

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780038

研究課題名(和文) 生物的・非生物的ストレスと病害抵抗性のクロストークに関わるタンパク質因子の探索

研究課題名(英文) Screening of protein associated with crosstalk between disease-resistance and biotic /abiotic stress responses.

研究代表者

安藤 杉尋 (Ando, Sugihiro)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10442831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：生物的/非生物的ストレスのクロストークについて新たな知見を得るため、キュウリモザイクウイルス抵抗性タンパク質RCY1の相互作用因子を酵母ツーハイブリッド法により探索したところ、WRKY70が単離された。免疫共沈法によりその相互作用を確認した結果、RCY1全長タンパク質では確認できなかったが、CC-NBドメインとWRKY70の相互作用が確認された。また、wrky70欠損変異体では防御関連遺伝子PR1の発現減少とウイルス感染の促進が認められた。WRKY70は病害応答以外に非生物的ストレスにも重要な機能を持つため、RCY1との相互作用が生物的/非生物的ストレスのクロストークのキーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：RCY1 encodes a CC-NB-LRR-class resistance protein that confers resistance to a yellow strain of Cucumber mosaic virus [CMV(Y)] in *Arabidopsis thaliana*. To understand the RCY1-mediated virus defense response and crosstalk of biotic and abiotic stress responses, host protein that interacts with RCY1 was isolated in a yeast two-hybrid system using the CC-NB domains of RCY1 as bait. As the result, the WRKY70 transcription factor was isolated as a candidate of RCY1 interactor. The interaction between WRKY70 and the CC-NB domains, but not complete protein, was confirmed by co-immunopurification. In CMV(Y)-inoculated leaves of the RCY1-HA-transformed wrky70-1 mutant, virus coat protein accumulation increased and the induction of PR-1 expression in response to CMV(Y) was partially compromised as compared to wild-type plants carrying RCY1-HA. It is possible that signaling of biotic and abiotic stresses connect via RCY1-WRKY70 interaction since WRKY70 has important roles in both of them.

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：病害抵抗性

キーワード：抵抗性タンパク質 病害応答 環境応答

1. 研究開始当初の背景

我々人類は効率的かつ安定的に農業生産を行うために、化学農薬の開発や耐病性作物の育種など様々な努力を重ねてきたが、植物病害による減収は依然として大きな問題である。加えて近年、地球温暖化等による世界レベルの異常気象が頻発していることから、農作物は多様で強烈なストレスにさらされ、これまで問題とならなかった病害の深刻化や地域拡大が懸念されている。このことから、植物免疫システムを研究する際に、多種多様な生物的・非生物的ストレスとの相互作用を考慮して解析を進めることが必要である。

植物免疫システムにおいて鍵となるのが植物病原菌が放出する(非)病原性因子(エフェクター)とこれを監視して抵抗性反応を始動する抵抗性タンパク質[Rタンパク質; その多くが NB-LRR(Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat)タンパク質]である。Rタンパク質によるエフェクター認識とこれに続くシグナル伝達の様式は非常に複雑で、様々な相互作用因子が介在して抵抗性反応を厳密に制御していると考えられる(Martin et al., 2003, Annu Rev Plant Boil 54:23-61)。近年、RAR1, SGT1, HSP90 及び OsRac1 などが NB-LRR タンパク質と複合体を形成し、その安定性や抵抗性誘導に関与していることが示されている(Kadota et al., 2010, Trends Biochem Sci 35:199-207; Kawano et al., 2010, Cell Host Microbe 7:362-375)。このような中、Rタンパク質による病害抵抗性に温度等の環境要因が影響することはよく知られているが(Fujita et al., 2006, Curr Opin Plant Biol 9:436-442)、その詳細な制御機構についてはほとんど明らかにされていないのが現状である。一方、NB-LRR タンパク質が環境ストレス応答にも関与する例や(Noutoshi et al., 2005, Plant J 43:873-888; Yang et al., 2010, Plant J 63:283-296)、2つの NB-LRR タンパク質が協調して3種の病原菌抵抗性を規定しているなどの報告があり(Narusaka et al., 2009, Plant J 60:218-226)、その多機能性及び複雑なシグナルネットワークの存在が示唆されている。

2. 研究の目的

近年、植物病原菌の(非)病原性因子(=エフェクター)とこれを監視して抵抗性反応を誘導する植物の抵抗性タンパク質(Rタンパク質)が数多く単離され、その相互作用に注目が集まっているが、これを制御するタンパク質因子についての情報は非常に限られている。本研究では、我々のグループが単離したシロイヌナズナのキュウリモザイクウイルス(CMV)抵抗性タンパク質(RCY1)と相互

作用するタンパク質を様々な生物的・非生物的ストレス条件下でスクリーニングし、CMV抵抗性と異なる病原菌感染や環境ストレス応答のクロストークを分子レベルで検証し、これによって、高度に制御された効率的な防除技術開発のための基礎知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

研究材料として、作成済みの RCY1-HA 導入形質転換シロイヌナズナを用いた。CMV 接種あるいは非接種の植物体を用い、HA-Tag を利用して RCY1 と相互作用するタンパク質の変動を検出した。手法として Blue-Native PAGE、免疫共沈法、磁気分離システムを利用した免疫共沈、酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、それぞれの利点を生かして網羅的な解析を行った。検出した相互作用因子のアミノ酸配列解析を行い、データベースを用いて遺伝子の同定を行った。また、RCY1 との相互作用について Yeast Two-hybrid system 及び *Nicotiana benthamiana* の一過的発現系を利用した免疫共沈法によって検証・解析した。さらに、当該遺伝子について T-DNA Tag line の検索・入手を行い、CMV 感染応答などのストレス応答における機能を調べた。

4. 研究成果

(1) キュウリモザイクウイルス黄斑系統 [CMV(Y)] 抵抗性遺伝子 RCY1 と相互作用するタンパク質を探索するため、Blue-native PAGE による RCY1 タンパク質複合体の検出を行った。可溶性タンパク質画分中の RCY1-HA タンパク質複合体は 150~200kDa と推定された。界面活性剤添加条件の検討の結果、0.1% DDM を添加することで、より高分子の複合体として検出できることが分かった。そこで、この条件で HA-agarose beads を用いた免疫共沈、磁気分離システムにより相互作用因子の単離を試みたが、特異的な相互作用因子は電気泳動によって検出できなかった。そこで RCY1-HA と同サイズの相互作用因子が存在する可能性を確認するため、LC-MS/MS によるアミノ酸配列解析を行った。その結果、DEAD-like helicase, RNA-metabolising metallo-beta-lactamase, Lipoxxygenase と同性的のあるタンパク質の存在が明らかとなった。そこでこれらについて酵母 Two-hybrid 法 (Y2H) 解析および、*N. benthamiana* の一過的発現系を用いた免疫共沈法によって RCY1 の相互作用の可能性を検証したが、RCY1 との相互作用は確認できず、相互作用因子である可能性は低いことが判明した。

(2) 免疫共沈による RCY1 相互作用因子の探索が良好ではなかったため、酵母 Two-hybrid 法による RCY1 相互作用因子の探索を行った。RCY1 は CC-NB-LRR 遺伝子である

ことから、BaitとしてCCドメイン、NBドメイン、LRRドメイン、CC-NBドメインを用いたところ、CC-NBドメインをBaitとした場合に、植物の病害応答に関わることが知られているWRKY70等が単離された。WRKY70は病害応答のみならず、乾燥ストレス等の非生物的ストレスにも重要な機能を持つことが示唆されているため、RCY1-WRKY70相互作用の確認を行った。まず、RCY1-WRKY70の相互作用を確認するため *Nicotiana benthamiana* を用いアグロインフィльтраーションによって一過的に発現させたタンパク質について、免疫共沈による相互作用の検証を行った。その結果、全長RCY1タンパク質を用いた場合はWRKY70との相互作用は認められなかったが、CC-NBドメインのみを発現させた場合は相互作用が確認された(図1)。

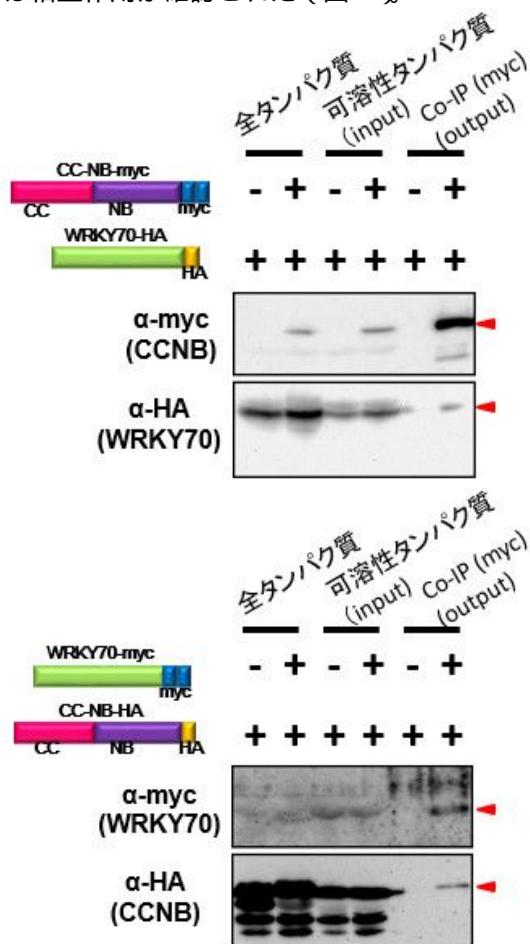


図1. *N. benthamiana* 一過的発現系を用いた免疫共沈によるRCY1のCCNBドメインとWRKY70相互作用の確認。

(3) WRKY70が実際にRCY1による抵抗性応答時に発現しているかを確認するため、CMV接種後の発現をノーザンプロット法によって解析した。その結果、WRKY70の発現はCMV(Y)接種後の抵抗性応答時にサリチル酸応答性の防御関連遺伝子であるPR1の発現誘導を伴って接種12時間以降から誘導された(図2)。一方、RCY1によって認識されない

親和性のCMV分離株CMV(B2)接種では、接種24時間目においてもWRKY70の発現は誘導されなかった。以上の発現パターンからWRKY70のCMV抵抗性への機能的関与が示唆された。

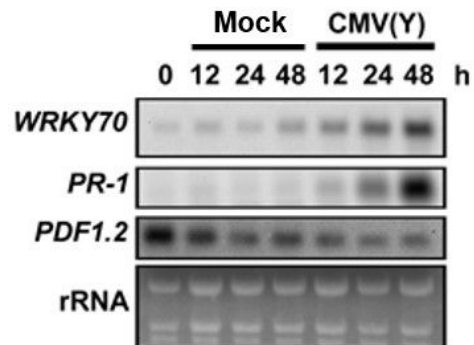


図2. CMV(Y)接種後のRCY1による抵抗性応答時におけるWRKY70遺伝子の発現解析。

(4) RCY1によるCMV抵抗性シグナル伝達機構におけるWRKY70の機能解析を行うため、WRKY70遺伝子のT-DNA挿入変異株を入手し、RCY1-HA導入形質転換体との交配により、RCY1-HA/wrky70-1系統を作成した。RCY1-HA/wrky70-1にCMV(Y)を接種したところ、接種葉におけるウイルス増殖量がRCY1-HA系統に比べ増加することが明らかとなった(図3)。

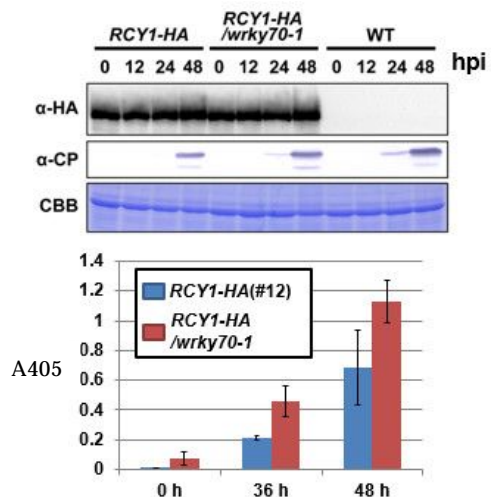


図3. RCY1-HA/wrky70-1系統におけるCMV(Y)増殖量の解析。上段：抗HA抗体(-HA)および抗CMV外被タンパク質抗体(-CP)を用いたウエスタンプロット解析。下段：抗CMV外被タンパク質抗体を用いたELISA解析によるウイルス増殖量の定量解析。

(5) RCY1-HA/wrky70-1系統においてウイルス増殖量に影響が認められたことから、防御応答への影響を解析した。まずトリパンブルー染色によるCMV(Y)接種後の過敏細胞死の有無を解析したところ、wrky70-1変異による影響は認められず、さらにDAB染色による活性酸素生成の検出でも差異は認められなかった(図4)。一方、CMV(Y)接種後の防御関連遺伝子PR1の発現はRCY1-HA/wrky70-1

系統において *RCY1-HA* 系統に比べ減少することが明らかとなった(図5)。以上により、*WRKY70* の *RCY1* シグナル伝達への関与が示唆された。

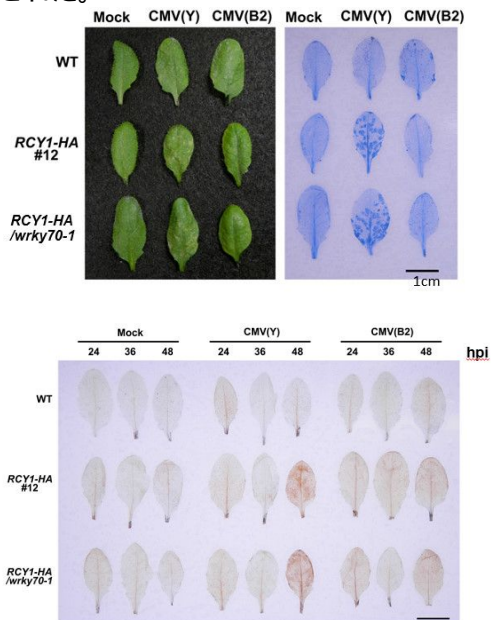


図4 *.RCY1-HA/wrky70-1* 系統における細胞死(上段)および活性酸素生成(下段)の検出。

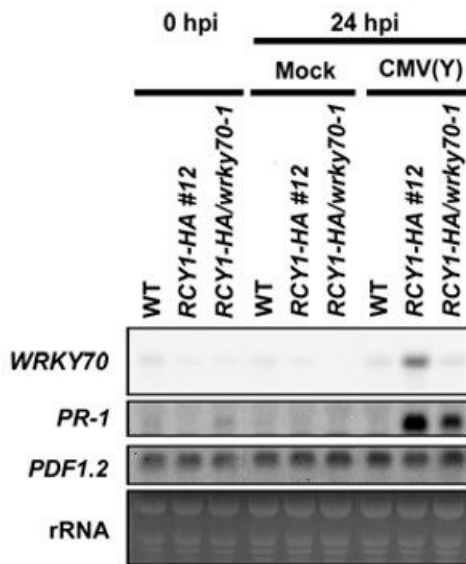


図5 *.RCY1-HA/wrky70-1* 系統における *CMV(Y)* 接種後の防御関連遺伝子の発現変動

以上により、特定の条件下において *RCY1* と *WRKY70* が結合することで抵抗性シグナルが制御される可能性が示唆された。*WRKY70* は病害応答のみならず、乾燥ストレス等の非生物学的ストレスにも重要な機能を持つことから、生物的/非生物学的ストレスのクロストークのキーとなる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Sugihiro Ando, Atsuya Obinata, Hideki Takahashi (2014) *WRKY70* interacting

with *RCY1* disease resistance protein is required for resistance to Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 85: 8-14, 査読あり

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2013.11.001>

〔学会発表〕(計 1件)

安藤杉尋・高橋英樹

キュウリモザイクウイルス抵抗性遺伝子 *RCY1* の抵抗性機構における *WRKY70* 遺伝子の機能解析、平成 25 年度日本植物病理学会大会、平成 25 年 3 月 27 日～29 日、岐阜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 杉尋 (ANDO, Sugihiro)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：10442831