

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07668

研究課題名(和文) クライオ電子顕微鏡を用いた抵抗性タンパク質の活性化機構と立体構造の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the activation mechanism and structure of resistance proteins using cryo-electron microscopy

研究代表者

河野 洋治 (Kawano, Yoji)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：00406175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抵抗性タンパク質は、植物免疫の重要な細胞内受容体である。申請者は、いもち病菌の免疫受容体である抵抗性タンパク質Pitがイネの免疫マスターレギュレーターである低分子量Gタンパク質OsRac1を介して、いもち病菌への防御応答を誘導することを明らかにしている。本研究で、PitがOsSPK1と呼ばれるGタンパク質の活性化タンパク質を介して、OsRac1を活性化することにより耐病性を誘導することを見出した。また、PitのCCドメインに細胞内局在と機能に大切な3アミノ酸を同定した。これらの発見により、植物の中で最も強い免疫応答を引き起こす抵抗性タンパク質の活性化機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究課題は、植物病理の分野で最も困難で重要な問題の一つである、抵抗性タンパク質の活性化機構の解明に正面から取り組んでいる。抵抗性タンパク質を介した免疫機構は、イネを含む穀物だけでなく、果樹、野菜、花卉でも抵抗力を高めている。申請者らの研究成果を利用することにより、「病気に強い様々な植物」を開発することが可能となり、食糧生産の安定化やバイオ燃料向けの農作物の生産向上にも役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Resistance proteins are important intracellular receptors for plant immunity. The applicant has previously shown that the resistance protein Pit, an immune receptor for blast fungus, induces a defense response to the fungus through small GTPase OsRac1, a master regulator of rice. In this study, we found that Resistance protein Pit induces disease resistance to rice blast fungus by activating OsRac1 through a G-protein activator protein called OsSPK1. In addition, they identified three amino acids in the CC domain of Pit that are important for subcellular localization and function. These discoveries reveal the activation mechanism of resistance proteins that induce the strongest immune response in plants.

研究分野：植物免疫

キーワード：植物免疫 抵抗性タンパク質 イネ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、イネ低分子量Gタンパク質 OsRac1 が活性酸素の産生や過敏感細胞死を誘導し、耐病性に制御することを明らかにしている (Kawano et al., Front. Plant Sci 2014, Kawano et al., COPB 2013, Kawano et al., Rice, 2010, Nagono et al., Plant Cell 2016)。OsRac1 は、植物免疫を司るマスター分子の1つであり、申請者らは OsRac1 を中心とした免疫ネットワーク Defensome の解析を行っている。申請者らは、OsRac1 が、イネの最重要病害であるいもち病菌に対する NLR 型抵抗性タンパク質 Pit の下流で働く分子スイッチであることを見出した。(Kawano et al., JBC 2014, Kawano et al., Cell Host Microbe, 2010)。Pit の相互作用タンパク質の同定を試み、OsRac1 を活性化する GDP/GTP exchange factor (GEF) タンパク質である OsSpike1 を同定した。Pit が OsSpike1 を介して OsRac1 を活性化することにより、耐病性を誘導することを明らかにしている。さらに、申請者らは、Pit のリガンドである AvrPit 候補タンパク質をすでに同定しており、AvrPit-Pit-OsSpike1-OsRac1 というシグナル伝達経路を確立しつつある。また、Pit の組換えタンパク質を用いた解析では、Pit が Coiled-coil (CC) ドメインを介してダイマー化することや、*in vitro* で ATP 結合能があることを見出している。更に、スモールスケールであるが、動物培養細胞を用いて全長の抵抗性タンパク質 Pit の精製に成功している (Kawano et al., Cell Host Microbe, 2010)。この全長の Pit 組換えタンパク質やこれまでに明らかにしたシグナル伝達経路を基盤とすることによって、これまで困難であった、抵抗性タンパク質のリガンド認識後の活性化から、下流分子の活性化までに至る全過程を明らかにすることが可能になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、理想の構造解析法であるクライオ電子顕微鏡と生化学解析を駆使して、現在まで不明である抵抗性タンパク質 Pit のリガンド認識から、下流分子の活性化に至るプロセスを明らかにすることを目的とする。以下のように実験を進めた。前述したように、全長の抵抗性タンパク質の精製が困難な為、生化学的な解析が不可能であった。これまで確立している動物培養細胞を用いた方法だけでなく、新たに昆虫細胞を用いた精製法を試して、全長の Pit タンパク質の精製系を確立する。得られたタンパク質を用いて、抵抗性タンパク質の活性の調節に重要であると考えられているヌクレオチド結合、分子内結合、分子間結合の解析を行い、抵抗性タンパク質 Pit の不活性化と活性化の状態を明らかにする。次に、クライオ電子顕微鏡を用いて、Pit の不活性化と活性化の状態の立体構造を明らかにする。その後、Pit のリガンドである AvrPit と Pit 複合体、そして、OsRac1 の活性化タンパク質であり 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を明らかにする。以上の解析により、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の活性化に至る全過程が明らかになる。

3. 研究の方法

In vitro の結合アッセイ、酵母-2 ハイブリッドアッセイ、ベンサミアナタバコを使った免疫沈降アッセイ、イネの植物体といもち病菌を使った感染実験などを行った。

4. 研究成果

【成果 1】 抵抗性タンパク質 Pit が GEF OsSPK1 と相互作用して OsRac1 を活性化し、イネの耐病性を高める (Wang et al., PNAS 2018)

Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat (NLR) ファミリーの抵抗性タンパク質は、植物や動物の細胞内で重要な免疫受容体として機能している。最初の抵抗性遺伝子が同定されてから約四半世紀が経過したが (Bent et al., Science 1994)、抵抗性タンパク質の直接の下流シグナル分子が不明なため、R タンパク質の活性化の分子メカニズムはほとんどわかっていない。Jones、Vance、Dangl は、Science 誌に掲載されたレビューの中で、「植物の NLR 活性化の下流のイベントと、防御遺伝子の転写、細胞透過性の変化、局所的な細胞死、全身的なシグナル伝達機構は、依然として不透明である」と記している (Jones et al., Science 2016)。NLR ファミリーの抵抗性タンパク質がどのように植物の防御を制御しているのかをより深く理解するためには、この問題を解決する必要がある。

本研究では、R タンパク質 Pit の直接的なシグナル分子を特定した。申請者らはこれまでに、イネの低分子量 G タンパク質 OsRac1 がスイッチタンパク質として Pit の下流で働き、抵抗性タンパク質の典型的な免疫反応である活性酸素の産生と局所的な細胞死を誘発することを明らかにしている (Kawano et al., Cell Host Microbe 2010; Kawano et al., J Biol Chem, 2014)。本研究で、GDP/GTP 交換因子タンパク質である OsSPK1 が Pit の直接の下流標的であることを明らかにした (図 1)。OsSPK1 は、OsRac1 の活性化タンパク質として機能しており、Pit-OsSPK1-OsRac1 モジュールは、Pit を介した免疫に重要な役割を果たしていると考えられる。申請者らの知る限り、本研究は、R タンパク質が直接の結合相手を通して活性酸素の生成や局所的な細胞死を引き起こす仕組みを初めて説明したものである。したがって、本研究は、植物の免疫の分子機構を理解する上で重要な知見を提供するものと考えている。さらに申請者らは、もう一つの R タンパク質である RGA4 もまた、OsSPK1 と相互作用することを酵母-2 ハイブリッドアッセイで発見した。この結果は、OsRac1 の RNAi またはドミナントネガティブ型の OsRac1 を過剰発現させると、RGA4 が介在するいもち病菌への抵抗性が損なわれるというこれまでの報告と一致する (Chen et al., Plant Cell Physiol, 2010; Ono et al., PNAS, 2001)。これらの結果を総合すると、Pit-OsSPK1-OsRac1 モジュールは、植物の抵抗性タンパク質を介した免疫に共通する重要な仕組みの一つである。今回の結果は、抵抗性タンパク質がダウンストリームシグナル分子を活性化して植物の免疫を誘導する仕組みに光を当てたものである。

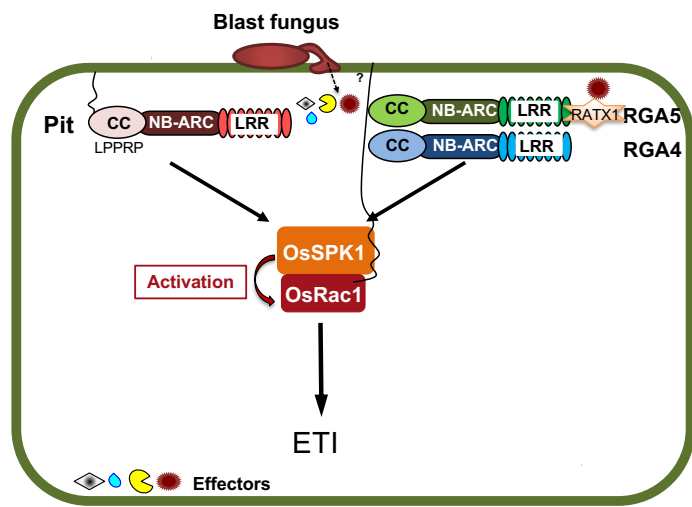


図1

【成果 2】 Pit の CC ドメインにある 3 つの保存された疎水性残基が、Pit の細胞膜局在化と免疫誘導に貢献している

NLR タンパク質は、植物病原体に対する重要な細胞内免疫受容体として働いている。NLR の N 末端にある CC ドメインと TIR ドメインは、免疫反応を誘導するための重要なプラットフォームとして機能している。NLR の CC ドメインと TIR ドメインは、オリゴマー化、下流のシグナル分子との結合、分子内相互作用、局在化など、多面的な機能を有している。したがって、NLR の CC および TIR ドメインの作用機序をより深く理解することは、NLR がどのようにして植物の免疫を引き起こすのかを理解するのに役立つ。

申請者らはこれまでに、Pit と名付けられたイネの CC 型 NLR タンパク質が、細胞膜でグアニンヌクレオチド交換因子 OsSPK1 を介して低分子 GTPase OsRac1 を活性化し、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* に対する病害抵抗性をもたらすことを明らかにしてきた (Wang et al., PNAS 2018 ; Kawano et al., JBC 2014 ; Kawano et al., Cell Host Microbe 2010)。本研究では、既知の NLR タンパク質の間で高度に保存されている Pit の CC ドメインの 3 つの疎水性残基に着目した。オオムギ MLA10 やシロイヌナズナ RPM1 の CC 型 NLR のこれらの保存残基は、ホモ二量化や病原菌に対する病害抵抗性に関与していることが報告されている (Kasmi et al. PNAS 2017; Maekawa et al. Cell Host Microbe 2013)。興味深いことに、Pit におけるこれら 3 つの残基の機能は、MLA10 や RPM1 の機能とは大きく異なることが明らかになった。Pit の 3 つの疎水性残基に変異を導入すると、オリゴマー化には影響しないが、Pit が媒介するイネいもち病菌への抵抗性が失われた。さらに、これらの疎水性残基が Pit の細胞膜局在化に関与していることを発見し、Pit の新しい機能を明らかにした。この結果は、シロイヌナズナの CC 型 NLR である ZAR1 をテンプレートとして、Pit の構造をホモロジーモデリングすることで実証された。今回の発見は、NLR の活性化のメカニズムや、細胞内での局在と機能の関係を理解する上で、新たな視点を提供するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Wang Pingyu, Jia Huimin, Guo Ting, Zhang Yuanyuan, Li Zhengguo, Kawano Yoji	4. 巻 0
2. 論文標題 The secreted peptide IRP functions as a DAMP in rice immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.01.31.429004	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Wang Pingyu, Yao Shaolun, Kosami Ken ichi, Guo Ting, Li Jing, Zhang Yuanyuan, Fukao Yoichiro, Kaneko Kawano Takako, Zhang Heng, She Yi Min, Wang Pengcheng, Xing Weiman, Hanada Kousuke, Liu Renyi, Kawano Yoji	4. 巻 18
2. 論文標題 Identification of endogenous small peptides involved in rice immunity through transcriptomics and proteomics based screening	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 415 ~ 428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pbi.13208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Akamatsu Akira, Fujiwara Masayuki, Hamada Satoshi, Wakabayashi Megumi, Yao Ai, Wang Qiong, Kosami Ken-ichi, Dang Thu Thi, Kaneko-Kawano Takako, Shimamoto Ko, Kawano Yoji	4. 巻 0
2. 論文標題 The Small GTPase OsRac1 forms two distinct immune receptor complexes containing the PRR OsCERK1 and the NLR Pit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.07.01.183301	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Wang Qiong, Li Yuying, Ishikawa Kazuya, Kosami Ken-ichi, Uno Kazumi, Nagawa Shingo, Tan Li, Du Jiamu, Shimamoto Ko, Kawano Yoji	4. 巻 115
2. 論文標題 Resistance protein Pit interacts with the GEF OsSPK1 to activate OsRac1 and trigger rice immunity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E11551 ~ E11560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1813058115	査読の有無 有
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	国際共著 該当する

1. 著者名 Wong Hann Ling, Akamatsu Akira, Wang Qiong, Higuchi Masayuki, Matsuda Tomonori, Okuda Jun, Kosami Ken-ichi, Inada Noriko, Kawasaki Tsutomu, Kaneko-Kawano Takako, Nagawa Shingo, Tan Li, Kawano Yoji, Shimamoto Ko	4. 巻 14
2. 論文標題 In vivo monitoring of plant small GTPase activation using a Förster resonance energy transfer biosensor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Methods	6. 最初と最後の頁 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13007-018-0325-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Xie Yongyao, Zhang Yaling, Han Jingluan, Luo Jikai, Li Gousi, Huang Jianle, Wu Haibin, Tian Qingwei, Zhu Qinlong, Chen Yuanling, Kawano Yoji, Liu Yao-Guang, Chen Letian	4. 巻 11
2. 論文標題 The Intronic cis Element SE1 Recruits trans-Acting Repressor Complexes to Repress the Expression of ELONGATED UPPERMOST INTERNODE1 in Rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Plant	6. 最初と最後の頁 720 ~ 735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2018.03.001	査読の有無 有
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	国際共著 該当する

1. 著者名 Xie Y, Zhang Y, Han J, Luo J, Li G, Huang J, Wu H, Tian Q, Zhu Q, Chen Y, Kawano Y, Liu YG, Chen L.	4. 巻 Mar 7
2. 論文標題 The Intronic cis Element SE1 Recruits trans-Acting Repressor Complexes to Repress the Expression of ELONGATED UPPERMOST INTERNODE1 in Rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Plant	6. 最初と最後の頁 S1674-2052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2018.03.001.	査読の有無 有
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	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 河野 洋治
2. 発表標題 マルチオミクス解析を用いた植物サイトカイン の同定と機能解析
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野 洋治
2. 発表標題 ベアNLR型免疫受容体Pit1とPit2の進化解析
3. 学会等名 埼玉大学-岡山大学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Li, Y., Wang, Q., Jia, H., and Kawano, Y.
2. 発表標題 ETI in rice: small GTPase OsRac1 signalings and evolutionary process of a pair of R proteins Pit-1 and Pit-2
3. 学会等名 International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions XVIII congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li, Y., Wang, Q., Jia, H., and Kawano, Y.
2. 発表標題 ETI in rice: small GTPase OsRac1 signalings and evolutionary process of a pair of R proteins Pit-1 and Pit-2
3. 学会等名 The 8th International Rice Blast Conference- (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li, Y., Wang, Q., Jia, H., and Kawano, Y.
2. 発表標題 Evolutionary process of a pair of R proteins Pit-1 and Pit-2
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li, Y., Wang, Q., Jia, H., and Kawano, Y.
2. 発表標題 Evolutionary process of a pair of R proteins Pit-1 and Pit-2
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野 洋治
2. 発表標題 Resistance protein Pit interacts with the GEF OsSPK1 to activate OsRac1 and trigger rice immunity
3. 学会等名 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野 洋治
2. 発表標題 OsGAPC1 acts as a NO sensor to control histone acetylation to induce rice immunity
3. 学会等名 the 12th Congress of the International Plant Molecular (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野 洋治
2. 発表標題 OsGAPC1 acts as a NO sensor to control histone acetylation to induce rice immunity
3. 学会等名 16th International Symposium on Rice Functional Genomics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoji Kawano
2. 発表標題 OsGAPC1 acts as a NO sensor to control histone acetylation to induce rice immunity
3. 学会等名 1st PSC Mini-Symposium on Plant-Biotic Interactions (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ http://sti-lab.org/ KAWANO LAB http://sti-lab.org/index.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 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

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------