

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 26 年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 基盤研究(C) 4. 補助事業期間 平成 26 年度～平成 28 年度

5. 課題番号

2	6	4	5	0	0	5	5
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 抵抗性タンパク質の活性化機構と立体構造の解明

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
0 0 4 0 6 1 7 5	カワノ ヨウジ 河野 洋治	バイオサイエンス研究科	客員准教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

多くの抵抗性遺伝子は、nucleotide binding site-leucine rich repeat (NB-LRR)型のタンパク質をコードしており、細胞内型レセプターであることが明らかになった。動物のNB-LRR型タンパク質も免疫に関与する細胞内レセプターとして働くことが知られている。動物のNB-LRR型タンパク質Apaf-1では、活性化は各ドメインの分子内結合、リガンド認識後のNBドメインに結合したヌクレオチドの交換反応、分子間結合の3つの要素によって決定される。しかしながら、植物のNB-LRR型の抵抗性タンパク質の活性化と、各ドメインの分子内/間結合やNBドメインのヌクレオチドの状態との関連はほとんど解析されていない。さらに、全長の抵抗性タンパク質の立体構造解析の報告は1つもない。抵抗性タンパク質は、植物において最強の免疫応答を誘導する重要な細胞内免疫レセプターであるにも関わらず、全長の抵抗性タンパク質を精製することが困難なことから、シグナル伝達機構や活性化機構はほとんど明らかになっていない。申請者は、イネいもち病菌の抵抗性タンパク質Pitのリガンド AvrPitと下流のシグナル分子 OsSpike1を同定している。本研究では、抵抗性タンパク質 Pitの精製系を確立し、生化学解析と立体構造解析を駆使して、Pitの活性化機構を明らかにする。さらに、得られた知見を利用して、Pitのリガンド AvrPit認識後の活性化から、下流分子OsSpike1活性化に至るメカニズムの全過程を明らかにすることを目的とする。

10. キーワード

(1) イネ	(2) 進化	(3) 遺伝子	(4) 耐病性
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

本年度は、抵抗性タンパク質Pit-1とその相互作用分子Pit-2の解析を通し、Pit-1、Pit-2による免疫制御機構を理解することを試みた。本研究で、生化学的な解析とYeast-two-Hybrid解析から、Pit-1がホモダイマーを形成すること、Pit-1とPit-2がヘテロダイマーを形成することを確認した。また、イネプロトプラストでの蛍光タンパク質で標識したPit-2の一過的発現、Agroinfiltration法を用いた*N. benthamiana*での一過的発現Immunoblottingにより、Pit-2はPit-1と比較して細胞内での安定性が低い可能性が示唆された。更に、Pit-1はPit-2と共発現させることで検出されるタンパク質が増加し、Pit-2がPit-1の安定性に寄与することが示唆された。また、Pit-1によって誘導される細胞死における各種Pit-2変異体の効果を検討したところ、スイッチドメインと考えられているNB-ARCドメインのMHDモチーフに変異を加えたPit-2変異体が、特異的に活性型Pit-1による細胞死誘導を抑制することを見出した。以上の結果から、Pit-1とPit-2は細胞内でヘテロダイマーを形成し、互いにタンパク質の安定性や活性を調節してペア抵抗性タンパク質として働く可能性があると推測された。

以上のように新規の見解が得られており、おおむね順調に進展している。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

本研究では、生化学解析と立体構造解析を駆使して、現在まで不明である抵抗性タンパク質 Pitのリガンド認識後の活性化から、下流分子OsSpike1活性化までの全過程を明らかにすることを目的とする。具体的には、抵抗性タンパク質Pitの全長タンパク質の精製系を立ち上げて[研究計画 1]、Pitの不活性化型と活性化型のヌクレオチドの状態[研究計画 2]、分子内結合と分子間相互作用を明らかにする[研究計画 3]、次に、抵抗性タンパク質がリガンドを認識した際に、不活性化状態から活性化状態にどのように遷移するかを明らかにする[研究計画 4]。立体構造解析では、1) 抵抗性タンパク質Pitの立体構造、2) Pitのリガンドである AvrPitとPitの複合体の立体構造、3) OsRac1の活性化分子でありPitの下流のシグナル分子でもある OsSpike1と Pitの複合体の立体構造の順に明らかにする[研究計画 5]。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

(使用計画)

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(6)件 うち査読付論文 計(6)件

著者名		論文標題			
Liu, L., Park, CH., He, F., Nagano, M., Wang, M., Bellizzi, M., Zeng, X., Liu, W., Ning, Y., Kawano, Y., and Wang, GL.		The RhoGAP SPIN6 Associates with SPL11 and OsRac1 and Negatively Regulates Programmed Cell Death and Innate Immunity in Rice.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
PLoS Pathog.	有	11	2015	e1004629.	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1371/journal.ppat.1004629					

著者名		論文標題			
Kawano Y, Kaneko-Kawano T, Shimamoto K.		Rho family GTPase-dependent immunity in plants and animals.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Front Plant Sci.	有	5	2014	522	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.3389/fpls.2014.00522					

著者名		論文標題			
Kosami K, Ohki I, Nagano M, Furuita K, Sugiki T, Kawano Y, Kawasaki T, Fujiwara T, Nakagawa A, Shimamoto K, Kojima C.		The crystal structure of the plant small GTPase OsRac1 reveals its mode of binding to NADPH oxidase.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
J Biol Chem.	有	289	2014	28569-78	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1074/jbc.M114.603282					

著者名		論文標題			
Cesari S, Kanzaki H, Fujiwara T, Bernoux M, Chalvon V, Kawano Y, Shimamoto K, Dodds P, Terauchi R, Kroj T.		The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
EMBO J.	有	33	2 0 1 4	1941-59	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.15252/embj.201487923					

著者名		論文標題			
Kawano Y, Fujiwara T, Yao A, Housen Y, Hayashi K, Shimamoto K.		Palmitoylation-dependent membrane localization of the rice resistance protein pit is critical for the activation of the small GTPase OsRac1.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
J Biol Chem.	有	289	2 0 1 4	19079-88	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1074/jbc.M114.569756					

著者名		論文標題			
Sakane H, Horii Y, Nogami S, Kawano Y, Kaneko-Kawano T, Shirataki H.		- Taxilin interacts with sorting nexin 4 and participates in the recycling pathway of transferrin receptor.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
PLoS One.	有	9	2 0 1 4	e93509	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1371/journal.pone.0093509					

〔学会発表〕計(1)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
河野洋治、島本功		抵抗性タンパク質Pitは、OsSPIKE1を介した低分子量Gタンパク質OsRac1活性化により耐病性を制御する	
学会等名		発表年月日	発表場所
第56回日本植物生理学会年会		2015年03月16日～2015年03月16日	東京農業大学(東京都、世田谷区)

〔図書〕計(0)件

著者名		出版社	
書名		発行年	総ページ数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15.備考

PSC
http://www.psc.ac.cn/research_personal.asp?id=144&Yoji%20Kawano
Kawano lab
<http://sti-lab.org>