 合成経路変異体(*sid2*)において完全に喪失することから、投与部から SA が拡散しているのではなく、何らかの細胞間 SA 合成誘導シグナルが細胞間を伝播することで非投与部での SA 合成を介して誘導されることが示唆された。このように植物組織を構成する各細胞は、組織内で秩序立った細胞間 SA 合成シグナルリレー機構を用いて、波のように防御応答シグナルを拡散していくことがわかった(図2)。



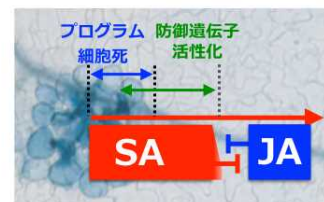
SA自身が細胞間移行するのではなく、何らかの細胞間シグナルにより、組織内の個々の細胞がそれぞれ秩序立って順にSA合成を行うことで組織内で波のようなSA応答が観測される。

図2. 細胞間SAシグナルリレー機構

<HRにおける局所的防御応答領域形成機構>

感染細胞を中心とする HR 中心部では SA を高蓄積するにも関わらず、*pPR1* 活性は中心部から波のように伝播せず、細胞死領域近傍でのみ見られる。このことは何らかの SA シグナルリレー阻害因子が HR 外側で機能していることを示唆している。SA の阻害因子として最も知られているものは JA である。絶対寄生性病原体への防御応答に必要な SA に対し、JA は昆虫による食害や腐生性病原体、もしくは傷害に対する防御応答に必要なホルモンである。通常、SA と JA の間には相互拮抗作用が観察され、このことは、植物は SA もしくは JA による防御応答どちらかひとつしか選択できないという植物防御応答機構におけるトレードオフの存在を示唆していた。しかし、植物は自然界で多様なストレスにうまく対処しており、こういったトレードオフの影響は薄いようにも見える。また、近年では SA が JA の影響を凌駕するケースが報告されたり、SA が重要な HR においても JA 系の活性化を示唆するデータが報告されたりし、混沌とした状態にあった。

私は 1) のイメージング系において、JA 応答性マーカー遺伝子 *VSP1* プロモーター (*pVSP1*) レポーターも構築しており、HR におけるその詳細な時空間動態を観測したところ、HR 誘導に伴い、早い時間にまずは葉全体で弱い *pVSP1* 活性が観察され、続いて、*pPR1* (≡ SA) 活性化領域の外側で一過的な強い *pVSP1* 活性が観測された。これにより、これまで謎であった、相互拮抗関係にあるはずの SA および JA シグナル系が HR 時に同時に活性化するという現象が、実は HR 組織の異なる細胞領域で起きていることで明快に説明出来ることがわかった。また、この外部での JA 系活性化によって、細胞間 SA シグナルリレーが感染中心周辺のみ限定されることが想定された。そこで、JA シグナル系変異体である *myc2* 変異体を用いて HR 時の *pPR1* 活性の時空間的動態を観測したところ、野生型に比べ、*pPR1* 活性誘導が早くなり、またその活性化領域も広くなることが確認され、上記仮説が正しいことが支持された。このように、HR における局所的な SA 依存型防御応答系の活性化は、緩やかな SA 濃度勾配のみに依存したフレンチフラッグモデルによって説明されるというよりも、むしろ HR 外側で JA シグナル系が活性化することにより、SA 活性化領域と JA 活性化領域の空間的な拮抗作用を通して、SA シグナル系の活性化が HR 内部のみに限定されることで説明できることが明らかとなった(図 3)。以上、上記の 1) および 2) を一つの論文として投稿しようとしている。



HR時には感染部位でSAが高蓄積するがそのすぐ外側で、ジャスモン酸(JA)シグナル系(SAと拮抗作用する)が活性化することでSAシグナルリレーを抑制し、局所的な免疫応答形成を可能としている。

図3. HRにおける植物免疫反応場形成機構

3) 標的一細胞での Avr 誘導発現系構築

病原菌由来の Avr 因子を植物内で発現させることで植物 R タンパク質を活性化し、細胞死を伴う HR を誘導することができる。ここでは、熱ショック誘導型 CRE 組換え酵素発現植物を用いて Cre/loxP システムにより、熱ショック特異的に Avr 因子を発現させる系を構築した。さらに、標的 1 細胞のみを赤外線レーザー照射により温めることができる IR-LEGO 装置と組み合わせることで、標的 1 細胞での Avr 発現を誘導し、1 細胞での最小 HR 再構成系を構築することを目指した。これまで多数の動植物において IR-LEGO と熱誘導型 Cre/loxP を用いた遺伝子発現誘導系は報告されており、植物では根組織において成功

報告がある。本研究でも根における GFP マーカー遺伝子発現は容易に達成できた。しかし、*Avr* 遺伝子発現には困難が伴った。*Avr* 因子は少しでも発現してしまうと細胞死を誘導し、植物の成長を著しく抑制するという特徴があることで、ほとんどの形質転換植物が矮性を示し、その中でも得られた矮性を示さない植物を用いたことでそもそも誘導系に何らかの問題を抱えた形質転換個体を選んでいった可能性が高い。また、本研究ではシロイヌナズナで広く用いられてきた *HSP18.2* プロモーターを採用したが、このプロモーターは実は非熱処理状態でも維管束で活性を示すことが大きな原因であると考えられた。そこで、新たな熱誘導特異的プロモーターの探索からやり直し、新規熱誘導特異的プロモーターを用いて実験系を再構築している段階である。

4) HR 誘導機構数理モデル化

本研究においては、(当たり前ではあるが)当初の想定を超えて研究が進んだ部分と想定していなかった困難にぶつかり、予定を変更した部分があった。数理モデル化も当初予定していた形ではなかったが、上記 3) で SA-JA の空間的な拮抗作用という HR における免疫反応場の形成原理と考えられる事象を見出したため、現在、この拮抗作用によるモデルをさきがけ研究期間内に構築しようとしている。

3. 今後の展開

今回、HR における植物免疫反応場形成機構として SA-JA 拮抗作用による免疫反応空間的限定システムを見出した。今後、どのようにして HR 時に JA 系が活性化するのか、どのように SA/JA 境界面が形成されるのかなど、植物免疫反応場での各細胞の位置情報決定機構や、SA 系抑制のみにとどまらない JA の植物免疫に対する機能の解析などの研究展開が期待される。また、本研究で構築したシステムは、今回の細菌病に対する HR だけでなく、他の様々な病原性微生物や食植性昆虫などに対する様々なレベルの免疫応答の空間的制御機構の解析にも応用可能である。そもそも、SA や JA は非常に重要な植物ホルモンであるが、どのように細胞間でシグナル伝達するかなどわかっていないことも多く、また他にもまだ免疫に関与するホルモンが存在する。本研究成果を土台として、個体という細胞社会の中での植物免疫反応場の形成機構を解析することで、植物免疫システムをさらに深く理解することができる。その成果は、基礎研究のみにとどまらず、農業での植物病害防除への応用利用、さらには植物という生き物の生存戦略の理解にも貢献するものであると期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究においては、予想を超える進展や問題もあったが、時間がかかりつつも適切に対応できた。その結果、HR における植物免疫反応の局所的限定機構に迫るという当初の目的に対しては、本研究で構築したライブイメージング系を中心とした解析により「拮抗する二つの植物ホルモン相互作用」という原理の一つを示すことができ、現在投稿準備中の本内容を記した

論文が受理されれば、当初の目的の重要部分は概ね達成できたと考えている。特にイメージングを用いて時空間的観点から植物免疫機構にアプローチするという手法は、植物免疫研究分野内でも斬新なものであった。このさきがけ研究のおかげで新たな切り口を示すことができ、本研究成果に記載できたこと、できなかったことも含めて、今まで想定されたこともなかったような多くの新しい現象を見出すことにつながった。これらは、植物免疫システムや植物生存戦略を理解する上で非常に重要な鍵となりうるものである。その意味では本さきがけ研究は一定の評価に値すると考えている。是非、続けて研究を行い、論文として世に出していきたい。本研究内容は、農業上重要な植物病害防除の根幹に関わる植物免疫システムの理解と解明であるため、その成果は基礎研究への貢献だけでなく、将来的な農業的な応用利用も期待されるものでもある。

ただ、このさきがけ領域のキーワードの一つである「構成的に理解する」という部分に関しては、実験系の再構築することになったために、研究期間内に「最小 HR 再構成系」を実現できなかったことは非常に悔やまれる。それでも、ようやく問題を解決した新たな実験系を準備できたので、さきがけ研究終了後にはなるが是非挑戦していきたいと考えている。それら今後の研究においては、本さきがけ研究領域に参加できたことで得られた有形無形の”財産”が生かされるであろうと確信している。

(2) 研究総括評価

耐病性に重要なホルモンであるサリチル酸(SA)が過敏感反応中心部で活性化し、その周囲では SAと拮抗するホルモンであるジャスモン酸(JA)が活性化していることを発見し、内側SA-外側JAという空間反応場がイメージングでき、HR誘導機構の基盤となる知見を得たことは大きな成果です。

今回の成果により、注目され、多くの招待講演を行っている。

数理モデル化することですが、植物細胞の内部(シンプラスト)と外部(アポプラスト)がシグナル伝達と物質移動において異なった機能を持つことを勘案した時空間モデルを考えて頂きたい。

植物病害防除の根幹に関わる植物免疫システムの理解と解明に注力され、今後、この植物免疫システムの分野で、ネットワークを広げ、第一人者として活躍されることを期待します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Endo S., Betsuyaku S., Fukuda H.: Endogenous peptide ligand-receptor systems for diverse signaling networks in plants. *Curr Opin Plant Biol.* (2014) 8;21C:140-146.
2. Tamaki, T., Betsuyaku, S., Fujiwara, M., Fukao, Y., Fukuda, H. and Sawa, S. SUPPRESSOR OF LLP1 1-mediated C-terminal processing is critical for CLE19 peptide activity. *The Plant Journal.* (2013) 76(6):970-81.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<主な招待講演>

1. 別役重之、「視ることで識る植物免疫反応場の形成機構」、BMB2015 ワークショップ「ライブイメージングから迫る植物科学」、(神戸、2015年12月2日)
2. 別役重之、「温故知新からはじめる植物病理学」、日本植物病理学会創立100周年記念大会記念シンポジウム「植物病理学:新たな100年への羅針盤」、(東京、2015年3月30日)
3. Betsuyaku S., “Watching plant immune response towards spatiotemporal dissection of plant immunity”, Georg-August-Universität Göttingen, Department of Plant Cell Biology (Department Seminar), (Göttingen, Germany, 2014年11月27日)
4. Betsuyaku S., “Watching plant immune response towards spatiotemporal dissection of plant immunity”, 5th NIBB-MPIPZ-TLL symposium “Horizons in Plant Biology”, (Max-Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany, 2014年11月26日)
5. 別役重之、「植物免疫反応場の極性形成機構」、奈良先端科学技術大学院大学植物グローバル平成26年度シンポジウム「植物の中をめぐる多様なシグナル分子」、生駒、2014年11月18日)
6. 別役重之・加藤新平・佐藤昌直・福田裕穂。「視(み)ることで識(し)る植物免疫応答」、平成26年度日本植物病理学会植物感染生理談話会(仙台、2014年8月7日)
7. 別役重之、「植物免疫応答を視る」、岩手生物工学研究センター第207回公開セミナー、(北上、2014年2月28日)
8. 別役重之、浦和博子、亀井保博、岡田清孝、福田裕穂、「植物過敏感反応(HR)の時空間的解析～IR-LEGOを用いたHR再構成系～」、新学術領域「植物の環境感覚」ワークショップセミナー、(岡崎、2012年10月19日)

<受賞>

2013年6月 第13回東京大学生命科学シンポジウム ポスター賞