

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780046

研究課題名(和文) エフェクターによる未知のタンパク質修飾と免疫抑制

研究課題名(英文) Unknown protein modifications by the effector and the immunosuppression

研究代表者

八丈野 孝 (Yaeno, Takashi)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：10404063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ジャガイモ疫病菌は、19世紀にアイルランドで起こったジャガイモ飢饉の原因菌で、現在でも世界中で深刻な病害を引き起こしている。病原性の主因子であるAVR3aタンパク質が宿主の細胞内に侵入し、宿主の免疫反応を抑制する。宿主のユビキチンE3リガーゼが標的となり、何らかの修飾が加えられてその機能が抑制されると考えられているがまだよくわかっていない。本研究では、ユビキチンE3リガーゼ内の修飾されるアミノ酸残基を見つけ、その修飾の実体を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Potato late blight (*Phytophthora infestans*), a causal pathogen of the Irish potato famine in the 19th century, is still serious disease in the world today. *P. infestans* secretes and injects a virulence protein AVR3a into host cells and suppresses the host immune responses. AVR3a targets the host ubiquitin E3 ligase and inhibits its function by adding some sort of modification. In this study, I found the amino acid residue to be modified and the substance of the modification.

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物免疫 糸状菌 ジャガイモ疫病菌 AVR3a CMPG1 PUB20 ユビキチン うどんこ病菌

### 1. 研究開始当初の背景

植物は動物と類似した自然免疫システムを持っている。膜貫通型のレセプターキナーゼが病原菌の分泌物を細胞外ドメインで認識して免疫反応を誘導する。これに対して病原菌は、エフェクタータンパク質を宿主の細胞内に送り込み、免疫反応を抑制する。最近、国内外の研究グループにより、植物特有のユビキチン E3 リガーゼである PUB (plant U-box) ファミリータンパク質群がレセプターキナーゼのシグナル伝達及び免疫誘導に深く関与することが明らかにされた。さらに、エフェクターが PUB を標的にすることがわかってきており、エフェクターのひとつである AVR3a の立体構造が解明されたが、PUB である CMPG1 をどのようにして標的にするのかまだよくわかっていない。

### 2. 研究の目的

標的にされるほど CMPG1 は免疫システムの中核で機能するが、どのようなメカニズムで CMPG1 の機能を抑制するのか不明であり解明が期待される。その手がかりのひとつとして、すでに申請者は、AVR3a と共発現させると、分子量が大きい CMPG1 が検出されることを見出している。プロテアソーム阻害剤であるエポキシマイシン処理によりタンパク質分解を阻害した場合にも同様に検出されることから、分子量が大きい CMPG1 は分解されずに安定化したものであると考えられる。しかしながら AVR3a は直接 CMPG1 と結合する。したがって、AVR3a は直接 CMPG1 に何らかの修飾を加えて安定化し、その機能を抑制すると考えられる。本研究では、この修飾の実体を明らかにし、AVR3a による CMPG1 の機能抑制メカニズムを解明することが目的である。

### 3. 研究の方法

未知の修飾を質量分析により明らかにするために、AVR3a と CMPG1 を共発現させたタバコ属ベンサミアナまたはシロイヌナズナの PUB20 過剰発現体からタンパク質を抽出する。免疫沈降後に SDS-PAGE で分離したそれぞれのバンドについて質量分析を行い、どのような修飾を受けているか調べる。質量分析を行ってもどのような修飾なのか判断できないことが考えられる。そのため違う角度からのアプローチとして、タンパク質トランケーション試験を行い、CMPG1/PUB20 のどの領域が修飾に必要なウエスタンブロット法で解析し明らかにする。CMPG1/PUB20 は N 末端側の U-box と C 末端側に ARM と呼ばれるロイシンリッチドメインを持っており、それぞれを様々な長さで削り込んだコンストラクトを作製する。PUB20 のトランケーション試験の際、シロイヌナズナ形質転換体を作製するには数ヶ月単位の時間がかかってしまう。それを解決する方法として、ベンサミアナの一過的発現

系で 4, 5 日後に PUB20 タンパク質を発現させるアッセイ系をすでに確立している。

トランケーション試験により重要な領域を同定した後、アミノ酸置換解析を行い、どのアミノ酸が修飾に必要なウエスタンブロット法で解析し明らかにする。必要なアミノ酸残基が判明すれば、その側鎖の化学構造からどのような修飾を受ける可能性があるか情報を得られる。この実験もベンサミアナの一過的発現系を用いて短時間に行うことができる。修飾されるアミノ酸を別のアミノ酸に置換した変異型 CMPG1 と AVR3a を共発現させ、CMPG1 が修飾されなくなると機能が抑制されなくなるかどうかを調べる。

### 4. 研究成果

予備的な実験から、CMPG1 タンパク質の蓄積量は非常に微量であることがわかっている。一方、オルソログである PUB20 をシロイヌナズナで過剰発現させると、安定して多くの PUB20 タンパク質を蓄積して恒常的に分子量が大きいバンドが検出される形質転換系統が得られた。そこで、この系統においては、CMPG1 の場合と同様に分解されずに安定化した PUB20 が蓄積したと考え、この修飾の実体を調べるためにウエスタンブロット法により解析した。その結果、抗ユビキチン抗体及び抗 SUMO 抗体ではこのバンドは検出されなかった。また、この形質転換系統から抽出したタンパク質を脱リン酸化酵素処理したがバンドパターンは変化しなかった。なお、CMPG1 と PUB20 のアミノ酸配列には、脂質や糖鎖などの修飾を受けるようなモチーフ配列は見つからなかった。以上の予備的な結果から、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化、脂質や糖鎖ではない修飾であると考えられた。

PUB20 のトランケーション試験により、C 末端側の ARM ドメインが修飾に必要であることが示唆された。さらに PUB20 を過剰発現したベンサミアナ葉から抽出したタンパク質を質量分析に供した結果、ARM ドメインがユビキチン化されていることがわかった。ユビキチン化されたアミノ酸を別のアミノ酸に置換した変異型 PUB20 タンパク質の蓄積をウエスタンブロット法で調べたところ、分子量が大きいバンドのみ消失した。これらの結果から、PUB20 の修飾はユビキチンであることが明らかとなった。

さらに、酵母ツーハイブリッド解析により、CMPG1 の ARM ドメインをアミノ酸置換すると AVR3a と結合しなくなった。そこで、AVR3a が植物体内で変異型 CMPG1 を標的にできなくなる可能性を検証するために、VIGS 法により CMPG1 をノックダウンさせて endogenous の CMPG1 の影響を減少させたベンサミアナ葉に、VIGS を回避するようにコドンを入れ替えた人工 CMPG1 を発現させて exogenous の CMPG1 の機能を解析できる実験系を構築した。変異型 CMPG1 を発現

させたところ、AVR3aにより標的されなくなることを示唆する結果が得られた。今後としては、どのようなメカニズムで AVR3a が CMPG1 の機能を抑制するかを明らかにする必要がある。

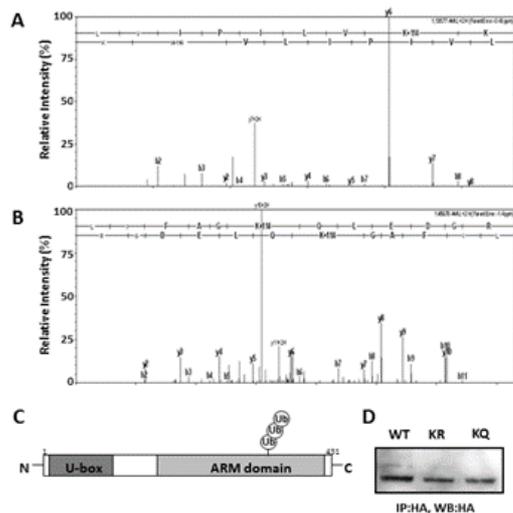


図. PUB20のARMドメインがユビキチン化される

## 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 3 件)

Yaeno, T. and Shirasu, K. The RXLR motif of oomycete effectors is not a sufficient element for binding to phosphatidylinositol monophosphates. *Plant Signal. Behav.* 8: e23865. 2013. 査読有

Hashimoto-Sugimoto, M., Higaki, T., Yaeno, T., Nagami, A., Irie, M, Fujimi, M., Miyamoto, M., Akita, K., Negi, J., Shirasu, K., Hasezawa, S., Iba, K. A Munc13-like protein in *Arabidopsis* mediates H<sup>+</sup>-ATPase translocation that is essential for stomatal responses. *Nature Commun.* 4:2215. 2013. 査読有

八丈野 孝, 白須 賢「植物の U-box 型ユビキチンリガーゼ」*生化学* 84(6), 425-431. 2012. 査読無

[学会発表](計 19 件)

出原 健吾, 関根 健太郎, 八丈野 孝, 山岡 直人, 西口 正通, 小林 括平「N<sup>+</sup>抵抗性はトウガラシ微斑ウイルスに対して永続的である」日本植物病理学会、札幌市、2014年6月3日

Alam, M. M., Nakamura, N., Ichikawa, H., Kobayashi K., Yaeno, T., Yamaoka, N. and Nishiguchi, M. "Response of rice heme activator protein gene (*OsHAP2E*) to virus infection." 日本植物病理学会、札幌市、2014年6月3日

Ali, M. E., Ishikawa, M., Kobayashi, K., Yaeno, T., Yamaoka, N. and Nishiguchi, M. "Analysis of transgenic tomato carrying the inverted repeat of tomato homologs of TOM1 in *Arabidopsis*." 日本植物病理学会、札幌市、2014年6月3日

Wagu G. S., Kobayashi, K., Yaeno T., Yamaoka, N., Masuta, C. and Nishiguchi, M. "Molecular cloning and nucleotide sequence of *Rice necrosis mosaic virus*, a fungal transmitted *Bymovirus*, RNA" 日本植物病理学会、札幌市、2014年6月3日

安達 広明, 石濱 伸明, 中野 孝明, 宮川 典子, 吉岡 美樹, 八丈野 孝, 白須 賢, 吉岡 博文「MAPK-WRKY 経路は抵抗性遺伝子に依存した NbRBOHB の転写活性化に關与する」日本植物病理学会、札幌市、2014年6月3日

香口 智宏, 小林 括平, 西口 正通, 山岡 直人, 八丈野 孝「オオムギうどんこ病菌の感染過程におけるエフェクターの分泌時期の解析」日本植物病理学会、札幌市、2014年6月2日

安達 広明, 石濱 伸明, 中野 孝明, 宮川 典子, 吉岡 美樹, 八丈野 孝, 白須 賢, 吉岡 博文「エフェクター認識後の NbRBOHB プロモーター活性化に複数の WRKY 型転写因子が關与する」日本植物生理学会、富山市、2014年3月18日

八丈野 孝「オオムギうどんこ病菌に対する抵抗性メカニズムの解析とブラキポディウム研究の可能性」ブラキポディウムワークショップ、倉敷市、2013年11月29日

Yaeno, T. "Molecular Mechanisms of Immunosuppression by Phytopathogen Effectors" *Phytogene Symposium*, Takamatsu, 28 Oct 2013.

安達 広明, 石濱 伸明, 中野 孝明, 宮川 典子, 吉岡 美樹, 八丈野 孝, 白須 賢, 吉岡 博文「複数の WRKY 型転写因子は抵抗性遺伝子に依存した活性酸素生産に關与する」日本植物病理学会關西部会、岡山市、2013年9月26日

香口 智宏、菅井 維之、中下 香、久野 裕、小林 括平、西口 正通、山岡 直人、八丈野 孝「オオムギうどんこ病菌エフェクターの分泌及び宿主細胞侵入機構の解析」日本植物病理学会関西支部会、岡山市、2013年9月26日

菅井 維之、新崎 裕樹、八丈野 孝、小林括平、西口 正通、山岡 直人「オオムギうどんこ病菌 (*Blumeria graminis*) の感染過程における第一発芽管の役割」日本植物病理学会関西支部会、岡山市、2013年9月26日

出原 健吾、関根 健太郎、八丈野 孝、山岡 直人、西口 正通、小林 括平「トウガラシ微斑ウイルス外被タンパク質変異株における N<sup>+</sup> 抵抗性を回避するために必須な変異の同定」日本植物病理学会関西支部会、岡山市、2013年9月26日

Ali, M. E., Kobayashi, K., Yaeno, T., Yamaoka, N. and Nishiguchi, M. "Further investigation on graft-transmission of RNA silencing and tobamovirus resistance to non-transgenic scions of tobacco and tomato" 日本植物病理学会関西支部会、岡山市、2013年9月26日

Alam, M. M., Nakamura, N., Ichikawa, H., Kobayashi, K., Yaeno, T., Yamaoka, N. and Nishiguchi, M. "Characterization of Rice Heme Activator Protein Gene (*OsHAP2E*) in response to fungal and bacterial infections" 日本植物病理学会関西支部会、岡山市、2013年9月26日

橋本(杉本)美海、桧垣 匠、秋田 佳恵、八丈野 孝、祢宜 淳太郎、白須 賢、馳澤 盛一郎、射場 厚「H<sup>+</sup>-ATPase 局在化因子 PATROL1 による気孔運動と成長制御」日本植物学会、札幌市、2013年9月14日

八丈野 孝、白須 賢「RXLR エフェクター-AVR3a の宿主細胞内における免疫抑制の分子メカニズム」日本植物生理学会、岡山市、2013年3月23日

八丈野 孝、瀧澤 香、白須 賢「ジャガイモ疫病菌エフェクター-AVR3a の宿主細胞内における免疫抑制機構」日本植物病理学会、岐阜市、2013年3月27日

Yaeno, T., Li, H., Chaparro-Garcia, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Kamoun, S., Shirasu, K. "Phosphatidylinositolphosphate-bind

ing ability of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is required for the virulence function" International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, Japan, 29 Jul - 2 Aug 2012.

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~seisan/shokubyo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八丈野 孝 (YAENO, Takashi)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：10404063