

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658045

研究課題名(和文)植物免疫におけるセロトニンの受容・情報伝達の解明

研究課題名(英文) Serotonin-mediated immune signaling in plants

研究代表者

川崎 努 (Kawasaki, Tsutomu)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：90283936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：セロトニンは、動物では神経伝達物質として知られているが、植物における機能は殆ど明らかになっていない。我々は、イネからセロトニン合成酵素遺伝子を同定し、セロトニンが防御反応に関わっていることを明らかにした。本研究により、シロイヌナズナにおいて、セロトニンが、防御遺伝子の発現、カロースの形成、MAPKの活性化などの免疫応答を誘導することが明らかになり、セロトニンが免疫誘導因子として機能していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Although serotonin is known as a neurotransmitter in animal, its function in plants remains to be identified. We identified rice SL gene encoding serotonin synthesizing enzyme involved in defense responses. In this work, we found that serotonin induces expression of defense genes, callose deposition, and activation of MAP kinase in Arabidopsis. Therefore, it is likely that serotonin functions as immune factor in plants.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：セロトニン 植物免疫

## 1. 研究開始当初の背景

セロトニンは、動物において神経伝達物質として機能し、うつ病や神経症などの精神疾患との関連が明らかにされている非常に重要な物質である。そのため、動物ではセロトニンの受容機構および信号伝達機構など、精力的に研究が進められている。一方、植物では、多くの植物種において、セロトニンの存在が確認されているものの、植物におけるセロトニンの機能や受容機構については、殆ど明らかになっていない。最近、我々は、トリプタミンからセロトニンの生成を触媒するイネのチトクロムP450モノオキシゲナーゼ(SL遺伝子)を同定した (Fujiwara et al. J. Biol. Chem. 285, 11308-11313, 2010)。このSL遺伝子は病原菌感染やキチン処理に応答して発現誘導されることから、植物の免疫応答に関与していることが示唆された。また、イネにセロトニン処理を行ったところ、抗菌性タンパク質の発現などの様々な免疫応答が誘導され、セロトニンが免疫反応を誘導する信号伝達因子として機能していると考えられた。そこで、本研究課題では、植物免疫応答におけるセロトニンの役割について解析を行う。

## 2. 研究の目的

イネでは、セロトニン合成酵素であるSLタンパク質が同定され、セロトニンが免疫応答を誘導することを明らかにしているものの、植物一般に、セロトニンが免疫誘導因子として機能しているかどうかは不明である。また、他の植物では、セロトニン合成酵素が同定されておらず、イネと同じ経路で生成されているかどうかは不明である。そこで、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、セロトニンが免疫誘導因子として機能しているかどうかを解析するため、セロトニンによって誘導される免疫応答を詳細に解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) セロトニンに応答した遺伝子発現の解析

シロイヌナズナの育成培地へのセロトニンの添加、あるいは葉にセロトニンを処理したサンプルから RNA を単離し、マイクロアレイ解析を行った。さらに、一部の遺伝子に関して、リアルタイム PCR を用いた定量的な解析を行った。また、セロトニンによって誘導される遺伝子のプロモーターを単離し、そのプロモーターの制御下でルシフェラーゼが発現するシロイヌナズナを作製し、発現解析を行った。

### (2) カロースの解析

シロイヌナズナの葉をセロトニンとトリプタミンで処理し、固定処理を行った後、アニリンブルーで染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

### (3) MAP キナーゼ活性の解析

シロイヌナズナの葉をセロトニンあるいはトリプタミンで処理し、タンパク質を抽出後、MAPK のリン酸化抗体を用いたウエスタン解析により、セロトニンに応答した MAPK の活性化を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) セロトニンによって誘導される遺伝子の解析

シロイヌナズナの育成培地にセロトニンあるいはその前駆体であるトリプタミンを添加することで、シロイヌナズナを処理し、RNA を精製した。得られた RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、セロトニンによって発現が変化する遺伝子群を単離した。さらに、それらの遺伝子群について、リアルタイム PCR を用いた解析を行い、セロトニンに応答した遺伝子発現を解析した。その結果、セロトニンに応答して、発現が誘導する遺伝子として、3 個の遺伝子、CRK6 (Cysteine-rich RLK)、BGL2 (glucan 1,3-beta glucosidase)、Aspartyl protease を単離した。これらの遺伝子はセロトニン処理により、発現量が 20 倍～30 倍に増加することが明らかになった。また、セロトニン処理により発現が減少する遺伝子として、Stress-responsive protein を単離した。この遺伝子の発現は、セロトニン処理により約 50 倍減少した。しかし、これらの遺伝子は、セロトニンによって変動するが、トリプタミンによっては変化しないことが明らかになった。そのため、セロトニンに特異的なメカニズムにより、これらの遺伝子が発現していることが明らかになった。

それらの 4 個の遺伝子のプロモーターを単離し、それらのプロモーターの制御下で、ルシフェラーゼが発現するコンストラクトを作製し、シロイヌナズナに導入した。得られた植物体を用いて、セロトニンに応答したルシフェラーゼの発光を観察した。いずれの遺伝子の系統も、ルシフェラーゼの発光は検出できるものの、セロトニンに応答した遺伝子発現の上昇を正確にモニターできる系統を得ることが出来なかった。

### (2) セロトニンに応答したカロースの誘導

病原菌感染に伴う植物の初期応答として、カロースの形成が誘導される。そこで、シロイヌナズナの葉をセロトニンあるいはトリプタミンで処理し、アニリンブルー染色法を用いてカロースの誘導を解析した。その結果、セロトニンによってカロースの形成が誘導されるが、トリプタミンでは誘導されないことがわかった。また、セロトニンの処理濃度を変えて、カロースの誘導を解析した。その結果、80  $\mu$ g/ml の濃度のセロトニンの処理で、もっとも強くカロースが誘導されることがわかった。

(3) セロトニンに応答した MAPK の活性化  
植物の免疫反応の初期応答として、MAPキナーゼが活性化することが知られている。シロイヌナズナの幼苗をセロトニンで処理し、タンパク質を調製した。SDS アクリルアミドゲルで電気泳動を行ったあと、MAPK のリン酸化抗体を用いたウエスタン分析を行った。その結果、セロトニンに反応して MAPK である MPK3 と MPK6 が活性化することが明らかになった。さらに、フラジェリン由来のペプチドである flg22 に処理によって誘導される MAPK の活性化のパターンと比較したところ、flg22 によって誘導される MAPK の活性化が数分で活性化し、3 時間後には全くなくなるが、セロトニンによって誘導される MAPK の活性化は、処理後 3 時間目まで持続していることがわかった。このことから、分子メカニズムは不明であるが、セロトニンにより、持続的に MAPK が活性化されることが明らかになった。

#### (4) SL 過剰発現体の解析

細胞内でのセロトニン生成が防御応答に与える影響を調べるため、CaMV35S プロモーターでセロトニン合成酵素 p450 をコードする SL を発現させるコンストラクトを作製し、シロイヌナズナに導入した。その後、導入した遺伝子をホモにもつ系統を選抜した。しかし、この植物体では、免疫応答の顕著な増加は見られなかった。

#### 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 8 件)

Yamaguchi, K., Yamada, K., Ishikawa, K., Yoshimura, S., Hayashi, N., Uchihashi, K., Ishihama, N., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Tsuge, S., Ochiai, H., Tada, Y., Shimamoto, K., Yoshioka, H., and Kawasaki, T. A receptor-like cytoplasmic kinase targeted by a plant pathogen effector is directly phosphorylated by the chitin receptor and mediates rice immunity. *Cell Host Microbe*, 13:347-357 (2013). 査読有  
DOI: 10.4161/psb.25662

Yamaguchi, K., Yamada, K., and Kawasaki, T. Receptor-like cytoplasmic kinases are pivotal components in pattern recognition receptor-mediated signaling in plant immunity. *Plant Signal Behav*, 8: e25662 (2013) 査読有  
DOI: 10.1016/j.chom.2013.02.007

Yamaguchi, K., Nakamura, Y., Ishikawa, K., Yoshimura, Y., Tsuge, S., and Kawasaki, T. Suppression of rice immunity by the *Xanthomonas oryzae* type III effector Xoo2875. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77:

796-801 (2013). 査読有

川崎 努 植物における免疫誘導と病原微生物の感染戦略、ライフサイエンス領域融合レビュー, 2, e008 (2013). 査読無

DOI: 10.7875/leading.author.2.e008

川崎 努, 山口公志, 石川和也, 吉村智美, 山田健太, 吉村悠矢 病原菌エフェクターによる PAMPs 誘導抵抗性の抑制機構、日本植物病理学会報 79: 263-268. (2013). 査読無

Yamaguchi, K., Imai, K., Akamatsu, A., Mihashi, M., Hayashi, N., Shimamoto, K., and Kawasaki, T. SWAP70 functions as a Rac/Rop guanine nucleotide-exchange factor in rice. *Plant J.*, 70: 389-397 (2012). 査読有

Kawasaki, T., Yamaguchi, K., Ishikawa, K., Yoshimura, S., Yamada, K., and Yoshimura, Y. Rice PAMPs-triggered immunity targeted by pathogen effectors. *Proceeding of 47<sup>th</sup> PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium*, 47: 23-32 (2012). 査読無

DOI:10.1111/j.1365-313X.2011.04874.x

Yamaguchi, K., and Kawasaki, T. Function of Arabidopsis SWAP70 GEF in immune response. *Plant Signal. Behav.* 7: 465-468 (2012). 査読有

DOI: 10.4161/psb.19562

[学会発表](計 14 件)

川崎 努: "Suppression of pattern recognition receptor-mediated plant immunity by bacterial effector"日本細菌学会ワークショップ「植物と動物の自然免疫に関する類似と相違」2014.3.26-28 タワーホール船堀(東京)

山口公志, 山田健太, 白川友美, 船間亮汰, 石川和也, 鳴坂真理, 鳴坂義弘, 市村和也, 深溝慶, 渋谷直人, 川崎 努, AtRLCK1 regulates MAPKKKa mediated activation of MAP kinase in chitin-triggered immunity, 日本植物生理学会, 2014.3.18 - 20. 富山大学(富山)

石川和也, 山口公志, 井上健人, 吉村智美, 坂本一明, 村口由一郎, 北野詩織, 小川まどか, 津下誠治, 川崎 努, OsPUB44 positively regulates PAMPs-induced resistance in rice, 日本植物生理学会, 2014.3.18 - 20. 富山大学(富山)

山田健太, 山口公志, 山内康平, 石川和也, 野元美佳, 市村和也, 多田安臣, 深溝慶, 川崎 努, AtRLCK1 functions as a MAPKKK kinase in chitin-induced immune signaling, 日本植物生理学会, 2014.3.18 - 20. 富山大学(富山)

山田健太, 山口公志, 石川和也, 吉村悠矢, 杉下亮丞, 加星(岸)光子, 高橋章, 内橋幸平, 多田安臣, 市村和也, 川崎 努, 植物免疫における MAP キナーゼカスケードへのシグナル伝達機構の解明、近畿植物学

会、2013.12.7. 帝塚山大学（奈良）  
川崎努：“植物の病原菌認識受容体における免疫反応の誘導機構” 日本生体防御学会シンポジウム「動物・植物・微生物の生体防御と、そのマスター分子活性酸素」2013.7.9  
12.くまもと森都心プラザ（熊本）  
山口公志、新屋友規、船間亮汰、石川和也、山田健太、鳴坂真理、鳴坂義弘、多田安臣、市村和也、渋谷直人、川崎努、イネとシロイヌナズナで保存されたキチンシグナル伝達経路の解析、日本植物病理学会、2013.3.27-29.岐阜大学（岐阜）  
川崎努、山口公志、石川和也、山田健太、吉村悠矢 エフェクターによるイネ免疫信号伝達系の抑制機構、日本植物生理学会、2013.3.21-23.岡山大学（岡山）  
山口公志、石川和也、山田健太、石濱信明、濱田聡、津下誠治、島本功、吉岡博文、川崎努、OsRLCK2 は OsCERK1 に依存した MAP キナーゼの活性化を制御する、日本植物生理学会、2013.3.21-23. 岡山大学（岡山）  
川崎努、植物の免疫と病原菌の感染戦略、平成 24 年度 近畿植物学会講演会、2012.11.9 近畿大学（奈良）  
川崎努、山口公志、石川和也、吉村智美、山田健太、吉村悠、イネにおける PAMPPs 誘導抵抗性の情報伝達機構と病原菌の感染戦略、平成 24 年度植物感染生理談話会、2012.8.30-9.1. 休暇村近江八幡（滋賀）  
山口公志、山田健太、石川和也、加星（岸）光子、高橋章、林長生、市村和也、島本功、吉岡博文、川崎努、キチン認識受容体 OsCERK1 の相互作用因子 OsRLCK2 を介した MAP キナーゼ活性化機構の解明、第 30 回日本植物分子細胞学会、2012.8.3-5. 奈良先端科学技術大学院大学（奈良）  
Yamaguchi, K, Yamada, K, Ishikawa, K, Tsuge, S, Ichimura, K, Yoshioka, H, Shimamoto, K, and Kawasaki, T “OsRLCK2 targeted by Xanthomonas Xoo1488 effector regulates MAP kinase cascade activated by OsCERK1-mediated recognition of chitin in rice” XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012.7.29-8.2. 京都国際会議場（京都）  
Kawasaki, T, Yamaguchi, K, Yamada, K, Ishikawa, K, Tsuge, S, Shimamoto, K, Ichimura, K, and Yoshioka, H “OsRLCK2 targeted by Xanthomonas Xoo1488 effector regulates MAP kinase cascade activated by OsCERK1-mediated recognition of chitin in rice” The Biology of Plant, 77th symposium of Cold Spring Harbor Laboratory, 2012.5.30-6.4. Cold Spring Harbor Laboratory (New York, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

近畿大学農学部バイオサイエンス学科・植物分子遺伝学研究室

<http://kawasakirice.web.fc2.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 努 (KAWASAKI, Tsutomu)

近畿大学・農学部・バイオサイエンス学科・教授

研究者番号：90283936