

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(S)

研究期間：2007～2011

課題番号：19678001

研究課題名（和文） 植物における免疫活性化機構と病原体による免疫抑制化機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of plant immunity and its suppression by pathogens

研究代表者

白須 賢 (SHIRASU KEN)

独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究グループ・グループディレクター

研究者番号：20425630

研究成果の概要（和文）：

植物の自然免疫に必要な植物免疫シャペロン複合体のコア構造を X 線結晶解析で明らかにした。またジャガイモ疫病エフェクタータンパク質の立体構造を明らかにした。さらに植物免疫に関与するタンパク質の探索を広くおこない、特に発現解析をベースにした逆遺伝学的解析や機能発現スクリーニングなどから、U-box タイプの E3 ユビキチンリガーゼや ATG 遺伝子が植物免疫を負に制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We determined crystal structure of the chaperone complex important for plant immunity. The structure of an effector from potato blight disease was also determined. Various screenings, such as reverse genetics and functional assays, revealed that U-box type E3 ubiquitin ligases and autophagy related proteins are negative regulators for plant immunity. .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008 年度	30,000,000	9,000,000	39,000,000
2009 年度	21,100,000	6,330,000	27,430,000
2010 年度	18,800,000	5,640,000	24,440,000
2011 年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
総計	88,100,000	26,430,000	114,530,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：遺伝子、ゲノム、シグナル伝達、植物、エフェクター、構造解析、抵抗性タンパク質、ユビキチン、シャペロン

1. 研究開始当初の背景

植物は PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) と総称される病原体が共通に持つ物質(鞭毛蛋白質、細胞壁構成因

子等)を感知することで病原体の接触を認識し、basal defense と呼ばれる防御反応を誘導する。しかし、植物病原菌は感染過程において植物細胞内にエフェクターを多数注入し、この basal defense の誘導機構を攪乱、抑制する。植物は病原菌のエフェクターを認

識する R 蛋白質を持ち、basal defense よりも急速で強力な防御反応である過敏反応を誘導する。過敏反応はイオンチャネルの活性化、活性酸素種生成、防御関連遺伝子の発現、抗菌性物質の蓄積といった応答が basal defense よりも強く起こるのに加え、感染部位の局所的プログラム細胞死が急速に誘導される点が特徴で、これにより病原菌を感染部位に閉じ込め、その拡散と増殖を阻害する。こうした研究は国内外でこの十年ほどのあいだに精力的に進められ、この機能に必要な遺伝子が数多く単離されている。しかしながら、これらの遺伝子の産物であるタンパク質の機能は不明なものがほとんどであり、生化学的な免疫活性化機構と病原体による免疫抑制化機構は依然として遺伝学的な解釈（必要か必要でないか、あるいはアミノ酸配列から予想される機能の推測）にとどまっていた。

2. 研究の目的

本研究ではタンパク質の大規模解析ツールおよびゲノム解析ツールを整備して、植物免疫シグナル伝達系の重要タンパク質、及びその複合体の同定そしてその構造決定をし、その制御機構の分子メカニズムを明らかにすることを主目的とする。候補タンパク質として、植物免疫シャペロン複合体、や病原体由来のエフェクタータンパク質の構造を決定し、その免疫抑制機能を明らかにする。

3. 研究の方法

ゲノム情報を駆使した逆遺伝学的機能解析やタンパク質相互作用を利用したプロテオーム的タンパク質同定技術を用いて、新規の植物免疫シグナル伝達系の重要タンパク質や複合体を同定し、ハイスループットの可溶化タンパク質スクリーニングで構造解析用のタンパク質候補を絞り込む。さらに NMR や X 線結晶解析をもちいて構造を決定する。また構造をベースに変異体を作成し、その生物学的、生化学的機能を解析する。

4. 研究成果

RAR1、SGT1、HSP90 からなる植物免疫シャペロン複合体の X 線結晶解析をおこない、その構造は RAR1、SGT1、HSP90 の二量体ずつの六量体であることを明らかにした。この構造から RAR1 と SGT1 がともに協調して HSP90 の二量体を開いた形を維持し、免疫レセプターである NLR タンパク質をシャペロン複合体へ運び込み、安定的に維持することが明らかになった。SGT1-HSP90 はヒトの自然免疫レセプターに重要であることがわかってきていること

から、この構造解析がヒトの免疫シグナル研究にも大きく貢献すると考えられる。

また本研究によって構築されたハイスループット解析技術をもちいて 85 以上のエフェクターの可溶化テストを試み、そのうちジャガイモ疫病エフェクター AVR3a のホモログである PcAVR3a の構造を NMR 解析によって決定した。さらに、この構造をベースに機能がある程度解明されている AVR3a の構造をモデル化した。

また、構造データベースから構造ホモログを探し AVR3a の機能を推定した。この解析により AVR3a は膜タンパク質ターゲティングに重要な ENTH ドメインと部分的に相同性があることがわかった。相同性がある部分は正に荷電を帯びた領域であり phosphatidyl inositol biphosphate と結合する。そこで AVR3a のリン脂質へ結合能を調べた結果、AVR3a は phosphatidyl inositol mono-phosphate と特異的に結合することが明らかになり AVR3a はリン脂質と結合することによってその病原性機能を発現していると考えられる。ジャガイモ疫病菌が属する卵菌類が生産するエフェクターの機能は未定であり、本研究は世界で初めてその構造の決定した意義は大きい。AVR3a はマラリア原虫が分泌するエフェクターにみられる RXLR モチーフをもつ。本研究は植物病原体の研究だけでなく、ヒトの病原体研究に大きく影響を与えるであろうと期待される。

構造解析を行うタンパク質群のプールを広げるために、シロイヌナズナにおける植物免疫に関与するタンパク質の探索を広く行った。特に発現解析をベースにした逆遺伝学的解析や機能発現スクリーニングなどから、U-box タイプの E3 ユビキチンリガーゼや ATG 遺伝子が植物免疫を負に制御していることを明らかにした。また、岡山生物科学研究所の鳴坂らとともに炭疽病、青枯れ病、トマト細菌病の三種の異なる病原体に対する抵抗性はゲノム上に隣接する二種の抵抗性遺伝子 RRS1 と RPS4 によるものであることを突き止めた。現在はこれらのタンパク質群の構造解析を始めている。

さらに構造解析を行うタンパク質のプールを広げるために新規病原体システムの開発を始めた。ウイルス、細菌、卵菌、カビなどはすでによく研究されているため、病原体としての植物、つまりは寄生植物に対する抵抗性のシステム開発を試みた。対象はアフリカで問題となっている *Striga hermonthica* に絞リイネに対する感染系を立ち上げた。理研の山口らとの共同研究により、脇芽の形成を負に制御する新規のホルモンであるストリ

ゴラクトンの合成と認識に関与するタンパク質群が *Striga* の感染性に関与することが明らかにした。また *Striga* のゲノム情報はいっさいないため、自ら EST のデータベースを立ち上げた。

タンパク質解析ツールとしては、植物免疫関連タンパク質および病原体由来エフェクターの結合するタンパク質を同定するために、慶応義塾大学の石濱らとともに高感度質量分析機 Orbi-Trap を用いたタンパク質同定技術を開発した。この方法を用いてシロイヌナズナおよびイネのリン酸化プロテオームを解析し、グローバルスケールでのリン酸化タンパク質の同定に成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

- ① Nakagami, H., Sugiyama, N., Ishihama, Y., and Shirasu, K. Shotguns in the front line: Phosphoproteomics in plants. *Plant Cell Physiol.* 53: 118-124 (2012) 査読：有
- ② Win, J., Krasileva, K. V., Kamoun, S., Shirasu, K. Staskawicz, B. J., Banfield, M. J. Sequence divergent RXLR effectors share a structural fold conserved across plant pathogenic oomycete species. *PLoS Pathogens* 8: e1002400 (2012) 査読：有
- ③ Kadota, Y. and Shirasu, K. The HSP90 complex of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823: 689-697(2012) 査読：有
- ④ Yaeno, T., Li, H., Chaparro-Garcia, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Kamoun, S., and Shirasu, K. Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 14682-14687(2011) 査読：有
- ⑤ Ishida, J.K., Yoshida, S., Ito, M., Namba, S. and Shirasu, K. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *PLoS One* 6: e25802(2011) 査読：有
- ⑥ Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, H., Yaeno, T., Shirasu, K. Yao, H. McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K., Kamiya, Y., Kasahara, H. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2012) 査読：有
- ⑦ Zhang M.*, Kadota Y.*, Prodromou C., Shirasu K.#, and Pearl L. H.# Structural Basis for Assembly of Hsp90-Sgt1-CHORD Protein Complexes: Implications for Chaperoning of NLR Innate Immunity Receptors. *Molecular Cell* 39:269-281(2010) *These authors contributed equally to this work. #Co-corresponding authors. 査読：有
- ⑧ Yoshida S., Maruyama S., Nozaki H., and Shirasu K. Horizontal Gene Transfer by the Parasitic Plant *Striga hermonthica*. *Science* 328:1128(2010) 査読：有
- ⑨ Yoshida S., Ishida K J., Kamal M N., Ali M A, Namba S. and Shirasu K. A full-length enriched cDNA library and expressed sequence tag analysis of the parasitic weed, *Striga hermonthica*. *BMC Plant Biology.* 10:55(2010) 査読：有
- ⑩ Nakagami H.*, Sugiyama N.*, Mochida K., Daudi A., Yoshida Y., Toyoda T., Tomita M., Ishihama Y. and Shirasu K. Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiol.* 153:1161-1174(2010) *These authors contributed equally to this work. 査読：有
- ⑪ Trujillo M. and Shirasu K. Ubiquitination in plant immunity. *Curr. Opin. in Plant Biol.* 13:402-408(2010) 査読：有
- ⑫ Kadota Y., Shirasu K. and Guerois R. NLR sensors meet at the SGT1HSP90 crossroad. *Trends in Biochem. Sci.* 35:199-206(2010) (Co-corresponding author) 査読：有
- ⑬ Yoshimoto K., Jikumaru Y., Kamiya Y., Kusano M., Consonni C., Panstruga R., Ohsumi Y. and Shirasu K. Autophagy

Negatively Regulates Cell Death by Controlling NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling during Senescence and the Innate Immune Response in Arabidopsis. Plant Cell. 60:218-226 (2009) 査読：有

- ⑭ Narusaka M., Shirasu K., Noutoshi Y., Kubo Y., Shiraishi T., Iwabuchi M. and Narusaka Y. RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. Plant J. 60:218-226 (2009) 査読：有
- ⑮ Yoshida, S. and Shirasu, K. Multiple layers of incompatibility to the parasitic witchweed, *Striga hermonthica*. New Phytologist 183(1):180-189(2009) 査読：有
- ⑯ Shirasu, K. The HSP90-SGT1 Chaperone Complex for NLR Immune Sensors. Annual Review of Plant Biology 60:139-164 (2009) 査読：有
- ⑰ Kadota, Y., Amigues, B., Ducassou, L., Madaoui, H., Ochsenbein, F., Guerois, R. and Shirasu, K. Structural and functional analysis of SGT1-HSP90 core complex required for innate immunity in plants. EMBO reports 9:1209-1215(2008) 査読：有
- ⑱ Zhang, M., Boter, M., Li, K., Kadota, Y., Panaretou, B., Prodromou, C., Shirasu, K. and Pearl, L. Structural and functional coupling of Hsp90- and Sgt1-centred multi-protein complexes. EMBO J. 27:2789-2798(2008) (Co-corresponding author) 査読：有
- ⑲ Trujillo, M., Ichimura, K., Casais, C. and Shirasu, K. Negative regulation of PAMP-triggered immunity by E3 ubiquitin ligase triplet in Arabidopsis. Current Biology 18:1396-1401(2008) 査読：有
- ⑳ Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kyojuka, J. and Yamaguchi, S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. Nature 455:195-200. (2008) 査読：有
- ㉑ Sugiyama, N.*, Nakagami, H.*, Mochida, K., Daudi, A., Tomita, M., Shirasu, K.# and Ishihama, Y.# Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis. Molecular Systems Biology 4:193 PubMed(2008) *These authors contributed equally to this work. #Co-corresponding authors. 査読：有

[学会発表] (計 19 件)

国際学会

- ① Yoshida, S., Ishida, J., Shirasu, K. Genomic-scale analysis of the parasitic plants-Towards understanding of the plant parasitism Plant Genomes & Biotechnology: From Genes To Networks New York USA, 1 Dec. 2011
- ② Shirasu, K. Towards understanding the parasitism of *Striga hermonthica*. 2011 International Plant Pathogenomics Conference Shenzhen China, 25 Jan. 2011
- ③ Shirasu, K. A large scale molecular analysis of the parasitic plant *Striga hermonthica*. International Symposium on Biodiversity Sciences (ISBDS2010) "Genome, Evolution and Environment" Nagoya Japan, 2 Aug. 2010
- ④ Yoshimoto, K., Osumi, Y., Shirasu, K. Plant autophagy negatively regulates cell death by controlling salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response. 21st International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2010) Yokohama Japan, 7 Jun. 2010
- ⑤ Shirasu, K. Towards understanding the parasitism of *Striga hermonthica* Crop Functional Genomics 2010 Jeju Korea, 15 Apr. 2010
- ⑥ Saska, I., Noutoshi, Y., Shirasu, K. Unravelling plant immunity signalling pathways with small molecules. Keystone Symposia: Receptors and Signaling in Plant Development and Biotic Interactions. Tahoe City USA, 14-19 Mar. 2010

- ⑦ Kadota, Y, Zhang, M, Guerois, R, Prodromou, C, Pearl, L, Shirasu, K. Structural and functional analysis of the SGT1-RAR1-HSP90 complex required for plant immunity IS-MPMI 2009 XIV International Congress Quebec City Canada, 21 Jul. 2009
- ⑧ Zhang, M, Boter, M, Li, K, Kadota, Y, Panaretou, B, Prodromou, C, Shirasu, K., Pearl, L. Structure and Function of the N-terminal Domain of Hsp90 in Complex with the CS-domain of Sgt1. 4th International Conference on The Hsp90 Chaperone Machine Bavaria Germany, 3 Oct. 2008
- ⑨ Yoshimoto, K, Ohsumi, Y, Shirasu, K. Plant autophagy negatively regulates senescence by eliminating salicylic acid signaling. Gordon Research Conferences on Plant Senescence South Hadley USA, 15-20 Jun. 2008
- ⑩ Kadota, Y, Boter, M, Zhang, M, Amigues, B, Prodromou, C, Pearl, L, Guerois, R, Shirasu, K. Structural and functional analysis of RAR1-SGT1-HSP90 complex. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology Keystone USA, 10-15 Feb. 2008

国内学会

- ① 吉田 聡子, Ishida Juliane, Wafula Eric, dePamphilis Claude, 白須 賢. ハマウツボ科寄生植物のトランスクリプトーム解析. 第 53 回日本植物生理学会年会 京都市 日本 2012 年 3 月 16 日
- ② 八丈野 孝, 李 華, Chaparro-Garcia Angela, Schornack Sebastian, 小柴 生造, 渡部 暁, 木川 隆則, Kamoun Sophien, 白須 賢. ジャガイモ疫病菌が分泌する RXLR エフェクター AVR3a の病原性機能にはホスファチジルイノシトールリン酸との結合が必要である. 第 53 回日本植物生理学会年会 京都市 日本 2012 年 3 月 16 日
- ③ 白須 賢. 植物免疫関連タンパク質の構造機能解析. 第 84 回日本生化学会大会 京都 日本 2011 年 9 月 23 日
- ④ 吉本 光希, 大隅 良典, 白須 賢. オートファジー能欠損シロイヌナズナにお

けるプログラム細胞死促進の原因は過剰なサリチル酸シグナリングである. 平成 22 年度日本植物病理学会大会 京都 日本 2010 年 4 月 20 日

- ⑤ 白須 賢. 修飾されたタンパク質の解析技術 (リン酸化). 第 142 回農林交流センターワークショップ つくば 日本 2009 年 11 月 19 日
- ⑥ 八丈野 孝, 門田 康弘, 五島 美絵, 大沢 登, 半田 徳子, 白水 美香子, 横山 茂之, 白須 賢. ハイスループット無細胞タンパク質発現系を用いた病害抵抗性関連タンパク質の立体構造解析. 平成 21 年度日本植物病理学会大会 山形 日本 2009 年 3 月 27-28 日
- ⑦ 能年 義輝, 白須 賢. ケミカルバイオロジーによるシロイヌナズナ過敏感細胞死制御機構の解明. 第 50 回日本植物生理学会年会 名古屋 日本 2009 年 3 月 21-24 日
- ⑧ 八丈野 孝, 門田 康弘, 五島 美絵, 大沢 登, 半田 徳子, 白水 美香子, 横山 茂之, 白須 賢. ハイスループット無細胞発現系を用いた病害抵抗性関連タンパク質の立体構造解析. 第 50 回日本植物生理学会年会 名古屋 日本 2009 年 3 月 21-24 日
- ⑨ 門田 康弘, Boter Marta, Zhang Minghao, Amigues Beatrice, Prodromou Chrisostomos, Pearl Laurence, Guerois Raphael, 白須 賢. 動植物共通の免疫レセプターの安定化に必須な SGT1-HSP90 複合体の立体構造及び機能解析. 第 50 回日本植物生理学会年会 名古屋 日本 2009 年 3 月 21 日

[図書] (計 3 件)

- ① 白須 賢. 文永堂出版 "相互認識遺伝子とその産物" 植物病理学, (2010) pp148-153
- ② Takahashi, F, Ichimura, K., Shinozaki, K., and Shirasu, K. Wiley-Blackwell. Plant Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Signaling Crosstalk, In "Signal Crosstalk in Plant Stress Responses" Keiko Yoshioka and Kazuo Shinozaki eds: (2009) pp.23-38

- ③ 白須 賢, 朝倉書店 "植物免疫, 防御" 植物の百科事典, (2009) pp32-33

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

- ① 名称: 複数の病害に対して抵抗性を示す植物及びその作出法
発明者: 鳴坂義弘、鳴坂真理、白須賢
権利者: 岡山県、(独) 理化学研究所
種類: 国際出願
番号: IBPF09-510W0
出願年月日: 2009 年 7 月 29 日
国内外の別: 海外
- ② 名称: 植物病害抵抗性誘導剤
発明者: 能年義輝、白須賢
権利者: (独) 理化学研究所
種類: 国際出願
番号: PH-3949-PCT
出願年月日: 2009 年 3 月 27 日
国内外の別: 海外
- ③ 名称: 複数の病害に対して抵抗性を示す植物及びその作出法
発明者: 鳴坂義弘、鳴坂真理、白須賢
権利者: 岡山県、(独) 理化学研究所
種類: 特許願
番号: 2008-198517
出願年月日: 2008 年 7 月 31 日
国内外の別: 国内
- ④ 名称: 植物病害抵抗性誘導剤
発明者: 能年義輝、白須賢
権利者: (独) 理化学研究所
種類: 特許願
番号: 2008-88491
出願年月日: 2008 年 3 月 28 日
国内外の別: 国内

[その他]

新聞報道

- ① Plant Cell (2009) について: 科学新聞 (2009. 10. 16) 、 日経産業新聞 (2009. 9. 25)
- ② Molecular Cell (2009) について: 科学新聞 (2010. 8. 6) 、 日刊工業新聞 (2010. 7. 30)
- ③ Plant Physiol. (2010) について: 日経産業新聞 (2010. 7. 29) 、 化学工業日報 (2010. 7. 12)

- ④ Science (2010) について: 日経産業新聞 (2010. 6. 3) 、 化学工業日報 (2010. 5. 28)

ホームページ等

<http://ksg.psc.riken.jp/>
<http://ksg.psc.riken.jp/index.en.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白須 賢 (SHIRASU KEN)
独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究グループ・グループディレクター
研究者番号: 20425630