

平成23年 5月31日現在

機関番号： 82401  
 研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2009～2010  
 課題番号： 21770059  
 研究課題名（和文）  
 比較リン酸化プロテオミクスによる植物免疫シグナル伝達因子の同定  
 研究課題名（英文）  
 Identification of plant immune signaling factors by differential phosphoproteomics  
 研究代表者  
 中神 弘史 (NAKAGAMI HIROFUMI)  
 独立行政法人理化学研究所・植物プロテオミクス研究ユニット・ユニットリーダー  
 研究者番号： 20435663

## 研究成果の概要（和文）：

リン酸化プロテオームの比較解析に必要な相互  $^{15}\text{N}$  代謝標識法の確立に成功した。確立手法を用い、免疫応答を誘導する微生物関連分子パターン刺激に伴うシロイヌナズナのリン酸化プロテオームの変動を解析し、免疫応答に伴いリン酸化状態が変動するタンパク性因子を 682 種類同定することに成功した。同定因子の遺伝子破壊株を用いた解析により、これまでに 3 種類の全く新しい免疫シグナル制御因子の同定に成功した。これら新規同定因子の情報は、植物の病害抵抗性の向上に貢献できると期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

To perform comparative analysis of phosphoproteomes, reciprocal  $^{15}\text{N}$ -labeling method has been established. By employing the method, phosphoproteome dynamics upon microbe-associated molecular pattern treatments have been analyzed in *Arabidopsis* cells. As a result, 682 protein factors, whose phosphorylation status altered upon the stimuli, were identified. Furthermore, novel three plant immune signaling regulators were identified by analyzing knockout mutant plants.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物プロテオミクス

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物免疫、プロテオミクス、リン酸化、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

植物免疫の分子機構の解明は植物への耐病性付与に重要な手掛かりを与えること

が期待され、順遺伝学的手法を用いた植物免疫制御因子のスクリーニングが精力的に行われてきた。その成果として、Rタンパク質、Rタンパク質の

安定化に寄与することで免疫応答を制御する因子群などが単離され、植物が病原体を認識するプロセスの理解が深まった。しかし、順遺伝学的手法によるスクリーニングが飽和状態に達したにも関わらず、病原体認識から抵抗性反応に至るシグナル伝達の分子機構は依然として闇に包まれていた。その主たる原因として、遺伝子の機能重複や変異体の致死性に由来する順遺伝学的手法の限界が挙げられた。

申請者はこの様な状況を打破すべく、プロテオーム解析技術の開発および適用による植物免疫シグナル伝達機構の解析を目指してきた。プロテオミクス的手法を採用した理由は、順遺伝学的手法による制約の解消のみならず、翻訳後修飾の解析に最も有効な手段であることから、未知のシグナル伝達機構の解析に威力を発揮すると考えたからであった。翻訳後修飾はタンパク質の機能を調節する代表的な制御機構であり、細胞内シグナル伝達におけるシグナルの受け渡し的手段として頻用されている。シグナル伝達の分子機構の理解には、シグナル伝達因子の同定に加えて、同定因子の翻訳後修飾制御の有無、更に翻訳後修飾を受ける場合の修飾位置の情報が、非常に重要かつ直接的な手掛かりとなり得る。リン酸化が植物免疫に重要な役割を担っていることが報告されていることを踏まえ、免疫応答に伴うリン酸化の変動を網羅的に解析することで全く新しい植物免疫制御因子を同定するアプローチを選択し、現在まで目的とする解析に必要な技術基盤の構築を行ってきた。

近年の質量分析器 (MS) およびナノ液体クロマトグラフ (nanoLC) 等の周辺設備の性能の飛躍的な向上とゲノム情報の充実が相まって、nanoLC-MS システムを用いたリン酸化タンパク質のハイスループットかつ網羅的な解析 (リン酸化プロテオミクス) が現実化してきていた。このようなプロテオーム解析の主流はショットガンプロテオミクスと呼ばれ、タンパク質混合物をプロテアーゼでまとめて消化し、ペプチド断片を nanoLC システムでキャピラリー逆相カラムなどを用いて分離して質量分析解析を行い、ペプチドの質量分析情報をもとに試料に含まれていたタンパク質集団を一度に大規模に同定する。理論的には細胞粗抽出液などの未分画の試料の解析を行い、リン酸化修飾されたペプチドを検索することで、リン酸化タンパク質およびそのリン酸化部位を同定することができる。しかし、実際はリン酸化ペプチドと未修飾ペプチドの存在比が大きく異なるため、解析試料が複雑すぎると存在比が小さいリン酸化ペプチドの同定は非常に難しくなる。つまりリン酸化プロテオミクス成功の鍵はリン酸化ペプチドの精製・濃縮技術にあった。

これまでに報告された植物のリン酸化プロテオミクスで用いられてきたリン酸化ペプチドの精製・濃縮技術は未熟なため、予め複雑性を下げた膜画分に含まれるタンパク質集団などからの精製にしか適用できず、申請者の研究目的である細胞内シグナル伝達の網羅的な解析には適さなかった。そこで植物材料用にリン酸化ペプチドの精製・濃縮法の改良および最適化を行い、微量なリン酸化ペプチドを効率よく検出できるように独自の工夫を施した nanoLC システムを駆使し、世界で初めて植物 (シロイヌナズナ) の未分画の細胞粗抽出液に含まれるタンパク質のリン酸化部位を大規模に同定することに成功した (研究業績 3)。この新技術では僅か 100 マイクログラムの総タンパク質から 400 以上ものリン酸化ペプチドを一度に同定することが可能になった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、申請者らが確立したショットガン方式のハイスループットなリン酸化プロテオーム解析基盤を駆使し、比較プロテオーム解析により、植物免疫応答のシグナル伝達に関するタンパク質因子の同定を目的とした。

より具体的には、リン酸化プロテオームのダイナミクス解析を可能にするために、比較定量法の確立を最初の目的とした。次に、シロイヌナズナでの免疫応答誘導時にリン酸化状態が変化するタンパク質の大規模同定を目的とした。最後に、遺伝子破壊株を用いた同定因子の植物免疫機構への関与の解析を目的とした。

## 3. 研究の方法

ショットガンプロテオミクスで使用可能な定量解析法は、1) ノンラベルの比較定量解析法、2) iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation) 等の安定同位体ラベルされた試薬で精製ペプチドを *in vitro* で標識する方法、3) SILAC (Stable isotope labelling with amino acids in cell culture) 法に代表される  $^{13}\text{C}$  や  $^{15}\text{N}$  でラベルされた成分を含む培地中で細胞を培養して全タンパク質を *in vivo* で標識する方法、の大きく三種類に分類される。

1) の方法は解析機器の安定性に高度に依存し、測定条件の僅かなブレに結果が左右されるため、最先端の技術を用いても未だに得られる結果の信頼性が低く、2) および 3) の方法が比較解析の主流となっていた。本研究で使用する質量分析器の特性上、2) の方法を用いると一度の解析で同定されるリン酸化ペプチドの数が大幅に減少することが予想された。そこで、本研究では 3) の方法を採用した。

SILAC 法でタンパク質の標識に用いるアミノ酸 (リジンおよびアルギニン) は植物細胞内では生合成されるため、植物を材料に SILAC 法を用いるとタンパク質の標識が不完全になり定量解析が極めて困難になる。そこで、培地に含まれる窒素

源を 15N でラベルされたものに置換し、代謝産物をも含めて全タンパク質を標識する方法を試みた。植物細胞でのこの方法の有用性は既に報告されていた。より具体的には、全タンパク質の 15N での完全標識に必要な培養細胞の培養条件および植物体の生育条件の検討を行った。

非標識および 15N で標識したペプチドの比較定量解析に必要と考えられる基礎的なデータ処理解析の基盤は既に整っていた。

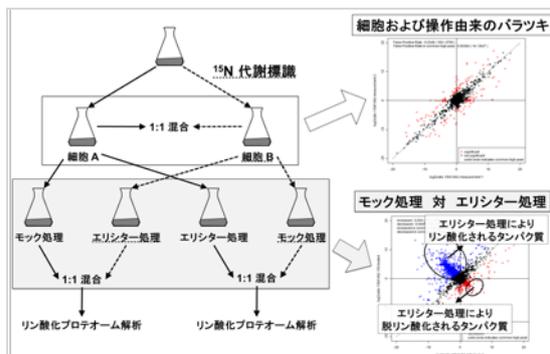
ショットガンプロテオーム解析には解析試料のゲノム情報が必要不可欠である。そこで本研究では、植物で最もゲノム情報が充実しているシロイヌナズナを研究材料として用いた。大量の試料が容易に得られ、同調的に免疫応答が誘導し易いという理由でシロイヌナズナ (Ler background) 由来の懸濁培養細胞を実験材料として用いた。

「basal defense」に関与する因子の解析に、微生物関連分子パターン的一种である Flg22 (細菌の鞭毛由来のペプチド) 処理による免疫応答誘導系を用いた。安定同位体で標識した細胞および非標識の細胞を Mock または Flg22 で処理し、それぞれの細胞からリン酸化ペプチドを精製して nanoLC-MS/MS を用いて比較解析を行い、免疫応答誘導の有無でリン酸化状態の違いが認められるタンパク質を同定した。

一般公開されているシロイヌナズナの T-DNA 挿入変異体のプールから、同定したタンパク質をコードする遺伝子の破壊株の単離を試みた。次に、得られた破壊株において免疫応答に異常が認められるかを解析した。Flg22 刺激に伴う活性酸素種の生成、生育阻害、そして MAP キナーゼの活性化に異常が認められるかを解析した。

#### 4. 研究成果

下図に示すような、相互 15N 代謝標識法の確立に成功した。この手法では、実験上のバラツキを計算考慮した閾値が設定されるので、与えた刺激特異的に有為な変動を示すものの同定に威力を発揮することが分かった。



この手法を用いた解析により、Flg22 処

理でリン酸化状態が変動するタンパク質を 682 種類同定することに成功した。同定因子の中には、Flg22 シグナルへの関与が知られている因子 (MAPK など) が含まれていた。一方、同定因子の多くは、これまでの研究手法では植物免疫システムに関わる因子として同定されなかったものであった。

この結果は、本研究手法によって植物免疫シグナル関連因子を同定することが実際に可能であり、機能未知の数多くの同定因子も植物免疫シグナリングに関与している可能性が高いことを示唆している。

実際に、遺伝子破壊株を用いた同定因子の解析により、これまでに 3 種類の同定因子が新たに植物免疫シグナリングに関わっていることが分かった。未だ、ごく一部の同定因子の解析にしか着手できておらず、更なる解析により、より多くの新しい植物免疫シグナル制御因子の同定が可能であると期待される。

#### 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 Joshi HJ, Hirsch-Hoffmann M, Baerenfaller K, Gruissem W, Baginsky S, Schmidt R, Schulze WX, Sun Q, van Wijk KJ, Egelhofer V, Wienkoop S, Weckwerth W, Bruley C, Rolland N, Toyoda T, Nakagami H, Jones AM, Briggs SP, Castleden I, Tanz SK, Millar AH, Heazlewood JL., “MASCP Gator: an aggregation portal for the visualization of Arabidopsis proteomics data.”, *Plant Physiol.* 2011 Jan;155(1):259-70. (査読有)
- ② Kosetsu K, Matsunaga S, Nakagami H, Colcombet J, Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Hirt H, Machida Y., “The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana.” *Plant Cell.* 2010 Nov;22(11):3778-90. (査読有)
- ③ Nakagami H, Sugiyama N, Mochida K, Daudi A, Yoshida Y, Toyoda T, Tomita M, Ishihama Y, Shirasu K., “Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants.”, *Plant Physiol.* 2010 Jul;153(3):1161-74. (査読有)

[学会発表] (計 19 件)

- ① 松井英譲, 野村有子, 加星(岸)光子, 高橋章, 廣近洋彦, 白須賢, 中神弘史, 「MAMPs シグナル伝達経路のリン酸化プロテオーム解析」, 平成 23 年度日本植物病理学会大会, 東京農工大学府中キャンパス, 2011 年 3 月 29 日
- ② 高橋章, 松井英譲, 中神弘史, 野村有子, 廣近洋彦, 「OsPti1a が病害抵抗性抑制因子として機能するためには、細胞膜上で適切な複合体

- を形成する必要がある」, 平成 23 年度日本植物病理学会大会, 東京農工大学府中キャンパス, 2011 年 3 月 27 日
- ③ 松井英議, 野村有子, 加星(岸)光子, 高橋章, 廣近洋彦, 白須賢, 中神弘史, 「リン酸化プロテオミクス手法を用いた MAMP シグナル伝達経路の解析」, 第 52 回日本植物生理学会年会, 東北大学川内北キャンパス, 2011 年 3 月 22 日
- ④ 高橋章, 松井英議, 野村有子, 中神弘史, 廣近洋彦, 「OsPtila が病害抵抗性抑制因子として機能するためには、細胞膜上で適切な複合体を形成する必要がある」, 第 52 回日本植物生理学会年会, 東北大学川内北キャンパス, 2011 年 3 月 22 日
- ⑤ 中南健太郎, 千葉由佳子, 松井章浩, 中神弘史, 野村有子, 田中真帆, 諸澤妙子, 石田順子, 関原明, 「シロイヌナズナの RNA 分解制御を介した低温ストレス応答の研究」, 第 52 回日本植物生理学会年会, 東北大学川内北キャンパス, 2011 年 3 月 22 日
- ⑥ Hirofumi Nakagami, Naoyuki Sugiyama, Yuko Nomura, Keiichi Mochida, Yuko Yoshida, Tetsuro Toyoda, Masaru Tomita, Yasushi Ishihama, Ken Shirasu, “Comparative phosphoproteomics in plants for translational research”, 2<sup>nd</sup> International Symposium on Frontier in Agriculture Proteome Research, Tsukuba NORIN Hall, 18-19 November 2010
- ⑦ 中神弘史, 野村有子, 大井信明, 持田恵一, 杉山直幸, 富田勝, 石濱泰, 白須賢, 「植物病害抵抗性のリン酸化プロテオーム解析」, 日本プロテオーム学会 2010 年会, 東京ベイホテル東急, 2010 年 7 月 26-27 日
- ⑧ Hirofumi Nakagami, “Phosphoproteomic approach for plant signaling network dissection”, IMMS Workshop ‘Inference and modelling of regulatory networks in multicellular systems’, RIKEN Plant Science Center, Yokohama, Japan, 11-12 June 2010
- ⑨ Hirofumi Nakagami, “Phosphoproteomic in plants”, MASC Proteomics Subcommittee Forum at 21<sup>st</sup> International Conference on Arabidopsis Research, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, 7 June 2010
- ⑩ Hirofumi Nakagami, Naoyuki Sugiyama, Keiichi Mochida, Arsalan Daudi, Yuko Yoshida, Tetsuro Toyoda, Masaru Tomita, Yasushi Ishihama, Ken Shirasu, “Comparative phosphoproteomics in plants”, 21<sup>st</sup> International Conference on Arabidopsis Research, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, 7-10 June 2010
- ⑪ Kentaro Nakaminami, Anzu Minami, Hirofumi Nakagami, Maho Tanaka, Taeko Morosawa, Junko Ishida, Kazuo Shinozaki, Ken Shirasu, Matsuo Uemura, Motoaki Seki, “RNA masking system during cold deacclimation of Arabidopsis plants”, 21<sup>st</sup> International Conference on Arabidopsis Research, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, 7-10 June 2010
- ⑫ 中神弘史, 野村有子, 大井信明, 持田恵一, 杉山直幸, 石濱泰, 白須賢, 「リン酸化プロテオーム解析手法を用いた病害抵抗性機構の解析」, 平成 22 年度日本植物病理学会大会, 国立京都国際会館, 2010 年 4 月 20 日
- ⑬ 中神弘史, 野村有子, 大井信明, 持田恵一, 杉山直幸, 石濱泰, 白須賢, 「リン酸化プロテオミクスによる植物免疫シグナリングの解析」, 第 51 回日本植物生理学会年会, 熊本大学黒髪北キャンパス, 2010 年 3 月 20 日
- ⑭ 中南健太郎, 南杏鶴, 中神弘史, 田中真帆, 諸澤妙子, 石田順子, 篠崎一雄, 白須賢, 上村松生, 関原明, 「シロイヌナズナの低温脱馴化過程に関与する RNA マスキング制御の研究」, 第 51 回日本植物生理学会年会, 熊本大学黒髪北キャンパス, 2010 年 3 月 20 日
- ⑮ Hirofumi Nakagami, “Comparative phosphoproteomics of Arabidopsis and rice to understand plant immunity”, Tsuruoka Proteomics Meeting 2009, Tsuruoka Metabolome Campus, Japan, 7 Dec 2009
- ⑯ 中神弘史, 杉山直幸, 持田恵一, Arsalan Daudi, 富田勝, 石濱泰, 白須賢, 「イネとシロイヌナズナにおける比較リン酸化プロテオミクス」, 第 82 回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド, 2009 年 10 月 23 日
- ⑰ 中神弘史, 杉山直幸, 持田恵一, Arsalan Daudi, 富田勝, 石濱泰, 白須賢, 「植物におけるリン酸化プロテオームの大規模な比較解析」, 日本プロテオーム機構第 7 回大会, 北里大学, 2009 年 7 月 27-28 日
- ⑱ Kentaro Nakaminami, Anzu Minami, Hirofumi Nakagami, Nobuaki Ohi, Maho Tanaka, Taeko Morosawa, Junko Ishida, Ken Shirasu, Matsuo Uemura, and Motoaki Seki, “Identification of novel RNA masking system during deacclimation of Arabidopsis plants”, Joint Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Phycological Society of America, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 18-22 July 2009
- ⑲ Hirofumi Nakagami, Naoyuki Sugiyama, Keiichi Mochida, Arsalan Daudi, Masaru Tomita, Yasushi Ishihama, Ken Shirasu, “Large-scale comparative phosphoproteomics of Arabidopsis and rice”, “Plant Genomics and Beyond” Conference

2009, URGV, France, 8 July 2009

[図書] (計1件)

- ① 中神弘史、杉山直幸、石濱泰, 「植物リン酸化プロテオーム解析の最前線」植物のシグナル伝達－分子と応答 共立出版, 2010 May 30: 228-36

[その他]

RIKEN Phosphoproteome Database (RIPP-DB)  
<https://database.riken.jp/sw/links/en/ria102i/>

MASCP Gator

<http://www.masc-proteomics.org/mascp/index.php/Gator>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中神 弘史 (NAKAGAMI HIROFUMI)

独立行政法人理化学研究所・植物プロテオミクス研究ユニット・ユニットリーダー  
20435663