

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24688007

研究課題名(和文) 基礎的抵抗性を普遍的に制御するシグナル伝達システムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of key signaling system in plant basal resistance

研究代表者

中神 弘史 (Nakagami, Hirofumi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：20435663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：複数の異なる微生物分子パターン(MAMP)刺激により同様にリン酸化制御を受ける因子群(conserved MAMP-signaling regulators: CMRs)の遺伝子破壊株を単離して解析を行い、シロイヌナズナにおいてCMR1が細胞死を調節することでトマト斑葉病菌に対する抵抗性を正に制御する因子であることを明らかにした。さらにCMR1と相互作用する因子MIP1の同定にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Identified CMR1, which is a MAMP-responsive phosphoprotein, as a novel component in plant immunity. I revealed that CMR1 positively regulates resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in *Arabidopsis* by modulating cell death induction.

研究分野：植物プロテオミクス

キーワード：シロイヌナズナ 病害抵抗性 微生物分子パターン リン酸化プロテオミクス 活性酸素種生成

1. 研究開始当初の背景

植物は、自然界において植物病原体となり得る多種多様な微生物の脅威に常に晒されているが、それら微生物の攻撃を防御する能力を有している。パターン認識受容体 (PRR) は、このような広範の微生物に対する抵抗性に主要な役割を果たしている。

植物では PRR として、アブラナ科植物のシロイヌナズナで細菌の鞭毛を認識する FLS2、そして細菌の翻訳伸長因子を認識する EFR、イネ科植物のイネで糸状菌の細胞壁由来のキチンオリゴ糖を認識する CEBiP、そして細菌が分泌するペプチドを認識する XA21 等が同定されている。同定された PRR の多くは、膜結合型プロテインキナーゼであるか、膜結合型プロテインキナーゼと相互作用する因子であることが明らかにされた。このことは、PRR 下流のシグナル伝達においてタンパク質リン酸化が重要な役割を果たしていることを示唆している。

これら PRR には、植物種間を超えて保存されているものと、特定の植物種・品種にのみ存在するものがある。例えば、FLS2 はイネ科とナス科にも保存されているが、EFR はイネ科とナス科には存在しない。驚くべきことに、ナス科の植物 (トマトとタバコ) に EFR を導入すると、病原性細菌に対する抵抗性が向上することが示された。同様に、イネ白葉枯病菌に対して羅病性品種のイネに XA21 を導入すると、イネ白葉枯病に対して抵抗性を示すようになることが示された。これらの事実は、「PRR シグナルの活性化が病害抵抗性の増強に実際的に有効なアプローチである」、そして「PRR は保存されていなくても下流の制御因子は高度に保存されている」、ことを示している。

これまで20年近く、植物病害抵抗性の分子機構の解明に向けて、順遺伝学的手法を用いた制御因子のスクリーニングが世界中で精力的に行われてきた。しかし、PRR の下流で働くと考えられるシグナル伝達因子は全く同定されてきていない。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る。そこで、画期的な解析技術の開発、そして PRR シグナル研究への適用による理解の促進が強く望まれてきた。

2. 研究の目的

申請者らが確立したリン酸化プロテオミクス技術は、タンパク質リン酸化を大規模にモニターすることで、微生物分子パターン (MAMP) 刺激により分子機能が制御される、言い換えると PRR の下流で働く、因子の同定を可能とした。

これまでシロイヌナズナを材料にして、PRR の1つである FLS2 の下流で働く因子群を同定し、それらの機能解析を進めてきた。そ

の結果、同定因子群が病害抵抗性の制御に関わっていることが分かった。このことは、申請者らが確立したプロテオミクス手法が、PRR シグナル伝達を制御する因子の同定に有効なアプローチであることを実証した。

最近、複数の異なる MAMP 刺激により同様に制御を受ける因子群 (conserved MAMP-signaling regulators: CMRs) を同定した。本研究課題では、CMRs の機能解析を行い、PRR 下流の未知の保存システムの一部を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

CMR をコードする遺伝子の破壊株および過剰発現体を単離する。単離した遺伝子破壊株および過剰発現体に関しては、順次、PRR シグナル伝達および病害抵抗性に関わる表現型の解析を進める。

PRR シグナル伝達もしくは病害抵抗性への寄与が明確になった CMR について、発現部位や発現タイミング、細胞内での挙動などを解析する。また、MAMP 刺激でリン酸化制御を受けるアミノ酸残基の変異体を作成し、分子機能へのリン酸化の影響を解析する。さらに、質量分析装置を用いて相互作用因子を同定し、上流および下流の因子を探索する。

4. 研究成果

遺伝子破壊株を用いた解析により、CMR1 と CMR32 が細菌トマト斑葉病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 株に対する抵抗性を正に制御する因子であることを明らかにした。CMR1 は病原体感染時における細胞死を負に制御することで、抵抗性に寄与することが分かった。これまでに細胞死の制御にはサリチル酸や活性酸素種 (ROS) が関与することが報告されているが、CMR1 を介した細胞死の制御はサリチル酸や ROS に依存しないことが分かった。さらに、CMR1 のリン酸化が細胞死の制御に重要であることを明らかにした。CMR1 はその分子機能が未知の因子であり、これまでに病害抵抗性への寄与への報告はない。CMR1 の同定およびその機能の解明は、病害抵抗性の理解を深め、新たな抵抗性増強戦略のシーズになると期待される。

CMR1 と相互作用する因子を多数同定することに成功した。その内の1つ MIP1 とは *in vitro* で直接相互作用すること、細胞内局在が一致することが分かった。さらに、CMR1 と MIP1 が相互作用する領域、そして相互作用に必要なアミノ酸の同定に成功した。MIP1 の変異体は、CMR1 の欠損変異体と同様の細胞死に関する表現型を示すことが分かった。

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7件)

- Egusa M, Matsui H, Urakami T, Okuda S, Ifuku S, Nakagami H, Kaminaka H (2015) Chitin nanofiber elucidates the elicitor activity of polymeric chitin in plants, *Front Plant Sci.*, Nov 22;6:1098. doi: 10.3389/fpls.2015.01098. (査読有)
- Choudhary M, Nomura Y, Wang L, Nakagami H, Somers D (2015) Quantitative circadian phosphoproteomic analysis of Arabidopsis reveals extensive clock control of key components in physiological, metabolic and signaling pathways, *Mol Cell Proteomics.*, Aug;14(8):2243-60. (査読有)
- Mogami J, Fujita Y, Yoshida T, Tsukiori Y, Nakagami H, Nomura Y, Fujiwara T, Nishida S, Yanagisawa S, Ishida T, Takahashi F, Morimoto K, Kidokoro S, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Two distinct families of protein kinases are required for plant growth under high external Mg²⁺ concentrations in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, Mar; 167(3):1039-57. (査読有)
- Nakaminami K, Matsui A, Nakagami H, Minami A, Nomura Y, Tanaka M, Morosawa T, Ishida J, Takahashi S, Uemura M, Shirasu K, Seki M (2014) Analysis of differential expression patterns of mRNA and protein during cold- and de-acclimation in Arabidopsis, *Mol Cell Proteomics.*, Dec;13(12): 3602-11. (査読有)
- Matsui H, Fujiwara M, Hamada S, Shimamoto K, Nomura Y, Nakagami H, Takahashi A, Hirochika H (2014) Plasma membrane localization is essential for OsPti1a-mediated negative regulation of immune signaling in rice, *Plant Physiol.*, Sep;166(1):327-36. (査読有)
- Kondo Y, Ito T, Nakagami H, Hirakawa Y, Saito M, Tamaki T, Shirasu K, Fukuda H (2014) Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF-TDR signaling, *Nat Commun.*, Mar 24;5:3504. (査読有)
- Fujita S, Pytela J, Hotta T, Kato T, Hamada T, Akamatsu R, Ishida Y, Kutsuna N, Hasezawa S, Nomura Y, Nakagami H, Hashimoto T (2013) An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in Arabidopsis, *Curr Biol.*, Oct 21;23(20):1969-78. (査読有)

〔学会発表〕(計56件)

- 松井英謙、野村有子、玄康洙、江草真由美、上中弘典、中神弘史「MAMP 応答性リン酸化タンパク質 MARK1 は病原菌感染による細胞死を制御する」平成 28 年度日本植物病理学会大会、岡山コンベンションセンター・岡山、2016 年 3 月 23 日
- 玄康洙、松井英謙、野村有子、中神弘史「MAMP 応答性プロテインキナーゼ MRPK1 のリン酸化部位変異体の解析」平成 28 年度日本植物病理学会大会、岡山コンベンションセンター・岡山、2016 年 3 月 22 日
- Matsui H, Hyon G, Nomura Y, Nakagami H, Phospho-regulation of MARK1 and MARK32, 第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学上田キャンパス・盛岡、2016 年 3 月 19 日
- Nakagami H, When proteomic meets Marchantia -Highroad to understand plant immune signaling-, Special symposium for international Marchantia training course, Kyoto Univ., Kyoto, Mar 3, 2016
- Matsui H, Yotsui I, Hyon G, Nomura Y, Nakagami H, Towards durable and broad-spectrum resistance: Post-genomic strategies to understand conserved immune system in land plants, Tsukuba Global Science Week 2015. Tsukuba, Sep 28, 2015
- 中神弘史「薬剤師が植物免疫を考える」日本植物病理学会“「若手の会」の統合を目指して”、明治大学駿河台キャンパス・東京、2015 年 3 月 30 日
- Matsui H, Yotsui I, Hyon G, Nomura Y, Nakagami H, Proteomics to understand pathogen-recognition systems at plant cell surface and their downstream events, The 5th symposium on International Collaborative Laboratories ~Front Lines of Plant Cell Wall Research~, Kinsho hall in Todaiji temple culture center, Nara, Mar 20, 2015
- Matsui H, Nomura Y, Nakagami H, Dead or Alive: early MAMP-responsive phosphoprotein watches hypersensitive cell death induction, 第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス・東京、2015 年 3 月 16 日
- Yotsui I, Matsui H, Nomura Y, Nishihama R, Kohchi T, Nakagami H, MAMP-recognition system in Marchantia polymorpha, The Marchantia Workshop 2014, Kobe University, Kobe, Dec 9, 2014

Nakagami H, MAMP-responsive phosphoprotein MARK1 negatively regulates cell death during pathogen infection, XII France-Japan Workshop on Plant Science 2014, The University of Tokyo, Tokyo, Oct 28, 2014

中神弘史「植物のプロテオミクス」日本プロテオーム学会 2014 年会、筑波国際会議場・つくば、2014 年 7 月 17 日

Nakagami H, Phosphorylation in plant immunity, Workshop 'Regulation by Protein Phosphorylation: from Molecules to Systems' at the 14th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan, Yokohama, Jun 26, 2014

Nakagami H, Matsui H, Nomura Y, Shirasu K, MAMP-responsive phosphoprotein MARK1 negatively regulates cell death during pathogen infection, The 31st Annual Interdisciplinary Plant Group Symposium "Plant Protein Phosphorylation". University of Missouri, Columbia, Missouri, USA. 29 May, 2014

Nakagami H, Shotguns for protein hunting -Exploration of novel players in plant immunity-, Marchantia IV. Buln Buln Cabins, Yanakie, Victoria, Australia, Dec 8-11, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中神 弘史 (NAKAGAMI, Hirofumi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・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