

# 研 究 報 告 書

## 「パターン受容体ネットワークによる高精度・持続型の植物防御システムの開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研 究 者: 西條 雄介

### 1. 研究のねらい

地球規模で植物の生存や生育を制約する主要な律速要因の一つは病害であり、持続的な耐病性を強化することが安定した植物生産の確保につながると期待される。従来の耐病性育種では、病害を引き起こす特定の病原体系統に有効な抵抗性遺伝子に依存した方法が主に利用されてきた。しかし、この方法では、対象となる病原体の種類が限定されてしまうことや病原体の急速な進化による抵抗性の打破等の問題点がある。一方、微生物全般を抑えるような抗菌性物質の利用も、植物に共生して生育・物質生産を補佐する良性の微生物に悪影響を与える懸念がある。

そこで本研究では、自らの細胞異常や破砕成分などのダメージシグナル(DAMPsと総称)を感知する免疫センサーと、微生物特有の成分(MAMPsと総称)を感知する免疫センサー同士が織りなす相互作用ネットワークに着目する。植物免疫シグナル系の最上流で司令塔として働くこれらの免疫センサー(パターン認識受容体)は、それぞれ制御様式やシグナル系の律速ステップが異なり、それらが連動して働くことで互いの機能を相補し、植物免疫の頑健性を高めている。また生育に負の影響を与えてしまう防御応答の規模がDAMPシグナルの量に応じて調節されるという仮説も提唱されている。したがって、パターン受容体の機能性ネットワークの解明を進めることで、様々な病原体の感染拡大を抑止し、その効果も持続的で、かつ植物の生育や微生物共生への負荷を抑えた生体防御システムの開発が可能になると考えられる。

具体的には、PEPRを介したDAMPシグナル系をモデルとして、まずシロイヌナズナにおいてDAMPリガンド活性化・受容体複合体形成・シグナル伝達の分子メカニズムの解明を進める。さらに、PEPR高発現イネを作出して耐病性・耐虫性等に関する性状解析を行うことで高等植物に広く保存されたPEPRシグナル系の応用に向けて役立つ情報を得る。パターン受容体の機能性ネットワークを有効に利用することにより、汎用性や持続性が高く、かつ生育とも調和が取れた耐病性の育種が実現できると考えている。Proof of Concept(概念実証)を得るに留まらず、PEPRシグナル系の強化による影響を重要作物(イネ)において検証することで、食糧作物やエネルギー生産植物への応用展開にも弾みをつけたい。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究領域等によって創出された「二酸化炭素の資源化技術」に実効性を持たせるためには、植物バイオマスの増産と同時にそれを病虫害や環境ストレスから保護する高持続性の技術の開発が極めて重要である。本プロジェクトは、まさにこの点における貢献を目的とするもので、植物が持つ様々な免疫システムの中でも、病原性微生物の認識ひいては防御応答(コスト)の規模の調節に働くと考えられる DAMPs-MAMPs 受容体のシグナルネットワークに着目した。シロイヌナズナの Pep ペプチドとその受容体 PEPR を介したシグナル系

が MAMPs シグナルの増幅に働くことを示した先行研究 (Tintor 2013 PNAS) に続き、本プロジェクト期間中に PEPR シグナル系が病原菌の侵入部位で機能して全身抵抗性を誘導することを報告した (Ross 2014 EMBOJ)。

DAMPs 受容体の活用に向けて、シロイヌナズナ PEPR シグナル系の分子制御機構に関してさらに解明を進めた。Pep ペプチド前駆体の一つ PROPEP3 の放出が感染細菌の病原性や宿主の細胞死に依存して亢進されることを突き止め、DAMP として働くことを証明した。また、PEPR による防御応答・細胞死の誘導が共受容体 BAK1 の非存在下で強まることを発見した上、重大植物病原菌の一つ炭疽病菌が BAK1 除去を通じて感染すること並びに同条件で機能を発揮する PEPR シグナル系が炭疽病抵抗性に重要であることも見出した (Yamada 2016 EMBOJ)。以上の知見を基盤として、Pep 感受性が低下した *alps* 変異体の独立系統を複数単離し、性状解析や原因遺伝子の機能解析を進めている。さらに、PEPR 相互作用タンパク質として細胞膜局在性アクアポリンを同定し、それが細菌抵抗性に必要であることも示した。これらの研究成果は、植物 DAMPs 研究を世界的にも牽引するものであり学術的に高い評価を得ている。

加えて、PEPR の高発現によりシロイヌナズナにおいて植物成長を保持 (有意に増加)しながら MAMPs 誘導性の防御応答並びに耐塩性も強化できることを示した。PEPR 相同遺伝子の発現を強化した形質転換イネも作出しており、現在、耐病性・耐虫性や耐塩性等に関する表現型解析を進めている。このようなアプローチからも「植物成長と調和した新しい生体防御技術」の開発に密接に貢献する知見も得られつつある。

## (2) 詳細

各研究テーマにおける達成状況は次の通りである。

研究テーマ A 「シロイヌナズナ PEPR シグナル系の分子制御機構の解析 (1) 病原菌感染に応じた Pep リガンドの産生・放出機序の解明」

PROPEP3-Venus 発現植物に病原性細菌 *Pseudomonas syringae* の野生株から弱毒株までさまざまな系統を接種して、PROPEP3 およびその低分子型の発現誘導に続く細胞外への放出が病原細菌の病原性や宿主の細胞死に依存して高まることを見出し、PROPEP3 が病原体の認識に関わる DAMP であることを実証した (Yamada et al, EMBOJ 2016)。この結果は、PEPR シグナル系が病原菌の侵入・感染組織において機能することが全身抵抗性の獲得に重要であることを示した研究成果 (Ross et al, EMBOJ 2014) とも合致する。

研究テーマ B 「シロイヌナズナ PEPR シグナル系の分子制御機構の解析 (2) PEPR 複合体の構成因子の同定と機能解析」

PEPR1 または PEPR2 の GFP 融合タンパク質をそれぞれの内生のプロモーター DNA 配列の制御下で発現する形質転換シロイヌナズナにおいて、Pep ペプチド処理の有り無しの条件下で、受容体複合体をアフィニティ精製法により回収し、構成因子の候補タンパク質を質量分析法によりリスト化した。そのいくつかについては現在、機能解析を進めている。また、単糖輸送

体 STP13 に関しては、山田晃嗣博士(京都大学、現徳島大学)との共同研究により機能解析を進めた。その結果、MAMPs 依存的に BAK1 によるリン酸化を受けて単糖吸収活性が増大し、細胞間隙の糖濃度の上昇を防ぐことで細菌の栄養源を枯渇させ、細菌抵抗性に寄与することを突き止めた。植物免疫による感染生物の栄養制御という全く新規の生体防御戦略を発見したことが高く評価された(Yamada et al, Science 2016)。

研究テーマ C「*Colletotrichum* 属炭疽病系状菌の感染戦略(BAK1 除去)の発見、並びに BAK1 除去時の基礎抵抗性における PEPR シグナル系の役割の解明」

病原菌 *Colletotrichum higginsianum*(Ch)が感染した葉において、BAK1 タンパク質の蓄積が特異的に低下する現象を発見した。*bak1* 変異体植物において Ch 感染が増すことから、Ch が BAK1 の除去を介して宿主植物の抵抗性を打破する仕組みを持つことが明らかになった。このような感染戦略に対して、BAK1 非存在下でも PEPR シグナル系が働くことで Ch に対する基礎抵抗性が維持されていることも示した(Yamada et al, EMBOJ 2016)。

研究テーマ D「シロイヌナズナ PEPR シグナル系の分子制御機構の解析(3)Pep 低感受性変異体の分子遺伝学的解析」

Pep 投与による根の伸長抑制が *bak1* 欠損変異体では顕著に起こることを利用して、その変異体背景で Pep 感受性が軽減した復帰突然変異体 *altered Pep sensitivity (alps)* 変異体のコレクションを単離した(既知の PEPR シグナル系の制御因子に変異を持たず、新規制御因子の同定が期待される変異体を7ライン以上含む)。Pep 応答(ROS バースト・MAPK 活性化・マーカー遺伝子発現・細胞死・耐病性)に関する表現型解析を行った。さらにトランスクリプトーム解析による *alps* 変異体コレクションの分類と簡単な性状解析も行った。その結果、各 *alps* アリルで損なわれている PEPR シグナル機能(防御応答経路)が判別できた。現在、ALPS 原因遺伝子の同定並びに機能解析を進めている。

研究テーマ E「シロイヌナズナにおける PEPR 高発現植物の性状解析」

PEPR1 や PEPR2 の高発現植物は、Pep 応答のみならず MAMP 誘導性の防御応答や耐塩性も増強されていることを見出した。特に PEPR2 高発現植物は、温室条件下において土植えて栽培すると生育も良くなっており、PEPR シグナル系の強化により植物の生育を維持しながらストレス耐性が増強できることを確かめた。

研究テーマ F「イネにおける OsPEPR 高発現植物の作出と性状解析」

OsPEPR1 または OsPEPR2 を高発現する形質転換イネをそれぞれ複数系統作出した。現在、高発現ラインを選定して Pep 応答に加えて MAMP 応答、耐病性、耐虫性等の性状解析を進めている。

### 3. 今後の展開

シロイヌナズナにおいて ALPS 遺伝子の同定・機能解析や PEPR 相互作用タンパク質に関する機能解析を進めて PEPR シグナル系の制御機構を明らかにしていくことで、植物の MAMPs-DAMPs 受容体のシグナルネットワークの分子制御メカニズムに関する理解を深める。

その際、互いに近縁でありながら病原菌から共生菌までを含む *Colletotrichum* 属糸状菌リソースを活用することで、植物による病原菌・非病原菌の識別に MAMPs-DAMPs 受容体ネットワークが果たす役割を明らかにする。また、シロイヌナズナの PEPR 高発現植物はさまざまな MAMPs に対する感受性も高まっており、これをレポーターとして活用することで、新規の MAMPs や DAMPs の同定に役立てる。このような研究路線を継承することで基礎研究としてのさらなる発展が期待される。

イネの PEPR 相同遺伝子 OsPEPR1 または OsPEPR2 の高発現イネについて、植物生理学・植物病理学の観点から詳細な表現型解析を実施して、植物成長や菌根菌など微生物共生と調和する形で耐病性・耐虫性・耐塩性などが増強しているかどうかに関して精査する。これらの研究成果をベースに応用展開を図る。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

植物の物質生産力の強化・安定化に向けて、病虫害の克服は喫緊の課題である。本プロジェクトでは、耐病性育種技術に関して従来の主流とは異なる切り口から、「植物成長と調和する新しい生体防御技術」の開発基盤となる知見の習得を目指した。

具体的には、植物免疫において重要な役割を担いながらあまり研究が進んでいない DAMPs シグナル研究並びに MAMPs-DAMPs (パターン) 受容体のシグナルネットワークに着目して、モデル植物シロイヌナズナのアドバンテージを活かしながらその生理意義や分子制御メカニズムの解明を進めることが出来た。中でも、MAMPs 受容体・DAMPs 受容体に加えて、他の重要な生理応答の制御に関わる多くの膜受容体にとって共通の共受容体として働く BAK1 を標的とする病原菌の感染戦略と、それに対抗する植物の生体防御戦略として PEPR を介した DAMPs シグナル系が果たす重要性を明らかにした研究成果は、国内外で学術的に高く評価されている (Tang and Zhou, EMBOJ 2016 News & Views)。また、パターン受容体シグナル系の活性化が耐病性のみならず、耐塩性の誘導にも促進的に働くことの発見 (特許出願済み、現在論文準備中) は、学術的にも応用的にも新規性・進歩性が高い成果である。ドイツ・マックスプランク研究所から主宰研究室を奈良先端科学技術大学院大学に移し、本プロジェクトの研究費を有効活用して上記の研究成果を上げるとともに、将来に渡って先駆的に研究を進められる研究実施体制 (大学院生や技術補佐員の育成も含む) を全くの新地から確立することが出来た。本学における形質転換植物実験停止措置の影響で、最終年度に遅れが生じたものの、追加支援を得られたこともあり現在急ピッチで解析を進めており、今年度末までには挽回が十分可能であると考えている。

応用的な観点からは、イネにおいても PEPR シグナル系が植物の成長促進機能を持つことを見出した点が評価できる。現在進行中の OsPEPR 高発現イネの表現型解析からも「植物成長と調和する新しい生体防御技術」の開発に向けて PEPR シグナル系の活用の有望性を裏付ける知見が得られるものと期待される。少なくとも本プロジェクト終了1年以内には一通りの解析を終えて、実効性を評価できる見通しである。これまでの進捗状況から判断して農学的な波及効果が大きく期待される成果が得られるものと予想しており、むしろ野外圃場実験など実用



化に向けて達成すべき課題点を明確にしたいと考えている。

結論として、本研究課題の目標に対する達成度は、基礎研究としては当初の想定を超えた PEPR シグナル系の新機能の発見も含めて非常に高いと評価できる。研究成果の外部発表や応用展開に関しては現在進行中の研究や投稿論文を合わせて一定の評価が妥当である。研究体制や研究マネジメントに関しては、ドイツから帰国直後、国内の研究環境に慣れ、研究室環境を確立するのに一定の期間を要したものの、産学連携を含む研究者ネットワークも形成することが出来、最終的には今後につながる生産性の高い体制が構築できたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

西條氏は、本研究において、植物免疫に重要な役割を果たしているパターン受容体ネットワークの仕組みを解明し、持続的で物質生産とも調和のとれた耐病性植物の作出を目指した。その結果、病原菌感染に由来するダメージシグナルに対する植物体の応答現象の分子実態の解明に成功し、また、ネットワーク構成要素の一つPEPRの過剰発現体で、防御応答性や耐塩性が増強していることを明らかにし、特許も出願している。これらの成果は高く評価されるもので、植物とそれを取り巻く微生物との複雑な相互作用の今後の解明に大いに期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Ross A., Yamada K., Hiruma K., Yamashita-Yamada M., Lu X., Takano Y., Tsuda K., Saijo Y.\* The Arabidopsis PEPR pathway couples local and systemic plant immunity, EMBO J., (2014) 33, 62-75.
2. Tintor N., Saijo Y.\* ER-mediated control for abundance, quality, and signaling of transmembrane immune receptors in plants, Front. Plant Sci. (2014) 5, 65.
3. Yamada, K., Yamashita-Yamada, M., Hirase, T., Fujiwara, T., Tsuda, K., Hiruma, K. and Saijo, Y.\* Danger peptide receptor signaling in plants ensures basal immunity upon pathogen-induced depletion of BAK1. EMBO J. (2016) 35(1): 46-61.
4. Espinas, NA., Saze, H. and Saijo Y.\* Epigenetic control of defense signaling and priming in plants. Front. Plant Sci., (2016) 7, 1201.
5. Yamada, K., Saijo, Y., Nakagami, H. and Takano, Y. Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in *Arabidopsis*. Science (2016) 354, 1427.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発 明 者：西條 雄介

発明の名称：植物の耐病性及び耐塩性を向上させる方法並びにその利用

出 願 人：奈良先端科学技術大学院大学

出 願 日：2015/3/10

出 願 番 号：特願 2015-047699

(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)

日本植物生理学会年会シンポジウム(国際、英語)の主宰

「Learning Plant Physiology on Plant-Pathogen Interactions」(H27 年3月)。

「Molecular Basis for Extended Phenotypes in Plant/Animal-Microbe Interactions」(H29 年3月)。

日本植物生理学会 国際委員長に着任(H28-29 年)。

The Global Plant Council Executive Board に選出。

<http://globalplantcouncil.org/about-us/executive-board>

プレスリリース

奈良先端科学技術大学院大学(H27. 11 月)

「植物は細胞異常を感知するセンサーによって病原菌侵入を察知していた

～病原菌による攻撃を受けた細胞が放出するシグナル因子を認識して植物が免疫応答を強化する仕組みを解明、耐病性と増収を兼ね備えた作物に期待～」

京都大学および奈良先端科学技術大学院大学(H28. 11 月)

「植物は侵入してきた病原菌を兵糧攻めにして撃退する一植物の新規防御メカニズムの発見と解明」

公募研究事業

三菱財団研究助成採択(H28 年)

「植物免疫受容体と微生物のクロストークによる共生の場の構築メカニズムの解明」