

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 25 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770044

研究課題名（和文）病原体レセプター抵抗性タンパク質による植物免疫の誘導機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms of plant innate immunity by R protein

研究代表者

河野 洋治 (KAWANO YOJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：00406175

研究成果の概要（和文）：抵抗性タンパク質 Pit は、病原体の侵入を感知する細胞内レセプターである。Pit が OsRac1 を活性化しうる GDP/GTP exchange factor (GEF) ドメインを有する OsSPIKE1 を介して、OsRac1 を活性化することを見出した。この、OsSPIKE1 による OsRac1 の活性化が、Pit を介した耐病性に重要であることを明らかにした。Pit の脂質修飾であるパルミトイル化が、Pit の細胞膜局在と耐病性誘導に重要であることを明らかにした。さらに、プロテオミクス解析により、新規の Pit の相互作用分子を多数同定した。

研究成果の概要（英文）：R protein Pit acts as an intracellular receptors for sensing the blast fungus. In this project, we found that Pit activates small GTPase OsRac1 through a GDP/GTP exchange factor OsSPIKE1. Pit-dependent OsRac1 activation via OsSPIKE1 plays important role in Pit-mediated disease resistance. Palmitoylation of Pit plays a critical role in activation of small GTPase OsRac1 on the plasma membrane. In addition, we identified the novel interactors of Pit.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：イネ、抵抗性タンパク質、OsRac1

## 1. 研究開始当初の背景

多くの抵抗性タンパク質は、病原体の侵入を感知する細胞内レセプターとして働き、過敏反応を伴う非常に強い免疫応答を誘導する。過敏反応では、酸化バースト、防御関連遺伝子の発現、抗菌性物質の蓄積などが急速に誘導される。また、感染部位で局所的な細胞死が誘導され、病原体を感染部位に閉じ込め、その拡散と増殖を抑制する。さらに、感染部位以外にも全身獲得

性抵抗性と呼ばれる防御反応を誘導して、二次感染に備える。このように、抵抗性タンパク質は、植物の自然免疫を制御する重要な細胞内レセプターである。現在までに、抵抗性タンパク質のシグナル伝達に関与する分子として、シャペロンタンパク質である RAR1, HSP90, SGT1 などが報告されている。これらの分子は、抵抗性タンパク質の安定性の制御が主な機能と考えられており、抵抗性タンパク質による免疫反応の誘導機構

を説明できない。植物の抵抗性タンパク質が同定されて 15 年以上が経過するにも関わらず、抵抗性タンパク質がどのようなシグナル分子を介して植物免疫を誘導するかは不明であった。

## 2. 研究の目的

抵抗性タンパク質は、病原体の侵入を感知する細胞内レセプターとして働き、植物の自然免疫において極めて重要な分子である。しかしながら、抵抗性タンパク質がどのようなシグナル分子を介して植物の免疫を誘導するかは不明であった。最近、申請者は、イネのいもち病菌の抵抗性タンパク質である Pit が G タンパク質 OsRac 1 に直接結合し、OsRac 1 の活性化を介して植物の免疫を制御することを見出した。本研究では、抵抗性タンパク質から OsRac1 に至る全シグナル伝達経路の解明及びその活性化機構の解明を試みる。さらに、抵抗性タンパク質による細胞死の誘導機構の解明も試みる。得られた成果は、動植物の自然免疫やシグナル伝達の研究に貢献するのみならず、耐病性育種などの応用研究にも貢献する可能性が高い。

## 3. 研究の方法

本研究では、病原体レセプターである抵抗性タンパク質による植物免疫の制御機構を以下の点に着目して解析を行う。

課題 1) 抵抗性タンパク質の新規下流シグナル分子の同定：アフィニティーカラム、免疫沈降法や酵母ツーハイブリッド法を用いて、抵抗性タンパク質の新規下流シグナル分子の同定を試みる。実際に同定した分子が抵抗性タンパク質のシグナル伝達に関与するか、いもち病菌の感染実験を過剰発現体や RNAi 植物体などに行い検討する。定量的な解析により、同定した分子がどの程度、抵抗性タンパク質による免疫に貢献するか算出し、評価する。

課題 2) 抵抗性タンパク質の細胞内輸送機構の解明：抵抗性タンパク質 Pit の局在変化をバイオイメージング技術を用いて解析する。

## 4. 研究成果

(i) 抵抗性タンパク質の細胞膜への局在化機構の解明

抵抗性タンパク質は、病原体を認識する細胞内レセプターとして働くことが知られている。現在、抵抗性タンパク質の細胞内局在の

分子メカニズムや耐病性反応と局在との関連に関してはほとんど明らかになっていない。我々は、抵抗性タンパク質 Pit の細胞内局在の分子メカニズムを明らかにする目的で、Pit 上に存在する細胞膜の局在化に関与するシグナル配列を探索し、パルミトイル化修飾のコンセンサス配列を発見した。抵抗性タンパク質 Pit の野生型は細胞膜上に局在するが、パルミトイル化コンセンサス配列の変異体は、細胞膜への局在の効率が減少しており、パルミトイル化が Pit の細胞膜局在に重要であることが明らかになった(図1)。これまでに、恒常的活性型の Pit は、細胞死や活性酸素の産生を誘導することを明らかにしている。この恒常的活性化型にパルミトイル化コンセンサス配列の変異を入れた二重変異体は、細胞死や活性酸素の産生が減少していた。さらに、パルミトイル化変異体は、OsRac1 に対する相互作用が減少していることも見出した。以上の結果から、パルミトイル化を介して Pit が細胞膜にアンカーすることが、OsRac1 を介した免疫誘導に重要であることが示唆された。

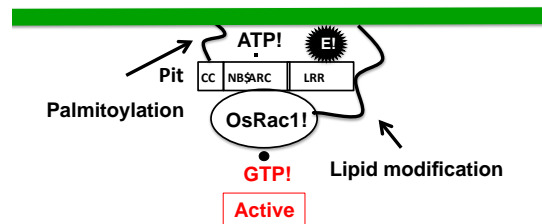


図1: 抵抗性タンパク質の細胞膜への局在化機構の解明

(ii) 抵抗性タンパク質 Pit による免疫スイッチ OsRac1 の活性化機構の解明

抵抗性タンパク質は、病原体を認識する細胞内レセプターとして働くことが知られている。現在、抵抗性タンパク質の活性化機構やシグナル伝達機構に関しては、ほとんど明らかになっていない。我々はこれまでに、いもち病菌に対する抵抗性タンパク質である Pit が植物免疫のスイッチタンパク質である低分子量 G タンパク質 OsRac1 を活性化し、いもち病菌に対する抵抗性に関与することを明らかにしている。しかしながら、どのような分子メカニズムで、Pit が OsRac1 を活性化するかは不明であった。本研究で、Pit の相互作用タンパク質として、OsRac1 を活性化しうる GDP/GTP exchange factor (GEF) ドメインを有する OsSPIKE を同定した。酵母ツーハイブリッドを用いた解析から、OsSPIKE1 と OsRac1 が結合することが明らかになった。

さらに、*OsSPIKE1* RNAi イネでは、Pit によって誘導される抵抗性が抑制されていることを見出した。以上の結果から、Pit は *OsSPIKE1* を介して *OsRac1* を活性化し、抵抗性を誘導している可能性が考えられた(図 2)。

(iii) 抵抗性タンパク質のシグナル伝達に関

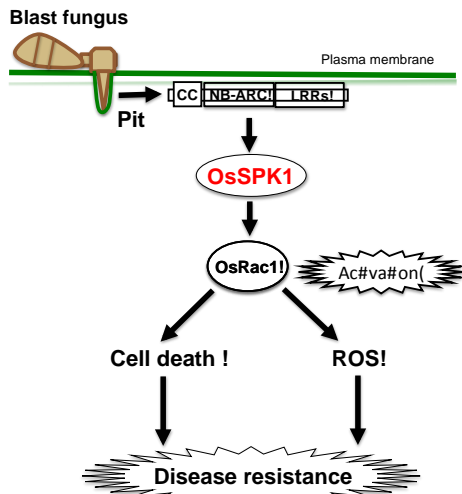


図2: 抵抗性タンパク質Pitによる免疫スイッチOsRac1の活性化機構の解明

る新規タンパク質の同定

*OsRac1*の上流に位置する免疫レセプターである抵抗性タンパク質PitとPia (RGA4とRGA5)、さらに、Piaのいもち病菌由来のリガンドであるPex22の形質転換体を用いた免疫沈降を行い、質量分析器によりこれらの相互作用分子の同定を試みた。活性化型のPit変異体であるPit D485Vの相互作用分子として、Pitのすぐ隣に座乗するNB-LRR型の抵抗性タンパク質であるNBSt1、Hsp70、*OsRac1*の不活性化タンパク質であるRhoGAP、*OsRac1*などを同定した。Pia (RGA4とRGA5)の相互作用分子として、Hsp90、Hsp70や足場タンパク質で細胞死などにも関与する14-3-3、解糖系のタンパク質でNOシグナルの下流で耐病性にも関与することが示唆されているGAPCなどを同定した。PiaのリガンドであるPiaもHsp90、Hsp70、14-3-3やGAPCと相互作用することを見出した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Akamatsu A, Wong H, Fujiwara M, Okuda J, Nishide K, Uno K, Imai K, Umemura K, Kawasaki T, Kawano Y, Shimamoto, K. An

*OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1* module is an essential component of chitin-induced rice immunity. *Cell Host Microbe* 13(4):465-76 (2013), 査読有 doi: 10.1016/j.chom.2013.03.007.

- ② Kim SH, Oikawa T, Kyojuka J, Wong HL, Umemura K, Kishi-Kaboshi M, Takahashi A, Kawano Y, Kawasaki T, Shimamoto K. The bHLH Rac Immunity1 (RAI1) Is Activated by *OsRac1* via *OsMAPK3* and *OsMAPK6* in Rice Immunity. *Plant Cell Physiol.* 53:740-54. (2012), 査読有 doi: 10.1093/pcp/pcs033

- ③ Wamaitha MJ, Yamamoto R, Wong HL, Kawasaki T, Kawano Y, Shimamoto K. *OsRap2.6* transcription factor contributes to rice innate immunity through its interaction with Receptor for Activated Kinase-C 1 (RACK1). *Rice* 5:35 (2012), 査読有 <http://link.springer.com/article/10.1186%2F1939-8433-5-35>

- ④ Kaneko-Kawano T, Takasu F, Naoki H, Sakumura Y, Ishii S, Ueba T, Eiyama A, Okada A, Kawano Y, Suzuki K. Dynamic regulation of myosin light chain phosphorylation by Rho-kinase. *PLoS One.* 7:e39269. (2012), 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0039269

- ⑤ Horii Y, Nogami S, Kawano Y, Kaneko-Kawano T, Ohtomo N, Tomiya T, Shirataki H. Interaction of  $\alpha$ -taxilin localized on intracellular components with the microtubule cytoskeleton. *Cell Struct Funct.* 37:111-26. (2012), 査読有 [https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/37/2/37\\_12002/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/37/2/37_12002/_article)

[学会発表] (計8件)

- ① Yoji Kawano and Ko Shimamoto Elucidation of mechanisms of small GTPase *OsRac1* activation by R protein Pit through *OsSPIKE1* 第54回日本植物生理学会年会 2013.3.22 岡山

- ② 河野 洋治、林 敬子、赤松 明、宝泉 雄介、奥田 淳、中島 綾子、高橋 弘喜、吉田 均、Hann Ling WONG、川崎 努、島本 功 細胞膜上でのNLRファミリー免

疫受容体PitによるRhoファミリーGタンパク質OsRac1の活性化がイネ免疫に重要である 第35回 日本分子生物学会年会 2012.12.14 福岡

③Yoji Kawano, Ai Yao, Yusuke Housen, and Ko Shimamoto (2012) Palmitoylation plays an important role in the localization and the immune responses of NB-LRR-type R protein Pit IPMB2012 2012.10.21 済州島

④Yoji Kawano, Ai Yao, Yusuke Housen, and Ko Shimamoto Palmitoylation plays an important role in the localization and the immune responses of NB-LRR-type R protein Pit IS-MPMI2012 2012.7.29 京都

⑤河野 洋治、八尾 藍、宝泉 雄介、島本 功 NB-LRR型Rタンパク質Pitのアルミトイル化が細胞膜局在と免疫誘導に重要である 平成24年度 日本植物病理学会; 2012.3.28 福岡

⑥Yoji Kawano, Ai Yao, Yusuke Housen, and Ko Shimamoto Palmitoylation plays an important role in the localization and the immune responses of NB-LRR-type R protein Pit 第53回日本植物生理学会年会 2012.3.16 京都

⑦Yoji Kawano, Akira Akamatsu, Satoshi Hamada and Ko Shimamoto Defensome network in rice immunity Defensome network in rice immunity ICBP2011年 11.18 中国 昆明

⑧河野 洋治、島本功、細胞膜上での免疫受容体PitによるGタンパク質OsRac1の活性化がイネの免疫に重要である 第75回 日本植物学会 2011.9.20 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 洋治 (KAWANO YOJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：00406175