

平成23年 4月 22日現在

機関番号： 82401

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21870044

研究課題名（和文）

植物の免疫レセプター制御機構の解明

研究課題名（英文） The analysis of the regulation mechanisms of plant immune receptors

研究代表者

門田 康弘 (KADOTA YASUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究グループ・基礎科学特別研究員

研究者番号： 80548975

研究成果の概要（和文）： RAR1、SGT1 及び HSP90 を含むシャペロン複合体は免疫レセプター（NLR protein）の安定化に重要な役割を担う。X線結晶解析により、RAR1、SGT1 及び HSP90 を含む複合体の立体構造解明に成功した（Zhang and Kadota et al., Mol Cell 2010）。さらに、RAR1 は SGT1 及び HSP90 と直接結合することにより免疫レセプターを含む複合体形成を促進することが明らかになった。また、RAR1 は HSP90 に結合した ATP と接触し、HSP90 の ATP 分解活性を増大することが分かった。このことから、RAR1 は複合体の形成を促進するとともに、HSP90 の ATP 分解活性を促進することで複合体の機能を増強することが分かった。

研究成果の概要（英文）： Hsp90-mediated function of nucleotide-binding leucine-rich repeat receptors (NLR protein) in plant and animal innate immunity depends on the cochaperone Sgt1 and, at least in plants, on Rar1. Both RAR1 and SGT1 domains are independently capable of interacting with the molecular chaperone Hsp90 and can coexist in complexes with Hsp90. We have determined the core structure of an Hsp90-SGT1-RAR1 ternary complex. Mutational and biochemical analyses define the architecture of the ternary complex that recruits NLR proteins by manipulating the structural elements to control the ATPase-dependent conformational cycle of the chaperone.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物免疫，分子シャペロン，抵抗性蛋白質，蛋白質立体構造解析，病害抵抗性，

## 1. 研究開始当初の背景

NLR (The nucleotide-binding domain, leucine rich repeat containing) protein は、病原体の認識を担う免疫レセプターとして働く。そして、RAR1-SGT1-HSP90 複合体はこの NLR protein の安定化に必須な制御因子である。RAR1 蛋白質はシステイン残基とヒスチジン残基に富む CHORD ドメインを2つ持つ。この二つの CHORD ドメインは HSP90 のN末端ドメインとそれぞれ結合し、CHORDII ドメインは SGT1 の CS ドメインとも結合する。また、SGT1 は CS ドメインを介して HSP90 と結合し、SGS ドメインを介して NLR protein と結合する (Kadota et al., *Trends Biochem Sci.* 35:199-207 (2010))。我々の研究により、近年この複合体の部分立体構造が次々と明らかになり、RAR1、SGT1 及び HSP90 の部分立体構造とその結合様式の詳細が明らかになってきている。

## 2. 研究の目的

最近、RAR1、SGT1 及び HSP90 の各ドメインを含む複合体の立体構造解明に成功した。この立体構造解析から得られた知見を生かし、本研究では(1)RAR1によるHSP90のATP分解活性における影響を調べる。さらに(2)生化学的解析により、このRAR1の働きに必要なアミノ酸を同定する。また、(3)この複合体の結合に必須なRAR1のアミノ酸残基を同定するとともに、これら変異体を用いて複合体における各因子の役割を解明する。

## 3. 研究の方法

リコンビナント蛋白質を用いて、RAR1が *in vitro* において HSP90 の ATP 分解活性を促進するか調べる。さらに RAR1 に変異を導入して HSP90 の ATP 分解活性の促進に及ぼす影響を調べることにより、この働きに必要なアミノ酸残基を同定する。また、立体構造情報をもとに RAR1、SGT1、HSP90 に様々な変異を導入し、免疫レセプターを含む複合体形成への影響を調べるとともに、病害抵抗性反応への影響を調べる。

## 4. 研究成果

部位特異的変異を導入した RAR1 を用いて結合実験を行った結果、RAR1 は SGT1 及び HSP90 と直接結合することにより、RAR1-SGT1-HSP90 複合体の形成を促進することが明らかになった。さらに SGT1 は RAR1 と

結合することにより、免疫レセプターとの結合親和性を増大することが分かった。RAR1 の SGT1 結合部位に変異を導入して調べたところ、**RAR1 と SGT1 の結合が複合体形成、及び抵抗性反応の誘導に必須**であることが明らかになった。また、*in vitro* で HSP90 の ATP 分解活性を測定すると、RAR1 の濃度依存的に HSP90 の ATP 分解活性が増大した (図 1)。このことから、**RAR1 は複合体の形成を促進するとともに、HSP90 の ATP 分解活性を促進することで複合体の機能を増強**することが分かった (図 2)。RAR1 変異体を用いた実験から、HSP90 の ATP 分解活性の増強には RAR の His181 が重要な役割を果たすことが明らかになった。実際、この His181 は我々の解明した立体構造において Nucleotide と直接結合しており、ATP の分解に直接関与していることが考えられる。このアミノ酸残基及び HSP90 との結合に必須な RAR1 のアミノ酸残基は CHORDI 及び CHORDII ドメインの両方で保存されている。さらに生化学的解析から、CHORDI 及び CHORDII の両方のドメインが HSP90 の ATP 分解活性の促進ができることが示唆された。また、動物の RAR1 ホモログにおいても、これらアミノ酸残基の多くは保存されており、この RAR1 の新機能は種を超えて保存されていることが示唆された。

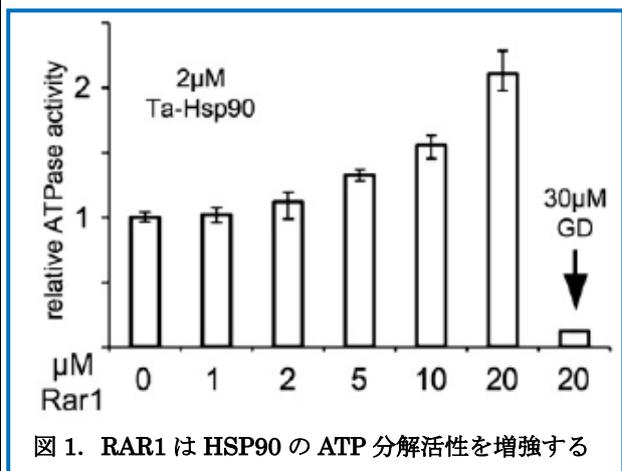
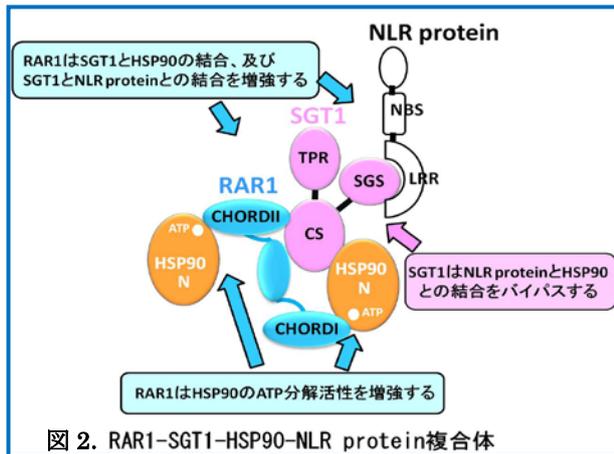


図 1. RAR1 は HSP90 の ATP 分解活性を増強する

NLR protein は植物だけでなく、動物においても細胞内の免疫レセプターとして働いており、動物の NLR protein の安定化や活性にも SGT1 及び HSP90 が必要であることが分かっている。よって本研究によって得られた成果は**動植物共通の免疫レセプターの制御機構解明を理解する上で重要な知見となると思われる。**



[雑誌論文] (計 6件)

- ① **門田 康弘**, 白須賢 動植物共通の免疫センサーの制御に働くタンパク質複合体, *化学と生物*, 49: 154-156 (2011) (査読無し)
- ② Schwessinger B, Roux M, **Kadota Y**, Ntoukakis V, Sklenar J, Jones A, Zipfel C, Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genetics*, in press (査読有り)
- ③ Ohno R, **Kadota Y**, Fujii S, Sekine M, Umeda M, Kuchitsu K, Cryptogein-induced cell cycle arrest at G2 phase is associated with inhibition of cyclin-dependent kinases, suppression of expression of cell cycle-related genes and protein degradation in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol*, in press (査読有り)
- ④ Kurusu T, Hamada H, Sugiyama Y, Yagala T, **Kadota Y**, Furuichi T, Hayashi T, Umemura K, Komatsu S, Miyao A, Hirochika H, Kuchitsu K, Negative feedback regulation of microbe-associated molecular pattern-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients by protein phosphorylation. *Journal of Plant Research*. in press (査読有り)
- ⑤ Zhang M\*, **Kadota Y\***, Prodromou C, Shirasu K\*, Pearl LH\*. Structural basis for assembly of Hsp90-Sgt1-CHORD protein complexes: implications for chaperoning of NLR innate immunity receptors. *Mol Cell*, 39: 269-81(2010)

\*co-1<sup>st</sup> author, +co-corresponding author (査読有り)

- ⑥ **Kadota Y**, Shirasu K, Guerois R. NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad. *Trends Biochem Sci.* 35:199-207 (2010) (査読有り)

[学会発表] (計 6件)

- ① 八丈野孝, **門田康弘**, 瀧澤香, 李華, 大沢 登, 半田徳子, 寺田貴帆, 小柴生造, 白水美香子, 渡部暁, 木川隆則, 横山茂之, Sophien Kamoun, 白須賢, 「ジャガイモ疫病菌エフェクターAVR3aの立体構造および機能解析」東北大学2011年3月20日
- ② 八丈野孝, **門田康弘**, 瀧澤香, 李華, 大沢登, 半田徳子, 寺田貴帆, 小柴生造, 白水美香子, 渡部暁, 木川隆則, 横山茂之, Sophien Kamoun, 白須賢, 「ジャガイモ疫病菌エフェクターAVR3aの構造機能解析」日本植物病理学会 2010年度大会 東京農工大学 2011年3月28日
- ③ **門田康弘**, Minghao Zhang, 竹林有理佳, Chrisostomos Prodromou, Raphael Guerois, Laurence H. Pearl, 白須賢, 「抵抗性蛋白質の安定化に必須な RAR1-SGT1-HSP90 複合体の立体構造及び機能解析」日本植物病理学会 2009年度大会 口頭発表, 国立京都国際会館 2010年4月20日
- ④ **門田康弘**, Zhang M., 竹林 有理佳, Prodromou C., Guerois R., Pearl H., 白須 賢, 「動植物共通の免疫レセプターの安定化に必須な RAR1-SGT1-HSP90 複合体の立体構造及び機能解析」日本植物生理学会 2009年度大会口頭発表 熊本大学 2010年3月18日
- ⑤ **Kadota Y**, Zhang M, Guerois R, Prodromou C, Pearl LH, Shirasu K, “Structural and functional analysis of the SGT1-RAR1-HSP90 complex required for plant immunity” The 14th Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions 21<sup>st</sup> of July, 2009 Quebec, Canada
- ⑥ Shirasu K, **Kadota Y**, Zhang M, Guerois R, Prodromou C, Pearl L, “Structural and Functional Analysis of the Chaperone Complex Required for NLR-type Immune Receptors.” 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium 2009 Jeju Island Korea 2009 11 of November

[その他]

新聞報道：

「ウィルスの侵入防止 植物のメカニズム解明」

日刊工業新聞 2010年7月30日掲載

「植物の免疫センサー 制御する複合体の構造」

科学新聞 2010年8月6日掲載

ホームページ等：

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2010/100730/detail.html>

<http://www.riken.jp/engn/r-world/info/release/press/2010/100730/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

門田 康弘 (KADOTA YASUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究グループ・基礎科学特別研究員

80548975

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし