

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780047

研究課題名（和文）OsPti1aを介した病害抵抗性の制御における細胞膜複合体の機能と役割の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of OsPti1a-associated protein complex at the plasma membrane in disease resistance

研究代表者

高橋 章 (TAKAHASHI AKIRA)

独立行政法人農業生物資源研究所・耐病性作物研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：20414914

研究成果の概要（和文）：イネの病害抵抗性の制御因子である OsPti1a は、細胞膜上で複合体を形成している。OsPti1a 複合体の動態について解析したところ、OsPti1a の機能はこの複合体への可逆的な結合による制御ではなく、複体内での相互作用による制御である可能性が示唆された。また、複合体の構成因子候補因子として、細胞膜型プロトンポンプである OSA タンパク質を同定し、遺伝学的な解析により細胞膜型プロトンポンプがエリシター応答における初期反応に関与している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：OsPti1a, which is a negative regulator of defense responses in rice, forms a protein complex at plasma membrane. The dynamics of OsPti1a-associated protein complex was investigated. As a result, it was indicated that OsPti1a functions through protein modification in the complex. Additionally, we identified an Osa protein, which encodes plasma membrane H⁺-ATPase, as a candidate factor included in the protein complex. Our analysis revealed that the Osa is involved in the early response to elicitor treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：植物病理学、イネ、病害抵抗性

1. 研究開始当初の背景

植物が病原体に対して抵抗性を示す潜在能力を持っていることは広く知られている。これまでに病害抵抗性応答の分子機構の解明へ向けて、病害抵抗性制御因子のスクリーニングが精力的に行われ、抵抗性(R)遺伝子をはじめ、病原体の認識に関わる因子の同定が進められてきた。その結果、認識に関わる受容体

タンパク質の構造は植物種を超えて非常に高く保存されていることが明らかとなり、その類似性から下流のシグナル経路も共通していることが示唆された。しかしながら、病原体の認識から抵抗性反応に至るシグナル伝達の分子機構は依然として不明である。

我々は、これまでにイネにおいて OsPti1a が病害抵抗性反応を負に制御する因子である

こと、また OsPti1a は R タンパク質によるシグナル制御に深く関与していることを明らかとしてきた。さらに、OsPti1a が制御因子として機能するためには、細胞膜上で複合体を形成する必要があることを見出した。しかし、OsPti1a により病害抵抗性発動制御の分子機構については不明である。そこで、OsPti1a を含むタンパク複合体の正体を解明するため、OsPti1a と細胞膜上で相互作用する因子を免疫沈降法により精製し、候補因子の一つとして細胞膜プロトンポンプ (H⁺-ATPase) をコードする *Osa* 遺伝子を同定した。

病害抵抗性反応を引き起こす病原体等の成分(エリシター)に対する植物の応答の一つとして、細胞内 pH の変化(培地のアルカリ化)が知られており、この反応に細胞膜プロトンポンプが重要な機能を果たしていることが示唆されている。また、遺伝学的な解析から、シロイヌナズナの細胞膜プロトンポンプである、AHA1/AHA2 は病害抵抗性応答の抑制因子であり、かつ R タンパク質の活性化に重要な RIN4 タンパク質の相互作用因子としても知られており、抵抗性の誘導に関与していることが報告されている。しかしながら、病害抵抗性における細胞膜プロトンポンプの機能およびその役割、制御機構などその正体についてはまだほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

OsPti1a の機能に必須と考えられる膜複合体に着目し、構成候補因子の機能解析を進める。特に、病害抵抗性誘導シグナルに関与していることが強く示唆される、細胞膜プロトンポンプファミリーである *Osa* 遺伝子を中心に解析を進めるとともに、膜複合体構成候補因子について順次解析を進め、OsPti1a による病害抵抗性発動制御の分子機構を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 病害抵抗性の誘導時における、OsPti1a を含む膜複合体の動態について解析するため、イネ種子由来の培養細胞を用いてエリシター処理を行い、病害抵抗性の誘導時における膜複合体の経時的な動態についてゲル濾過法により解析した。

(2) *Osa* 遺伝子はゲノム情報から遺伝子ファミリーを形成していると考えられ、これらの遺伝子間で機能の重複が予測される。しかし、ノックアウト変異体を解析したところ、*Osa* は遺伝子ファミリー間での機能の重複性は見られないことが示唆された。そこで、細胞膜プロトンポンプである OSA が、イネにおいて病害抵抗性の誘導に関与するか解析するため、変異をホモに持つ *osa* 変異体種子から培養細胞を作成し、エリシター応答を解析した。また、*osa* 変異体ならびに *ospti1a* 変異体のそれぞれヘテロ個体同士を交配し、二重変異体を作成した。

(3) 相補試験ならびに過剰発現体の獲得のため、*Osa* 遺伝子をトウモロコシ UBQ プロモーターにつないだコンストラクトを作成し、*osa* ホモ変異体および野生型である日本晴、また *ospti1a* 変異体に形質転換し、エリシター応答ならびに病害抵抗性について解析した。

(4) *Osa* 以外の膜複合体候補因子の同定にむけ、単離されている候補因子について、Yeast two hybrid 法により OsPti1a と相互作用する因子を探索した。

4. 研究成果

病害抵抗性の発動時における OsPti1a を含

む膜複合体の動態について解析した結果、エリシター処理 10 分~180 分後では、OsPti1a 複合体の分子量に変化はみられなかった。*ospti1a* 変異体では、この時間内にエリシター処理に対する生理応答が野生型とは異なるにもかかわらず、複合体の分子量が変わらなかったことは、OsPti1a の機能は複合体への可逆的な結合による制御ではなく、複合体内での相互作用による制御である可能性が考えられた。

osa 変異体培養細胞では、無処理時の培地の pH がそもそも野生型に比べ高い傾向が観察された。このことは OSA の機能欠損により H⁺の細胞外への排出効率が低下しているためと考えられた。一方、エリシター処理による培地のアルカリ化は、*osa* 変異体でも同様に観察された。しかしながら、エリシターに対する感受性は *osa* 変異体で高く、OSA がエリシター応答における初期応答に関与している可能性が強く示唆された。*Osa* 遺伝子を過剰発現させたイネでは、イネいもち病菌に対する抵抗性の程度には差は見られなかった。

OsPti1a と *Osa* の遺伝的相互作用を調べるため、OsPti1a 欠損変異体に *Osa* 遺伝子を過剰させた形質転換体を作成したが、OsPti1a 欠損変異体で見られる自発的な抵抗性反応の誘導に変化は見られなかった。細胞膜型プロトンポンプの活性の制御は転写だけではなく、リン酸化等による転写後制御が重要であることが示されている。そのため、過剰発現だけでは十分な機能の増強には到らない可能性も考えられた。そこで、機能欠損による影響を調べるため、*ospti1a-osa* 二重変異体を作成し、F2 種子を得た。今後、両遺伝子の機能欠損が抵抗性反応に与える影響を解析予定である。

Osa 以外の OsPti1a 複合体候補因子を同定

するため、さらに単離されている複合体候補因子 10 個について、Yeast two hybrid 法により OsPti1a と相互作用する因子を探索したが、直接相互作用するものは得られなかった。

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 Yamaguchi, K., Yamada, K., Ishikawa, K., Yoshimura, S., Hayashi, N., Uchihashi, K., Ishihama, N., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Tsuge, S., Ochiai, H., Tada, Y., Shimamoto, K., Yoshioka, H., Kawasaki, T. “A Receptor-like Cytoplasmic Kinase Targeted by a Plant Pathogen Effector is Directly Phosphorylated by the Chitin Receptor and Mediates Rice Immunity.” *Cell Host Microbe*. 13, 347-357, 2013 (査読有)
- ② Kim, S. H., Oikawa, T., Kyojuka, J., Wong, H. L., Umemura, K., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Kawano, Y., Kawasaki, T., Shimamoto, K. “The bHLH *rac* immunity1 (RAI1) is activated by OsRac1 via OsMAPK3 and OsMAPK6 in rice immunity.” *Plant Cell Physiol.* 53, 740-754, 2012 (査読有)
- ③ Miyao, A., Nakagome, M., Ohnuma, T., Yamagata, H., Kanamori, H., Katayose, Y., Takahashi, A., Matsumoto, T., Hirochika, H. “Molecular spectrum of somaclonal variation in regenerated rice revealed by whole-genome sequencing.” *Plant Cell Physiol.* 53, 256-264, 2012 (査読有)

- ④ Konishi, T., Aohara, T., Igasaki, T., Hayashi, N., Miyazaki, Y., Takahashi, A., Hirochika, H., Iwai, H., Satoh, S., Ishii, T. “Down-regulation of UDP-arabinopyranose mutase reduces the proportion of arabinofuranose present in rice cell walls.” *Phytochemistry* 72, 1962-1968, 2011 (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 高橋章, 瀬尾茂美, 廣近洋彦 「イネ病害抵抗性におけるサリチル酸の関与」 第 54 回日本植物生理学会年会、岡山大学、2013 年 3 月 23 日
- ② 加星光子, 高橋章, 廣近洋彦 「イネ MAMPs 応答性 MYB 遺伝子は病害抵抗性反応を増強する」 第 54 回日本植物生理学会年会、岡山大学、2013 年 3 月 21 日
- ③ 高橋章, 瀬尾茂美, 廣近洋彦 「イネにおける病害応答の発動はサリチル酸の蓄積に依存する」 平成 25 年度日本植物病理学会大会、岐阜大学、2013 年 3 月 29 日
- ④ 加星光子, 高橋章, 廣近洋彦 「イネ MAMPs 応答性 MYB 遺伝子は病害抵抗性反応を増強する」 平成 25 年度日本植物病理学会大会、岐阜大学、2013 年 3 月 29 日
- ⑤ Takahashi A. “Genetic studies of signaling pathways for innate immunity of rice.” :Workshop in XV international Congress of Molecular Plant-Microbe interactions 京都国際会議場、2012 年 7 月 29 日
- ⑥ Kaboshi M., Takahashi A., Hirochika H. “Transcription factors, which connect MAMPs-responsive MAPK cascade to the coordinately-expressed

phenylpropanoid biosynthesis genes.” XV international Congress of Molecular Plant-Microbe interactions 京都国際会議場、2012 年 7 月 30 日

- ⑦ 高橋章, 松井英譲, 瀬尾茂美, 伊藤紀仁, 来須孝光, 朽津和幸, 廣近洋彦 「OsPtila により制御される病害抵抗性シグナル経路の解明」 平成 24 年度日本植物病理学会大会、福岡国際会議場、2012 年 3 月 30 日
- ⑧ 加星光子, 高橋章, 廣近洋彦 「イネ PAMPs 応答性 MAPK カスケードからフェニルプロパノイド合成系に至るシグナル経路の解析」 平成 24 年度日本植物病理学会大会、福岡国際会議場、2012 年 3 月 30 日
- ⑨ 高橋章, 松井英譲, 瀬尾茂美, 廣近洋彦 「OsPtila により制御される病害抵抗性シグナル経路の解明」 第 53 回日本植物生理学会年会、京都産業大、2012 年 3 月 16 日
- ⑩ 加星光子, 高橋章, 廣近洋彦 「イネ PAMPs 応答性 MAPK カスケードからフェニルプロパノイド合成系に至るシグナル経路の解析」 第 53 回日本植物生理学会年会、京都産業大、2012 年 3 月 18 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 章 (TAKAHASHI AKIRA)
独立行政法人農業生物資源研究所
耐病性作物研究開発ユニット
主任研究員
研究者番号 : 20414914