

平成22年4月10日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19380028  
 研究課題名（和文）植物の病原体関連分子パターンの認識とGタンパク質による情報伝達の分子基盤  
 研究課題名（英文）Molecular basis of G-protein mediated PAMPs signaling

研究代表者  
 川崎 努 (KAWASAKI TSUTOMU)  
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授  
 研究者番号：90283936

研究成果の概要（和文）：植物は、それぞれの病原菌を構成する因子を、病原菌に特有な分子パターン（PAMPs）として認識し、迅速な抵抗性を誘導する。本プロジェクトでは、PAMPs 誘導抵抗性における低分子量Gタンパク質 Rac/Rop の活性化機構を解析し、PAMPs 誘導抵抗性が、PAMPs を認識する受容体キナーゼ-Rac/Rop 活性化因子 (GEF) -Rac/Rop による信号伝達により調節されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Plants induce a series of immune responses through recognition of pathogen-derived molecules (Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs). We analyzed the molecular mechanism of activation of Rac/Rop GTPase during PAMPs triggered responses, and found that Rac/Rop GTPase is regulated through activation of Rac/Rop GEF by PAMPs receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物免疫、Gタンパク質、耐病性、PAMPs、信号伝達

## 1. 研究開始当初の背景

植物が病原体から身を守るためには、迅速なかつ適切な病原体の感染認識および抵抗性誘導が必要である。植物は、それぞれの病原体を構成する因子を、病原体に特有な分子パターン (Pathogen-associated molecular pattern (PAMP)) として認識し、効果的な抵抗性反応を誘導する。近年、様々な PAMPs が

同定され、細菌のべん毛の構成タンパク質であるフラジェリン、細菌表層のリポ多糖やペプチドグルカン、翻訳伸長因子 (EF-Tu) などが、糸状菌では、エルゴステロール、キチン類、グルカンや細胞壁結合タンパク質などが PAMPs として報告されている。植物では、PAMPs 受容体としてフラジェリンを認識する FLS2 や、EF-Tu を認識する ERK などのロイ

シンリッチリピート (LRR) をもつ受容体型キナーゼや、キチンや $\beta$ グルカンの結合部位をもつ受容体が単離されている。しかし、PAMPs 受容体が病原体由来の因子をリガンドとして認識後、どのように一連の抵抗性反応を誘導するのか、その分子機構は明らかになっていない。

植物には、他の生物に比べ非常に多くの受容体型プロテインキナーゼ (Receptor-like kinase: RLK) の遺伝子が存在する。中でも、植物では6番目のキナーゼドメインの保存配列であるアルギニン (R) とアスパラギン酸 (D) が他のアミノ酸に置き換わっている non-RD クラスに属する RLK が多く存在し、これまでに同定された、FLS2 や ERK を含むすべての病原体認識関連の RLK は、この non-RD クラスに含まれる (Dardick & Ronald, PLoS Pathogens, 2006)。したがって、この non-RD クラスの RLK が PAMPs の認識および抵抗性誘導に重要な役割を果たしていることが示唆される。non-RD クラスの RLK の相互作用因子として、低分子量 G タンパク質 Rac/Rop (アラビドプシスでは Rop、他の植物では Rac という表記が使用されている) の活性化因子である GDP-GTP 交換因子 (GEF) が単離された (Kaothien et al. Plant J, 2005)。このことから、PAMPs を認識した RLK からの信号が Rac/Rop GEF-Rac/Rop を介して伝達され、一連の耐病性反応が誘導されている可能性が強く示唆される。そこで、本研究課題では、RLK-Rac/RopGEF-Rac/Rop の信号伝達系の解析を通じて PAMPs によって誘導される抵抗性反応の分子基盤を明らかにする。

## 2. 研究の目的

これまでに単離された PAMPs 受容体は、植物において特異的に大きな進化を遂げた non-RD クラスの RLK をコードしている。RLK は細胞外に存在する LRR で PAMPs を認識し、細胞内のプロテインキナーゼドメインを通じて、その情報を伝達している。この non-RD 型 RLK のキナーゼドメインに結合するタンパク質として単離された PRONE 型の RopGEF は、PAMPs の情報伝達をつかさどる第一候補であると考えられる。したがって、本研究課題では、PAMPs 誘導抵抗性に関わる Rac/Rop GEF を同定し、RLK による PAMPs の認識、Rac/Rop GEF-Rac/Rop を介した情報伝達について、その分子機構を明らかにする。実際には、Rac/Rop GEF の過剰発現体あるいは発現抑制体を用いて PAMPs 信号伝達に関わる Rac/RopGEF を同定するとともに、RLK の PAMPs 信号の認識から Rac/RopGEF の活性化に至る過程を、植物病理学的・遺伝学的・生化学的・分子生物学的手法を用いて解析する。また、PRONE 型 Rac/Rop GEF はリン酸化による翻訳後修飾をうけることが知られており、リン酸

化による Rac/Rop GEF の活性制御について解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) PAMPs 誘導抵抗性関与する Rac/Rop GEF の単離

イネ低分子量 G タンパク質 OsRac1 は、キチンなど PAMPs によって活性化される。そこで、イネに存在する 11 種類の PRONE 型 GEF の中から OsRac1 に対して高い GEF 活性をもつものを選ぶ。さらに、酵母 Two Hybrid 法を用いて、OsRac1 の GEF を探索する。

(2) RacGEF の過剰発現体あるいは機能欠損変体の解析

Rac GEF の過剰発現体あるいは機能欠損変異体の病害応答を解析し、PAMPs 誘導抵抗性への関与を調べる。

(3) RacGEF と PAMPs 受容体の相互作用

RacGEF と PAMPs 受容体との相互作用を、酵母 Two Hybrid 法や BiFC 法を用いて解析する。

(4) PRONE 型 GEF のリン酸化による制御

PRONE 型 GEF の活性は分子内相互作用によって抑制され、その抑制はリン酸化によって解除される可能性が示唆されている。そのため、リン酸化による PRONE 型 GEF の活性制御について解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) PAMPs 誘導抵抗性に関与する Rac/Rop GEF の単離

イネには 11 種類の PRONE 型 GEF が存在した。そこで、PAMPs 誘導抵抗性に関わる OsRac1 に対して高い GEF 活性をもつ PRONE 型 GEF を同定するため、全ての GEF の組換えタンパク質を調製し、OsRac1 に対する GEF 活性を *in vitro* の実験系を用いて調べた。その結果、GEF7 を含む 4 つの GEF が高い GEF 活性を示すことがわかった。同時に、酵母 Two Hybrid 法を用いて OsRac1 と相互作用する GEF を探索したところ、GEF7 に加えて、PH-DH ドメインをもつ新規な GEF 候補 (OsSWAP70) が得られた。そこで、OsSWAP70 の組換えタンパク質を調製し、OsRac1 に対する GEF 活性を調べたところ、高い GEF 活性を示すことがわかった。そこで、OsSWAP70 がもつ各ドメインについて GEF 活性を調べたところ、DH ドメインが GEF 活性を有していることが明らかとなった。

(2) RacGEF の過剰発現体あるいは機能欠損変体の解析

PRONE 型 GEF のうち、OsRac1 に対して高い GEF 活性を示す 4 種の GEF について過剰発現体を作成した。得られた組換え体植物について、防御遺伝子の発現を解析したところ、その全てで防御遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。このことは、GEF の過剰発現により、防御反応を誘導できることを示

している。そこで、それらの GEF にいもち病菌を感染させ、抵抗性が向上しているかどうかを調べた。しかし、顕著な抵抗性の上昇は観察されなかった。これは、全長タンパク質として過剰発現させたために、分子内相互作用が起り、GEF 活性が抑制されたためであると考えられた。そこで、GEF 活性をもつ PRONE ドメインのみを病原菌感染誘導プロモーターによって発現させるコンストラクトを作製し、それを導入した植物体を作製した。その植物体にいもち病菌を感染させると感染に伴って PRONE ドメインが発現し、防御反応の発現も誘導されることがわかった。さらに、いもち病菌の伸展が顕著に抑制され、PRONE ドメインに依存した Rac の活性化により、防御反応を誘導できることがわかった。

SWAP70 遺伝子はイネでは 2 個、シロイヌナズナでは 1 個のみ存在する。そこで、シロイヌナズナの SWAP70 機能欠損変異体を用いて、PAMPs 誘導抵抗性への関与を調べた。PAMPs 抵抗性への影響を見るため、Type III 分泌システムを欠損し、強く PAMPs 抵抗性を誘導する *P. syringae* DC3000 *hrcC* 株を、SWAP70 変異体に感染させ、菌の増殖量を調べた。その結果、変異体では野生型に比べて、菌が 2 倍に増えることがわかった。このことは、SWAP70 が PAMPs 誘導抵抗性に関与していることを示唆している。つぎに、抵抗性遺伝子 RPM1 に依存した抵抗性誘導についても解析を行った。その結果、変異体では RPM1 に依存した過敏感反応が抑制されており、SWAP70 が抵抗性遺伝子に依存した抵抗性反応においても重要な役割を果たしていることがわかった。

### (3) RacGEF と PAMPs 受容体の相互作用

PRONE 型 GEF は、細胞膜に存在する受容体型キナーゼと相互作用することが示唆されている。そこで、キチンの受容体である CERK1、べん毛タンパク質の受容体である FLS2、白葉枯病菌がもつ AX21 の受容体である Xa21 を用いて、PRONE 型 GEF との相互作用を解析した。しかし、顕著な相互作用は酵母 Two Hybrid 法では検出できなかった。そこで、BiFC 法を用いて、細胞内における GEF と CERK1 受容体の相互作用を解析したところ、細胞膜で両タンパク質が結合していることがわかった。したがって、キチン認識による防御応答は、CERK1-GEF-OsRac1 を介して誘導されていると考えられる

### (4) PRONE 型 GEF のリン酸化による制御

バイオイメージングを用いて、細胞内における OsRac1 の活性をモニターするための実験系を構築した。この実験系を用いて、PRONE 型 GEF による OsRac1 の活性化を調べたところ、GEF の全長を用いた場合、OsRac1 を活性化することが出来ないことがわかった。これは、GEF の分子内相互作用により、活性が抑

制させているためであると考えられた。そこで、GEF 活性をもつ PRONE ドメインのみを発現させたところ、OsRac1 を活性化できることがわかった。このことにより、分子内相互作用により、GEF の PRONE ドメインがマスクされ、活性が抑制されていることを確認することができた。そこで、GEF の PRONE ドメイン以外の領域で、リン酸化を受ける可能性があるアミノ酸配列を検索したところ、C 末端領域にリン酸化されると考えられるセリン残基やスレオニン残基が存在することが明らかになった。そこで、セリンをアスパラギン酸に置き換えた GEF の疑似リン酸化変異体を作製し、OsRac1 の活性化を調べたところ、疑似リン酸化変異体により OsRac1 が活性化されることがわかった。このことは、PRONE 型 GEF の GEF 活性がリン酸化によって制御されていることを強く示唆するものである。

以上のように、一連の研究により、PAMPs 誘導抵抗性が受容体キナーゼ (RLK)-Rac/Rop GEF-Rac/Rop を介して誘導されていることを明らかにし、当初、計画していた目的を達成することができた。今後、さらに受容体キナーゼによる GEF の活性化機構について、詳細に解析を行っていく必要がある。

## 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 8 件)

①Fujiwara, T., Maisonneuve, S., Isshiki, M., Mizutani, M., Chen, L., Wong, H.L., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *J. Biol. Chem.*, 285: 11308-11313, 2010 査読有

②Chen, L., Hamada, S., Fujiwara, M., Zhu, T., Thao, N.P., Wong, H.L., Krishna, P., Ueda, T., Kaku, H., Shibuya, N., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. Hop/Stil and HSP90 are involved in maturation and transport of a PAMP receptor in rice innate immunity. *Cell Host Microbe*, 7: 185-196, 2010 査読有

③Chen, L., Shiotani, K., Togashi, T., Miki, D., Aoyama, M., Wong, H.L., Kawasaki, T., Shimamoto, K. Analysis of the Rac/Rop Small GTPase Family in Rice: Expression, Subcellular Localization and Role in Disease Resistance. *Plant Cell. Physiol.*, 51: 585-595, 2010 査読有

④Oda, T., Hashimoto, H., Kuwabara, N., Akashi, S., Hayashi, K., Kojima, C., Wong, H.L., Kawasaki, T., Shimamoto, K., Sato,

M., and Shimizu, T. The structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. J. Biol. Chem., 285: 1435-1445, 2010, 査読有

⑤Fujiwara, M., Hamada, S., Hiratsuka, M., Fukao, Y., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. Proteome analysis of detergent resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1 mediated innate immunity in rice. Plant Cell. Physiol., 50: 1191-1200, 2009, 査読有

⑥Oda, T., Hashimoto, H., Kuwabara, N., Hayashi, K., Kojima, C., Kawasaki, T., Shimamoto, K., Sato, M. and Shimizu, T. Crystallographic characterization of the N-terminal domain of plant NADPH oxidase. Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun., 64:867-869, 2008, 査読有

⑦Nakashima, A., Chen, L., Thao, N.P., Fujiwara, M., Wong, H.L., Kuwano, M., Umemura, K., Shirasu, K., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. Plant Cell, 20: 2265-2279, 2008, 査読有

⑧Igari, K., Endo, S., Hibara, K., Aida, M., Sakakibara, H., Kawasaki, T., and Tasaka, M. Constitutive activation of a CC-NB-LRR protein alters morphogenesis through the cytokinin pathway. Plant J., 55: 14-27, 2008, 査読有

[学会発表] (計 18 件)

①赤松明、奥田淳、川崎努、Wong Hann Ling、島本功、Analysis of PAMPs-induced OsRac1 activation using FRET biosensor in rice, 第 32 回日本分子生物学会, 2009. 12. 10, 横浜

②河野洋治、赤松明、林敬子、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、Rタンパク質によるGタンパク質OsRac1 の活性化が植物免疫に重要である, 第 32 回日本分子生物学会, 2009. 12. 10, 横浜

③赤松明、奥田淳、川崎努、Hann Ling Wong、島本功、FRETバイオセンサーを用いたPAMPによるOsRac1 の活性化解析, 第 82 回日本生化学学会, 2009. 10. 22, 神戸

④藤原幹、Sylvie Maisonneuve、一色正之、水谷正治、川崎努、島本功、植物免疫信号伝達系におけるセロトニンの機能解析, 第 82 回日本生化学学会, 2009. 10. 22, 神戸

⑤河野洋治、赤松明、林敬子、宝泉雄介、中島綾子、高橋弘喜、吉田均、Hann Ling Wong、川崎努、島本功、Rタンパク質によるGタンパク質OsRac1 の活性化が植物免疫に重要であ

る, 第 82 回日本生化学学会, 2009. 10. 22, 神戸

⑥Yamaguchi, K., Furutani, A., Ochiai, H., Tsuge, S., Shimamoto, K., and Kawasaki, T., Type III effectors of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suppress PAMPs-triggered immunity in rice, XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009. 7. 20, カナダ, ケベック

⑦Kawasaki, T., Yamaguchi, K., Shimamoto, K., Identification of DH-PH type GDP-GTP exchange factor for Rac/Rop GTPase in plant immune response, XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009. 7. 20, カナダ, ケベック

⑧Kim, S., Oikawa, T., Kyojuka, J., Wong, H.L., Kawasaki, T., and Shimamoto, K., LAP (bHLH) is a transcription factor activated by OsRac1 in rice innate immunity, XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009. 7. 20, カナダ, ケベック

⑨Wong, H.L., Akamatsu, A., Imai, K., Okuda, J., Zhu, T., Kawasaki, T., and Shimamoto, K., Activation of RacGTPase-mediated defence signalling by pathogen-associated molecular patterns and guanine nucleotide exchange factor in rice, XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009. 7. 20, カナダ, ケベック

⑩Akamatsu, A., Okuda, J., Kawasaki, T., Wong, H.L., and Shimamoto, K., Analysis of PAMPs-induced OsRac1 activation using FRET biosensor in rice, XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009. 7. 20, カナダ, ケベック

⑪山口公志、古谷綾子、落合弘和、津下誠治、島本功、川崎努、イネ白葉枯病菌Type III エフェクターの機能解析, 日本植物病理学会, 2009. 3. 27, 山形

⑫藤原 幹、Sylvie Maisonneuve、一色正之、水谷正治、川崎努、島本 功、植物免疫信号伝達系におけるセロトニンの機能解析, 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009. 3. 22, 名古屋

⑬河野洋治、林敬子、赤松明、宝泉雄介、Loh, P. C.、中島綾子、高橋弘喜、吉田均、川崎努、島本功、低分子量GTP結合タンパク質イネ OsRac1 を介した抵抗性タンパク質による過敏感反応死と耐病性の制御機構, 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009. 3. 22, 名古屋

⑭藤原幹、Maisonneuve, S.、一色正之、水谷正治、川崎努、島本功、植物免疫信号伝達系におけるセロトニンの機能解析、第 31 回日本分子生物学会年会, 2008. 12. 9, 神戸

⑮ 赤松明、河野洋治、奥田淳、Wong, H.L.、川崎努、島本功 FRETバイオセンサーを用いた植物細胞における低分子量Gタンパク質の解析, 第31回日本分子生物学会年会, 2008.12.9, 神戸

⑯ 河野洋治、Loh, P.C.、林敬子、赤松明、中島綾子、高橋弘喜、吉田均、川崎努、島本功 低分子量GTP結合タンパク質イネOsRac1を介した抵抗性タンパク質による過敏感反応死と耐病性の制御機構, 31回日本分子生物学会年会, 2008.12.9, 神戸

⑰ Kim, S.H., Oikawa, T., Kyojuka, J., Wong, H.L., Kawasaki, T., and Shimamoto, K., LAP (bHLH) is a transcription factor activated by OsRac1 in rice innate immunity, The 6th International symposium on rice functional genomics, 2008.11.10, 韓国, 済州

⑱ Chen, L., Nakashima, A., Thao, N.P., Fujiwara, M., Wong, H.L., Kawasaki, T., and Shimamoto, K, RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the OsRac1 immune complex, Plant Genomics in China, 2008.7.18, 中国, 広州

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川崎 努 (KAWASAKI TSUTOMU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：90283936