

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07319

研究課題名(和文) 新奇病害抵抗性制御因子MARK1を介したHR細胞死の調節機構の解明

研究課題名(英文) The regulatory mechanism of HR cell death via MARK1

研究代表者

松井 英譲 (Matsui, Hidenori)

岡山大学・環境生命科学研究所・助教

研究者番号：20598833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物免疫応答の解明にむけて、リン酸化プロテオミクス手法を用いて同定したPSIG1 (MARK1から呼称変更)は、病原菌感染時の細胞死を制御する因子であることが明らかとなった。そこで、PSIG1の分子機能の解明にむけて、PSIG1の相互作用因子の単離、同定を試みた。その結果、PSIG1の相互作用因子としてシロイヌナズナにおいてRNA分解制御に関わるSMG7が同定された。PSIG1とSMG7は物理的に相互作用すること、さらに細胞内で共局在することを見出した。以上の結果は、PSIG1が病原菌感染時にmRNAの制御に関与し、細胞死を制御している可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：To reveal the plant immune components, we have performed phosphoproteomics approach, and identified PSIG1 that functions as a negative regulator of cell death during pathogen infection. For exploring of the molecular function of PSIG1, we assessed the subcellular localization of PSIG1, and identified PSIG1 interacting protein. One of the interactors of SMG7 which functions as a regulator of mRNA decay in *Arabidopsis thaliana*. PSIG1 physically binds to SMG7, and PSIG1 and SMG7 were co-localized around P-bodies using Agroinfiltration method in *Nicotiana benthamiana*. These results suggest that PSIG1 might regulate mRNA metabolism for controlling cell death during pathogen infection.

研究分野：植物病理学

キーワード：リン酸化 植物免疫 細胞死 RNA metabolism

1. 研究開始当初の背景

植物の備える「Resistance (R) -gene mediated resistance」は、特定の感染性病原体と宿主植物の相互作用で発動される病害抵抗性機構である。病原菌が分泌する「エフェクター」と植物の「Rタンパク質」の特異的認識により規定され、急速な過敏反応 (Hypersensitive Response: HR) を誘導し、侵入した病原体を封じ込める。エフェクターと R タンパク質は多様性に富んでいるが、それらの相互作用により引き起こされる HR は植物種間を超え共通しており、極めて強力な抵抗性機構である。その効果の高さから、育種において R-gene の導入が、様々な作物品種で試みられてきている。一方、R-gene 導入イネにおいて、僅か数年で病原性レースが発生して抵抗性が打破されるなど、特定の R-gene 導入による育種では病原菌の進化速度に対応できない問題点が提起されている。その解決策として、普遍性の高い HR 誘導の分子機構を理解し、R-gene 導入に因らず「R-gene mediated resistance」を強化する全く新しい育種法を編み出すことが期待されている。HR 誘導の分子機構に関しては、R タンパク質がエフェクターを認識する仕組みの詳細は明らかになりつつあるが、多様な「エフェクター」-「R タンパク質」ペアが HR を誘導する仕組みは全く分かっていない。その理由として、従来の研究アプローチによる、新しい HR 制御因子の同定の困難さが議論されている。

申請者は、最新のプロテオミクス手法を利用したスクリーニングにより、順遺伝学的手法を含む従来法では難しいと考えられる、新たな病害抵抗性制御因子の同定を進めてきた。その中で同定した MARK1 (MAMP-responsive phosphoprotein for appropriated ROS kinetics : MARK) は、MAMP (微生物分子パターン) 応答性の活性酸素種 (ROS) 生成に必要な、リン酸化タンパク質である。その後の解析から、MARK1 を PSIG1 (Plant-SMY2 type IIu type GYF domain containing protein 1) と命名した。*psig1* 変異体の詳細な解析を進めた結果、*psig1* 変異体は通常生育時の疑似病斑を形成しないが、エフェクターと R タンパク質の相互作用に伴う HR を亢進させるという、これまでに報告のない非常にユニークな表現型を示すことが分かった。そこで本研究課題では、HR 誘導に関わる全く新しい因子 PSIG1 の解析を通じ、HR 誘導の分子機構の

解明に取り組んだ。

PSIG1 は、分子機能が全く未知の、陸上植物に特徴的な因子である。*psig1* 変異体は、非親和性病原性細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) *avrRps4* および *Pto* DC3000 *avrRpm1* のスプレー接種で、野生型では見られない細胞死が強く誘導される。*Pto* DC3000 *avrRps4* 接種による細胞死は、TIR-NB-LRR 型 R タンパク質である RPS4 (AvrRps4 を認識する) の制御因子 EDS1 との二重変異体で抑制される。つまり、*psig1* 変異体は R タンパク質の活性化に伴う HR 細胞死を抑制する制御因子であると考えられる。

特筆すべきことに、*psig1* 変異体は R-gene mediated resistance が活性化しやすい特徴を有するが、疑似病斑 (エフェクター認識なしでの R タンパク質の無秩序な活性化による細胞死) を形成しない。一般に、病原菌に抵抗性を示す変異体の多くは、疑似病斑形成による生育不良を起こす。これは、植物が限られたエネルギーを防御応答に割くために引き起こされる生育障害である (Trends in Plant Science, 2014 Sep 30. pii: S1360-1385(14)00228-3)。抵抗性の強化と生育不良の解消というジレンマは、解決すべき課題の1つである。*psig1* 変異体の HR 制御機構を理解は、生育不良のトレードオフなしに R-gene mediated resistance を強化できる技術の開発に繋がると期待される。これまでに PSIG1 タンパク質の分子機能を探るために様々な解析を進めており、PSIG1 は RNA 分解制御に重要とされる Processing Body (P-body) に寄り添って局在することを明らかにした。また、PSIG1 と相互作用する因子 (PSIG1-interacting protein: PIP) を 17 種類同定することに成功した。興味深いことに、その中の1つの SMG7 は、幾つかの生物種において P-body での RNA 分解制御に関わることが報告されている因子であった。*smg7* 変異体を単離して解析したところ、*psig1* 変異体と同様の HR 誘導を亢進する表現型を示すことが分かった。これらの予備的知見は、PSIG1 が P-body での RNA 分解制御を介して HR 誘導を調節していることを示唆している。

2. 研究の目的

PSIG1 と SMG7 の機能解析を通じて、P-body による HR 誘導制御という新しい「R-gene mediated resistance」制御シス

テムの一端を解き明かすことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PSIG1 の SMG7 制御機構の解明

PSIG1 と SMG7 の相互作用の様式および生理的意義の解析を明らかにすることを目的として、PSIG1, SMG7 の組換えタンパク質を精製し、相互作用の様式を検討した。また、推定される相互作用部位に変異を導入することで、相互作用における重要性を検証した。次に、相互作用に重要なアミノ酸配列を置換した *pPSIG1::PSIG1^{Y575A}* を *psig1-1* 変異体に形質転換し、相補個体を作成した。ホモ化した T3 世代に関して、*psig1* 変異体で認められる病原細菌感染時の細胞死を指標とし、相互作用の重要性について検証した。

PSIG1-GFP, SMG7-CFP, DCP1-mCherryなどを Agroinfiltration 法によりニコチアナベンサミアナタバコで一過的に発現させ、その局在について検討した。*psig1-1* 変異体に *pPSIG1::PSIG1-GFP* を導入した形質転換体ならびに、*smg7-4* 変異体に *pSMG7::SMG7-TagRFP* を導入した形質転換体の作出を試み、その局在変化について検証を試みた。

(2) *psig1* ならびに *smg7* 変異体における過敏感細胞死が亢進する原因の特定

psig1 変異体と *smg7* 変異体では、非親和性病原細菌接種時に共通して細胞死が亢進することから、共通した因子群の制御不全が引き起こされているものと推察された。そこで、RNA-seq 解析を行い、*psig1* 変異体と *smg7* 変異体で共通して発現変動が認められる因子の同定を試みた。

(3) PSIG1 制御因子の同定

PSIG1 のリン酸化部位のアミノ酸配列を基に、PSIG1 の制御因子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1)(2) 本研究では、PSIG1 が病原菌感染時の細胞死の制御に関わる新奇な因子であること、mRNA 分解制御に関わる SMG7 と相互作用することを見出し、PLoS Genetics 誌で発表した (Matsui et al., 2017)。上述の通り、PSIG1 は分子機能が全く未知の陸上植物に特徴的な因子であった。PSIG1 の相互作用因子として同定した SMG7 は nonsense-mediated RNA decay と呼ばれる RNA 分解制御機構に関わることが報告された (Riehs-Kearnan et al., 2012)。*smg7-1* 変異体は、擬似病斑を形成するなど、一連

の植物免疫応答が活性化される。さらに、Gloggnitzer らは、SMG7 が有する NMD 自己調節能を不活性化した *SMG7-ΔUTR* 形質転換体を作成し、病原性細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) に対して、より罹病性が高まることを報告した (Gloggnitzer et al., 2014 Cell Host Microbe)。*SMG7-ΔUTR* 形質転換体は Type III secretion system (TTSS) を欠損した *Pto* DC3000 *hrcC*-に対する抵抗性は野生型と同程度であった。すなわち、NMD は病原菌感染時の抵抗性の活性化に重要であることを示している。*SMG7-ΔUTR* 形質転換体の *Pto* DC3000 に対する表現型は、*psig1* 変異体の表現型と一致している。

PSIG1 が NMD に直接関与するかは現時点では明らかではない。しかしながら、PSIG1 と SMG7 がタンパク質-タンパク質相互作用をすること、ストレス条件下において細胞内で PSIG1 と SMG7 が共局在すること、PSIG1 は RNA 分解に関わる P-bodies と関連した局在を示すことから、PSIG1 が RNA 制御に関わると推察している。

PSIG1 と SMG7 の細胞内共局在の解析に向けて、形質転換植物の作出を試みた。しかしながら、作出段階で SMG7 の 3' UTR が SMG7 の制御に重要であることが報告された。さらに、選択マーカーが原因の生育異常が起きてしまったことから、プラスミドの再構築が必要となった。現在、解析を進めるまでに至っていない。今後は、再度 SMG7-RFP を構築し、作出済みの PSIG1-GFP と交配することで、局在変化について解析を進める必要がある。

PSIG1 の分子機能について、2 つの独立した研究グループからも研究報告が相次いだ。Hashimoto らのグループは、ポテックスウイルスの増殖に必須な植物遺伝子 *exa1* として *psig1* 変異体を単離、同定した (Hashimoto et al., 2016 Plant J.)。*exa1* 変異体はポテックスウイルスの蓄積が減少する。このウイルス蓄積の減少は、R-gene mediated resistance の構成的な活性化に起因するものではない。すなわち、PSIG1 が植物病原ウイルスの複製に関わる何らかの機能を有することを示唆している。

Wu らのグループは R-gene である *SNC1* の表現型が強まる変異体 MUSE11 (mutant, *snc1*-enhancing) を単離し、原因として PSIG1 に変異が生じていることを明らかにした (Wu et al., 2017 eLIFE)。

psig1/esa1/muse11 (以降 *psig1* と記載) の欠損は、*R-gene* (RPS4, RPM1, RPS2) の転写量に影響を与えない。しかしながら、RPS4, RPM1 ならびに RPS2 タンパク質蓄積量が増加した。さらに、PSIG1 は eIF4E1, eIF4E1B と相互作用することで、翻訳阻害を引き起こし、R タンパク質の蓄積を制御する可能性について報告している。驚いたことに、Wu らの研究グループでは、*psig1* 変異体が構成的な植物免疫応答を示しており、病原性細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 に対する抵抗性が高まっていた。この点は、当研究グループや、Hashimoto らの報告とは異なっていた。

我々は、*psig1* 変異体が構成的な植物免疫応答の活性化が認められないこと、さらに、*psig1* 変異体が病原性細菌 *Pto* DC3000 に対してより罹病性を示すことを明らかにしている。また、後述の RNA-seq 解析結果からも、通常条件下において構成的な防御応答は活性化していなかった。以上の結果は、*psig1* 変異体は少なくとも生育する環境条件の影響を受け、植物免疫の活性調節に影響が出やすい可能性を示唆している。

植物 病原菌相互作用における *psig1* 変異体の過敏感細胞死が亢進する原因の特定することを目的として、RNA-seq 解析を試みた。PSIG1 と SMG7 の相互作用に着目し、*psig1* 変異体と *smg7* 変異体に共通して発現変動する遺伝子群の探索を進めた。その結果、mock 処理では、野生型、*psig1* 変異体、*smg7* 変異体において遺伝子発現変動にほとんど差は検出できなかった。このことは、*psig1* 変異体や *smg7-4* 変異体において構成的な植物免疫応答の活性化が認められないことと一致する。一方で、病原菌を接種したサンプルでは、*psig1* 変異体、*smg7* 変異体で共通して発現変動する遺伝子群を見出した。発現変動した遺伝子には、*R-gene* も多数含まれることが明らかとなった (未発表)。本結果は、PSIG1 や SMG7 が制御する分子機構が欠損することに伴い、制御下の mRNA がより蓄積する可能性を示唆している。また、PSIG1 や SMG7 で共通して発現が低下した遺伝子群には、RNA 関連因子が多数含まれることも明らかとなった (未発表)。

今後は、*psig1* 変異体で発現変動した遺伝子群が病原菌感染時に誘導される細胞死の原因となっているかを明らかにすることが重要となる。今後は、*psig1* 変異体の表現型が回復する多重変異体の作出などを試みることで、原因となる遺伝子の同定、さらに

は細胞死誘導機構の詳細に迫ることが可能となる。

(3) PSIG1 制御因子の同定

PSIG1 のリン酸化部位のアミノ酸配列を基に、PSIG1 の上流で機能する制御因子の同定を試みた。PSIG1 のリン酸化部位は、MAPK の基質に共通するものであった。また、PSIG1 は MAMP 処理後 10 分という早期にリン酸化修飾されることから、flg22 処理で早期に活性化する MPK6 をモデルとして、PSIG1 のリン酸化について *in vitro* phosphorylation assay を行った。PSIG1 ならびに MPK6 について組換えタンパク質を作出し、リン酸化反応を行った。MPK6 を活性制御のため、MCK4DD タンパク質も精製し、リン酸化反応に供試した。リン酸化反応産物は、電気泳動でバンドサイズの変動などを確認すると共に、LC-MS/MS によりリン酸化ペプチド検出を試みた。しかしながら、現在までに *in vitro* における MPK6 による PSIG1 のリン酸化は検出できていない。MPK3/6 などが上流因子である可能性はあるものの、実験系の再検討が必要と考えられる。

PSIG1 相互作用因子として、2 種類の protein kinase が同定できており、今後はそれら protein kinase に着目して解析を進めることで、PSIG1 の詳細な分子制御機構の理解が可能となると考えている。

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1件)

1. Matsui, H., Nomura, Y., Egusa, M., Hamada, T., Hyon, G-S., Kaminaka, H., Watanabe, Y., Ueda, T., Trujillo, M., Shirasu, K., Nakagami, H. The GYF domain protein PSIG1 dampens the induction of cell death during plant-pathogen interactions. *PLoS Genet.* 2017 13(10): e1007037. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007037> (査読有)

[学会発表](計11件)

1) 松井英議, 野村有子, 玄康洙, 江草真由美, 上中弘典, 中神弘史. MAMP 応答性リン酸

化タンパク質 MARK1 は病原菌感染による細胞死を制御する。平成 29 年度日本植物病理学会大会。2017. 4. 26-28. マリオス アイーナ・岩手県民情報交流センター。岩手県盛岡市

2) Matsui, H., Nomura, Y., Hamada, T., Hyon, G-S., Watanabe, Y., Ueda, T., Nakagami, H. HR cell death regulator “MARK1” is associated with P-bodies in Arabidopsis. 第 58 回日本植物病理学会年会 2017.3.16-18. 鹿児島大学郡元キャンパス。鹿児島県鹿児島市。

3) Matsui, H. Nomura, Y. Egusa, M. Hyon, G-S. Kaminaka, H. Trujillo, M. Shirasu, K. Nakagami, H. PAMP-responsive phosphoprotein MARK1 limits program cell death induction 2016 IS-MPMI XVII congress. 2016.7.17-21. オレゴンコンベンションセンター, ポートランド, アメリカ合衆国

4) Matsui, H., Yotsui, I., Maeda, K., Hyon, G-S., Nomura, Y., Ichinose, Y., Nakagami, H. Functional analysis of PAMP-responsive phosphoprotein MARK2. 2016 IS-MPMI XVII congress. 2016.7.17-21. オレゴンコンベンションセンター, ポートランド, アメリカ合衆国

5) 松井英譲, 玄康洙, 野村有子, 中神弘史. MARK1とMARK32のリン酸化制御. 第57回日本植物生理学会年会. 2016.3.18-20. 岩手大学上田キャンパス, 岩手県盛岡市

6) Matsui, H., Nomura, Y. and Nakagami, H. MAMP-responsive phosphoprotein “MARK1” negatively regulates hypersensitive cell death during pathogen infection. The 11th US-Japan Scientific Seminar. 2015. 10.25-29. Takamatsu, Kagawa, Japan.

7) 松井英譲, 野村有子, 中神弘史. 細胞死制御因子 MARK1 のホモログの機能解析. 平成 27 年度日本植物病理学会関西西部会. 2015. 9.29-30. あわぎんホール徳島県郷土文化会館. 徳島県徳島市

8) 松井英譲, 野村有子, 中神弘史. MAMP 応答性リン酸化タンパク質 MARK1 は ETI における細胞死を負に制御する. 平成 27 年度植物感染生理談話会 2015.8.24-26. 道後温泉メ

ルバルク松山, 愛媛県松山市

〔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〕

ホームページ等

岡山大学農学部 遺伝子細胞工学研究室
https://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/pr/ofile/nougaku02_1.html

プレスリリース

植物病原菌感染時の細胞死調節因子を同定
https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id498.html

プレスリリース

Identification of the regulator of cell death during plant-pathogen interaction
https://ousvo.org/press_release/identification-of-the-regulator-of-cell-death-during-plant-pathogen-interactions/

プレスリリース

A new cell death regulatory factor for plants during pathogen interactions
<http://www.csrs.riken.jp/en/press/press171027-2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 英譲 (MATSUI, Hidenori)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・助教
研究者番号: 20598833