

機関番号：14603

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780036

研究課題名 (和文) OsRac1 複合体を介した植物免疫応答のプロテオーム解析

研究課題名 (英文) Proteome analysis of plant innate immunity mediated by OsRac1 complex

研究代表者

藤原 正幸 (FUJIWARA MASAYUKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任助教

研究者番号：70403350

研究成果の概要 (和文)：イネに多大な被害をもたらす、いもち病、このいもち病菌に対する抵抗性を発揮するための重要な制御因子である OsRac1 タンパク質を生化学的手法により解析した。イネから抽出した全タンパク質をゲルろ過法により、タンパク質のサイズに従って分離した結果、OsRac1 は非常に大きな複合体を形成していることが明らかになった。また、この複合体が病原体からの刺激により大きさを変化させることも明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：It has previously been shown that OsRac1 is involved in defense response for infecting of rice blast fungus. In this work, I analyzed OsRac1 by using biochemical techniques. The analysis of gel filtration indicated that OsRac1 formed complex(es) at very high molecular range. Furthermore, it was shown that this complex contained OsRac1 was changed molecular size by stimulus of pathogen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：植物病理

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物・病原体相互作用、プロテオーム、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

イネは我が国における主要作物であり、その防除においてはさまざまな研究がなされている。

イネの病害応答において G タンパク質 OsRac1 が重要な制御因子として機能していることは知られていた。当時、足場タンパク質として知られる RACK1、シャペロンタンパク質である Hsp90 と Hsp70、そのコシャペロ

ンである Hop/Stil、さらに抵抗性遺伝子産物に高く保存される NB-LRR を持つタンパク質等が相互作用因子の候補として同定され、解析されつつあった。しかしこれらは OsRac1 と一対一で結合するかどうかという解析により得られてきた候補タンパク質であり、実際の生細胞中で起こっているのか、またこれらが複合体を形成しているのかといった解析は行われていないという状況であった。

2. 研究の目的

タンパク質、特に G タンパク質のような分子スイッチが機能するには、エフェクターと呼ばれる相互作用因子へシグナルを伝え、その結果、下流因子を制御することが知られている。本研究では、生化学的手法を用いて、OsRac1 がイネ生細胞中でどのようなタンパク質と相互作用、または複合体を形成するかについて調べることにより、イネ防御応答における OsRac1 の制御の仕組みを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

イネ培養細胞を研究材料とし、ゲルろ過や免疫沈降といった生化学的な手法を用いた。

OsRac1 が活性型、不活性型になるよう変異させた遺伝子にタグをつけたものをイネに形質転換した。これら培養細胞から全タンパク質を抽出し、サイズ分画するためにゲルろ過に供試した。分画後のサンプルをタグ抗体を用いたウエスタンブロット法により検出することで、OsRac1 を含む複合体の大きさを調べた。また、病原体刺激による変動を解析するため、エリシターと呼ばれる病原体由来の物質を培養細胞に処理し、その処理の有無によって、複合体の挙動に変化が生じるかについての解析を行った。

4. 研究成果

ゲルろ過による解析により、活性型 OsRac1 が 250 から 350 kDa といった大きな複合体中に存在することが明らかにされた。OsRac1 単体は約 25 kDa であることからさまざまな相互作用因子と複合体を形成することが示された。この OsRac1 が検出された画分を用いて、当時相互作用していることが知られていたいくつかの因子に対する抗体を反応させたところ、シャペロンタンパク質である Hsp90 と Hsp70、それらのコシャペロンである Hop/Stil が検出された。不活性型 OsRac1 を導入したイネ培養細胞からタンパク質を抽出し、同様の解析したところ 100 kDa 程度の画分でしか検出されなかった。さらにエリシター刺激実験を行ったところ、通常は 100 kDa 程度であるのに対して、刺激後 3~10 分では活性型 OsRac1 と同様、250 から 350 kDa で検出され、30 分以上経過すると 100 kDa に戻ることが明らかとなった。これらの結果から、OsRac1 は防御応答を生に制御する際には大きな複合体を形成し、さまざまなエフェクターへシグナルを伝達することが明らかとなった。

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 2 件)

- ① Chen, L., Hamada, S., Fujiwara, M., Zhu, T., Thao, N.P., Wong, H.L., Krishna, P., Ueda, T., Kaku, H., Shibuya, N., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. The Hop/Stil-Hsp90 chaperone complex facilitates the maturation and transport of a PAMP receptor in rice innate immunity.

Cell Host Microbe. 7, 185-196, 2010.

(査読有)

- ② Fujiwara, M., Hamada, S., Hiratsuka, M., Fukao, Y., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice. Plant Cell Physiol., 50, 1191-1200, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

- ① 濱田聡, 藤原正幸, 島本功 イネの自然免疫における Defensome 複合体の解析, 平成 24 年度植物病理学会大会, 2012. 3. 30, 福岡
- ② Satoshi Hamada, Masayuki Fujiwara, Ko Shimamoto Analysis of the Defensome complex in rice innate immunity, 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012. 3. 17, 京都
- ③ Satoshi Hamada, Masayuki Fujiwara, Ko Shimamoto Analysis of the Defensome complex in rice innate immunity, The 2nd ICBPI, 2011. 11. 12-16 (ポスター展示期間), Kunming China
- ④ 濱田聡, 藤原正幸, 島本功 Defensome は免疫受容体を含む, 平成 23 年度植物病理学会大会, 2011. 10. 2, 高松
- ⑤ 藤原正幸, 濱田聡, 深尾陽一朗, 島本功 植物細胞膜マイクロドメインのプロテオーム解析, 日本植物学会第 75 回大会, 2011. 9. 17, 東京
- ⑥ 藤原正幸, 濱田聡, 島本功 低分子量 G タンパク質 OsRac1 が制御するイネ免疫機構のプロテオーム解析, 日本プロテオーム学会 2011 年大会, 2011. 7. 29, 新潟
- ⑦ 濱田聡, 藤原正幸, 島本功 植物免疫を制御する OsRac1 複合体 Defensome の解析, 平成 23 年度植物病理学会大会, 2011. 3. 27, 府中
- ⑧ Satoshi Hamada, Masayuki Fujiwara, Ko Shimamoto Analysis of the Defensome complex in rice innate immunity, BMB2010, 2010. 12. 8, 神戸
- ⑨ 濱田聡, 藤原正幸, 島本功 活性型 OsRac1 は高分子量複合体 (Defensome) を形成する, 平成 22 年度植物病理学会大会, 2010. 4. 19, 京都
- ⑩ 藤原正幸, 濱田聡, 深尾陽一朗, 川崎努, 島本功 イネ免疫応答における OsRac1 (低分子量 G タンパク質) 複合体の解析, 平成 22 年度植物病理学会大会, 2010. 4. 19, 京都
- ⑪ 濱田聡, 藤原正幸, 島本功 植物免疫を制御する OsRac1 複合体 Defensome の解析, 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010. 3. 20, 熊本
- ⑫ 藤原正幸, 濱田聡, 深尾陽一朗, 川崎努, 島本功 イネ免疫機構を制御するタンパク質複合体 Defensome のプロテオーム解析, 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010. 3. 20, 熊本

- ⑬ Masayuki Fujiwara, Satoshi Hamada, Minori Hiratsuka, Yoichiro Fukao, Tsutomu Kawasaki, Ko Shimamoto Role of lipid raft domain in OsRac1-mediated rice innate immunity 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9, 横浜
- ⑭ 濱田聡, 藤原正幸, 島本功植物免疫を制御する OsRac1 複合体 (Defensome) の解析, 第 82 回日本生化学会大会, 2009.10.24, 神戸
- ⑮ Masayuki Fujiwara, Satoshi Hamada, Yoichiro Fukao, Tsutomu Kawasaki, Ko Shimamoto Proteome analysis of lipid rafts associated with rice innate immunity mediated by OsRac1, 14th IS-MPMI, 2009.7.23, Quebec City, Canada
- ⑯ Satoshi Hamada, Masayuki Fujiwara, Ko Shimamoto Analysis of the OsRac1 complex (Defensome) involved in rice innate immunity, 14th IS-MPMI, 2009.7.23, Quebec City, Canada
- ⑰ 島本功, 藤原正幸 濱田聡, 深尾陽一郎・川崎努 植物免疫のプロテオミクス, 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009.6.4, 名古屋

[その他]

ホームページ等

http://bsw3.naist.jp/plantglobal/team/protein_ntwk/index.shtml

http://bsw3.aist-nara.ac.jp/simamoto/research_sick.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 正幸 (FUJIWARA MASAYUKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任助教

研究者番号 : 70403350