

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850034

研究課題名(和文) 耐病性機構における新奇活性酸素シグナル制御因子“RAM1”の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ROS signal regulator "RAM1" in plant defense

研究代表者

松井 英譲 (Matsui, Hidenori)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：20598833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物の耐病性機構の理解に向けて、リン酸化プロテオミクス手法を用いて同定したMAMP応答性リン酸化タンパク質MARK1(RAM1から名称変更)の機能解析を行った。MARK1はMAMP応答に重要な因子であるだけでなく、R-gene mediated resistanceにおける細胞死を制御する因子であることが明らかとなった。そこで、MARK1の分子機能の理解に向けて、MARK1相互作用因子を同定した。mip1変異体も、R-gene mediated resistanceに關与することが示唆された。本研究により、MARK1を介した植物免疫制御機構の一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To identify novel plant immune components, we performed advanced phosphoproteomics approaches and identified the mutant of “MAMP-responsive phosphoprotein for appropriated ROS kinetics 1”. MARK1 plays an important role for proper regulation of MAMP responses, but also functions as a regulator of cell death during R-gene mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. To reveal the molecular function of MARK1 protein, we performed yeast two hybrid assay to identify MARK1 interacting proteins (MIPs). We successfully isolated several MIPs, including mip1 which shows enhanced cell death phenotype, similar to mark1. These data suggest that MARK1-MIP1 interaction may regulate cell death during R-gene mediated resistance and this interaction likely play a role in plant immunity.

研究分野：植物病理学

キーワード：MAMP リン酸化タンパク質 細胞死 抵抗性 R遺伝子

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る。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。この抵抗性は、微生物関連分子パターン (MAMP: microbe-associated molecular pattern) を植物の受容体 (PRR: Pattern recognition receptor) が認識することで発動され、防御遺伝子の発現や抗菌性物質の蓄積を誘導する。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特異的な抵抗性である。病原体が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、感染細胞及びその周辺で急速な細胞死や抗菌性物質の分泌を誘導し、侵入した病原体を感染部位に封じ込める。

近年の解析から、これら二つの免疫システムは、共通した初期応答コンポーネントを利用することが示唆されているが (Plant physiol. 135: 1113-1128. 2004)、その詳細については未だ不明である。この未知の共通したシグナル伝達系の解明は、植物免疫システムの理解に極めて重要である。しかしながら、順遺伝学的手法やトランスクリプトミクスを基盤とした解析では、植物免疫の初期応答、特にリガンドと受容体相互作用直後に機能する因子の同定は難しい。そのため、初期応答に関わる因子は殆ど明らかにされていない。

申請者の所属研究グループは、PRR がキナーゼであることに着目し、リン酸化タンパク質の変動を大規模にモニターすることで下流制御因子を同定できると考え、そのシステムの構築に取り組んできた。その成果として、世界に先駆けて、高感度かつ網羅性の高い植物リン酸化プロテオミクスを可能とした (Mol Syst Biol. 2008;4:193., Plant Physiol. 2010 Jul; 153(3):1161-74)。この最先端システムを用いることで、MAMP 刺激により速やかにリン酸化制御を受ける、植物免疫の制御に関わると期待される新奇因子を多数同定することに成功した (未発表)。MAMP 処理後、3 ~ 10 分で速やかに応答するリン酸化タンパク質は、転写制御以外の情報処理・情報統御により植物免疫の初期応答を制御する因子であると期待される。申請者は、これら同定因子の変異体の解析を進めることで、これまでに MAMP 刺激に対する活性酸素種 (ROS) 生成に異常を示す変異体 (MAMP-responsive phosphoprotein for appropriated ROS kinetics: mark) (ram 変異体から呼称変更) を数多く単離することに成功した (現時点で 38 種)。その 1 つ、

MARK1 は、分子機能が全く未知の因子である。様々な MAMP 刺激によってリン酸化制御を受けることより (未発表)、異なる PRR の下流で機能する鍵因子であると考えられる。興味深いことに mark1 変異体は、MAMP 応答性の ROS バーストに異常を示すのみならず、エフェクター応答時の ROS 生成が量的・空間的に制御できなくなる表現型を示す。ROS は、防御遺伝子の活性化に関わるシグナルとして機能するだけでなく、直接的な殺菌作用、抗菌性タンパク質を誘導するサリチル酸生合成経路の活性化を導くことが知られている。逆に、過剰な ROS 生成は、細胞に有害であることから、厳密な制御がなされていると考えられている。MARK1 は、自身のリン酸化を介して ROS 生成を厳密に制御することで、植物免疫システムの正常な発動に貢献するものと考えられる。

実際に mark1 は、親和性病原性細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) の感染にともない、野生型と比較してより罹病性になる一方で、非親和性病原細菌 *Pto* DC3000 *avrRpm1* の感染に対して過剰な細胞死を誘導するという希有な表現型を示す (図 3)。これは MARK1 が、「Basal resistance」および「R-gene mediated resistance」の両システムを ROS シグナル介して制御する鍵因子であることを示唆している。

2. 研究の目的

これまでに最先端のプロテオミクス手法を用いて、初期応答に関わる複数の MAMP 応答性リン酸化タンパク質を同定した。その一つである、MARK1 は「Basal resistance」および「R-gene mediated resistance」の両システムを ROS シグナル介して制御する鍵因子である可能性が示唆された。そこで、本研究では、新奇リン酸化タンパク質“MARK1”の未知の機能に迫ることで、植物免疫システムの一端的な解明を目指す。

3. 研究の方法

a) MARK1 の機能解析

MARK1 は、そのアミノ酸配列からは分子機能を予測することが困難な、未知のタンパク質である。そこで、植物体レベルでの発現プロファイルや細胞レベルでの局在などの解析を試みた。MARK1 プロモーター (*pMARK1*)::*GUS* を発現する植物体を作成し、発現部位や発現タイミングを解析した。また、細胞レベルでの役割を調べるため、GFP などのタグを付加したタンパク質を植物体で発現させ、細胞内での局在や挙動を解析した。

MAMP 刺激でリン酸化される部位の同定に成功したことから、リン酸化部位のアミノ酸置換変異体を作製し、機能解析に利用した。

b) MARK1 機能の遺伝学的解析

病害応答の ROS 生成や細胞死に重要な役割を果たす因子の変異体 (*sid2*, *rbohD* 等) との二重変異体を作成し、抵抗性における機能を解析した。

c) MARK1 相互作用因子の同定

MARK1 相互作用因子の同定を、Yeast two hybrid 法による相互作用因子の同定を試みた。次に、それらの T-DNA 挿入遺伝子破壊株を単離した。得られた破壊株を用い、*mark1* と関連した表現型を示すか解析した。

4. 研究成果

a) MARK1 の機能解析

pMARK1::MARK1, *pMARK1-MARK1-GFP* を *mark1* 変異体に形質転換し、相補個体を作成した。相補個体は MAMP 応答時の ROS 生成や、*PR1* 遺伝子発現、親和性病原性細菌 *Pto DC3000* に対する抵抗性が、野生型と同程度に回復した。以上の結果は、*mark1* 変異体の表現型は *MARK1* 遺伝子の欠損に起因することを示している。

MAMP 処理で誘導される MARK1 タンパク質のリン酸化部位をアラニン置換 (A) もしくはアスパラギン酸置換 (D) したコンストラクトを *pMARK1* プロモーター制御下で発現するベクターを構築し、*mark1* 変異体に形質転換した。ホモ系統を確立した後、解析に用いた。*pMARK1-MARK1^{SA}* および *pMARK-MARK1^{SD}* 形質転換体は生育不良を示さなかった。本結果は、MARK1 タンパク質のリン酸化の有無が生育に与える影響は低いことを示唆している。現在引き続き、MARK1 タンパク質のリン酸化の意義について解析を進めている。

b) MARK1 機能の遺伝学的解析

mark1 変異体は、MAMP 応答 (*PR1* 遺伝子発現、MAMP 処理時の ROS 生成の増加、MAPK の活性化) がやや亢進する表現型を示す。そこで、これらの表現型にサリチル酸や ROS が与える影響に関して解析するため、サリチル酸合成の鍵遺伝子 *ICS1 (SID2)* の変異体、および、MAMP1 応答時の活性酸素生成の鍵酵素 *NADPH oxidase (rbohD)* の変異体との二重変異体を作成した。

mark1 変異体のやや矮性の表現型は、*mark1sid2*, *mark1rbohD* 二重変異体では相補されなかった。*mark1* 変異体の *PR1* 遺伝子の亢進は *mark1sid2* 二重変異体で抑制された。一方で、MAMP 処理に伴う ROS 生成は、*sid2* 変異体と同様に遅延するものの、ROS 生産量は抑制されなかった。以上の結果から、*mark1* 変異体では、サリチル酸シグナルが亢進している可能性が示唆された。

また、*mark1* 変異体で認められる MAMP 処理時の ROS 生成は、*mark1rbohD* 二重変異体で完全に抑制された。このことから、*mark1* 変異

体における ROS 生成の増加は、RBOHD の制御メカニズムに異常が起きているものと考えられた。

mark1 変異体は、病原性細菌 *Pto DC3000* の噴霧接種に伴い、より罹病性の表現型を示す。*Pto DC3000* 接種時のイオン漏出について測定した結果、*mark1* 変異体は野生型と比較して有意にイオン漏出が増加することを見いだした。この結果は、MARK1 が病原菌接種時に細胞死の負の制御因子として機能する可能性を示唆した。また、*mark1sid2* 二重変異体でイオン漏出は相加的に増加したことから、MARK1 の制御する細胞死の経路はサリチル酸シグナルに非依存的であると考えられた。

そこで、*mark1* 変異体に対して、非親和性病原性細菌 *Pto DC3000 avrRpm1* および *Pto DC3000 avrRps4* の噴霧接種を行った。興味深いことに、*mark1* 変異体は、野生型では細胞死が認められないにもかかわらず、細胞死が亢進する表現型を示した。この細胞死は、*mark1sid2*, *mark1rbohD* 二重変異体でも観察された。このことから、*mark1* 変異体で認められる細胞死は、サリチル酸および ROS シグナルとは独立している可能性が考えられた。

次に、絶対寄生菌である親和性病原性卵菌 *Hyaloperonospora arabidopsidis Noco2 (Hpa Noco2)* の接種を行った。興味深いことに、*mark1* 変異体では *Hpa Noco2* 感染部位で顕著に細胞死が観察された。また、*mark1* 変異体は、野生型と比較して *Hpa Noco2* に対し、より抵抗性を示した。*mark1* 変異体で認められる細胞死は、*Hpa* 感染後の吸器周辺の細胞で観察された。つまり、感染後に *mark1* 変異体では細胞死が亢進することで、*Hpa Noco2* 感染を抑制していると考えられた。

これら *mark1* 変異体で観察される細胞死が R-gene mediated resistance に依存するか確認するため、TIR-NB-LRR 型 R タンパク質の制御因子 *EDS1* の欠損変異体 (*eds1-2 (col)*) との二重変異体を作成した。エフェクターである *AvrRps4* と R タンパク質である *RPS4* をモデル系とし、解析を進めた。

mark1eds1-2(Col) 二重変異体は、*Pto DC3000 avrRps4* 噴霧接種において *mark1* 変異体で認められる細胞死が完全に抑制された。本結果は、*mark1* 変異体で観察される細胞死がエフェクターと R タンパク質の相互作用に起因することを示唆している。

以上の結果から、MARK1 は Basal resistance と R-gene mediated resistance を繋ぐ新奇因子であることが明らかとなった。これまでに Basal resistance と R-gene mediated resistance の関連性については、いくつか報告がなされてきたが、直接的な相互作用については不明なままであった。今後、MARK1 の詳細な解析を進めることで、両者の制御メカニズムの詳細が明らかになると期待される。

c) MARK1 相互作用因子の同定

MARK1 は機能未知のタンパク質をコードする。そこで、MARK1 相互作用因子を同定することで、MARK1 の分子機能に迫った。Yeast two hybrid 法を用いて相互作用因子の探索を行った結果、17 種類の相互作用因子 (MIPs: MARK1-interacting proteins) の同定に成功した。次に、*Nicotiana benthamiana* 植物を用いた一過的発現系を用いて、細胞内共局在を指標とした候補因子の探索を行った。その結果、MIP1 および MIP2 が、MARK1 と共局在を示すことが明らかとなった。そこで、*mip1*、および *mip2* T-DNA 挿入変異体を単離した。*mip1* 変異体に関して、*mark1* 変異体と同様に非親和性細菌 *Pto* DC3000 *avrRpm1* を噴霧接種した結果、*mip1* 変異体も *mark1* 変異体と同様に、細胞死が強く誘導された。本結果は、MIP1 も R-gene mediated resistance を調節する可能性を示唆している。現在、*mip1* 変異体と、植物免疫関連因子の変異体との二重変異体を作成しており、これらの解析を進めることで、今後、MARK1 ならびに MIP1 が制御する植物免疫システムの理解が進むものと期待される。

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 2 件)

Rice immune regulator, OsPti1a, is specifically phosphorylated at the plasma membrane.

Matsui H, Takahashi A, Hirochika H. *Plant Signal Behav.* 2015 Mar 4;10(3):e991569. doi: 10.4161/15592324.2014.991569. 査読有

Plasma membrane localization is essential for *Oryza sativa* Pto-interacting protein 1a-mediated negative regulation of immune signaling in rice.

Matsui H, Fujiwara M, Hamada S, Shimamoto K, Nomura Y, Nakagami H, Takahashi A, Hirochika H.

Plant Physiol. 2014 Sep;166(1):327-36. doi: 10.1104/pp.114.243873. Epub 2014 Jun 23. 査読有

[学会発表](計 23 件)

松井英譲、野村有子、中神弘史 MAMP 応答性リン酸化タンパク質 MARK1 は過敏細胞死を負に調節する 明治大学駿河台キャンパス 東京都 平成 27 年度日本植物病理学会大会 平成 27 年 3 月 29 日

玄 康洙、松井英譲、野村有子、中神弘史 MRPK1 は *Pto* DC3000 への抵抗性を正に制御する 明治大学駿河台キャンパス 東京都 平成 27 年度日本植物病理学会大会 平成 27 年 3 月 29 日

四井いずみ、松井英譲、野村有子、西浜竜一、河内孝之、中神弘史 基部陸上植物ゼニゴケにおけるキチン認識機構 明治大学駿河台キャンパス 東京都 平成 27 年度日本植物病理学会大会 平成 27 年 3 月 29 日

江草真由美、松井英譲、中神弘史、伊福伸介、上中弘典 植物病害防除における高分子キチン・キトサンのナノファイバー化の有効性について 明治大学駿河台キャンパス 東京都 平成 27 年度日本植物病理学会大会 平成 27 年 3 月 30 日

鈴木那奈、松井英譲、中神弘史、高橋章、光原一朗、新井亮一、加藤新平 AtICS1 の顕著な ICS 活性およびベンサミアナタバコにおける高蓄積に必要な領域の同定 明治大学駿河台キャンパス 東京都 平成 27 年度日本植物病理学会大会 平成 27 年 3 月 30 日

松井英譲、野村有子、中神弘史 MARK1 は過敏細胞死を負に調節する因子である 第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学 世田谷キャンパス 平成 27 年 3 月 16 日

玄 康洙、松井英譲、野村有子、中神弘史 MAMP 応答性プロテインキナーゼ MRPK1 の機能解析 第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学 世田谷キャンパス 平成 27 年 3 月 16 日

四井いずみ、松井英譲、野村有子、西浜竜一、河内孝之、中神弘史 基部陸上植物ゼニゴケにおける MAMP 認識機構 第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学 世田谷キャンパス 平成 27 年 3 月 16 日

中神弘史、松井英譲、野村有子 Dead or Alive: early MAMP-responsive phosphoprotein watches hypersensitive cell death induction 第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学 世田谷キャンパス 平成 27 年 3 月 16 日

四井いずみ、松井英譲、野村有子、西浜竜一、河内孝之、中神弘史 MAMP-recognition system in *Marchantia polymorpha* *Marchantia* Workshop 2014 Centennial Hall (百年記念館), Rokkodai Campus, Kobe University 平成 26 年 12 月 9 日

四井いずみ、松井英譲、野村有子、西浜竜一、河内孝之、中神弘史 MAMP-recognition system in *Marchantia polymorpha* *Marchantia* workshop 2014 Centennial Hall (百年記念館), Rokkodai Campus, Kobe University ポスター発表 2014/12/9

四井いずみ、松井英讓、野村有子、西浜竜一、河内孝之、中神弘史 苔類ゼニゴケを用いた MAMP 応答機構の解明 日本植物学会第 78 回大会 明治大学生田キャンパス、東京都 平成 26 年 9 月 13 日

四井いずみ、松井英讓、野村有子、西浜竜一、河内孝之、中神弘史 基部陸上植物ゼニゴケを用いた MAMP 応答機構の分子進化の解明 日本進化学会年大会 第 16 回大阪大会 高槻現代劇場、大阪市 平成 26 年 8 月 21 日

江草真由美、松井英讓、奥田真未、伊福伸介、中神弘史、上中弘典 キチン・キトサンナノファイバーを用いた作物病害防御資材の開発 第 28 回キチン・キトサンシンポジウム 順天堂大学本郷キャンパス・センチュリータワー、東京都 平成 26 年 8 月 7 日~8 日

松井英讓、野村有子、中神弘史 MAMP 応答性リン酸化タンパク質 MARK1 は過敏細胞死を負に調節する 平成 26 年度 植物感染生理談話会 作並温泉 鷹泉閣 岩松旅館、宮城県 2014 年 8 月 7 日

四井いずみ、松井英讓、野村有子、西浜竜一、河内孝之、中神弘史 苔類ゼニゴケを用いた MAMP 応答機構の解明 日本プロテオーム学会 2014 年会 つくば国際会議場、茨城県 2014/7/18

松井英讓、野村有子、中神弘史 MAMP-responsive phosphoprotein MARK1 negatively regulates cell death during pathogen infection in an SA-independent manner XVI International congress on Molecular plant microbe interactions Rhodes, Greece Rhodes, Greece 2014/7/6-10

松井英讓、四井いずみ、西浜竜一、玄康洙、竹林裕美子、野村有子、河内孝之、白須賢、中神弘史 Evolutionary phosphoproteomics of PRR-triggered immunity XVI International congress on Molecular plant microbe interactions Rhodes, Greece 2014/7/6-10

玄 康洙、松井英讓、野村有子、白須賢、中神弘史 MAMP 応答性 ROS 制御因子「MARK32」の機能解析 平成 26 年度日本植物病理学会大会 北海道コンベンションセンター、札幌市 平成 26 年 6 月 2 日

松井英讓、野村有子、中神弘史 MARK1 (MRP for appropriate ROS kinetics 1) は病原菌感染時の細胞死を負に調節する 平成 26 年度日本植物病理学会大会 北海道コ

ンベンションセンター、札幌市 平成 26 年 6 月 2 日

② 四井いずみ、松井英讓、野村有子、西浜竜一、河内孝之、中神弘史 基部陸上植物ゼニゴケを用いた MAMP 応答機構の解明 平成 26 年度日本植物病理学会大会 北海道コンベンションセンター、札幌市平成 26 年 6 月 2 日

② 江草真由美、松井英讓、松井英讓、奥田真未、伊福伸介、中神弘史、上中弘典 キチンナノファイバーのエリクター活性と病害抵抗性誘導能 平成 26 年度日本植物病理学会大会 北海道コンベンションセンター、札幌市 平成 26 年 6 月 2 日

③ Hirofumi Nakagami, Hidenori Matsui, Yuko Nomura, Ken Shirasu MAMP-responsive phosphoprotein MARK1 negatively regulates cell death during pathogen infection 13th international symposium of plant protein phosphorylation University of Missouri, Columbia, Mo. USA 5 月 28 - 30 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: キチンナノファイバーおよび/またはキトサンナノファイバーを用いる植物の病害抵抗性誘導

発明者: 上中弘典、河毛真由美、伊福伸介、中神弘史、松井英讓

権利者: 上中弘典、河毛真由美、伊福伸介、中神弘史、松井英讓

種類: 国際出願

番号: PCT/JP2014/78812, 整理番号 672148, 受付番号 51402231550

出願年月日: 平成 26 年 10 月 29 日

国内外の別: 国外

名称: ナノファイバー化したキチン・キトサンによる植物の病害抵抗性誘導技術

発明者: 上中弘典、江草真由美、伊福伸介、中神弘史、松井英讓

権利者: 上中弘典、江草真由美、伊福伸介、中神弘史、松井英讓

種類: 出願特許

番号: 特願 2013 - 227282

出願年月日: 平成 25 年 10 月 31 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

国立研究開発法人理化学研究所

植物プロテオミクス研究ユニット

http://proteomics.riken.jp/top/top_jp.h

[tml](#)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松井 英議 (MATSUI Hidenori)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研

究センター・特別研究員

研究者番号：20598833