

機関番号：16201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880033

研究課題名（和文） 全身獲得抵抗性反応におけるサリチル酸シグナル伝達機構の解析

研究課題名（英文） Molecular dissection of salicylic acid signaling in systemic acquired resistance

研究代表者

多田 安臣 (TADA YASUOMI)

香川大学・総合生命科学研究センター・准教授

研究者番号：40552740

研究成果の概要（和文）：サリチル酸シグナル伝達における鍵転写コアクチベーターである NPR1 は、オリゴマー化を経て活性化するが、その調節因子については現在十分に明らかになっていない。本研究では、NPR1 と細胞内で複合体を形成するタンパク質として EF-Tu を同定した。EF-Tu は NPR1 オリゴマーの安定性に寄与することが明らかになった。さらに同遺伝子破壊株は強い病原性を示すことより、SA シグナルに関与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：NPR1 protein is the key transcription coactivator in salicylic acid (SA) signaling. Although the formation of NPR1 oligomer is prerequisite for its activation, the molecular mechanism is not fully elucidated. Here we have identified EF-Tu as a member of NPR1 complex in planta. We found that EF-Tu is involved in the stabilization of NPR1 oligomer, and disease resistance against *Pseudomonas syringae*. It is strongly suggested that EF-Tu is a positive regulator of SA-mediated signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,120,000 | 336,000 | 1,456,000 |
| 2010年度 | 980,000 | 294,000 | 1,274,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：サリチル酸、全身獲得抵抗性

1. 研究開始当初の背景

植物は、病原菌の侵入を認識することにより細胞死を伴う迅速な抵抗性反応を誘起する。その後、植物個体全体でシグナル伝達物質であるサリチル酸が蓄積し、非感染葉においても防御応答機構を活性化することでさらなる病原菌の感染に備える。この全身獲得

抵抗性反応（SAR）と呼ばれる植物固有の免疫応答機構は、鍵転写補因子である NPR1 遺伝子により制御されることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

本研究は、NPR1 が介在する植物誘導抵抗性

反応の分子機構の解明を目指すものであり、NPR1 と相互作用するか或いはタンパク質複合体を形成することによりその転写補因子としての働きを制御する新規遺伝子の同定及び特徴付けを目的としている。特に NPR1 の活性化には細胞内酸化還元状態（レドックス）の変移が関与していることより、同定されたタンパク質のレドックス制御能についても検討し、その疾病防御応答における役割を解明する。

3. 研究の方法

NPR1 複合体の精製は、タンパク質精製用のアフィニティタグを付加した NPR1 トランスジェニックシロイヌナズナを用い、ゲルろ過クロマトグラフィーで部分精製された NPR1 複合体粗画分を免疫沈降法により行う。得られた画分を SDS-PAGE により分離後、コントロールと比較し、特異的に検出されるバンドを全て Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) により解析し、複合体構成因子を同定する。同定されたタンパク質をコードする当該遺伝子破壊植物体を用い、サリチル酸曝露時の NPR1 オリゴマー及びモノマー形成能、NPR1 ターゲット遺伝子の発現レベル及び病害抵抗性反応について解析し、NPR1 複合体構成因子の免疫応答に与える影響を検討する。

4. 研究成果

SA シグナル伝達における NPR1 の転写コアクチベーターとしての役割を理解するために、NPR1-GFP 植物を用い、NPR1 複合体解析を行った。まず、GFP 抗体を用いた免疫沈降実験 (IP) を行ったが、これにより NPR1 オリゴマー複合体の精製に成功した。本複合体タンパク質をコマジー染色により確認後、同バンドを切り出し、質量分析装置に供試した。その結果、オリゴマー複合体メンバーとして NPR1 及び葉緑体由来のタンパク質である EF-Tu が検出された。EF-Tu は原核生物におけるタンパク質の翻訳に関与するタンパク質であり、リボソームに tRNA を輸送する役割で知られている。一方、EF-Tu の生化学的研究より、同タンパク質は複数のレドックス感受性のシステインを有することが知られている。そこで、NPR1 オリゴマーの形成に EF-Tu がどのような役割を担っているかを明

らかにするために、EF-Tu のノックアウト植物を用い、SA 応答時の NPR1 オリゴマー・モノマーの動性をウエスタンブロットで確認した。その結果、EF-Tu 変異体では、NPR1 オリゴマーの形成は一過的で弱いものであった。また、活性型である NPR1 モノマーの蓄積も同様に一過的で、野生型に比べ量的にも少なかった。

NPR1 は一酸化窒素 (NO) を直接認識することにより、ジスルフィド結合を介したオリゴマーを形成するが、細胞内が還元的になるとオリゴマーから活性型のモノマーが遊離する。一方、EF-Tu は、分子シャペロン活性やタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性を有しており、タンパク質の高次構造の形成に関与することが知られている。

そこで、EF-Tu は、NPR1 オリゴマーの形成に関与するかを調査した。その結果、EF-Tu と NPR1 モノマーを *in vitro* において反応させると、NPR1 のみの場合よりもオリゴマー形成能は抑制されることが明らかになった。これは、EF-Tu が NPR1 と直接的に相互作用し、NPR1 同士の会合を抑制している、或いは NPR1 が形成するジスルフィド結合を、EF-Tu が有するレドックス感受性の高いシステインで還元している可能性があげられる。

次に、NPR1 オリゴマーの安定性を検討するために、*in vitro* において NPR1 モノマーに NO を処理し、NPR1 オリゴマーを誘導した。本サンプルを透析後、EF-Tu 及び還元剤である dithiothreitol (DTT) を加え、NPR1 のモノマー化誘導能を検討した。その結果、NPR1 オリゴマーに DTT のみを処理したサンプルと比較し、EF-Tu を添加すると NPR1 オリゴマーの安定性は極めて良かった。すなわち、EF-Tu のジスルフィドイソメラーゼ活性が NPR1 同士のジスルフィド結合の安定性に寄与しているものと考えられた。

上記反応に関し、NPR1 自身にも同酵素活性が有る可能性があるため、インスリン還元系を用い、同可能性について検討した。その結果、NPR1 は直接インスリンを還元しないが、DTT によるインスリン還元活性を極めて強く抑制することが明らかになった。本活性には少なくともシステイン C156 が関与することも明らかになった。今後は、EF-Tu と NPR1 のジスルフィド結合能について当該システイン残基を同定し、その *in vivo* での役割を検討する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- ①W. Wang, J.Y. Barnaby, Y. Tada, H. Li, M. Tor, D. Caldelari, D. Lee, X.D. Fu, X. Dong: Timing of plant immune responses by a central circadian regulator: *Nature* (査読あり) 470: 110-114 (2011).
- ② S.H. Spoel, Y. Tada, G.J. Loake, Post-translational modification as a tool for transcription reprogramming: *New Phytol.* (査読あり) 186: 333-339 (2010).
- ③Kano, A., Gomi, K., Yamasaki-Kokudo, Y., Satoh, M., Fukumoto, T., Ohtani, K., Tajima, S., Izumori, K., Tanaka, K., Ishida, Y., Tada, Y., Nishizawa, Y., Akimitsu, K.: A rare sugar, D-allose, confers resistance to rice bacterial blight with upregulation of defense-related genes in *Oryza sativa* L. *Phytopathology* (査読あり) 100: 85-90 (2010).
- ④Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T. L., Tada, Y., Ichimura, K., and Akimitsu, K.: ACTTS3 encoding a polyketide synthase is essential for the biosynthesis of ACT-toxin and pathogenicity in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* (査読あり) 23: 406-414 (2010).
- ⑤Ajiro, N., Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T. L., Izumi, Y., Tada, Y., and Akimitsu, K.: Role of the host-selective ACT-toxin synthesis gene ACTTS2 encoding an enoyl-reductase in pathogenicity of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* (査読あり) 100: 120-126 (2010).
- ⑥Akimitsu, K., Miyamoto, Y., Ohtani, K., Masunaka, A., Izumi, Y., Yasuda, S., Nishida, S., Fukumoto, T., Ishimoto, T., Kano, A., Katoh, H., Saitoh, M., Tada, Y., Ichimura, K., and Gomi, K.: Genome-enabled Evaluation of Specificity in Citrus and *Alternaria* Interactions. (査読あり) In: *Genome-Enabled Analysis of Plant-Pathogen Interactions*, T. Wolpert et al. eds., APS press, in press (2010).
- ⑦Akimitsu, K., Kano, A., Fukumoto, T., Ohtani, K., Gomi, K., Ichimura, K., Tada, Y., Tajima, S., and Izumori, K.: Role of rare sugars in plant-microbe interactions. In: *The 3rd Joint Symposium between CMU and KU*, (査読あり) 16-17 (2010).
- ⑧S.H. Spoel, Z. Mou, Y. Tada, N. Spivey, P. Genschik, X. Dong : Proteasome-mediated turnover of the transcription co-activator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity: *Cell* (査読あり) 137: 860-872 (2009).
- ⑨Kim, B. G., Fukumoto, T., Tatano, S., Gomi, K., Ohtani, K., Tada, Y., and Akimitsu, K.: Molecular Cloning and Characterization of a Thaumatin-like Protein-encoding cDNA from Rough Lemon. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (査読あり) 74: 3-10 (2009).

[学会発表] (計4件)

- ①植物病理学会、サリチル酸依存的シグナルネットワークにおけるタンパク質翻訳後修飾の役割、平成2010年4月19日、京都
- ②植物生理学会、The redox and proteolysis-coupled transcription cycles regulate the salicylic acid signaling、平成2010年3月18日、熊本
- ③Redox regulation of NPR1 requires NOC protein in plant immunity, *Proceedings of 21st International Conference on Arabidopsis Research* (2010.6.8)、Pacifico Yokohama, Kanagawa, Japan

④植物病理学会、全身獲得抵抗性反応におけるレドックス制御機構、平成2009年10月18日、神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/gene/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田安臣 (TADA YASUOMI)

香川大学・総合生命研究センター・准教授

研究者番号：40552740