

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770045

研究課題名 (和文) *mekk1* 変異体の矮性致死形質を抑制する遺伝子の同定研究課題名 (英文) forward genetic approach toward identifying gene(s) suppresses dwarf and lethal phenotypes of *Arabidopsis mekk1* mutant

研究代表者

市村 和也 (ICHIMURA KAZUYA)

独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究チーム・研究員

研究者番号：70321726

研究成果の概要：PAMP 情報伝達に関わるシロイヌナズナ *MEKK1* 遺伝子の欠損変異体は、構造的な防御反応により、強い矮性を伴う致死形質を示す。この表現型の原因遺伝子を解明するため、1) *MEKK1* 調節ドメインの発現誘導により、欠損変異体表現型の再現系を構築した。2) 上記の形質転換シロイヌナズナを用いた EMS スクリーニングにより、矮性致死表現型を抑制する変異体を単離した。また、ポジショナルクローニングに向けた条件検討を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物・植物生理・分子

キーワード：細胞死、防御反応、プロテインキナーゼ、MAP キナーゼカスケード、リン酸化、抵抗性遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

高等植物では MAP キナーゼカスケードが一般抵抗性および遺伝子対遺伝子抵抗性において重要な役割を果たしていると考えられている。

細菌の鞭毛タンパク質やカビのキチン質などの PAMP (pathogen associated molecular pattern) は、細胞表面のパターン認識受容体が検出し、その後 MAP キナーゼカスケードに情報が伝達される。

PAMP の情報伝達を担う *MEKK1* (MAPKKK) の遺伝子破壊株では興味深いことに劣性の矮性致死表現型を示し、維管束組織特異的な細胞死や活性酸素蓄積が認められた。遺伝学的な解析から、この形質は抵抗性 (R) タンパク質の安定性を制御する *RARI* や、サリチル酸 (SA) 蓄積に依存していた。この結果から、*mekk1* 変異体では R タンパク質が活性化しているために、SA 蓄積や細胞死が常に活性化されていると申請者は考えた。このことから遺

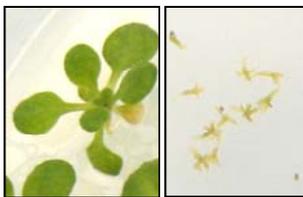
伝的には MEKK1 が R 遺伝子を介した細胞死を負に制御することが示唆された。

## 2. 研究の目的

MEKK1 は一般抵抗性の情報伝達を担いながらも、細胞死という強い反応を遺伝的に負に制御している矛盾が生じている。次に明らかにすべき課題は、この相反する結果を矛盾なく説明することである。本研究の目的は *mekk1* の矮性致死形質を抑制する変異体を単離、原因遺伝子を同定、解析することで、MEKK1 の機能の本質を明らかにすることである。MAP キナーゼカスケードは真核生物において普遍的に存在し、様々な受容体からの情報を細胞内へ伝達するモジュールとして機能している。病原体認識は FLS2 などのパターン認識受容体や R (抵抗性) タンパク質によって行われる。その情報は数分以内に MAP キナーゼカスケードへ伝達されるが、どのような仕組みが存在するのか、またどのように防御反応を誘導するのか、情報伝達経路の全体像はまだ見えていない。その部分を MAP キナーゼカスケードという切り口から明らかにするのが、研究の全体構想における目標である。

## 3. 研究の方法

本研究の目的は *mekk1* の矮性致死形質を抑制する変異体を単離、原因遺伝子を同定することであるが、スクリーニングの成否が本研究の鍵となった。以下に事項を述べる。



ED - +

図1 エストラジオール(ED)処理による矮性形質の誘導

### (1) *mekk1* 致死形質の回避

*mekk1* の矮性致死形質は非常に強く、ホモ系統の維持は 28°C に空調した栽培室でも現在のところ成功していない (28°C 寒天プレートなど高温高湿度では完全に表現型は抑制されるが、高湿度のために野生型でも不稔とな

る)。この問題を回避するため、申請者は MEKK1 制御ドメインの過剰発現と、ステロイドホルモン発現誘導ベクターを組み合わせることにした。致死形質を回避するために、エストラジオール発現誘導ベクターに MEKK1 制御ドメインを挿入した形質転換シロイヌナズナを作製して表現型を解析すると、エストラジオール処理依存的に矮性致死形質が現れた (図 1)。この矮性致死表現型は、*RAR1* および *SGT1b* 遺伝子に依存し、高温により抑制された。また、*mekk1* 変異体と同様な維管束組織での細胞死や *PR* 遺伝子の発現が観察された。このことから MEKK1 制御ドメインの過剰発現による表現型は、*mekk1* 変異体致死形質と本質的に同じであると判断した。以上の結果から、エストラジオール発現誘導系を用いることで、MEKK1 制御ドメインの過剰発現による致死形質を回避しつつ、変異体スクリーニングを可能とする基礎が確立できた。

### (2) スクリーニングのシステム

申請者はいかなるスクリーニングにおいても重要視すべき点は以下の 6 点であると考えた。(a) 陽性と陰性の区別が明確、(b) ハイスループット、(c) 小規模スペースで実施可能、(d) 低コスト、(e) スクリーニング強度を調整可能、(f) 少人数で実施可能。これらの点を考慮した結果、スクリーニングは次のように行うことにした。エストラジオールを含む培地を染み込ませた濾紙上に、上記形質転換シロイヌナズナ M2 種子を播種、発芽生育させる。ほとんどの発芽個体は生育阻害を起こすなかで、比較的正常な形態を示す個体を回収、以降の解析に供する。

## 4. 研究成果

### (1) 変異体のスクリーニング

MEKK1 制御ドメイン発現誘導による矮性致死形質を抑制する変異体を、EMS変異M2 系統種子約 25 万粒からスクリーニングを行った。スクリーニングには、およそ一ヶ月を要したが、その間植物育成チャンバーを一台占有したが、コンセプト通り、時間的にも空間的にも高効率で行うことができた。その結果、79 個体のサプレッサー変異体を単離し、*smn* (*suppressor of MEKK1N over expression lethality*) 変異体と名付けた。

(表1) 2次スクリーニングのまとめ

dwarf phenotype suppression		MEKK1N expression	
score	Number of lines	score	Number of lines
+++	18	+++	9
		++	3
		+	5
		-	1
		nd	0
++	33	+++	21
		++	6
		+	5
		-	1
		nd	0
+	16	+++	7
		++	4
		+	1
		-	2
		nd	2
-	7	+++	1
		++	3
		+	1
		-	0
		nd	2
nd	5	+++	2
		++	0
		+	0
		-	0
		nd	3
total			79

## (2) 2次スクリーニング

これらのうち擬陽性や既存の変異体を除外するため2次スクリーニングを行うと共に、矮性抑制能の強さを4段階に分けて評価した(表1)。また、矮性形質誘導のため用いているMEKK1制御ドメイン自身への変異やエストラジオール誘導系への変異を除外するため、エストラジオールによるMEKK1制御ドメインの発現量を、コンストラクトに付加したMycエピトープを用いたウェスタンブロット解析により評価した(表1)。この段階で、再現性が得られない系統やMEKK1制御ドメインの誘導が起らない系統は除外された。



図2 MEKK1制御ドメイン過剰発現による矮性形質を抑制する変異体

さらに遺伝的解析から *mekk1* 変異体表現型を抑制することが明らかな *RARI* と *SGT1b* 遺伝子への変異の有無をチェックし、これらの遺伝子に変異が無いことを確認した。以上の2次スクリーニングにより、最終的に抑制変異体は9系統に絞り込まれた(図2)。

(表2) *smn*変異体相補性試験結果

complementation group	<i>smn</i> number
I	53, 71, 98, 136, 150, 169
II	85, 90, 91

## (3) 相補性試験

これらについて、総当たりの掛け合わせによる相補テストを行った結果、2つの相補群に分かれた(表2)。また、各変異体について検定交雑を行い、矮性抑制形質は劣性遺伝することを明らかにした。このことから、*SMN* 遺伝子の機能欠失により、MEKK1制御ドメイン過剰発現による矮性形質が抑制されたと予想された。今後予定しているマッピングの際に、MEKK1制御ドメインを含むT-DNA上の変異を見分けるため、ゲノム上のT-DNA挿入部位をTail-PCR法により同定した。その結果、T-DNAは3番染色体上腕末端近傍に3コピー挿入されていることが明らかになった。以上のように、マッピングに関する周辺情報を取得し、実際の作業を開始した。

## (4) 顕在化した問題点

それぞれの相補群から数系統を選び、ポジショナルクローニングのためのマッピングの準備を始めた。変異体のエコタイプはLandsburg erecta (Ler)であることから、マッピングにはColumbia-8 (Col-8)エコタイプと掛け合わせることで行うこととした。Col-8と変異体を交雑し、F2雑種を取得した。MEKK1制御ドメインの過剰発現による矮性形質誘導には、T-DNA挿入がduploidゲノムあたり、5コピー以上であることが必要である。このような個体を得た上で、*smn*変異をF2集団中でマップしてゆく必要がある。しかしながら、T-DNA上にコードされるハイグロマイシン耐性遺伝子を利用して、T-DNAを保有する個体を選抜すると、5コピー以上のT-DNAを持つ個体を得られない問題に遭遇した。このため、マッピングに利用できる個体の出現頻度が非常に低く、十分な個体数を準備するためには、上記の問題解決が必要な状況となっていた。結論としては、5コピー以上T-DNAを持つ個体はMEKK1制御ドメインの発現誘導とは無関係に矮性形質が現れることが明らかになった。このため、ハイグロマイシン選択時に、感受性個体(生育が停止)と区別が付かなくなり除外されてしまったと考えた。そのためハイグロマイシンを含まない培地

に種子を播種して矮性個体を得ることで、問題を回避することにした。またこの矮性形質の原因遺伝子は、本研究で同定を試みている遺伝子と同一である可能性が考えられた。しかしながら、EMS スクリーニングの母集団として作製した Ler エコタイプの形質転換シロイヌナズナを Ler 野生型と戻し交雑した BC2 集団では、上記の矮性形質が表れた。この結果から、矮性形質を付与する遺伝子は Ler 自身も保有していること。また、その形質ゆえ、スクリーニング母集団を増やしてゆく際に、遺伝子を含む個体を除いていたことが明らかになった。この遺伝子は Col-8 にも存在することから、掛け合わせにより再び遺伝子が導入され矮性形質が表れてきたことが、明らかになった。

今後の方針としては、は矮性形質が現れることを有効に利用し、この形質を選択マーカーとして、5 コピー以上 T-DNA を持つ個体を選抜した上で、MEKK1 制御ドメインの過剰発現による致死形質の抑制に立ち戻り、smn 遺伝子のマッピングを行いなるべく早期に、マップポジションを確定してゆきたい。マッピングのためのツールやノウハウはすでにシロイヌナズナでは十分蓄積していることから、ひとたびマッピング条件が確定すれば比較的短期間で染色体上における *SMV* 遺伝子の候補領域が推定できることが期待される。

#### 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)

- ① Trujillo, M., Ichimura, K., Casais, C. and Shirasu, K. Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 18, 1396-1401, (2008)、査読有
- ② Ichimura, K. (10 名中 5 番目) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Acad. Natl. Sci. U.S.A.*, 109, 19613-19618, (2007)、査読有
- ③ Ichimura, K. (8 名中 3 番目) The Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK3-MPK6 Is an Important Part of the Jasmonate Signal Transduction Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19, 805-818, (2007)、査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 市村和也、シロイヌナズナ *mekk1* 変異体表現形を抑制する変異体の単離、植物生理学会第 49 回年会、2008 年 3 月 20 日、札幌

- ② 市村和也、シロイヌナズナ MEKK1 に結合する U-box 型ユビキチンリガーゼの解析、植物生理学会第 50 回年会、2008 年 3 月 21 日、名古屋

[図書] (計 1 件)

- ① Takahashi, F., Ichimura, K., Shinozaki, K., Shirasu, K. Plant Mitogen Activated Protein Kinase cascades in Signaling Crosstalk. Chapter 2, In *Signal Crosstalk in Plant Stress Responses*. (Yoshioka, K. Shinozaki, K. eds). Ames, Iowa, Blackwell publishing. 「In press」

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2007/071120/index.html>

[http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2008/080905\\_2/index.html](http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2008/080905_2/index.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

市村 和也 (ICHIMURA KAZUYA)

独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究チーム・研究員

研究者番号：70321726