

平成 22 年 6 月 6 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2007 ~ 2008  
 課題番号： 19770033  
 研究課題名 (和文)  
 OsRac1 と抵抗性タンパク質による耐病性シグナルの発動機構の解析  
 研究課題名 (英文)  
 Elucidation of mechanism of disease resistance-induced by OsRac1 and R proteins  
 研究代表者  
 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・研究員  
 研究者番号： 00406175

## 研究成果の概要：

植物の体内に病原体が侵入すると、細胞内のセンサーの役割を果たす免疫受容体の「抵抗性タンパク質」(Rタンパク質)が病原体を感知し、殺菌作用がある活性酸素の産生や細胞死などさまざまな防御反応を誘導することにより、感染を阻止するメカニズムが知られている。我々は、植物が「抵抗性タンパク質」によって病原体を認識した際に、防御反応の引き金になるタンパク質と、その活性化のメカニズムを世界に先駆けて発見した。「抵抗性タンパク質」が植物免疫のスイッチタンパク質 (OsRac1) に結合し、活性化する。続いてスイッチタンパク質が活性化すると活性酸素の産生や細胞死などの防御応答が誘導され、イネの最重要病害である「いもち病菌」に対して抵抗性を獲得することを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：植物分子、病害抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

植物の病原体の認識機構、またそれに伴う耐病性シグナル伝達の発動機構を明らかにすることは、植物の耐病性反応を理解する上で必須であり、耐病性育種を考える上でも大変重要な課題である。植物の免疫反応における認識機構は、病原体に由来するシグナルによって二つに分類される (Chisholm et al., Cell 2006

124:803-8014)。一つ目は、Pathogen Associated molecular patterns (PAMPs) と総称される細胞壁や細胞膜成分などの病原体に共通して存在する物質を認識する機構である。この認識機構により、basal defense と呼ばれる病原体に対して非特異的な抵抗性反応が発動される。二つ目は、植物の抵抗性(Disease resistance:R) 遺伝子産物 (以下、R タンパク質) による認識

機構である。R タンパク質は、病原体を認識する細胞内レセプターとして働き、病原体が感染の際に植物の細胞内に注入した病原菌のゲノム上に存在する Avirulence (Avr) 遺伝子産物を直接あるいは間接的に認識する。その結果、過敏細胞死などを伴う過敏反応と呼ばれる強い特異的な抵抗性反応が引き起こされる。多くの R タンパク質は、核酸結合部位 (NBS) とロイシンリッチリピート (LRR) をもつ NBS-LRR 型 R タンパク質に属している。近年、イネでは約 480 個の NBS-LRR 様遺伝子がゲノム中に存在することが明らかになっている。このうちの一部が R 遺伝子として同定されている。しかしながら、最初に植物で R 遺伝子が単離されてから 10 年以上が経つにも関わらず、NBS-LRR 型 R タンパク質がどのような複合体を形成し、下流のシグナル伝達系を制御しているかはほとんど明らかになっていない。

我々はこれまで、一貫して分子スイッチである低分子量GTP結合タンパク質の解析を行ってきた。我々は、イネの最重要病害であるいもち病菌を用いて、植物の免疫機構の解明に取り組んでいる。我々は、これまでに、低分子量GTP結合タンパク質OsRac1がRタンパク質を介した抵抗性反応において重要な役割を果たしていることを明らかにしている (Ono et al., PNAS 2001 98:759-764)。また、OsRac1 は、細胞死、活性酸素、防御遺伝子、抗菌性物質、細胞壁構成成分リグニンの産生を誘導し、耐病性に関与することも明らかにしている (Kawasaki et al., PNAS 1999 96:10922-10926, Ono et al., PNAS 2001 98:759-764, Wong et al., Plant Physiol, 2004 135:1447-1456, Kawasaki et al., PNAS 2006 103:230-235)。最近、OsRac1 相互作用分子の探索を行ったところ、NBS-LRR構造をもつRタンパク質様のタンパク質が複数同定された (Nakashima et al., Plant Cell 2008 20(8):2265-79)。このことから、OsRac1 と NBS-LRR型Rタンパク質が相互作用してRタンパク質を介した抵抗性反応を制御していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究ではOsRac1を手がかりとして、NBS-LRR型Rタンパク質の耐病性シグナルの発動機構の解明を試みる。具体的にはイネ

ゲノム上に存在する約480個のNBS-LRR様遺伝子の中から、OsRac1に相互作用するNBS-LRR型タンパク質を同定し、どのNBS-LRR型タンパク質とOsRac1が働いているかを明らかにする。NBS-LRR型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の働き、病原体の侵入を感知すると活性化しそのシグナルを下流へと伝えることが知られている。生化学的な解析を用いて、OsRac1とNBS-LRR型タンパク質の相互作用がそれぞれのタンパク質の活性にどのような影響を与えるか検討する。上述した生化学的な解析で得られた知見が正しいか否か、実際にイネやタバコの植物体を用いて検討する。解析には、OsRac1やNBS-LRRの過剰発現、RNA干渉法、イネトランスポゾンTos17ノックアウト変異体等を用いる。以上の解析により、OsRac1とNBS-LRR型タンパク質による耐病性のシグナル伝達機構が、分子レベルで明らかになる。

## 3. 研究の方法

(1) 生化学的手法を用いたOsRac1とNBS-LRRの相互作用の解析

### ①OsRac1と相互作用するNBS-LRRの同定

イネでは約480個のNBS-LRR遺伝子がゲノム中に存在することが明らかになっており、どのNBS-LRRタンパク質がOsRac1と相互作用するかを知ることは、その後の解析において重要な問題である。既知のNBS-LRR構造をもつイネいもち病抵抗性遺伝子 (Pita, Pib, Pi9等) のcDNAは入手して、OsRac1との相互作用を解析する。

### ②OsRac1とNBS-LRRの相互作用の解析

分子スイッチであるOsRac1は細胞内において活性型 (GTP型) あるいは不活性型 (GDP型) で存在することが知られている。酵母 two-hybridやin vitro binding assayを用いて①で同定したNBS-LRRタンパク質とOsRac1の相互作用が、活性型に特異的であるかを調べる。

エピトープタグをもつOsRac1あるいはNBS-LRRタンパク質発現させ免疫沈降法により、in vivoでのOsRac1とNBS-LRRの相互作用を解析する。

### ③NBS-LRRタンパク質のOsRac1結合ドメインの同定

NBS-LRRタンパク質は、N末端からエフェクターと結合し下流へとシグナルを伝えるエ

フェクター結合 (EB) ドメイン、アデニンヌクレオチドと結合し自身の活性を制御する NBS ドメイン、病原体の侵入を認識する LRR ドメインが存在する。NBS-LRR タンパク質の OsRac1 結合ドメインを同定することは、OsRac1 と NBS-LRR タンパク質の結合の意義を解明する上で重要である。そこで、EB、NBS、LRR ドメインに分けて OsRac1 との相互作用を検討し、結合領域を特定する。

## (2) 植物を用いたOsRac1とNBS-LRRの機能解析

### ①一過的発現系を用いたOsRac1とNBS-LRRの機能解析

これまでに同定されたNBS-LRR構造をもつ Rタンパク質の中には、タバコでの過剰発現により病原体認識とは関係なく、過敏感細胞死を誘導するものが知られている。また、恒常的に過敏感細胞死を誘導するNBS-LRRのアミノ酸変異も知られている。このようなNBS-LRRとドミナントアクティブ型あるいはドミナントネガティブ型のOsRac1を発現させ、過敏感細胞死のレベルを調べ、NBS-LRR依存型細胞死におけるOsRac1の役割を検討する。

### ②イネを用いたOsRac1とNBS-LRRの機能解析

平成19年度に得られた知見をもとにイネといもち病菌の系を用いて、OsRac1とNBS-LRRの機能解析を行う。具体的には、RNA干渉法を用いたOsRac1の遺伝子機能破壊やOsRac1変異体の過剰発現体を用いて、非病原性(非親和性)いもち病菌が誘導する過敏感反応におけるOsRac1の役割を明らかにする。

## (3) 蛍光タンパク質を用いたOsRac1シグナル伝達のバイオイメーキング

### ①抵抗性誘導時におけるOsRac1及びNBS-LRRの動態の解析

蛍光タンパクであるGFPとOsRac1あるいはNBS-LRRを融合したタンパクを発現する植物体を作製し、耐病性反応時におけるOsRac1及びNBS-LRRの挙動を観察する。

### ②1分子FRETシステムによる抵抗性誘導時におけるOsRac1活性化の可視化

我々は、既に動物で利用されている1分子FRETシステムを改変して、OsRac1の活性化をイネ培養細胞でモニタリングすることに成功している。このコンストラクトを導入した形質転換植物を作製し、病原体の感染過程及

び抵抗性反応の誘導過程におけるOsRac1の活性化を解析する。

## 4. 研究成果

我々は、OsRac1相互作用する既知のRタンパク質を探索したところ、いもち病の抵抗性タンパク質であるPitを同定した。Pitは、OsRac1と自身のNB-ARCドメインを介して直接結合した。また、大変興味深いことに、Pitは活性化するとOsRac1に対する親和性が顕著に上昇することが明らかになった。Pitの細胞内局在をイネの培養細胞で検討したところ、細胞膜上に濃縮することが明らかになった。この局在は、我々がこれまでに報告しているOsRac1の局在と類似していた。Pitによる抵抗性にOsRac1が関与するかOsRac1の発現抑制イネを用いて検討したところ、OsRac1発現抑制イネではPitを介した抵抗性が抑制され、顕著にいもち病の病斑が大きくなっていることが確認された。実際に、OsRac1のRNAi植物体でのいもち病菌の菌体量を測定したところ、野性型と比較して約2倍のいもち病菌が存在することが確認された。活性型のPitやOsRac1をタバコで過剰発現すると、過敏感反応や活性酸素の産生が観察された。この活性型Pitによる過敏感反応や活性酸素の産生は、ドミナントネガティブ型OsRac1によって抑制された。したがって、OsRac1はPitの下流で過敏感反応死や活性酸素の産生を制御することにより、耐病性を制御することが示唆された(図1)。

以上の結果から、PitがOsRac1を活性化する

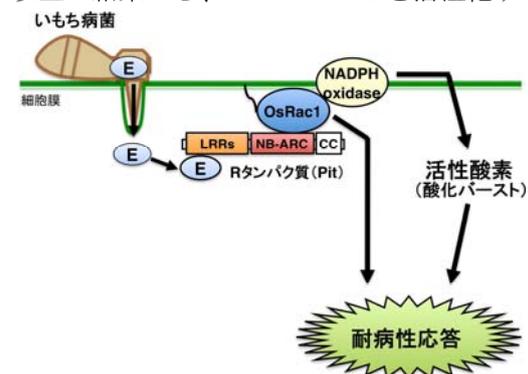


図1. Rタンパク質 (Pit)によるOsRac1の活性化

可能性が考えられた。そこで、イネの細胞内において、PitによるOsRac1の活性化をモニタリングするFRETセンサーの作製を試み、植物ではじめてGタンパク質の活性化をモニタリングするFRETセンサーを完成させた。FRETセンサーを用いて、OsRac1がPitを活

性化できるか否かを検討したところ、活性型 Pit は OsRac1 を活性化できることが明らかになった。したがって、Pit がいもち病菌を認識して活性化すると、OsRac1 と結合し、OsRac1 を活性化する。その結果、活性酸素や細胞死が誘導され、耐病性が誘導されると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Kawano Y, Chen, L., and Shimamoto K. Function of small GTPase Rac and associated proteins in rice innate immunity. *Rice*, in press. (査読有)
- ② Kawano Y, Akamatsu A, Hayashi K, Housen Y, Okuda J, Yao A, Nakashima A, Takahashi H, Yoshida H, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K. 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(5):362-75, 2010 (査読有)
- ③ Kawasaki T, Imai K, Wong H, Kawano Y, Nishide K, Okuda J, and Shimamoto K. Rice guanine nucleotide exchange factors for small GTPase OsRac1 involved in innate immunity of rice. In *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. 179-184, 2009 (査読有)

[学会発表] (計10件)

- ① 河野 洋治, 他10名、タンパク質によるGタンパク質OsRac1の活性化が植物免疫に重要である 日本植物病理学会大会 京都 2010年 3月
- ② 河野 洋治, 他10名、Rタンパク質によるGタンパク質OsRac1の活性化が植物免疫に重要である 日本植物生理学会第51回年会 熊本 2010年 3月
- ③ 河野 洋治, 他10名、Rタンパク質によるGタンパク質OsRac1の活性化が植物免疫に重要である 第32回日本分子生物学会年会 横浜 2009年 12月
- ④ 河野 洋治, 他10名、抵抗性蛋白質によるGタンパク質OsRac1の活性化が稲の免疫に重要である 第82回日本生化学大会 神戸 2009年 10月
- ⑤ 河野 洋治, 他10名、Rタンパク質によるGタンパク質OsRac1を介した過敏反応死の

誘導機構 第13回植物バイテクシンポジウム 京都 2009年 9月

- ⑥ Kawano Y, et al, The activation of OsRac1 by R protein plays a critical role in innate immune responses in rice, MPMI ケベック カナダ 2009年 7月
- ⑦ 河野 洋治, 他10名、低分子量GTP結合タンパク質OsRac1を介した抵抗性タンパク質の耐病性制御機構 日本植物生理学会第50回年会 名古屋 2009年 3月
- ⑧ Kawano Y, et al., The small GTPase OsRac1 is involved in R gene-mediated cell death and defense signaling in rice 第31回日本分子生物学会年会 神戸 2008年 12月
- ⑨ 河野 洋治, 他10名、低分子量GTP結合タンパク質OsRac1とNBS-LRRタンパク質の相互作用 日本植物生理学会第50回年会 札幌 2008年 3月
- ⑩ Kawano Y, et al., Small GTPase OsRac1 interacts with NBS-LRR resistance proteins MPMI ソレント イタリア 2007年 7月

[図書] (計2件)

- ① 河野 洋治, 島本 功: パターン認識受容体とRタンパク質による耐病性シグナルをコーディネートする分子Gタンパク質OsRac1 秀潤社 細胞工学 2010 印刷中
- ② 河野 洋治, 島本 功: 低分子量Gタンパク質Rac/Ropファミリーによる植物免疫の制御機構 共立出版 植物のシグナル伝達 -分子と応答- 99-104, 2010

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

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・研究員  
研究者番号: 00406175