

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06053

研究課題名（和文）MAMP応答性リン酸化タンパク質によるカロース蓄積制御機構の解明

研究課題名（英文）Studies on the regulation of callose deposition through MAMP-responsive phosphoprotein

研究代表者

松井 英譲（Matsui, Hidenori）

岡山大学・環境生命科学学域・准教授

研究者番号：20598833

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：植物免疫の理解は、病害抵抗性育種に向けた重要な研究課題である。植物は病原菌の感染を認識すると、免疫応答を活性化し感染から身を守る。感染部位におけるカロース沈着は植物免疫応答の一つであり、病原菌に対する物理的障壁として機能すると考えられている。本研究では、カロース沈着が低下する変異体mark2の機能解明を通じて、カロース沈着の制御に向けた分子機構の解明を目指した。その結果、MARK2タンパク質のリン酸化はMAMP応答時のカロース沈着制御に寄与することを見出した。さらに、MARK2の分子機能の理解に向けて、共免疫沈降法によりMARK2相互作用因子の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、環境負荷を低減した持続可能な農業の必要性が議論されている。環境負荷の低減には、作物への病害抵抗性の付与は欠かすことができない。そのためにも、植物が備える抵抗性の理解が必要である。本研究では、植物のMAMP認識を起点としたリン酸化シグナルの下流因子であるMARK2タンパク質の機能解明を通じて、植物が備える免疫応答の解明を進めた。その結果、MARK2タンパク質のリン酸化がカロース沈着制御に関わることを見出した。カロース沈着の制御プロセスの理解は学術的にも価値の高い成果であり、将来的にはカロース沈着の制御による物理的抵抗性の強化が可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Understanding plant immunity is an important research topic for disease resistance breeding. When plants recognize pathogen infection, they activate an immune response to protect themselves from infection. Callose deposition at the site of infection is one of the plant immune responses and is thought to act as a physical barrier against pathogens. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms for the regulation of callose deposition by explaining the function of the mutant MARK2, which has reduced callose deposition. As MARK2 is a MAMP-responsive phosphoprotein, we also examined the significance of phosphorylation of MARK2. As a result, we found that phosphorylation of MARK2 protein contributes to the regulation of callose deposition during MAMP response. To understand the molecular function of MARK2, we successfully identified MARK2 interacting factors by co-immunoprecipitation.

研究分野：植物病理学

キーワード：PTI 植物免疫 リン酸化 カロース沈着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の備える Pattern-triggered immunity (PTI)は広範な病原菌に対する重要な防御機構である (Boutrot and Zipfel 2017 Annu Rev Phytopathol. 55: 257-28)。微生物の保存性の高い細胞成分 (microbe-associated molecular pattern: MAMP) を植物のパターン認識受容体 (pattern recognition receptor: PRR) が認識し、タンパク質リン酸化を介してシグナルを下流に伝達することで、広範な病原菌に効果を有する抵抗性反応を誘導する。しかしながら、病原菌の認識から抵抗性誘導の間には未だ大きなギャップが存在する。このギャップを埋めることは、植物病原菌の感染制御への有用な技術発展に繋がると考えられる。

カロース蓄積は PTI 応答の一つであり、物理的障壁として病原菌感染の抑制に関わる (Schwessinger and Ronald, 2012 Annu Rev Plant Biol. 63:451-482)。例えば、カロース生合成酵素過剰発現体は、生育不良は認められないものの、ウドンコ病菌に対し抵抗性を示す (Ellinger et al. 2013 Plant Physiol. 161:1433-1444)。つまり、物理的障壁としてのカロース制御技術の開発は病原菌感染制御に有効であると考えられる。一方で、病原菌感染部位へのカロース蓄積の分子制御機構は明らかになっていない。

申請者はシロイヌナズナを用いたリン酸化プロテオミクス手法により、複数の MAMP に応答してリン酸化が変動する新奇植物免疫調節因子の同定を進めてきた (2012 年, 日本プロテオーム学会大会)。その中で単離した *mark2* 変異体は、flg22 処理に伴うカロース蓄積が有意に低下する。MARK2 は PRR の下流で共通して機能する新奇因子であることから、MARK2 の分子機能の理解を通じて、植物の病原菌認識から始まるカロース蓄積制御の分子機構を明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、「カロース集積に関わる全く新しい因子 MARK2 の解析を通じ、病原菌感染部位のカロース集積の制御機構の解明」を目指した。

3. 研究の方法

(1) Col-0 と *mark2* 変異体を用いた *Pto* 接種時の RNA-seq 解析

(2) MARK2 のリン酸化が抵抗性に及ぼす影響の検証

flg22 処理に伴うカロース沈着への MARK2 のリン酸化状態の影響について

複数の病原菌を用いた MARK2 リン酸化状態改変形質転換体の抵抗性の検証

(3) MARK2 と MK2BP1 の相互作用の解明と新規 MARK2 相互作用因子の同定

4. 研究成果

(1) Col-0 と *mark2* 変異体を用いた *Pto* 接種時の RNA-seq 解析

MARK2 遺伝子はプロモーター解析から、シロイヌナズナの親和性病原菌であるトマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*) 接種部位で顕著に遺伝子発現が誘導される (澁谷平成 30 年度日本植物病理学会関西支部会)。MARK2 の機能解明にむけて、*mark2* 変異体を用いた RNA-seq 解析を試みた。処理区として mock 24 時間後、flg22 処理 24 時間後、*Pto* 接種 24 時間後のサンプルから Total RNA を抽出、解析した。GO 解析の結果、*mark2* 変異体では *Pto* 接種および flg22 接種に伴い、キチン応答関連遺伝子群がエンリッチされることが明らかとなった。一方で発現が低下する遺伝子群はほとんどエンリッチされなかった。個々の遺伝子に関して解析したところ、*mark2* 変異体では、Col-0 と比較してジャスモン酸およびエチレン応答性のマーカー遺伝子 *VSP1*, *VSP2*, *PDF1.2* 遺伝子発現が低下していた。*VSP1*, *VSP2*, *PDF1.2* 遺伝子発現制御に関わる *myb* 遺伝子群の遺伝子発現を確認したところ、*mark2* 変異体では *myb* 遺伝

子発現が低下していた。そこで、RNA-seq 解析結果の検証のため RT-qPCR を試みた。*mark2* 変異体では *flg22* 処理および *Pto* 接種において *VSP1*, *VSP2*, *PDF1.2* 遺伝子発現が低下した。*VSP1*, *VSP2*, *PDF1.2* 遺伝子発現は *mark2* 変異体の遺伝背景に *MARK2* ゲノム配列を相補した *MARK2* 相補個体では Col-0 程度に回復したことから、*MARK2* 遺伝子の欠損に伴い、ジャスモン酸およびエチレンシグナルに何らかの影響が出ると推察された。サリチル酸とジャスモン酸は互いに拮抗的に作用するだけでなく、防御応答には両者が協調して機能することも知られている (Kachroo et al., 2003, MPMI, Tsuda et al., 2009, PLoS Genet)。近年では、サリチル酸とジャスモン酸の病原菌感染部位特異的な濃度勾配が抵抗性誘導時に重要な役割を担うことも報告されている (Betsuyaku et al., 2018, Plant and Cell Physiol)。そこで、*MARK2 promoter ::GUS* 植物の解析結果から、病原菌感染部位で *MARK2* 遺伝子発現が誘導されたことから、次に *mark2* 変異体のサリチル酸関連遺伝子の発現を確認した。しかしながら、サリチル酸のマーカ-遺伝子である *Pathogenesis-related 1 (PR1)* 遺伝子の発現は、*mark2* 変異体で Col-0 とほとんど変動が認められなかった。これらの結果は、*mark2* 変異体ではジャスモン酸およびエチレンシグナルに何らかの影響が出ていると推察された。エチレンシグナルはカロース沈着の正の制御因子として機能することから (Clay et al. 2009 Science 323:95-101; Tintor et al., 2013, PNAS)、少なくとも、*mark2* 変異体の表現型はこれまでの報告と矛盾はしないものと考えられた。

(2) *MARK2* のリン酸化が植物免疫に及ぼす影響の検証

MARK2 は MAMP 応答性リン酸化タンパク質として単離した経緯があり、MAMP 処理に伴い、C 末端側領域のセリン残基 (S) がリン酸化修飾を受ける。そこで、セリン残基をリン酸化されないアラニン残基 (A) に置換した SA 変異体、擬似リン酸化アミノ酸であるアスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E) に置換した SD もしくは SE 変異体を用いて、カロース蓄積における *MARK2* のリン酸化の影響、複数の病原菌を用いた形質転換体の抵抗性について検証した。

flg22 処理後 24 時間のカロース沈着について *MARK2* のリン酸化が与える影響について検証した。*MARK2^{SA}* 相補個体は、Col-0 と比較して *flg22* 処理時のカロース沈着が *mark2* 変異体と同程度にまで低下した。*MARK2^{SD}* 相補個体でも、*flg22* 処理時のカロース沈着は *mark2* 変異体と同程度であり、回復しなかった。そこで、*MARK2^{SA}* 相補個体ならびに *MARK2^{SD}* 相補個体の *MARK2* 遺伝子発現を RT-qPCR 法で定量したところ、両相補個体ともに Col-0 と同程度まで回復していることを確認した。以上の結果は、*flg22* 処理時のカロース沈着に *MARK2* のリン酸化修飾が重要な役割を担うことを示している。一般に、タンパク質のリン酸化修飾は機能調節を担うことが知られている。例えば、リン酸化修飾に伴うタンパク質の立体構造および酵素活性の変化、リン酸化修飾に伴う電荷変化による可溶性の変化などが知られている。今回、擬似リン酸化相補個体で表現型が回復しなかったが、類似した例はしばしば報告されている。おそらく *MARK2* タンパク質のリン酸化部位の立体構造がカロース沈着に制御に影響を及ぼしていると推察された。

次に、*MARK2* 相補個体による病害抵抗性を検証した。*Pto* に加えて、親和性糸状菌 *C. higginsianum* に対する抵抗性の解析には、Col-0, *mark2* 変異体、*MARK2* 相補個体、*MARK2^{SA}* 相補個体および *MARK2^{SD}* 相補個体を用いた。*Pto* のスプレー接種およびインフィルトレーション接種とともに、*mark2* 変異体は Col-0 と比較して細菌数が増加し、より罹病性の表現型を示した。*mark2* 変異体における *Pto* の細菌数の増加は、*MARK2* 相補個体に伴い Col-0 程度にまで回復したことから、*MARK2* 遺伝子が病害抵抗性の正の制御因子として機能することが示された。また、*MARK2^{SA}* 相補個体、*MARK2^{SD}* 相補個体は、*MARK2* 相補個体と同程度にまで *Pto* の細菌増殖が回復するという結果になった。

次に、*C. higginsianum*のドロップ接種に伴う病斑進展を計測した。*mark2*変異体はCol-0よりも病斑長が進展し、*MARK2*の相補に伴いCol-0程度まで回復する傾向が認められた。一方で、*MARK2^{SA}*相補個体、*MARK2^{SD}*相補個体ともに、*C. higginsianum*接種に伴う病斑長は、Col-0と同程度にまで回復した。

以上の接種試験結果をまとめると、少なくとも*MARK2*遺伝子の相補に伴い、*mark2*変異体の高罹病性の表現型が回復することが示された。すなわち、*MARK2*は植物免疫を正に制御する因子であることを示している。一方で、今回の解析からは、*MARK2*タンパク質のリン酸化修飾が抵抗性に及ぼす影響については明らかにできていない。*MARK2*タンパク質のリン酸化の重要性について解析するには、カロール沈着制御に影響を及ぼすType III effectorを欠損させた*Pto*を用いるなど、新たな実験系の構築が必要になると考えられる。以上の結果については、現在投稿準備中である。

(3) *MARK2* と *MK2BP1* の相互作用部位の同定

MARK2 と *MARK2*-binding protein1 (*MK2BP1*)の相互作用の検証

MARK2 タンパク質は分子機能未知な分子であり、その機能解明に向けて、*MARK2* タンパク質を bait に用いた Yeast two hybrid screening (Y2H)による相互作用因子の単離、同定を試みた。同定した因子の一つ、*MK2BP1* は細胞内輸送関連タンパク質であり、カロール沈着制御に関わることがシロイヌナズナで報告されていた。そこで、大腸菌による組換え *MK2BP1* タンパク質を用いた Pull down assay、一過的発現系を用いた *MK2BP1* と *MARK2* タンパク質の共局在解析ならびに共免疫沈降法を試みた。Pull down assay では、*MARK2* タンパク質と *MK2BP1* の相互作用は検出できなかった。次に、ニコチアナベンサミアナタバコによる一過的発現系にて、共発現させることで細胞内局在を解析した。*MARK2*-GFP と *MK2BP1*-TagRFP は部分的な共局在に留まった。また、一過的発現系による共免疫沈降を試みたが、*MK2BP1* と *MARK2* の物理的な相互作用の検出には至らなかった。

Y2H では、複数の相互作用因子を単離同定したものの、*MK2BP1* より強い相互作用を示すタンパク質は、*MARK2* および *MARK2* ホモログであった。つまり、*MARK2* タンパク質は、dimer もしくは homodimer 形成する可能性が考えられた。しかしながら、*MARK2* ならびに *MARK2* ホモログの分子機能は明らかになっておらず、分子機能の理解に向けて解析が必要であると判断した。そこで、*MARK2* の C 末端に GFP タグを付加したシロイヌナズナ相補個体を作成し、共免疫沈降ベースの相互作用因子の同定を試みた。

MARK2-GFP 相補個体を用いた相互作用因子の探索

*mark2*変異体を遺伝背景に、floral dip法により *MARK2*-GFP相補個体を作成した。2kbの *MARK2* プロモーターを含む *MARK2* ゲノム配列の下流に GFP を連結したコンストラクトを構築した。T3世代でホモ化した独立2系統の単離に成功したことから、以降の解析に供試した。まず、*MARK2*-GFPタンパク質蓄積を共焦点顕微鏡で確認した後、*MARK2*-GFP相補個体における flg22処理時のカロール沈着を検証した。その結果、*MARK2*-GFP相補個体は、Col-0程度にまでカロール沈着が回復することを確認した。本結果は *MARK2* の C 末端への GFP-tag が *MARK2* の分子機能に影響を及ぼさないことを示唆している。そこで、*MARK2*-GFPタンパク質を Protein blot による検出を試みた。土壌生育した植物体からのタンパク質抽出では、*MARK2*-GFPタンパク質は検出が困難であった。そこで、水耕栽培に切り替えた結果、*MARK2*-GFPタンパク質の検出に成功した。そこで、flg22処理時の *MARK2*-GFPタンパク質蓄積を確認した。flg22処理4時間から *MARK2*-GFPタンパク質の蓄積が増加し、処理後24時間で mock 処理区と比較してより蓄積することを見出した。また、anti-GFP-agarose beads を用いて共免疫沈降したサンプルについて銀染色したところ、flg22処理4時間後に *MARK2*-GFP 処理区で特異的なバンドを複数検出することに

成功した。以上の結果を基に、0 time, mock処理4時間後、flg22処理4時間後におけるMARK2-GFP相互作用因子の単離同定を試みた。共免疫沈降法はnanoLC-MS/MS解析用のプロトコールに従い、MARK2-GFPタンパク質を精製した。その結果、複数のMARK2相互作用因子の同定に成功した。同定したMARK2相互作用因子には、カロール合成酵素と相互作用する膜タンパク質や、細胞内輸送に関わるSyntaxinのホモログ、分子機能未知なプロテインキナーゼなどが含まれていた。一方で、flg22処理時に特異的に相互作用する因子は単離されなかった。理由として、nanoLC-MS/MS解析に供試するサンプルは、サンプル中に含まれる界面活性剤の除去が必須であり、入念なサンプル洗浄操作に伴い、弱い物理的相互作用を示すタンパク質が除去されたものと推察される。得られたMARK2相互作用因子には、カロール沈着関連因子、細胞内輸送関連因子の単離に成功しており、今後のMARK2の分子機能ならびにカロール沈着制御の分子機構の解明に繋がると期待される。

以上の結果をまとめると、本研究では、カロール沈着制御に関わる新規因子MARK2タンパク質の分子機能の解明に焦点を当て、カロール沈着に関するリン酸化の意義、MARK2相互作用因子の同定を進めてきた。PRRを介した微生物認識にはじまる植物の免疫誘導機構については、未だ不明な点も多く残されているが、本研究において少なくとも、カロール沈着に関わる因子群と、PRRからのシグナル伝達がリンクするところまで解析できたと考えている。現時点で、植物病害に対する抵抗性へのMARK2の寄与についての報告はない。一方で、MARK2ホモログの過剰発現は病害抵抗性を高めるとの報告が近年なされており、我々の研究内容とも一致すると考えている。今後は、MARK2タンパク質の相互作用因子との相互作用様式の検証、相互作用因子の表現型の解析が必要であり、PTIにおけるカロール沈着制御の分子機構の解明が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松井英議, 澁谷日奈, 前田和輝, 四井いずみ, 玄康洙, 野村有子, 一瀬勇規, 中神弘史
2. 発表標題 MARK2のリン酸化はflg22処理に伴うカロース蓄積に関与する
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澁谷日奈, 前田和輝, 四井いずみ, 玄康洙, 野村有子, 一瀬勇規, 松井英議, 中神弘史
2. 発表標題 mark2欠損変異体はPto接種時のジャスモン酸関連遺伝子発現が低下する.
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井英議, 澁谷日奈, 太田和輝, 前田和輝, 晝間敬, 四井いずみ, 玄康洙, 野村有子, 能年義輝, 豊田和弘, 一瀬勇規, 中神弘史
2. 発表標題 MAMP応答性リン酸化タンパク質MARK2はアブラナ科炭そ病菌に対する抵抗性に貢献する
3. 学会等名 令和3年度 日本植物病理学会関西部会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

遺伝子細胞工学 (Genetic Engineering)
https://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/profile/nougaku02_1.html
<https://hidenorimatsui.wixsite.com/website-1>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中神 弘史 (Nakagami Hirofumi)		
研究協力者	晝間 敬 (Hiruma Kei)		
研究協力者	一瀬 勇規 (Ichinose Yuki)		
研究協力者	四井 いずみ (Yotsui Izumi)		
研究協力者	能年 義輝 (Noutoshi Yoshiteru)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	豊田 和弘 (Toyoda Kazuhiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Max planck Institute			