

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 27 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)（一般） 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	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
0 0 3 5 5 5 0 4	ヤスタ ノブコ 安田 伸子	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 ・その他部局等	研究員
0 0 3 7 8 0 1 9	カワノ タカコ 河野 貴子（金児貴子）	立命館大学・薬学部	准教授

## 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つも無い。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。申請者らは、イネ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) 抵抗性タンパク質	(2) イネ	(3) 耐病性	(4)
(5)	(6)	(7)	(8)

## 11. 現在までの進捗状況

(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。免疫沈降実験から、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。この結果から、植物細胞内でPit-1とPit-2はヘテロダイマーを形成し、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。Pit-1とPit-2は異なる機能を持っており、Pit-1は免疫を誘導するが、Pit-2はPit-1の免疫を抑制する。Pit-1とPit-2の高い相同性を利用して、Pit-1とPit-2の機能の違いを生むアミノ酸残基の同定をドメインスワッピングを用いて試みた。その結果、スイッチドメインであると考えられているNB-ARCドメインのL301がPit-1による細胞死誘導に重要であることを同定した。以上のように新規の知見が得られており、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)

平成27年度の消耗品の使用が計画より少なかった為、残額が出てきた。

(使用計画)

平成27年度分を平成28年度に使用予定である。

(課題番号： 26450055 )

(注) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

## 13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(3)件/うち査読付論文 計(2)件/うち国際共著 計(3)件/うちオープンアクセス 計(0)件

著者名		論文標題				
Akamatsu, A., Uno, K., Kato, M., Wong, HL., Shimamoto, K., and Kawano, Y.		New insights into the dimerization of small GTPase Rac/ROP guanine nucleotide exchange factors in rice.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Plant Signal Behav	有	10	2   0   1   5	e1044702	該当する	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
26251883						
オープンアクセス						
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難						

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	国際共著	
PLoS Pathog	有	11	2   0   1   5	e1004629	該当する	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
25658451						
オープンアクセス						
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難						

著者名		論文標題 【掲載確定】				
Akamatsu, A., Shimamoto, K., and Kawano, Y.		Crosstalk of Signaling Mechanisms Involved in Host Defense and Symbiosis against Microorganisms in Rice				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Curr Genomic	無	掲載予定	2   0   1   6	in press	該当する	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
なし						
オープンアクセス						
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難						

(課題番号: 26450055)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(3/6)

(学会発表) 計(4)件/うち招待講演 計(1)件/うち国際学会 計(2)件

発表者名	発表標題	
Yoji Kawano	Small GTPase OsRac1 is a key regulator in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity	
学会等名	発表年月日	発表場所
3rd Beijing International Symposium on Molecular Plant Pathology(招待講演)(国際学会)(招待講演)(国際学会)	2015年07月28日 ~ 2015年07月30日	北京 (中国)

発表者名	発表標題	
Yoji Kawano	Elucidation of mechanisms of small GTPase OsRac1 activation by R protein Pit-1 through OsSPK1	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 4th International Conference on Biotic Plant Interactions (国際学会)(国際学会)	2015年07月31日 ~ 2015年08月02日	南京 (中国)

発表者名	発表標題	
Yoji Kawano	Elucidation of mechanisms of small GTPase OsRac1 activation by R protein Pit-1 through OsSPK1	
学会等名	発表年月日	発表場所
第57回日本植物生理学会年会	2016年03月18日 ~ 2016年03月20日	岩手大学 (岩手県盛岡)

発表者名	発表標題	
Yoji Kawano	Elucidation of mechanisms of small GTPase OsRac1 activation by R protein Pit-1 through OsSPK1	
学会等名	発表年月日	発表場所
平成28年度日本植物病理学会大会	2016年03月21日 ~ 2016年03月23日	岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

(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. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

## 16.本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1)国際共同研究：国際共同研究である

共同研究相手国	相手方研究機関			
アメリカ	Ohio State University	-	-	-
中国	Institute of Plant Protection	Hunan Agricultural University	Shanghai Center for Plant Stress Biology	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	/	/	/	/

## 17.備考