

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 ( 共通 )

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 3 0 年 6 月 1 9 日現在

機関番号 : 1 2 1 0 2

研究種目 : 挑戦的萌芽研究

研究期間 : 2016 ~ 2017

課題番号 : 1 6 K 1 4 7 5 0

研究課題名 ( 和文 ) マイクロ流体デバイスを用いた植物 1 細胞サリチル酸応答解析

研究課題名 ( 英文 ) Analysis of salicylic acid response in a single plant cell using microfluidics

研究代表者

別役 重之 ( BETSUYAKU, Shigeyuki )

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号 : 8 0 5 8 8 2 2 8

交付決定額 ( 研究期間全体 ) : ( 直接経費 ) 2,900,000 円

研究成果の概要 ( 和文 ) : 植物防御応答に重要な分子サリチル酸 (SA) に対する細胞応答機構を明らかにするために、本研究では SA 応答性 PR1 プロモーターレポーターシロイヌナズナ (pPR1 植物) 由来のプロトプラストをマイクロ流体デバイス内に封入することで、多細胞体ではなく、一細胞レベルでの SA 応答解析系を立ち上げることを目指した。高感度解析や遺伝学的解析に適した新規 pPR1 植物を構築しつつ、既存の核局在型 YFP による pPR1 植物プロトプラストを用いたデバイス中での SA 応答観測系の構築を行なったが、植物体の葉では検出できる pPR1 活性による SA 応答がプロトプラスト状態では検出できないことを見出した。現在、原因を調査中である。

研究成果の概要 ( 英文 ) : To understand plant cellular response against salicylic acid (SA), a hormone required for plant immune response, we aimed to establish a system to analyze the SA response at the single cell level using microfluidic devices and the protoplast derived from Arabidopsis transgenic plants carrying YFP-NLS under the control of the SA-responsive PR1 promoter (pPR1 plants). While we established the 2nd generation pPR1 plants that should enable us to perform genetic analysis as well as highly sensitive imaging, we also conditioned microfluidics-based single cell analysis using the 1st generation pPR1 plants with YFP-NLS as a reporter. In this study, the protoplast from the 1st generation pPR1 plants did not show any YFP signal in response to SA treatment, although the leaf cells of the same pPR1 plant exhibited YFP signal clearly after SA treatment. We are currently investigating the reason of this unresponsiveness only found in protoplasts.

研究分野 : 植物病理学

キーワード : 植物免疫 レポーター植物 MEMS サリチル酸

## 1. 研究開始当初の背景

サリチル酸(SA)は植物防御応答における重要なシグナル分子であり、プログラム細胞死や防御遺伝子発現などの防御応答を誘導するとされている。このような SA 応答の分子機構を時空間的に解析するため、私はモデル植物シロイヌナズナを用いて、核局在型蛍光タンパク質 YFP によるプロモーターレポーター植物を各種構築し、防御応答変異体と組み合わせ研究を行ってきた。葉の片側に高濃度 SA を注入すると、まず非注入部位において SA 応答マーカー遺伝子 *PR-1* のレポーター(*pPR-1*)活性が観測され、その後、注入部位において *pPR-1* 活性が見られた。しかし、SA 合成酵素変異体 *sid2* 背景においては注入部位での弱い *pPR-1* 活性のみが観測された。このことは、高濃度 SA 受容細胞は周辺細胞に SA 合成を促す何らかの細胞間シグナルを生成することを示唆していると考えられた。SA シグナル系には *EDS1* や *PAD4* を介した自己シグナル増幅機構の存在が知られており、上記データは細胞間相互作用も SA 自己増幅機構に関与していることを示唆している。そのため、SA に対する細胞応答の正確な解析には、そのような細胞間相互作用を極力排除した 1 細胞レベルでの解析が必須であると考え、上記レポーター植物由来のプロトプラストを、近年その発展が目覚ましいマイクロデバイス中に封入することで、1 細胞レベルでの SA に対する細胞応答解析系を構築することを着想した。

## 2. 研究の目的

植物防御応答に重要な分子サリチル酸(SA)は細胞内/細胞間での自己シグナル増幅制御機構を持つ。このような分子に対する細胞応答機構を明らかにするには、多細胞体を用いた研究では出力が複雑になりすぎるため、1 細胞レベルでの解析が必須であると考えられる。しかし、これまでの研究においては葉組織や植物個体全体を用いた遺伝学的解析や、生理学的解析および生化学的解析がほとんどで、このような問題意識を考慮した研究はほとんど行われてなかった。

そこで、本研究では SA 応答性プロモーターレポーター植物由来のプロトプラストをマイクロデバイス内に封入し、タイムラプスイメージングと組み合わせることで、様々なパターンでの SA 刺激下で、定量的な 1 細胞レベルの細胞応答を測定する系を構築し SA シグナル系分子機構のさらなる理解を目指す。さらに、SA のみならず他の植物細胞間シグナル因子の解析への応用も視野に入れた形で技術基盤の確立を目標とする。

## 3. 研究の方法

本研究に必要な、YFP レポーターを用いたサリチル酸(SA)応答性 *PR-1* プロモーターレポーター形質転換植物は、研究開始時点において野生型において構築済みであり、また SA 合成経路および SA シグナリング経路に関わる各種変異体とも交配し、これら変異体背景においても *pPR-1* レポーターの挙動を解析することができる系を順次構築していた。また、本研究においては、研究目的に最適なマイクロデバイスを開発することが最も大きなポイントであるが、この点ではマイクロデバイス研究に詳しい連携研究者の協力を仰ぎながら、一つ一つトライアンドエラーを繰り返しつつ課題を解決して、最適化していく予定である。また、プロトプラスト細胞の調整、封入時のストレス等に関しては、ストレス応答性でもある *pPR-1* 活性挙動を見つつ対応することが可能であると考えられた。本研究で開発するマイクロデバイスを用いた植物 1 細胞解析系は植物の広範なシグナル因子解析に利用可能であり、植物科学における新技術になりうるため、簡便さや安定性も考慮した形でシステムを構築することを目指した。

## 4. 研究成果

本研究では SA 応答性プロモーターレポーター植物由来のプロトプラストをマイクロ流体デバイス内に封入し、一細胞レベルの解像度を持ったタイムラプスイメージングと組み合わせることで、様々なパターンでの SA 刺激下で、定量的な一細胞レベルの細胞応答を測定する系を構築し、SA シグナル系分子機構のさらなる理解を進めることを目指した。

まず、H28 の成果としては、すでに構築済みであった核局在型 eYFP を用いた *pPR-1* レポーター植物に関して、防御応答変異体と交配した後代でほとんどサイレンシングを受けることが明らかとなり、今後の遺伝学的な解析に支障をきたすことが想定された。これまでに構築し、主に用いていた 3 種の *pPR-1* レポーター植物ラインは、すべて遺伝学的には 1 コピー挿入体に見えるが、最大 20 コピーほど同一座位に挿入されていることが定量的 PCR により示され、これがサイレンシングの主要な原因になっていると考えられた。この *pPR-1* レポーター植物のサイレンシング問題を受けて、H29 には新たにレポーター植物を構築し直し、定量的 PCR を用いて真の 1 コピー挿入形質転換体を得ることを試みた。この際、SA 応答検出系の時間的精度を上げるため、より成熟が早く、かつ半減期が短い、より鋭敏なレポーターとなりうる核局在型 Venus や mStrawberry を用いたレポーター植物を再度作製し直し、定量的 PCR を用いて真

の1コピー挿入形質転換を選抜している。また、SAはジャスモン酸(JA)との強い相互作用があるため、*pPR-1*レポーターとJAマーカー遺伝子である *VSP1* を用いたプロモーターレポーターを異なる色の蛍光タンパク質で構築し、一つの植物中で同時にSAとJAの応答を検出できる二重レポーター植物も構築した。また、H29に異動した筑波大学の所属研究室において、共焦点顕微鏡をベースにして、一細胞レベルで核局在型eYFPの輝度変化を経時的に計測できるタイムラプスイメージング系を構築することができた。これにより、病原菌接種をした植物葉中の各細胞でSA依存型防御応答(*pPR-1*レポーター活性)の時空間的変動を追うことができるようになり、デバイス中に固定したプロトプラストに関しても問題なく経時的な蛍光タンパク質シグナルの変動を追うことができるものと考えられた。

デバイスに関しては、まずはチャンバー型デバイスを用いてeYFPによる*pPR-1*レポーター植物由来のプロトプラストをチャンバー中にトラップし、SA応答の観測を試みた。しかし、植物個体としてはSA処理によってeYFPシグナルが検出できるにも関わらず、プロトプラスト状態ではSA処理後にeYFPが検出できないという問題が生じた。プロトプラスト化の条件検討(酵素液組成や処理および洗浄条件、利用する植物葉のステージなど)を検討したが、プロトプラスト中で通常用いられる濃度範囲のSA処理でeYFP活性は検出されなかった。同様のSA濃度処理した植物体では*pPR-1*活性を示すeYFPシグナルが検出できることから、この現象はプロトプラスト化に伴う事象であることが強く示唆された。現在、その原因を調査・検証しているところであるが、SA処理は植物細胞のレドックス状態を変動させるという報告もあり、そのような間接的な影響でeYFPの蛍光発色に影響している可能性もある。SA処理したプロトプラスト集団から採取したRNAを用いての発現解析や、現在作成している核局在型VenusやmStrawberryを用いた第二世代のレポーター植物由来のプロトプラストを用いるなどして、本課題に関して検証して行くことを考えている。また蛍光タンパクではなく、プロトプラストでのプロモーター活性解析によく用いられているルシフェラーゼやGUSなどの検出系を用いて検証することも想定している。以上のように、本研究においては想定外のプロトプラスト化した*pPR-1::eYFP*レポーターが、SAの添加に対してeYFP活性を示さないという問題が生じたが、今後、本課題を上記のような方法で解決することで、本研究の目的である1細胞ホルモン応答検出系を構築したい。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

1. 別役重之・別役恵理子・石賀貴子・石賀康博・野村暢彦「イメージングによるシロイヌナズナ免疫システムの理解に向けて」平成30年度日本植物病理学会大会 2018年
2. Betsuyaku, S., Betsuyaku, E., Ishiga, T., Ishiga, Y., Nomura, N「Towards imaging-based understanding of immune responses in Arabidopsis」第59回日本植物生理学会年会 2018年

〔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

研究室

<http://www.envr.tsukuba.ac.jp/~microbio/>

<http://www2.envr.tsukuba.ac.jp/jpn/faculty-research/fr-view?id=103>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

別役 重之 (BETSUYAKU, Shigeyuki)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号：80588228

### (3)連携研究者

瀧ノ上 正浩 (TAKINOUE, Masahiro)  
東京工業大学・大学院総合理工学研究科・准教授  
研究者番号：20511249

神谷 厚輝 (KAMIYA, Koki)  
神奈川科学技術アカデミー・人工細胞膜システムグループ・研究員  
研究者番号：70612315

田端 和仁 (TABATA, Kazuhito)

東京大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：50403001