

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05621

研究課題名(和文) 多様な作物種の抵抗性誘導基盤となるサリチル酸シグナル伝達の選択的制御

研究課題名(英文) Selective regulation of salicylic acid signaling for inducing the systemic acquired resistance of various crops

研究代表者

宮川 拓也 (Miyakawa, Takuya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：50596559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：サリチル酸(SA)は植物の免疫応答を制御する植物ホルモンであり、病原菌の感染拡大を防ぐ全身獲得抵抗性(SAR)を誘導する。SAシグナル伝達では、NPRタンパク質がSA受容体として機能し、SA応答性遺伝子の発現を制御する。本研究では、NPRタンパク質及びSA応答性遺伝子の転写調節因子の複合体形成を検証し、NPRタンパク質を介したSAシグナル伝達の制御機構に関する構造生物学研究を実施した。

研究成果の概要(英文)：Salicylic acid (SA) is a plant hormone that regulates the immune response of plants and induces systemic acquired resistance (SAR) to prevent infection of plant pathogens. In SA signaling, NPR proteins function as SA receptors and control the expression of SA responsive genes. In this study, we investigated the complex formation of NPR proteins and the transcription factor for SA responsive genes, and then conducted a structural biology study on the regulation mechanism of SA signaling by NPR proteins.

研究分野：構造生物学

キーワード：植物ホルモン サリチル酸 抵抗性誘導剤 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

サリチル酸 (SA) は植物の免疫応答を制御する植物ホルモン (セカンドメッセンジャー) であり、病原菌の感染によって SA 内生量が上昇すると、感染部位では病原菌を隔離する過敏反応 (HR) が起こり、周囲の細胞では感染拡大の阻止に備えた全身獲得抵抗性 (SAR) が誘導される。SAR を誘導する薬剤「抵抗性誘導剤」は従来の殺菌性農薬と異なり、宿主作物に作用するため薬剤耐性菌が出現せず、持続的かつ効果的な薬剤として利用できる。代表的な抵抗性誘導剤オリザメート (プロベナゾール) は、実に 40 年にわたりイネいもち病の防除等で水稻栽培に欠かせない薬剤である。抵抗性誘導剤のこうした優れた特徴から、他の作物種と土壤病害を含む広範な病害への適用が望まれている。しかしながら、既存の抵抗性誘導剤の作用点は不明である場合が多く、また SAR 誘導の基礎をなす分子機構の理解は不十分である。

SA シグナル伝達では、シロイヌナズナの 3 種類の NPR タンパク質 NPR1, NPR3, NPR4 が SA 受容体として機能し、SA 応答性遺伝子の発現を制御することが提案されている (図 1)。

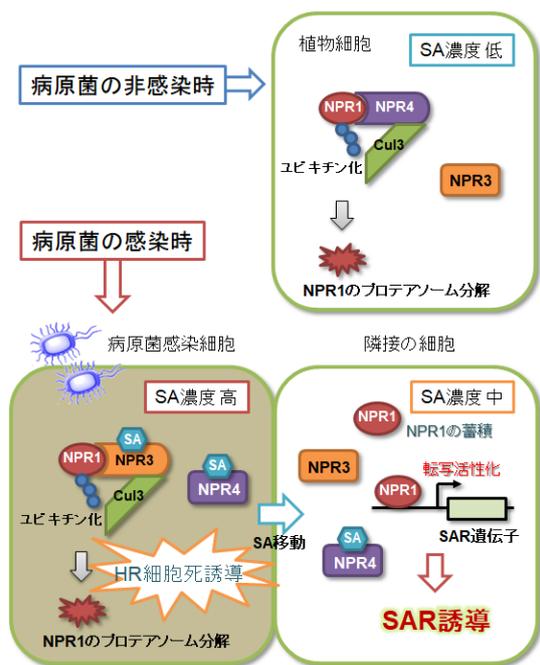


図 1 : SA シグナル伝達の制御モデル

このモデルにおいて、SA は作用点となる受容体 NPR3 及び NPR4 に対して異なる親和性で結合し、NPR1 に対する NPR3 と NPR4 の相互作用を真逆に調節する。このモデルは SA がその内生量に応じて HR 細胞死と SAR を切り分けて誘導することを説明する一方、複数の NPR タンパク質が機能分担して SA シグナル伝達を複雑に制御していることを示唆している。異種の NPR タンパク質における SA の選択的作用とそれに依存した機能変換の分子機構を理解することは、HR 細胞死を回

避して SAR を効果的に誘導するための薬剤開発等への応用につながる事が期待される。

2. 研究の目的

NPR タンパク質 NPR1, NPR3, NPR4 は共に BTB ドメイン (Cul3 E3 ユビキチンリガーゼ結合部位) と Ankyrin リピート (多様な分子間相互作用に関与) からなり、構造の類似性が高いことが予想されるが、SA シグナル伝達の制御においては異なる機能を分担している。本研究では、NPR1, NPR3, NPR4 が形成する各種複合体を検証し、NPR タンパク質を介した SA シグナル伝達の制御機構を構造生物学的手法により解析する。また、植物ホルモンを介した他の宿主植物-寄生生物間の応答機構についても構造生物学的な検討を行う。

3. 研究の方法

(1) SA シグナル伝達制御モデルの生化学的解析

大腸菌の異種タンパク質発現系を用いて NPR タンパク質を生産し、各種クロマトグラフィ法により精製する。プルダウンアッセイ、ゲルシフトアッセイ、等温滴定カロリメトリー (ITC) 等の相互作用アッセイ法により、SA の存在・非存在下での複合体形成を解析し、*in vitro* で制御モデルを検証する。

(2) SA 受容体複合体の構造解析

安定かつ単分散性を示す各種複合体を調製して Sparse Matrix 法で結晶化を行い、X 線結晶構造解析法により立体構造を解析する。

4. 研究成果

(1) SA シグナル伝達制御モデルの生化学的解析

NPR1 は SA 非存在下で NPR4 と相互作用し、SA 存在下で NPR3 と相互作用することで SA シグナル伝達を制御するモデルが提案されている。各 NPR タンパク質は大腸菌の異種発現系により可溶性タンパク質として得られ、精製した NPR タンパク質の SEC 解析を行った結果、NPR タンパク質はいずれも単量体と多量体の平衡状態であった。NPR タンパク質と同様に Ankyrin リピートをもつ BSS1/BOP1 は細胞内における会合・離散によってブラシノステロイド (BR) シグナル伝達を制御することから、NPR タンパク質の多量体形成もまた機能調節に関連する可能性が考えられる。

異種の NPR タンパク質における相互作用を検討したところ、NPR タンパク質間の相互作用は SA 非依存的であった。一方、NPR タンパク質の単量体と多量体を分取して、SA 応答性遺伝子の制御に関わる TGA 転写因子との相互作用を解析した結果、NPR タンパク質は単量体の状態で TGA 転写因子と複合体を形成できることが示された。また、TGA 転写因子の DNA に対する結合能は NPR タンパ

ク質及び SA により影響を受けなかった。植物細胞内において NPR1 のシステイン (Cys) 残基は SA 依存的に酸化されることが知られている。このため、酸化模倣変異体を調製して TGA 転写因子との相互作用を検討し、特定の Cys 残基の酸化模倣変異が転写因子との相互作用に影響することが示唆された。以上の知見より、SA シグナル伝達の転写調節の機構として、NPR タンパク質-TGA 転写因子間の SA 依存的な相互作用様式の変化が考えられる。

(2) SA 受容体複合体の構造解析

NPR タンパク質と本研究で形成が確認できた各種複合体の構造解析のために、主に NPR タンパク質の性状を変異導入・タグ融合により改善させることを検討し、結晶化スクリーニングを行った。具体的には、NPR タンパク質は分子内に 10 以上の Cys 残基をもち、これらが非特異的な分子間ジスルフィド結合形成による NPR タンパク質の会合性の要因と考えられたため、各 Cys 残基の変異体を検討した。また、結晶化促進のための融合タグを多様なリンカー配列を介して融合させた。これらの検討により NPR タンパク質の性状を改善した結果、SA 存在下で NPR4 の単独結晶及び NPR1-TGA2-DNA 複合体結晶を取得した。期間内では、X 線回折実験によって構造解析に十分な分解能の X 線回折データを収集するには至らなかったが、SA シグナル伝達の中心的な制御機構解明を進展させるための基礎データとして今後も活用していく。

(3) 植物ホルモンを介した宿主植物-寄生物間の応答機構の構造生物学的解析

宿主植物-寄生物のコミュニケーション物質として働くストリゴラクトン (SL) シグナル伝達を検討した。宿主植物の根から分泌される SL に応答して発芽する寄生植物 *Striga hermonthica* の SL 受容体として複数の HTL タンパク質が存在する。HTL タンパク質はアミノ酸配列から 3 つのクレードに分類されているため、各クレードの HTL タンパク質を調製して解析した。これにより、SL と植物の発芽誘導活性を示す他のブテノライド化合物に対する各クレードのリガンド結合性を明らかにした。また、X 線結晶構造解析により決定した各クレードの HTL タンパク質の立体構造を比較解析することにより、リガンド結合性の違いを規定するアミノ酸残基の進化的置換位置を決定した。これらの知見は、HTL タンパク質の制御を介して寄生植物の防除に機能する薬剤等の設計に役立つことが期待される。

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 12 件)

- ① Takeuchi J, Jiang K, Hirabayashi K, Imamura Y, Wu Y, Xu Y, Miyakawa T, Nakamura H, Tanokura M, Asami T. Rationally designed strigolactone analogs as antagonists of the D14 receptor. *Plant Cell Physiol* in press. 査読有
- ② Shojima T, Hou F, Takahashi Y, Matsumura Y, Okai M, Nakamura A, Mizuno K, Inaba K, Kojima M, Miyakawa T, Tanokura M. Crystal structure of a Ca²⁺-dependent regulator of flagellar motility reveals the open-closed structural transition. *Sci Rep* 8: 2014 (2018). 査読有
- ③ Kato Y, Miyakawa T, Tanokura M. Overview of the mechanism of cytoskeletal motors based on structure. *Biophys Rev* 10: 571-581 (2018). 査読有
- ④ Qin HM, Miyakawa T, Inoue A, Nakamura A, Nishiyama R, Ojima T, Tanokura M. Laminarinase from *Flavobacterium* sp. reveals the structural basis of thermostability and substrate specificity. *Sci Rep* 7: 11425 (2017). 査読有
- ⑤ Xu Y, Liu L, Nakamura A, Someya S, Miyakawa T, Tanokura M. Studies on the regulatory mechanism of isocitrate dehydrogenase 2 using acetylation mimics. *Sci Rep* 7: 9785 (2017). 査読有
- ⑥ Qin HM, Miyakawa T, Inoue A, Nishiyama R, Nakamura A, Asano A, Sawano Y, Ojima T, Tanokura M. Structure and polymannuronate specificity of a eukaryotic member of polysaccharide lyase family 14. *J Biol Chem* 292: 2182-2190 (2017). 査読有
- ⑦ Shin N, Hanaoka K, Piao W, Miyakawa T, Fujisawa T, Takeuchi S, Takahashi S, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Tahara T, Tanokura M, Nagano T, Urano Y. Development of an azoreductase-based reporter system with synthetic fluorogenic substrates. *ACS Chem Biol*, 12: 558-563 (2017). 査読有
- ⑧ Miyakawa T, Kumazawa A, Fuke Y, Noshita T, Miyauchi Y, Okada M, Tanokura M. Preparation of the extracellular domain of recombinant human Toll-like receptor 6. *Protein J*, 36: 28-35 (2017). 査読有
- ⑨ Xu Y, Miyakawa T, Nakamura H, Nakamura A, Imamura Y, Asami T, Tanokura M. Structural basis of unique ligand specificity of KAI2-like protein from parasitic weed *Striga hermonthica*. *Sci Rep* 6: 31386 (2016). 査読有
- ⑩ Sugi H, Chaen S, Akimoto T, Minoda H, Miyakawa T, Miyauchi Y, Tanokura M, Sugiura S. Electron microscopic recording of myosin head power stroke in hydrated myosin filaments. *Sci Rep* 5: 15700 (2015). 査読有

- ⑪ Guan LJ, Ohtsuka J, Okai M, Miyakawa T, Mase T, Zhi Y, Hou F, Ito N, Iwasaki A, Yasohara Y, Tanokura M. A new target region for changing the substrate specificity of amine transaminases. *Sci Rep* 5: 10753 (2015). 査読有
- ⑫ Hou F, Miyakawa T, Kitamura N, Takeuchi M, Park SB, Kishino S, Ogawa J, Tanokura M. Structure and reaction mechanism of a novel enone reductase. *FEBS J* 282: 1526–1537 (2015). 査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 野崎翔平, 宮川拓也, 浅見忠男, 中野雄司, 田之倉優. ブラシノステロイド情報伝達におけるマスター転写因子の DNA 結合特異性の構造基盤. 日本農芸化学会 2018 年度大会. 2018 年 3 月 17 日. 名城大学 (名古屋)
- ② 徐玉群, 宮川拓也, 劉凌ウエン, 中村顕, 染谷慎一, 田之倉優. アセチル化模倣型変異体を用いた IDH2 の活性調節機構の構造学的解析. 2018 年 3 月 17 日. 名城大学 (名古屋)
- ③ 石玄, 宮川拓也, 中村顕, 侯峰, 日比慎, 小川順, 田之倉優. 構造情報に基づく 4-HIL 合成酵素の立体選択性の制御. 第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会. 2016 年 9 月 5 日. 名古屋市立大学 (名古屋)
- ④ 宮川拓也. 植物のストレス応答・生長制御に関する構造生物学的研究. 2015 年 6 月 20 日. 東京大学 (東京)

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 拓也 (MIYAKAWA, Takuya)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
特任准教授
研究者番号：50596559

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし