

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5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780048

研究課題名（和文） MAMPs シグナルに関わる新規リン酸化制御因子の解析

研究課題名（英文） Functional analysis of a novel phosphorylation regulator in MAMPs signaling

研究代表者

松井 英謙 (MATSUI HIDENORI)

独立行政法人理化学研究所・植物プロテオミクス研究ユニット・特別研究員

研究者番号：20598833

研究成果の概要（和文）：

植物免疫応答におけるリン酸化シグナルネットワークの解明を目的に、シロイヌナズナにおいて MAMP 処理に伴いリン酸化されるタンパク質群の T-DNA タグラインを単離し、MAMP 処理で生成される活性酸素に着目してスクリーニングを行った。その結果、MAMP 処理で活性酸素生成が変動する 38 遺伝子を同定することに成功した。同定した遺伝子の中には、病原菌に対する抵抗性が変化する因子が含まれていたことから、リン酸化プロテオミクス手法が植物シグナルネットワークの解明の為の強力なツールになることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To identify the phosphorylation signal network in plant immunity, we performed screening of T-DNA insertion lines in Arabidopsis to determine proteins with changed phosphorylation status in response to MAMP treatment as indicated by measurement of reactive oxygen species (ROS) by flg22 treatment. We identified 38 genes that showed abnormal ROS production after flg22 treatment. Additionally, some candidates exhibited the abnormal immune responses against bacterial pathogen infection, suggesting that phosphoproteomic approaches have the potential to identify novel immune signaling components in plants.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：植物プロテオミクス

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物免疫、プロテオミクス、リン酸化、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

植物の免疫システムは大きく二つに分類され、一方は「basal resistance」と呼ばれ、微生物に対して非特異的に発動される抵抗性反応である。この反応は、微生物関連分子パターン (MAMPs: Microbe associated molecular patterns) を植物の受容体 (PRRs: Pattern recognition receptor) が認識することにより発動され、防御遺伝子の発現や、抗菌性物質の蓄積等が誘導される。そのため、

広範囲の病原菌に対する抵抗性に寄与すると考えられている。もう一方は、「R-gene mediated resistance」と呼ばれ、感染性病原体に対して発動される抵抗性反応であり、病原菌の分泌するエフェクターと植物側の R タンパク質の特異的認識機構により規定され、急速な細胞死や、抗菌性物質の蓄積を誘導し、進入した病原体を感染部位に封じ込める。

これまでの研究から植物免疫に関わる複

数の因子が単離、同定され、植物が病原菌を認識するプロセスの理解が深まった。しかしながら、病原菌認識から抵抗性反応に至るシグナル伝達の分子機構が未だ不明であることから、植物免疫シグナルネットワークの解明が求められてきた。本研究では、「basal resistance」を発動するための受容体がキナーゼであることを着目した。

これまでに共同研究者である中神らによって確立された「複数のリン酸化タンパク質を同定する手法」を用いることで、MAMP 処理によってリン酸化が変動する因子群を同定することで、植物免疫シグナルネットワークの解明が試みられた。

その結果、シロイヌナズナの培養細胞を用いて、MAMPs 処理後にリン酸化状態が変動するタンパク質の大規模同定に成功 (569 種類) した。同定した MAMP 応答性リン酸化タンパク質には、植物免疫への寄与が知られている因子も多数同定されていたことから、比較リン酸化プロテオミクス手法による解析がシグナルネットワークの解明に向けて強力なツールになり得ることを示唆する物であった。これら MAMP 応答性リン酸化タンパク質群の機能解析を行うことで、新奇な植物免疫シグナル伝達の解明が期待された。

2. 研究の目的

比較リン酸化プロテオミクス手法により初めて同定された、MAMPs 処理によってリン酸化が変動する一連の因子群の機能解析を行い、植物免疫応答における新奇シグナル伝達因子群の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

同定された MAMP 応答性リン酸化タンパク質に対応する T-DNA tagged line または CRES-T line の単離を行い、スクリーニングの為に基盤を作成した。次に、MAMP 処理により生産される活性酸素 (ROS: Reactive oxygen species) 生成に着目し、MRP 変異体に対して flg22 を処理し、処理に伴い活性酸素を経時的測定することで、ROS 生産に異常を来した変異体 (*ram: ROS abnormal production mutant*) の単離、同定を行った。

単離した変異体については、様々な MAMP 応答 (複数の MAMP に対する活性酸素生産の変動、MAP kinase の活性化、カロースの沈着、遺伝子発現の変動) を解析後、植物病原菌に対する抵抗性に関して検討した。

また、植物免疫応答に寄与する変異体との二重変異体を作成し、二重変異体の表現型を解析することで、植物免疫シグナルにおける *ram* 変異体の機能解析を試みた。

4. 研究成果

比較リン酸化プロテオミクス手法により同定された新奇因子群について、flg22 処理により ROS 生成が変動する因子の同定を試みた。その結果、今回のスクリーニングにおいて 79 遺伝子中 38 遺伝子で ROS 生成に異常が認められた。この結果は、スクリーニングに供した変異体のうち、48% という高い頻度で、活性酸素種生成が変化する変異体を単離できたことを示している。

単離された変異体の一つである *ram1* は一連の MAMP 応答 (活性酸素種の生成、MAPK の活性化、カロースの沈着) が MAMP 処理で強く活性化されたことから、MAMP 応答を負に制御する新奇因子であると考えられた。

そこで、病原菌に対する抵抗性の変化を確認することを目的に、親和性病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) に対する抵抗性を解析した。その結果、*ram1* 変異体は WT より罹病性を示した。MAMP 応答は活性化するにも関わらず、病原性細菌に対してはより罹病性を示すことから、RAM1 タンパク質は病原菌に対して抵抗性を発揮する為の直接的な機能を有している可能性が考えられた。しかしながら、RAM1 は機能未知のタンパク質であることから、現在機能解析に向けて様々なアプローチを行っている。

RAM1 と同様に、本研究で単離、同定した因子の多くが機能未知であった。この結果は、比較リン酸化プロテオミクスを用いた解析が新奇シグナル伝達経路の解析に極めて有用な手法であることを示している。今後の更なる解析により、同定した因子群の植物免疫シグナルにおける役割を明らかにすることによって、新奇な植物免疫シグナルネットワークの解明に繋がることが期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 18 件)

- ①横尾尚平, 天川奈穂, 村田和美, 小島知弥, 松井英譲, 中神弘史, 高橋章, 光原一郎, 加藤新平, 「シロイヌナズナ、タバコおよびイネのイソコリスミン酸合成酵素 (様) タンパク質の比較解析」, 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

②松井英議, 野村有子, 中神弘史, 「MARK1 (MRP for appropriate ROS kinetics)は*Pto* DC3000 への抵抗性を正に制御する」, 平成25年度日本植物病理学会大会, 岐阜大学, 2013年3月28日

③松井英議, 野村有子, 玄康洙, 白須賢, 中神弘史, 「プロテオミクスによる植物免疫制御因子の探索」, 第54回日本植物生理学会年会, 岡山大学津島キャンパス, 2013年3月23日

④玄康洙, 松井英議, 野村有子, 白須賢, 中神弘史, 「MAMP 応答性 ROS 制御因子群「MARK」の同定とその機能解析」, 第54回日本植物生理学会年会, 岡山大学津島キャンパス 2013年3月21日

⑤松井英議, 野村有子, 中神弘史, 「MARK1はMAMP 応答を負に制御するが*Pto* DC3000への抵抗性を正に制御する」, 第54回日本植物生理学会年会, 第54回日本植物生理学会年会, 岡山大学津島キャンパス, 2013年3月21日

⑥松井英議, 野村有子, ジュリアルニ, 中神弘史, 「MAMP 応答性のリン酸化タンパク質「RAM1」は活性酸素種生成を負に制御する」, 植物微生物研究会 第22回研究交流会, 神戸大学, 2012年9月25日

⑦Hidenori Matsui, Yuko Nomura, Hirofumi Nakagami, 「MAMP-responsive phosphoprotein RAM1 negatively regulates ROS production in Arabidopsis」, XV International congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto International Conference center, Kyoto, Japan, July 29th - August 2nd 2012

⑧松井英議, 野村有子, ジュリアルニ, 白須賢, 中神弘史, 「リン酸化プロテオミク

スによる新奇植物免疫シグナリング制御因子の効率的な同定」, 東京都江東区 日本未来科学館, 日本プロテオーム学会2012年大会 日本ヒトプロテオーム機構第10回大会, 2012年7月26-27日

⑨ Hidenori Matsui, Yuko Nomura, Ken Shirasu, Hirofumi Nakagami, 「PHOSPHOPROTEOMICS-BASED SCREENING REVEALED NOVEL COMPONENTS IN MAMP-TRIGGERED IMMUNITY」, 23rd International conference on Arabidopsis Research, The Hofburg Imperial Palace in Vienna, Austria, July 3rd-7th 2012

⑩松井英議, 野村有子, 加藤史子, 白須賢, 中神弘史, 「MAMP 刺激によりリン酸化制御を受ける因子群の機能解析」, 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28-30日

⑪松井英議, 野村有子, 加藤史子, 白須賢, 中神弘史, 「リン酸化プロテオミクス技術を用いたMAMP シグナル制御因子の探索」, 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28-30日

⑫Hidenori Matsui, Yuko Nomura, Fumiko Kato, Ken Shirasu, Hirofumi Nakagami, 「Establishment of phosphoproteomic approaches for plant signaling dissection」, The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, Todaiji Culture Center, Nara, Japan, 2012 March 19th-21th

⑬松井英議, 野村有子, 加藤史子, 白須賢, 中神弘史, 「リン酸化プロテオミクスを用いた植物免疫シグナル因子の同定と機能解析」, 第53回日本植物生理学会年会, 京都産業大学, 2012年3月16-18日

⑭Hidenori Matsui, Yuko Nomura, Fumiko Kato, Ken Shirasu, Hirofumi Nakagami,

「Phosphoproteomic dissection of plant immune signaling」, International Symposium “Strategies of Plants against Global Environmental Change”, Kurashiki, Japan, 2011 December 8th -10th

⑮ Hidenori Matsui, Yuko Nomura, Fumiko Kato, Ken Shirasu, Hirofumi Nakagami, 「Elucidation of plant immune signaling pathways by phosphoproteomic approaches」, 3rd International symposium on frontiers in agriculture proteome research, Tsukuba International Congress Center (EPOCHAL), 2011 November 8th-10th

⑯ 松井英譲, 野村有子, 加藤史子, 白須賢, 中神弘史, 「リン酸化プロテオミクスを用いた新規植物免疫シグナル制御因子の探索」, 植物微生物研究会第21回研究交流会, 岡山大学, 2011年9月20-22日

⑰ Hidenori Matsui, Yuko Nomura, Fumiko Kato, Ken Shirasu, Hirofumi Nakagami, 「Phosphoproteomics-based screening identifies novel components in plant immune signaling network」, Plant Protein Phosphorylation Symposium 2011, The University of Tübingen, Germany 2011, September 14th -16th

⑱ 松井英譲, 野村有子, 加藤史子, 白須賢, 中神弘史, 「植物免疫シグナリングのリン酸化プロテオーム解析」, 日本プロテオーム学会2011年大会, 新潟市 朱鷺メッセ, 2011年7月28-29日

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.csrs.riken.jp/en/labs/ppru/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 英譲 (MATSUI HIDENORI)

独立行政法人理化学研究所・植物プロテオミクス研究ユニット・特別研究員

研究者番号：20598833