

耐病性植物作出を目指した植物細胞死の制御系の解明

初谷 紀幸

北海道大学大学院医学研究科

1. 研究のねらい

これからの農業では、植物が本来もつ自己防衛能力を強化した耐病性作物の分子育種が注目されている。その技術基盤として、病原体感染に対する植物の生体防御機構を分子レベルで解明することが緊急かつ必須の課題である。植物は病原体の感染から身を守るために様々な防御系を進化させてきた。そのなかでも、汎用性の高い防御戦略が、病原体の認識に基づいて誘導される「過敏感細胞死」である。過敏感細胞死は感染を受けた細胞が自らを犠牲にして自発的に死ぬことによって、病原体を封じ込め、周囲の健全細胞への感染拡大を抑制する防御機構である。私はこれまでに植物に固有の液胞が細胞の生死を決定する重要なオルガネラであることを明らかにした。本さきがけ研究では、液胞に着目して過敏感細胞死の分子メカニズムを解明することによって、植物が獲得した生体防御戦略を理解することを目指した。細胞死における液胞の機能を制御することで病害抵抗性作物の分子育種に役立てようとするものである。

2. 研究成果

シロイヌナズナにおいて植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) strain DC3000 (*avrRpm1*) を接種した際に誘導される防御発現系をモデルとして、植物の耐病性に重要な役割を担っている「過敏感細胞死」に着目して研究を進めた。*Pseudomonas* 属菌による農作物被害は世界的にも深刻で、既発生国および未発生国ともにその防除には多大の関心が寄せられており、研究対象として興味深い。本さきがけ研究で病原細菌 *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) の感染によって誘導される過敏感細胞死の鍵を握る分子がプロテアソームであることを見出した。

植物のプログラム細胞死における Caspase 様活性の関与

高等植物は、発生の過程や感染防御の過程で一部の細胞を死に至らせる能力を備えている。この植物の細胞死のシステムは動物のシステムとは大きく異なる。動物では老廃細胞は食食細胞マクロファージによって補食・消化される。しかし、植物はマクロファージをもたないため、細胞が死に向かう際には細胞内成分を自力で分解しなければならない。私はこの際の速やかな分解に液胞が重要な役割を果たしていると考えている。

プログラムされた細胞死は植物細胞と動物細胞の両方にとって基本的な生理プロセスであり、両者には共通した分子機構が働いているとする研究も多数ある。例えば、動物の細胞死の実行因子として知られる Caspase 活性は、植物の細胞死の局面でも検出され、特に Caspase-1 と Caspase-3 の阻害剤で細胞死が抑制されるという報告もある。しかしながら、国内外の多くの研究者の努力にも関わらず、Caspase 活性をもつ分子は長い間不明であった。

私はこれまでに逆遺伝学的解析などから Caspase-1 活性を示す酵素の実体が液胞プロセシング酵素 (VPE, Vacuolar Processing Enzyme) であることを見出した。また VPE は病原ウイルス (*Tobacco mosaic virus*) の感染に対する植物の防御機構を制御することを証明した。VPE はウイルス感染にともない液胞の崩壊を導くことによって細胞死を引き起こす。

植物の Caspase-3 様活性を示す酵素の実体

シロイヌナズナの葉に *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) を接種すると、12 時間以内に過敏感細胞死が誘導され、感染細胞は死に至る。この過敏感細胞死がプロテアソームの阻害剤で抑制されることを見出した。さらに、Caspase 様の活性をもつプロテアーゼが関与する可能性について調べるために Caspase-1 および Caspase-3 の阻害剤を処理したところ、Caspase-3 阻害剤で過敏感細胞死が抑制された。この結果は、シロイヌナズナの過敏感細胞死に Caspase-3 様の活性を持つプロテアーゼ

が関与することを示唆する。

シロイヌナズナにおける Caspase-3 様活性およびプロテアソーム活性を測定した。Caspase-3 様活性はプロテアソーム阻害剤で抑制され、一方、プロテアソーム活性は Caspase-3 阻害剤で抑制された。この結果はプロテアソームに Caspase-3 様活性があることを示唆している。プロテアソームは3つのサブユニット $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ にプロテアーゼ活性をもつ。シロイヌナズナの $\beta 1$ タンパク質は *PBA1* 遺伝子によってコードされている。内在性の *PBA1* の発現を抑制したシロイヌナズナ (*ipba1*) を作製し、プロテアソーム活性と Caspase-3 様活性を比較した。*ipba1* 植物ではプロテアソーム活性とともに Caspase-3 様活性が低下しており、両者の活性は相関関係を示した。この結果はシロイヌナズナにおける Caspase-3 様活性を示す酵素の実体がプロテアソームの *PBA1* であることを示している。

プロテアソームは過敏感細胞死を制御する

過敏感細胞死におけるプロテアソームの関与について調べるために *ipba1* 植物に *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) を接種した。野生型のシロイヌナズナに *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) を接種すると、感染を受けた細胞は過敏感細胞死を起こし、図1に示すように死細胞がトリパンブルーで青色に染色される。一方、*ipba1* 植物では過敏感細胞死が起こらず (図1)、病原細菌が増殖していた。この結果は明らかにプロテアソームが過敏感細胞死において重要な役割を担っていることを示している。

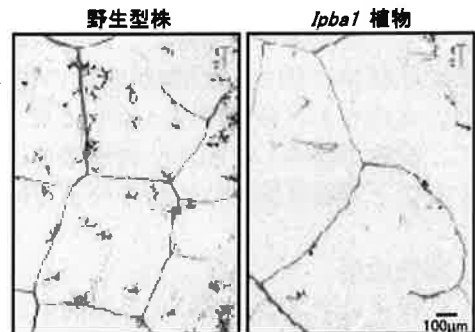


図1. 病原細菌 *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) を接種した葉のトリパンブルー染色。野生型株では染色された死細胞が観察されるが、*ipba1* 植物では染まった細胞が観察されず、細胞死が抑制されている。

過敏感細胞死におけるプロテアソームの役割

過敏感細胞死を起こしつつある細胞の形態変化を電子顕微鏡レベルで観察した。接種後3時間目の細胞に注目すると、液胞膜が細胞膜と融合することが分かった (図2)。このような膜融合は、*ipba1* 植物の細胞では観察されなかった。

液胞膜と細胞膜の融合をリアルタイムで観察するために、細胞膜を GFP-PIP2a で可視化し、液胞膜を RFP-Vam3 で可視化した。感染後3時間目の細胞において、細胞膜 GFP-PIP2a (緑) と液胞膜を RFP-Vam3 (赤) が融合し、オレンジ色 (緑+赤) になった。この膜融合は、プロテアソームの阻害剤を添加することによって抑制された。膜融合により液胞内の分解酵素群が細胞外に放出されることが期待できる。これについて検討するために、液胞局在型の GFP を導入したシロイヌナズナに *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) を接種し、GFP 蛍光の挙動を観察した。その結果、接種後約 4.5 時間で、GFP 蛍光が細胞外で検出された。この GFP 蛍光の漏出はプロテアソームの阻害剤を添加することによって阻害された。これら結果は、プロテアソームが植物の細胞死の過程において液胞膜と細胞膜の融合に関わっており、膜融合の結果、液胞内の分解酵素群が細胞外に放出されることを示唆する。

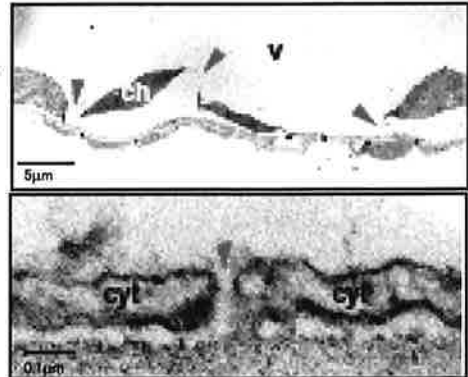


図2. 病原細菌 (*Pst* DC3000/*avrRpm1*) を接種した葉の電子顕微鏡写真。矢頭で示す部分で液胞膜と細胞膜が融合している。

プロテアソーム/Caspase-3 様活性が制御する過敏感細胞死は、VPE/Caspase-1 様活性が関わる細胞死機構と同様に液胞が重要な役割を担っていた。しかし、植物の感染防御戦術という視点から見ると、液胞の役割は大きく異なっていた。植物は病原体の生活様式 (細菌は植物の細胞間隙で増殖する、一方ウイルスは植物細胞内に侵入し増殖する。) の違いによって全く異なる感染防御戦術 (細胞死メカニズム) を発動することが示唆された。プロテアソーム/Caspase-3 様活性が制御する防御戦術の大きな特徴は、液胞膜が細胞膜と融合することである。これによって、植物細胞は液胞内の分解酵素や抗菌物質を細胞外に放出し、細胞間隙に潜む細菌を攻撃すると同時に自らも

死に至る。一方、これら抗菌物質はウイルスに対する効果は低く、ウイルスは細菌と異なり細胞内に侵入し増殖する。VPE/Caspase-1 様活性を介する防御戦術では、液胞の崩壊を導くことによって素早く感染細胞を死に至らせることが特徴である。この戦術は、細胞内で増殖するウイルスにとっては効果的である。これまではウイルス、細菌、カビすべての病原体に対して植物は共通した防御戦術を発動していると信じられてきた。ところが、本研究成果は、病原体それぞれの生活様式に応じた防御戦術を植物は進化させてきたことを示唆している。



図3. 細胞死モデル

①病原体の感染により過敏感細胞死のスイッチがオンになる。②プロテアソーム依存的に液胞膜と細胞膜が融合し、その結果、液胞内分解酵素群が細胞外に放出される。③細胞質が凝集し、④自らを分解し細胞は死に至る。

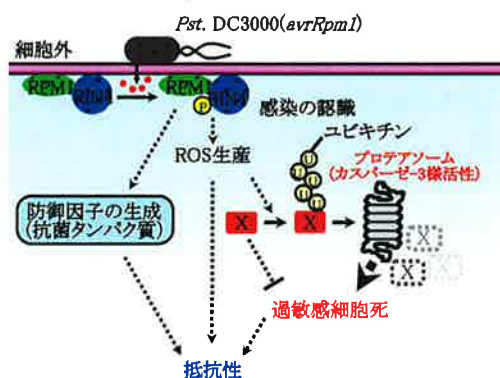


図4. 細胞死の分子メカニズム仮説

プロテアソームはポリユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解することから、過敏感細胞死を負に制御する因子“X”(プロテアソームの基質)の存在を仮定し、分子モデルを考えた。感染シグナル伝達の結果、“X”がユビキチン化される。ポリユビキチン化された“X”がプロテアソームで分解されることによって細胞死が実行される。

3. 主な発表

論文

- ・ I. Saska, A.D. Gillon, **Noriyuki Hatsugai**, R.G. Dietzgen, I. Hara-Nishimura, M.A. Anderson and D.J. Craik (2007) An asparaginyl endopeptidase mediates in vivo protein backbone cyclization *J. Biol Chem.* 282: 29721-29728.
- ・ **Noriyuki Hatsugai**, M. Kuroyanagi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura (2006) The cellular suicide strategy of plants. *Apoptosis* 11: 905-911.
- ・ I. Hara-Nishimura, **Noriyuki Hatsugai**, S. Nakaune, M. Kuroyanagi and M. Nishimura (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr. Opinon Plant Biol.* 8: 404-408.

招待講演

- ・ 初谷紀幸, 岩崎慎治, 西村いくこ, プロテアソームを介した植物の感染防御機構, 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 合同大会シンポジウム, 神戸, 2008年12月.
- ・ 初谷紀幸, 黒柳美和, 中畦悟, 西村いくこ, 液胞プロセシング酵素が制御する植物のプログラム細胞死, 日本分子生物学会 2006 フォーラム シンポジウム, 名古屋, 2006年12月.
- ・ 初谷紀幸, 西村幹夫, 西村いくこ, 液胞プロセシング酵素が制御するプログラム細胞死機構の解明, 植物科学研究プロジェクト シンポジウム, 東京, 2005年12月.
- ・ I. Hara-Nishimura, **Noriyuki Hatsugai**, M. Kuroyanagi, S. Nakaune, T. Kunieda, K. Takahashi and M. Nishimura, Vacuolar processing enzyme (VPE): an executor of vacuole-mediated cell death in plants. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Dec., 2006, Kyoto.
- ・ I. Hara-Nishimura, **Noriyuki Hatsugai**, M. Kuroyanagi, S. Nakaune, K. Yamada and M. Nishimura, A VPE exhibiting caspase-1 activity regulates pathogen-induced cell death and developmental cell death in plants. XII International Congress on Molecular Plant Microbe Interaction, Dec., 2005, Merida, Mexico.