

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22780037  
 研究課題名（和文） ユビキチン系による植物免疫MAPキナーゼ経路の促進的制御  
 研究課題名（英文） positive contribution of E3 ubiquitin ligases in regulation of MAP kinase cascade involved in plant immunity

研究代表者  
 市村 和也（ICHIMURA KAZUYA）  
 香川大学・農学部・准教授  
 研究者番号：70321726

研究成果の概要（和文）：

本研究では植物免疫情報伝達に關与する MAPKKK である MEKK1 の結合蛋白質として単離した U-box 型ユビキチンリガーゼの PUB25 および PUB26 を同定し特徴付けを行った。組換えタンパク質による *in vitro* ユビキチン化反応、プロモーターGus による組織特異的な発現解析、詳細な結合特異性解析を行った。また、PUB25 および PUB26 のシロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体を用いて各 MAPK 活性、および MAMP によるマーカー遺伝子発現を解析し、*in planta* での機能について特徴付けを遂行した。

研究成果の概要（英文）：

A mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade has an important role in innate immunity in plants. Arabidopsis MEKK1, a MAPK kinase kinase (MAPKKK) is an important factor in the upstream of MPK4 which has at least two functions, negative regulation of SA-mediated defense responses and positive regulation of JA-induced gene expression, however regulatory mechanism of MEKK1 remains to be elucidated. To identify possible regulator of MEKK1, we performed yeast two-hybrid screening using MEKK1 protein as bait. We found two putative E3 ligases which contain U-box domain, named PUB25 and PUB26 as novel MEKK1-binding proteins. Characterization using *pub25/26* double mutant suggested that PUB25 and PUB26 positively contribute MEKK1 function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学、植物病理学

キーワード：MAPキナーゼ経路、ユビキチンリガーゼ、シロイヌナズナ、MAMPs、シグナル伝達

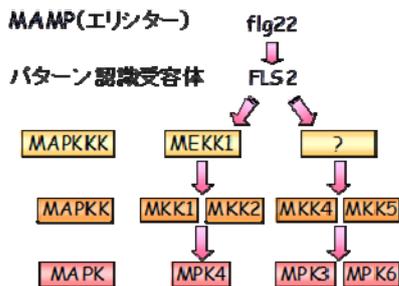
1. 研究開始当初の背景

植物 MAP キナーゼ経路の防御反応制御における役割：MAP キナーゼ (MAPK) 経路は、MAPKKK→MAPKK→MAPK が連鎖的に活性化して、情報を伝達かつ増幅させるモジュールであ

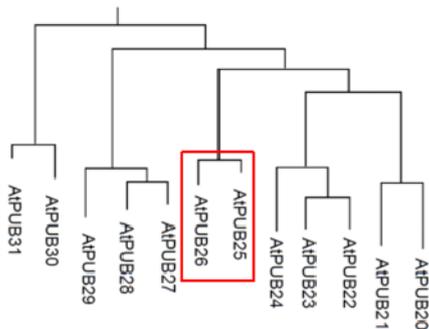
る。MAPK は、MAMP (microbe-associated molecular pattern) を認識するパターン認識受容体の下流で機能する。活性化した MAPK は、防御遺伝子の発現 (Nature 415:977, 2002)、エチレン誘導 (PlantCell 16:3386,

2004)、ファイトアレキシンの生合成誘導 (PNAS 105:5638, 2008; EMBOJ 27:2214, 2008)、以上を制御することが、これまで明らかにされている。

これまでの申請者による研究：シロイヌナズナゲノムでは、20 個の MAPK 遺伝子が同定されている。このうち、当該分野では MPK3, MPK4, MPK6 が、最も解析されている (図 1)。その中でも、MPK4 を含めた MEKK1-MKK1, 2-MPK4 から構成される MAPK 経路を、申請者は植物で最初に同定、かつ、機能解析に注力してきた (図 1)。さらに、*mekk1* 変異体もとに、上記経路を遺伝学的に証明した。



**図1 MAMPが活性化するMAPK経路**  
MAMPを処理するとMPK3,4,6が活性化  
する。MPK4とMPK3,6は異なった経路を  
構成すると考えられている。



**図2 クラスIII PUB遺伝子族の系統樹**

研究動向：上記経路では、Mundy らのグループが、1) MPK4 の基質である MKS1 の同定 (EMBOJ 24:2579, 2005)、2) MPK4 が MKS1 および WRKY33 転写因子と複合体を形成、3) 活性化した MPK4 による MKS1 のリン酸化が複合体の解離を引き起こし、WRKY33 を介してファイトアレキシンの生合成が促される、以上を報告している (EMBOJ 27:2214, 2008)。

着想に至った経緯、本研究の進捗状況：申請者が同定した上記 MAPK 経路の MEKK1 結合タンパク質を探索し、ユビキチンリガーゼである PUB26 を単離した。PUB26 は、シロイヌナズナに 61 遺伝子存在する PUB (plant U-box) 遺伝子属の一つで、クラス III に属している (TIPS 6:354, 2001) (図 2)。この結果から MEKK1 が PUB26 の特異的な基質である可能性が強く示唆された。

## 2. 研究の目的

植物 MAPK は防御反応マーカーとして、認知されているにもかかわらず、リン酸化以外にどのように制御されているか、ほとんど解明されていない。本研究ではイーストツーハイブリット法を用いたスクリーニングで U-box 型ユビキチンリガーゼの PUB26 を MEKK1 結合タンパク質として単離したことから、PUB26 による MEKK1 の制御について明らかにすることを当初の目的とした。具体的には、1) PUB 26 による MEKK1 の調節機構、2) 防御反応における役割を明らかにすることを目的とした。

これまでの研究から、MEKK1 は MKK1 および MKK2 (MAPKKs)、MPK4 (MAPK) と結合し特異的な MAPK 経路を構成している。*mekk1* 変異体では、f1g22 による MPK4 の活性化が劇的に低下することから、MEKK1 が f1g22 による下流因子の活性化に必須であることを示している。また、MPK4 は基質である MKS1 のリン酸化を介して転写因子 WRKY33 を制御しており、WRKY33 は MAMP による標的遺伝子である *PAD3* の発現に必要である。以上のこれまでの成果や、関連研究の知見を有効に活用し、MEKK1 以下の経路における PUB26 の役割を明らかにしてゆく。また、ユビキチン化修飾による選択的タンパク質分解が一般には有名だが、本研究の予備的な結果では、それとは異なる新奇な調節機構が明らかにされうる可能性がある。また、PUB25, 26 に相同性が高い PUB22, 23, 24 (図 2) は、防御反応を負に制御する因子である。三重変異体は、MAMP により MAPK がより強く活性化する。これらの結果を受け、本研究は、同族遺伝子間での機能対比も考慮に入れて研究を行う。本研究は、MAPK 経路研究とユビキチン系研究、両方にインパクトを与えうるユニークな成果へ発展する可能性についても解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

PUB26 の結合特異性：MEKK1 を用いたイーストツーハイブリット法を用いた結合タンパク質のスクリーニングによって PUB26 が単離されたが、PUB26 は図 2 に示すようにクラス III PUB タンパク質の一員であり、パラログに当たる PUB25 も存在する。一方、MEKK1 にも MEKK2 から MEKK4 までのパラログが存在する。このためパラログを含めた詳細なイーストツーハイブリット解析を行い、PUB26 と MEKK1 との結合特異性について検証を行った。また、この結果を踏まえて *in vivo* における結合に関しても検証した。

PUB26 と MEKK1 の発現に関する組織特異性：MEKK1 結合タンパク質として PUB26 が単離されたが、PUB26 が MEKK1 に結合するのならば両者は同じ細胞で発現している必要がある。この点について検証するため、PUB26

のプロモーターを単離し、Gus 遺伝子を連結した形質転換シロイヌナズナを作製し、組織特異的発現を Gus 染色により解析する。MEKK1 についてはすでに申請者によって作製されている (JBC 281:36969, 2006)。

変異体、過剰発現体の表現型解析: *PUB26* の in planta における機能を明らかにするには変異体及び過剰発現体を作製し、表現型を解析する必要がある。このため、*PUB26* の変異体を取得するとともに過剰発現体を作製し、MAMP による MAPK 活性化やマーカー遺伝子の発現について機能解析を行った。また、*PUB26* のパラログである *PUB25* についても変異体を取得し、*pub26* 変異体と掛け合わせ、*pub25/pub26* 二重変異体を作製し、表現型解析を行った。

MEKK1 タンパク質の解析: MEKK1 結合タンパク質として *PUB26* が単離されたことから、ユビキチン化を介して MEKK1 タンパク質が調節される可能性が考えられた、このため MEKK1 タンパク質量などを解析するため、MEKK1 に対する抗体を作製しウェスタンブロット解析を行った。

#### 4. 研究成果

*PUB26* の in vitro ユビキチン化アッセイ: *PUB26* が機能的なタンパク質であるか解析するため組換えタンパク質を作製し、ユビキチン化アッセイを行った。*PUB26* は GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、アフィニティー精製を行い in vitro ユビキチン化反応の酵素標品とした。別に調製したシロイヌナズナ E2 酵素も用いた、その他の E1 やユビキチンなどは市販品を利用した。ポリユビキチン化タンパク質の検出は抗ユビキチン抗体によるウェスタンブロットにより行った。アッセイの結果、*PUB26* のユビキチン化能が検出され、U-box の欠失や、U-box 中の保存アミノ酸の置換変異によって消失したことから、U-box 依存的に *PUB26* はユビキチン化を行う機能的なタンパク質であることが証明された。

イーストツーハイブリッド法による詳細な結合特異性解析: *PUB26*、MEKK1 はともに多重遺伝子族の一員であり、*PUB26* にはパラログの *PUB25* が、MEKK1 にはパラログの MEKK2、MEKK3、MEKK4 が存在する。このため、これらのパラログを含めた詳細な相互作用解析を行うことで、結合特異性についてイーストツーハイブリッド法を用いて詳細に解析した。その結果、*PUB26* だけでなく、*PUB25* も MEKK1 に結合したが、近接するグループに属する *PUB23* は結合しなかった。また、*PUB26* の ARM リピード領域のみを発現させても MEKK1 に対する結合能が失われないことから、*PUB25* および *PUB26* は ARM リピード領域を介して MEKK1 へ結合することが示唆された。また、

*PUB25* と *PUB26* は MEKK1 にのみ結合し、パラログの MEKK2 には結合しなかった。

BiFC 解析: ツーハイブリッド法で検出された相互作用は、異なる実験系で検証されなければならない。in vivo での MEKK1 と *PUB25*、*26* の結合を示すため、BiFC (bimolecular fluorescence complementation) 法を用いて結合を解析した。MEKK1 の発現効率が低いためバックグラウンドのシグナルが高く、preliminary な結果となったが、MEKK1 と *PUB26* の相互作用が観察された。

ウェスタンブロットによる MEKK1 のタンパクレベル解析: MEKK1 は様々な生物的・非生物的ストレスの情報伝達に関係しているが、内在性タンパクレベルについてはこれまで解析されていない。本研究では MEKK1 がユビキチンリガーゼの *PUB25* および *PUB26* と結合することから、MEKK1 のタンパクレベルが環境ストレスやユビキチン化の影響を受けるか MEKK1 抗体を作製しウェスタンブロットにより解析を行った。MEKK1 のタンパクレベルは MAMP である f1g22 や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理によって上昇した。この結果から通常はユビキチン化を介した選択的分解によりタンパクレベルが低く抑えられ、環境ストレス時にタンパク量が少々する可能性が考えられた。このため、プロテアソーム阻害剤を処理し、阻害剤の有無によるタンパクレベルを比較したが、変化は見られなかった。一方、f1g22 および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理によって速やかに MEKK1 の転写量が少々することから、ストレスによるタンパクレベルの上昇は転写の上昇によると考察した。この結果から *PUB25* および *PUB26* は MEKK1 のタンパク分解に関係していない可能性も示唆された。

*pub25/pub26* 二重変異体および *PUB26* 過剰発現体の表現型解析: MAMP による MEKK1 → MKK1, 2 → MPK4 経路の情報伝達における *PUB25* および *PUB26* の機能を明らかにするため、*pub25/pub26* 二重変異体を用いて MAPK 活性と上記経路の標的遺伝子である PAD3 の発現を解析した。f1g22 処理では野生型と比較して *pub25/pub26* 二重変異体では MPK4 の活性が低下していた。また、f1g22 による PAD3 の発現誘導も野生型より低かった。一方、*PUB26* 過剰発現体では PAD3 の誘導が野生型より強く、かつより長く維持されていた。この結果から、*PUB25* および *PUB26* は、MEKK1 以下の経路に対して促進的な役割を果たしていることが示唆された。

#### 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 4 件)

1. Fukumoto, T., Kano, A., Ohtani, K., Yamasaki-Kokudo, Y., Kim, BG, Hosotani,

- K., Saito, M., Shirakawa, C., Tajima, S., Izumori, K., Ohara, T., Shigematsu, Y., Tanaka, K., Ishida, Y., Nishizawa, Y., Tada, Y., Ichimura, K., Gomi, K., Akimitsu, K.: Rare sugar D: -allose suppresses gibberellin signaling through hexokinase-dependent pathway in *Oryza sativa* L. *Planta* 234, 1083-1095 (2011). 査読有
2. Kano, A., Hosotani, K., Gomi, K., Yamasaki-Kokudo, Y., Shirakawa, C., Fukumoto, T., Ohtani, K., Tajima, S., Izumori, K., Tanaka, K., Ishida, Y., Nishizawa, Y., Ichimura, K., Tada, Y., Akimitsu, K.: D-Psicose induces upregulation of defense-related genes and resistance in rice against bacterial blight. *Journal of Plant Physiology* 168, 1852-1857 (2011). 査読有
  3. Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., Shinozaki, K.: Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 41, 649-660 (2011). 査読有
  4. Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T.L., Tada, Y., Ichimura, K., Akimitsu, K.: ACTTS3 encoding a polyketide synthase is essential for the biosynthesis of ACT-toxin and pathogenicity in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 23, 406-414 (2010). 査読有
- [学会発表] (計 22 件)
1. Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., Shinozaki, K.: Convergence Mechanism between Calcium and Phosphorylation Signal via MPK8 in Mechanical Wounding. 第 53 回日本植物生理学会年会およびシンポジウム 講演要旨集, 242-242 (2012) .
  2. Fukumoto, T., Ohtani, K., Kano, A., Tajima, S., Izumori, K., Ohara, T., Shigematsu, Y., Ohkouchi, T., Ishida, Y., Tada, Y., Ichimura, K., Gomi, K. and Akimitsu, K.: Disease control of rice foolish disease by D-allose: Sugar Phosphorylation of D-allose by hexokinase lead to GA dependent shoot elongation. The 2nd Korea-Japan Joint Symposium, Fukuoka Japan, 153-153 (2012).
  3. Kano, A., Fukumoto, T., Ohtani, K., Yoshihara, A., Ohara, T., Tajima, S., Izumori, K., Ohkouchi, T., Ichimura, K., Tada, Y., Gomi, K. and Akimitsu, K.: Rare sugar D-Allose Induces Disease Resistance with ROS Generation in Rice. The 2nd Korea-Japan Joint Symposium, Fukuoka Japan, 153-153 (2012).
  4. 高橋史憲, 溝口剛, 吉田理一郎, 市村和也, 篠崎一雄: 傷害応答におけるカルシウムおよびリン酸化で制御を受けるMPK8 の機能解析, 第 52 回日本植物生理学会年会およびシンポジウム 講演要旨集, 347-347 (2011) .
  5. 加野彰人, 福元健志, 大谷耕平, 何森 健, 田島茂行, 小原敏明, 重松由夫, 田中啓司, 石田 豊, 市村和也, 多田安臣, 五味剣二, 秋光和也 希少糖の植物への作用 (20): D-Allose処理イネにおける活性酸素種の蓄積にはNADPH oxidaseが関与する, 平成 23 年度日本植物病理学会大会・プログラム・講演要旨予稿集, 192-192 (2011).
  6. 福元健志, 大谷耕平, 加野彰人, 何森健, 田島茂行, 重松由夫, 小原敏明, 田中啓司, 石田豊, 市村和也, 多田安臣, 五味剣二, 秋光和也: 希少糖の植物への作用 (19): D-Allose 処理によるイネの遺伝子発現制御には糖リン酸化が関与する, 平成 23 年度日本植物病理学会大会・プログラム・講演要旨予稿集, 192-192 (2011).
  7. 加野彰人, 福元健志, 大谷耕平, 何森 健, 田島茂行, 小原敏明, 重松由夫, 田中啓司, 石田 豊, 市村和也, 多田安臣, 五味剣二, 秋光和也 希少糖の植物への作用 (21): D-Alloseの誘導するイネ白葉枯病耐性はNADPH oxidaseに依存する, 平成 23 年度日本植物病理学会関西部会プログラム・講演要旨予稿集, 17-17 (2011).
  8. 樋尾隼平, 市村和也, 溝口 剛, Alexander Graf, 高橋史憲, 篠崎一雄, 白須 賢 シロイヌナズナMAMP応答性MAPKKKであるMEKK1 に結合するU-box型ユビキチンリガーゼの解析, 平成 23 年度日本植物病理学会関西部会プログラム・講演要旨予稿集, 32-32 (2011).
  9. 中村雅子, 瀧澤 香, 白須 賢, 市村和也 多様なストレスシグナル伝達に関与するシロイヌナズナMKK3 の上流因子の同定, 平成 23 年度日本植物病理学会関西部会プログラム・講演要旨予稿集, 32-32 (2011).
  10. Fukumoto, T., Ohtani, K., Kano, A., Tajima, S., Izumori, K., Ohara, T., Shigematsu, Y., Tanaka, K., Ohkouchi, T., Ishida, Y., Tada, Y., Ichimura, K., Gomi, K., Akimitsu, K.: Mechanism of Plant Growth Regulation Caused by D-Allose. The 5th Symposium of International Society of Rare Sugars, Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, 57-57 (2011).
  11. Kano, A., Yoshihara, A., Fukumoto, T., Ohtani, K., Ohara, T., Tajima, S., Izumori, K., Tanaka, K., Ohkouchi, T., Ishida, Y., Nishizawa, Y., Ichimura, K., Tada, Y., Gomi, K., Akimitsu, K.: D-Allose Confers

- Resistance to Rice Bacterial Blight with Induction of Defense Response in *Oryza sativa* L. The 5th Symposium of International Society of Rare Sugars, Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, 58-58 (2011).
12. Kano, A., Yoshihara, A., Fukumoto, T., Ohtani, K., Ohara, T., Tajima, S., Izumori, K., Tanaka, K., Ohkouchi, T., Ishida, Y., Nishizawa, Y., Ichimura, K., Tada, Y., Gomi, K., Akimitsu, K.: Rare Sugar D-Allose Acts as a Triggering Molecule of the Rice Defense with ROS Generation. The 5th Symposium of International Society of Rare Sugars, Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, 114-114 (2011).
  13. Fukumoto, T., Ohtani, K., Kano, A., Tajima, S., Izumori, K., Ohara, T., Shigematsu, Y., Tanaka, K., Ohkouchi, T., Ishida, Y., Tada, Y., Ichimura, K., Gomi, K., Akimitsu, K.: Phosphorylation of D-Allose by Hexokinase Gives Inhibition of GA-Signaling in Rice. The 5th Symposium of International Society of Rare Sugars, Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, 117-117 (2011).
  14. 高橋史憲, 溝口剛, 吉田理一郎, 市村和也, 篠崎一雄: カルモジュリンおよびリン酸化で制御を受けるMPK8の機能解析, 第51回日本植物生理学会年会およびシンポジウム 講演要旨集, 179-179 (2010) .
  15. 市村和也, 溝口剛, Alex Graf, 高橋史憲, 篠崎一雄, 白須賢: シロイヌナズナMAMP応答性MAPキナーゼ経路を正に制御するユビキチンリガーゼ, 平成22年度日本植物病理学会大会・プログラム・講演要旨予稿集, 80-80 (2010) .
  16. 福元健志, 大谷耕平, 加野彰人, 何森健, 田島茂行, 重松由夫, 小原敏明, 田中啓司, 石田 豊, 市村和也, 多田安臣, 五味剣二, 秋光和也: 希少糖の植物への作用 (13): D-Allose 処理イネのGA反応抑制における*OsABF1* 遺伝子の関与, 平成22年度日本植物病理学会大会・プログラム・講演要旨予稿集, 176-176 (2010) .
  17. 加野彰人, 吉原明秀, 森本兼司, 福元健志, 細谷浩二, 大谷耕平, 何森健, 田島茂行, 田中啓司, 石田 豊, 市村和也, 多田安臣, 五味剣二, 秋光和也: 希少糖の植物への作用 (14): *E. coli*由来の*Alk*過剰発現イネはD-allose に高度感受性を示す, 平成22年度日本植物病理学会大会・プログラム・講演要旨予稿集, 176-176 (2010) .
  18. Kazuya Ichimura, Tsuyoshi Mizoguchi, Fuminori Takahashi, Alexander Graf, Kazuo Shinozaki, Ken Shirasu : CHARACTERIZATION OF ARABIDOPSIS MEKK1-INTERACTING E3 UBIQUITIN LIGASES, 21<sup>st</sup> International Conference on Arabidopsis Research • Program & Abstracts, 72-72 (2010).
  19. 市村和也, モデル植物シロイヌナズナを用いた環境ストレス情報伝達の基礎研究, 香川園芸研究協議会平成22年度第1回例会 (2010) .
  20. 市村和也, 植物免疫におけるシロイヌナズナMAPキナーゼ経路の解析, 第31回日本植物病理学会関西地区若手の会・プログラム・講演要旨集, 11-13 (2010) .
  21. 加野彰人, 福元健志, 何森健, 田島茂行, 小原敏明, 重松由夫, 田中啓司, 石田 豊, 市村和也, 多田安臣, 五味剣二, 秋光和也: 希少糖の植物への作用 (18): イネ由来のHexokinaseはD-allose のリン酸化を行う, 平成22年度日本植物病理学会関西西部会プログラム・講演要旨予稿集, 16-16 (2010) .
  22. 福元健志, 大谷耕平, 加野彰人, 何森健, 田島茂行, 重松由夫, 小原敏明, 田中啓司, 石田 豊, 市村和也, 多田安臣, 五味剣二, 秋光和也: 希少糖の植物への作用 (17): D-Allose 処理イネのGAおよびABAシグナルの制御における糖リン酸化の関与, 平成22年度日本植物病理学会関西西部会プログラム・講演要旨予稿集, 16-16 (2010) .
- [図書] (計0件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)
- [その他]
- 市村和也: モデル植物シロイヌナズナを用いた環境ストレス情報伝達の基礎研究, 香川園芸研究協議会々報, 49, 2-7 (2010). 査読無
6. 研究組織
    - (1) 研究代表者
 

市村 和也 (ICHIMURA KAZUYA)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号: 70321726