

卒業研究要旨

植物ホルモン分析とマイクロアレイ解析による 感染防御応答制御因子 CAS の機能解析

(応用生物学研究室) 神田ゆい

1. 序論

植物は日々様々な外的ストレスにさらされている。しかし、固定生活を営んでいる植物は、これらのストレスを回避できない。そこで植物は、ストレスを認識すると、そのストレスに応じて様々な反応を起動し、防御応答を行う手段を発達させてきた。例えば、ストレスの一種である病原体に対して、その接触を認識すると、病原体の侵入口である気孔を閉鎖したり、防御遺伝子の発現を誘導したり、さらに病原体に侵された細胞が自ら細胞死をおこすなど、様々な防御応答を生じて病原体の感染を阻止する。しかし、このような植物の防御応答において、植物特有のオルガネラである葉緑体が、どのような役割を担っているかはあまり分かっていない。

所属研究室では、葉緑体局在の Ca^{2+} 結合タンパク質 CAS が植物病理応答に関わっている可能性を指摘し、感染防御応答の起動、過敏感細胞死と呼ばれる細胞死の誘導に葉緑体が必要であることを明らかにしてきた。そこで本研究では、葉緑体による感染防御応答制御の分子機構の解明を目指し、葉緑体由来の植物ホルモンの動態解析と、マイクロアレイ解析による遺伝子発現誘導の網羅的解析を行った。その結果、①感染防御応答に関わる重要なホルモンであるサリチル酸 (SA) の合成誘導が葉緑体蛋白質 CAS によって制御されていること、②サリチル酸の誘導制御遺伝子群の初期発現誘導が葉緑体 CAS によって特異的に制御されていることを明らかにした。

2. 材料と方法

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型 (WT)、CAS 欠損変異体 (*cas-1*)、CAS 過剰発現体 (CASOX) を用いた。

① *flg22* が誘導する SA 誘導の測定

発芽後 2 週間の植物を、MS 溶液に浮かべ 24h 静置し、*flg22* (細菌の鞭毛に存在する分子パターン。*flg22* 処理により、植物は防御応答反応を生じる。) を処理し、処理後 0h、5h、12h の植物について 200mg ずつサンプリングを行った。その後、遊離性 SA と配糖体 SA (SAG) を抽出分離し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてそれぞれの量を測定した。また、UPLC/TOF-MS による植物ホルモンの網羅的解析も行った。

② マイクロアレイ解析による病原菌処理後の遺伝子発現誘導の比較検証

flg22 を処理後 0h、2h の植物 (WT と *cas-1*) について 200mg ずつサンプリングを行った。その後、RNA 抽出作業を行い、*affimetrix* のマイクロアレイを用い、WT と *cas-1* 間の遺伝子発現の差を 2 色法により解析した。

3. 結果と考察

①CAS によるサリチル酸合成誘導の制御

まず、蛍光 HPLC を用いた SA 測定系を立ち上げた。植物中には、生理活性を持つ遊離型 SA と配糖体として液胞に蓄積する SAG が存在する。本実験では遊離型 SA と SAG を分離した後、それぞれについて測定を行った。野生型では、flg22 処理後 5 時間、12 時間で、遊離性 SA と SAG とともに増加しており、flg22 によって SA 合成が誘導されているのが分かる。一方、cas-1 においては、遊離性 SA と SAG とともに flg22 による誘導が見られず、SA 誘導に葉緑体 CAS が必須であることが分かった。逆に、CASOX では、SA 誘導が早まっている傾向が見られた。さらに UPLC/TOF-MS による網羅的ホルモン解析を行い、CAS は他のストレスホルモンであるアブサイジン酸やジャスモン酸合成には関係しないことも確認した。植物の SA 合成は葉緑体で行われる。SA 合成に関わる酵素 (ICS1、EDS5 など) の変異体では、flg22 処理前の SA 内生量が大きく減るが、cas-1 においては優位な差は見られない。従って、CAS は SA 合成に直接関わるのではなく、その制御において重要な役割を持つ因子であると考えられる。

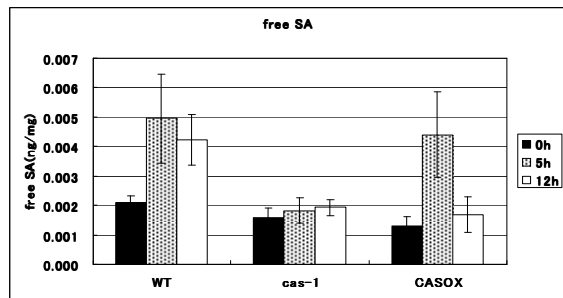


図 1. flg22 処理後の遊離性 SA 量

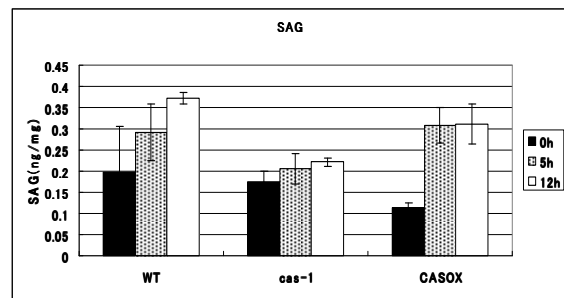


図 2. flg22 処理後の SAG 量

②マイクロアレイ解析による CAS 依存遺伝子の同定

flg22 は、SA 合成に先立って 2500 ほどの遺伝子の発現を誘導する (flg22 応答遺伝子)。CAS による SA 誘導の分子機構を探るため、flg22 処理 2 時間後の植物 (WT および cas-1) から RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、1236 個の CAS 依存遺伝子を同定した。CAS 依存遺伝子の 7 割は flg22 応答遺伝子であり、逆に flg22 応答遺伝子の 3 割が CAS 依存であることが分かった。本実験により、葉緑体タンパク質 CAS が、flg22 による防御応答遺伝子群の発現誘導に大きな役割を果たしていることが明らかになった。CAS 依存遺伝子には、PAD4、EDS5、PBS3 などの SA 合成誘導に必須の遺伝子が含まれる。従って、CAS はこれらの SA 合成関連遺伝子の発現誘導を介して SA 合成を制御している可能性が考えられた。

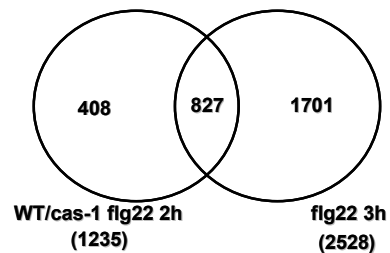


図 3. アレイ解析による CAS 依存及び flg22 依存遺伝子群

3. 参考文献

竹林 宏祐, ナノ液体クロマトグラフ質量分析計による植物ホルモン解析システムの改良と応用, 大阪大学工学研究科生物資源工学領域 卒業論文 (2010)