

## 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 6 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007～2011

課題番号：19108005

研究課題名（和文） Rac GTPase を介した植物免疫の分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular basis of Rac GTPase in plant innate immunity

研究代表者

島本 功 (SHIMAMOTO KO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：10263427

研究成果の概要（和文）：

耐病性反応において、イネの低分子量 G タンパク質 Rac ファミリーの OsRac1 がシグナル伝達の分子スイッチとして機能していることを明らかにしているが、その分子機構の詳細は不明だった。本研究で、OsRac1 と複合体を形成するタンパク質を探索し、抵抗性タンパク質、パターン認識受容体、シャペロン、コシャペロン、足場タンパク質、活性酸素を生成する NADPH オキシダーゼなどを同定した。我々は、OsRac1 を含むタンパク質複合体を「Defensome」と名付けた。さらに、Defensome がイネの植物免疫に中枢を担うタンパク質複合体であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have previously reported that small GTPase OsRac1 plays important roles in rice innate immunity. However, it is largely unknown how OsRac1 induces immune responses. In this study, we showed that OsRac1 forms a complex termed Defensome with various downstream proteins, including R proteins, pattern recognition receptors, a scaffolding protein, and cochaperone proteins. OsRac1 also plays a dual role in the induction of ROS production through direct interactions with NADPH oxidases and the suppression of the ROS scavenger. Moreover, we demonstrate here that Defensome acts as an important regulator in rice innate immunity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2008 年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
2009 年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2010 年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2011 年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
総計	74,600,000	22,380,000	96,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：植物免疫

## 1. 研究開始当初の背景

植物は病原微生物の侵入を認識し、自らが

もっている様々な抵抗性反応を発動させ、病原体の増殖を防ぐことが出来る。植物がどの

ように病原体シグナルを認識し、下流の信号伝達系を活性化しているかについては殆ど明らかにされていない。また、耐病性シグナルの情報伝達機構については、申請者らを含めたグループにより、Gタンパク質やプロテインキナーゼの関与が明らかにされているが、まだその詳細な分子機構はわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

イネの低分子量Gタンパク質 OsRac1 がタンパク質複合体を形成し、病原菌認識からシグナル伝達に至る重要な過程を担っているという結果を得ている。我々は、この OsRac1 を含むタンパク質複合体を「Defensome」と名付けた。本研究では、Defensome のタンパク質間相互作用ネットワークを明らかにすることにより、耐病性シグナル伝達に関わるタンパク質複合体の機能を解明することを試みる。

## 3. 研究の方法

- 1) OsRac1 と R タンパク質の相互作用と病原体認識機構の解析
- 2) OsRac1 ファミリーの活性化因子(GDP-GTP 交換因子:GEF)の解析
- 3) FRET 技術を用いた OsRac1 の活性化機構の解析
- 4) OsRac1 を含む免疫複合体 Defensome の構成因子の相互作用のダイナミズム
- 5) FRET による Defensome の動態の時間的・空間的解析

## 4. 研究成果

### 1) R タンパク質の機能に関する新規な発見

抵抗性 (R) タンパク質は、病原体の侵入を感知する細胞内レセプターとして働き、植物の自然免疫において極めて重要な分子である。しかしながら、R タンパク質がどのようなシグナル分子を介して植物の免疫を誘導するかは不明であった。我々は、イネのいもち病菌の R タンパク質 Pit が G タンパク質 OsRac1 に直接結合し、OsRac1 を活性化することを見出した(図1)。また、Pit は、OsRac1 を活性化することにより、活性酸素や過敏感細胞死を制御して、いもち病に対する抵抗性を制御することを明らかにした(Kawano et al., Cell Host Microbe, 2010)。本研究成果は、世界に先駆けて R タンパク質による耐病性誘導の分子メカニズムを明らかにしたものである。

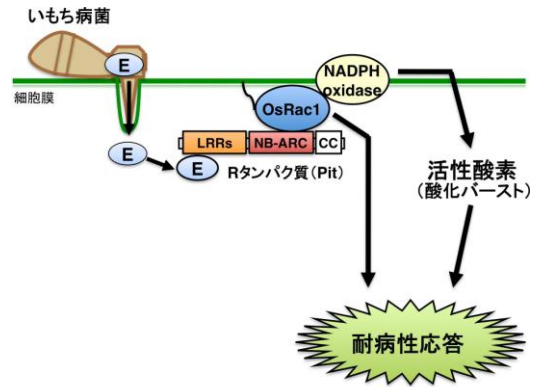


図1. Rタンパク質 (Pit)によるOsRac1の活性化

### 2) 細胞膜貫通型免疫レセプターの成熟と細胞内輸送に関する新規な発見

細胞膜貫通型免疫レセプターは、細胞膜上に局在するが、それらの輸送機構や成熟機構はほとんど明らかになっていない。我々は、Defensome の構成タンパク質である Hop/Stil と Hsp90 がキチンレセプターに直接結合することを見出した(Chen et al., Cell Host Microbe, 2010)。また、Hop/Stil の RNAi によりキチンレセプターの局在異常が観察され、いもち病菌に対する抵抗性が抑制されることを明らかにした(図2)。したがって、Hop/Stil がキチンレセプターに直接結合し、ER から細胞膜への輸送あるいは、ER での成熟に関与することが示唆された。Hop/Stil が現在不明である植物の病原体レセプターの輸送機構や成熟機構の解明の分子基盤となる可能性が高い。

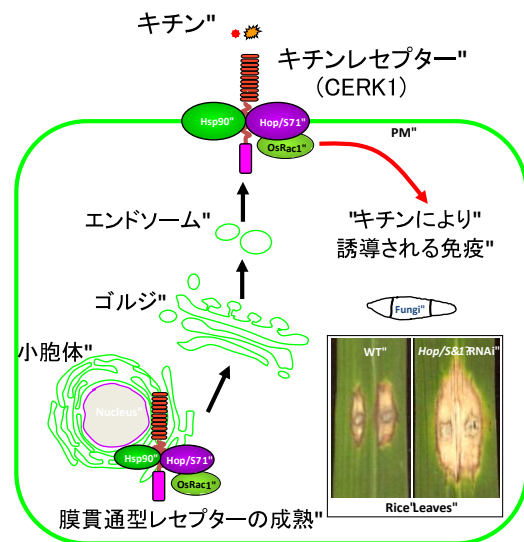


図2. Hop/Stilシャペロン複合体がレセプターの成熟と細胞内輸送に重要

### 3) OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構の解明

OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構を明らかにする目的で、恒常的活性型の OsRac1 により発現誘導がされる転写因子を検索したところ、basic helix-loop-helix 型転写因子である Rac Immunity 1 (RAI1) を得た。RAI1 が耐病性に関与するか否かを感染実験により検討した。RAI1 のアクティベーションタグラインは、顕著に耐病性が向上しており、RAI1 が耐病性に関与する分子であることが明らかになった (図 3: Kim et al., Plant Cell Physiol., 2012)。RAI1 により発現が調節される遺伝子をマイクロアレイを用いて単離を試み、PAL1 と OsWRKY19 を同定した。RAI1 のアクティベーションタグラインでは、PAL1 と OsWRKY19 の発現が上昇し、反対に、RAI1 RNAi 個体では発現が減少した。さらに、ゲルシフトアッセイにより、RAI1 が PAL1 と OsWRKY19 のプロモーター部位に直接結合することも見出した。以上の結果から、RAI1 は PAL1 と WRKY19 のプロモーター部位に直接結合して、それらの遺伝子発現調節をしていることが明らかになった。MAPK3 と MAPK6 による basic helix-loop-helix 型転写因子 SPEECHLESS のリン酸化が気孔形成に重要であることが知られている。SPEECHLESS と同様に、RAI1 が MAPK3 と MAPK6 に直接相互作用することを明らかにした。さらに、OsRac1 と MAPK3 及び MAPK6 も複合体を形成することを見出した。PAL1 と OsWRKY19 のプロモーターを用いたレポーターアッセイにより、MAPK3 あるいは MAPK6 依存的に、PAL1 と OsWRKY19 の発現が誘導されることを明ら

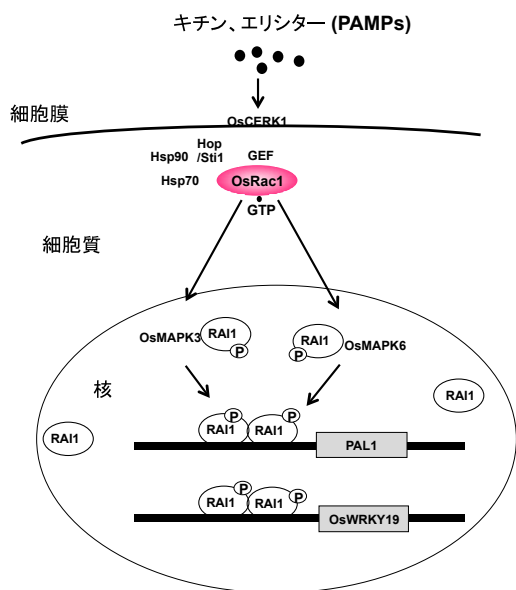


図3: OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構を明らかにした。以上の結果から、OsRac1 は MAPK3 あるいは MAPK6 によるリン酸化を介して転

写因子 RAI1 の活性を調節し、PAL1 と OsWRKY19 の発現を調節することが示唆された。

#### 4) イネの免疫反応を制御するDefensomeモデルの構築

プロテオーム解析により、OsRac1複合体 Defensomeを構成する因子として、RAR1, Hsp90、RACK1、Hop/Sti1を同定し、それらのタンパク質が耐病性において重要な役割を果たすことを明らかにした(Thao et al., Plant Cell, 2007; Nakashima et al., Plant Cell, 2008; Fujiwara et al., Plant Cell Physiol., 2009; Chen et al., Cell Host Microbe, 2010)。さらに、バイオイメージングを駆使した結果、OsRac1が細胞膜貫通型レセプター (CERK1) や Rタンパク質 (Pit) などの病原体レセプターと結合することを見出した。

生化学的な解析の結果、OsRac1は自身の活性化に依存して高分子の複合体を形成することが明らかになった。この結果から、直接的にOsRac1がタンパク質複合体を形成することが証明できた。本研究のスタート時点では、不明瞭であったOsRac1を含むタンパク質複合体Defensomeの分子実体を明らかにしつつある (図4)。

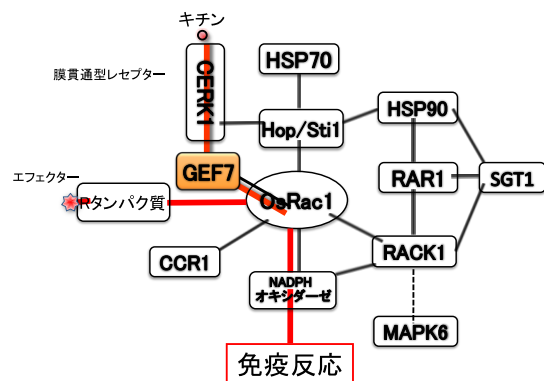


図4. イネの免疫反応を制御するDefensomeモデル

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (17件)

- 1) Kim SH, Oikawa T, Kyojuka J, Wong HL, Umemura K, Kishi-Kaboshi M, Takahashi A, Kawano Y, Kawasaki T, Shimamoto K. (2012) The bHLH Rac Immunity1 (RAI1) Is Activated by OsRac1 via OsMAPK3 and OsMAPK6 in Rice Immunity. Plant Cell Physiol. 53:740-54. 査読有
- 2) Chen L and Shimamoto K, Emerging roles of molecular chaperones in plant innate immunity, (2011) J. Gen. Plant Pathol.

- 77(1): 1-9. 査読有
- 3) Yamaguchi K, Imai K, Akamatsu A, Mihashi M, Hayashi N, Shimamoto, K., Kawasaki T. (2011) SWAP70 functions as a Rac/Rop guanine nucleotide-exchange factor in rice. *Plant J.* 2012 70(3):389-97. 査読有
- 4) Takahashi S, Kimura S, Kaya H, Iizuka A, Wong HL, Shimamoto, K., Kuchitsu K. Reactive oxygen species production and activation mechanism of the rice NADPH oxidase OsRbohB. *J Biochem.* 2012 in press 査読有
- 5) Kawano, Y., Akamatsu, A., Hayashi, K., Housen, Y., Okuda, J., Yao, A., Nakashima, A., Takahashi, H., Yoshida, H., Wong, H.L., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. (2010) Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate immunity. *Cell Host Microbe* 7: 362-375. 査読有
- 6) 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. (2010) 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. 査読有
- 7) Chen, L., Shiotani, K., Togashi, T., Miki, D., Aoyama, M., Wong, H.L., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. (2010) Analysis of the Rac/Rop small GTPase family in rice: expression, subcellular localization and role in disease resistance. *Plant Cell Physiol* 51: 585-595. 査読有
- 8) Fujiwara, T., Maisonneuve, S., Isshiki, M., Mizutani, M., Chen, L., Wong, H.L., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. (2010) Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *J Biol Chem* 285: 11308-11313. 査読有
- 9) Oda, T., Hashimoto, H., Kuwabara, N., Akashi, S., Hayashi, K., Kojima, C., Wong, H.L., Kawasaki, T., Shimamoto, K., Sato, M. and Shimizu, T. (2010) Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *J Biol Chem* 285: 1435-1445. 査読有
- 10) Wong, H.L. and Shimamoto, K. (2009) Sending ROS on a bullet train. *Sci. Signal* 29: 60. 査読有
- 11) Fujiwara, M., Hamada, S., Hiratsuka, M., Fukao, Y., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. (2009) Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice. *Plant Cell Physiol* 50: 1191-1200. 査読有
- 12) Thao, N.P., Chen, L., Nakashima, A., Hara, S., Umemura, K., Takahashi, A., Shirasu, K., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. (2007) RAR1 and HSP90 form a complex with Rac/Rop GTPase and function in innate-immune responses in rice. *Plant Cell* 19: 4035-4045. 査読有
- 13) Oda, T., Hashimoto, H., Kuwabara, N., Hayashi, K., Kojima, C., Kawasaki, T., Shimamoto, K., Sato, M. and Shimizu, T. (2008) Crystallographic characterization of the N-terminal domain of a plant NADPH oxidase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64: 867-869. 査読有
- 14) Nakashima, A., Chen, L., Thao, N.P., Fujiwara, M., Wong, H.L., Kuwano, M., Umemura, K., Shirasu, K., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. (2008) RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell* 20: 2265-2279. 査読有
- 15) Wong, H.L., Pinontoan, R., Hayashi, K., Tabata, R., Yaeno, T., Hasegawa, K., Kojima, C., Yoshioka, H., Iba, K., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. (2007) Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell* 19: 4022-4034. 査読有
- 16) Takahashi, A., Agrawal, G.K., Yamazaki, M., Onosato, K., Miyao, A., Kawasaki, T., Shimamoto, K. and Hirochika, H. (2007) Rice Ptila negatively regulates RAR1-dependent defense responses. *Plant Cell* 19: 2940-2951. 査読有
- 17) Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N. and Yoshioka, H. (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive

oxygen species by potato NADPH oxidase.  
Plant Cell. 9: 1065-1080. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

- 1) Ko Shimamoto, Defensome model for rice innate immunity, 2nd International Conference on Biotic Plant Interactions, 2011. 11. 12, 中国
- 2) Ko Shimamoto, Defensome model for rice innate immunity. International Union of Microbiological Societies, 2011. 9. 6, 札幌
- 3) Ko Shimamoto, Molecular signaling in rice immunity, 6th International Rice Genetics Symposium, 2010. 11. 19. フィリピン
- 4) Ko Shimamoto, OsRac1-mediated innate immunity in rice, 6th Rice Functional Genomics, 2009. 11. 10, 韓国
- 5) Ko Shimamoto, OsRac1 is involved in both PTI and ETI in rice, 2009. 7. 24, カナダ
- 6) Ko Shimamoto, Rice innate immunity, BioHanoi2007, 2008. 12. 18, ベトナム
- 7) Ko Shimamoto, Rice innate immunity, 13th International Congress of Plant Pathology, 2008. 8. 24, イタリア
- 8) Ko Shimamoto, Signaling in OsRac1-mediated rice immunity, 13th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008. 7. 21, イタリア

〔図書〕(計3件)

河野、島本、蛋白質 核酸 酵素 増刊 (2010) 95-100 共立出版  
藤原、島本、化学と生物 47: 378-380 (2009)  
日本農芸化学会  
Wong ら、実験医学 増刊 27: 80-83 (2009)  
羊土者

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島本 功 (SHIMAMOTO KO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：10263427

### (2) 研究分担者

川崎 努 (KAWASAKI TSUTOMU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：90283936

Wong Hann Ling (Wong Hann Ling)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：00403353

寺田 理枝 (TERADA RIE)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：30137799

河野 洋治 (KAWANO YOJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：00406175