

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450060

研究課題名(和文)植物免疫MAPキナーゼ経路の欠損による防御反応活性化に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of dwarf and constitutive defense responses activated by loss of specific Arabidopsis MAP kinase pathway involved in innate immunity signaling

研究代表者

市村 和也 (Ichimura, Kazuya)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：70321726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナでは、MEKK1が下流のMKK1/MKK2、MPK4と特異的なMAPキナーゼ経路を構成する。本経路は防御関連遺伝子の発現誘導に関与する。一方、経路因子の変異体はいずれも矮性を伴う構成的な防御反応表現型を示す。以上より、本経路には防御反応誘導と抑制の相反する機能が存在すると考えられた。この機構を解明するため、mekk1変異体表現型のサブレッサー変異体を単離し、さらに原因遺伝子としてSMN1を同定した。smn1変異はmekk1のみならずmpk4変異体の矮性及び表現型も抑制した。以上の結果から、上記経路の欠損はSMN1の活性化を引き起こし、一連の表現型を誘導する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways have a pivotal role in innate immunity signaling in plants. Arabidopsis MEKK1, a MAPK kinase kinase, constitutes specific pathway with MKK1/MKK2 and MPK4. This pathway has an important role in regulation of defense gene expression in response to microbe associated molecular patterns recognition. However, loss of MEKK1 results in constitutive defense responses accompanying severe dwarfism and temperature-dependent cell death. To elucidate the complex mechanism underlying the mekk1 phenotypes, we performed genetic screening to isolate suppressor mutant of the dwarf and defense phenotypes. With the aid of the MutMap analysis, we identified the candidate of causal gene for the mutant. Genetic analysis by producing double mutant with mekk1 or mpk4, smn1 mutation suppressed the dwarf and defense phenotypes of these mutants. These results showed that SMN1 positively contributed to the phenotypes.

研究分野：植物病理学

キーワード：サブレッサー変異体 MAPキナーゼ経路 防御反応 矮性

## 1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナにおける MAP キナーゼ経路、MEKK1(MAPKKK) MKK1,2 (MAPKKs) MPK4(MAPK) 経路は、flg22 などの MAMPs により活性化し、パターン誘導免疫に関連する防御反応を正に制御する。(EMBO J. 27: 2214, 2008)。

一方、*mekk1* 変異体をはじめ上記経路の変異体は、矮性を伴う細胞死を構成的に示すため、当初の予想と反して、エフェクター誘導免疫に関連する防御反応を負に制御するように見受けられた(J. Biol. Chem. 281: 36969, 2006)。これまでの研究において、申請者は *mekk1* 変異体の矮性を伴った防御反応表現型が *rar1* 変異によって抑制されることを明らかにしていた。RAR1 は HSP90 と結合し、コシャペロンとして機能することで NLR タンパク質の安定性や活性を調節する (Mol. Cell 39: 269, 2010)。この知見から、*mekk1* 変異体の表現型には、NLR タンパク質をコードする遺伝子の関与が強く示唆された。

以上より、MEKK1 MKK1,2 MPK4 経路が防御反応を正にも負にも制御する一見矛盾する現象を解明するため、本研究では、MEKK1 遺伝子の欠損により現れる表現型に關与する遺伝子を同定し、解析を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では、パターン誘導免疫における防御反応を正に制御するシロイヌナズナ MEKK1 MKK1,2 MPK4(MAPK) 経路において、構成因子の欠損による防御反応活性化機構を解明することを目的としている。まず、*mekk1* 変異体が示す矮性を伴った防御反応表現型を抑制する変異体の単離と原因遺伝子の同定を行う。次に、*mekk1* に加え *mpk4* 変異体とも二重変異体作製を作製し、表現型解析を中心に研究を遂行する。また、単離された変異体の原因遺伝子の機能についても解析する。以上により、病害抵抗性における防御反応活性化の仕組みについて明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) *mekk1* 変異体の矮性表現型を抑制する変異体の単離

*mekk1* 変異体は細胞死や活性酸素種蓄積、PR 遺伝子の構成的な発現などの防御反応を伴う強い矮性により致死表現型を示す。本来であれば *mekk1* 変異体のホモ系統に変異を導入し、サプレッサー変異体を単離すべきであったが、致死表現型のため不可能だった。本研究では *mekk1* 変異体の致死表現型を回避するため、ドミナントネガティブ型の MEKK1 を誘導型バイナリベクターに挿入したコンストラクトを作製し、シロイヌナズナを形質転換してサプレッサー変異体単離の親系統とした。この形質転換シロイヌナズナを用いて EMS による変異導入を行い、ドミナントネガティブ型 MEKK1 誘導による矮性表現型を指標に、サプレッサー変異体を選抜した。

(2) サプレッサー変異体原因遺伝子の同定

選抜された変異体は、表現型の強さ、形質転換したコンストラクトの発現レベル、*RAR1* 遺伝子における変異の有無等、複数段階の更なる選抜を経て、最終的な候補に絞り込んだ。次に最終候補の系統の相補性試験を行った。これにより候補群を決定した。また、最終候補の変異体を、次世代シーケンサーを用いた MutMap 解析 (Nature Biotechnol. 30:174, 2012) に供試し、変異体原因遺伝子の推定を行った。

(3) サプレッサー変異体と *mekk1* 及び *mpk4* 変異体との二重変異体作製と表現型解析

サプレッサー変異体と *mekk1* 変異体または *mpk4* 変異体を交配し、二重変異体を作製した。これらについて *mekk1* 変異体、および *mpk4* 変異体と、矮性、細胞死、活性酸素種蓄積、PR 遺伝子の発現の各項目に関して比較を行い、表現型抑制を解析した。

## 4. 研究成果

(1) *mekk1* 変異体の矮性表現型を抑制する変異体の単離

*mekk1* 変異体の致死表現型を回避しつつ矮性表現型のサプレッサー変異体を単離するため、ドミナントネガティブ型の MEKK1 をステロイド処理によって発現誘導する形質転換シロイヌナズナ系統を作製した。本系統を継続的にステロイド処理したところ、*mekk1* 変異体様の防御反応を伴った矮性表現型が観察された。この系統を親系統として EMS による変異導入を行い、ドミナントネガティブ型 MEKK1 誘導による矮性表現型を指標に、矮性を示さないサプレッサー変異体を選抜した。複数段階の選抜の後、最も矮性抑制が明確だった 9 系統の変異体に解析対象を絞り込んだ。

(2) サプレッサー変異体原因遺伝子の同定

9 系統の変異体を相互に交配し、相補性試験を行ったところ、少なくとも 2 群の相補群に分類できることが明らかになった。さらに、各変異体を戻し交雑し、サプレッサー表現型を示す F2 個体について MutMap 解析を行い、表現型と關連する SNPs を同定した。その結果、供試した第 1 相補群全系統において異なる位置にアミノ酸置換変異を有する唯一の遺伝子 (*SMN1*) が同定された。このことから、*SMN1* がサプレッサー変異体第 1 相補群の原因遺伝子の最有力候補であると判断した。

(3) *smn1* 変異体と *mekk1* 及び *mpk4* 変異体との二重変異体作製と表現型解析

*smn1* 変異体各系統に関して、CAPS 及び dCAPS マーカーを作製して遺伝子型の判定を可能とした。その後、*smn1* 変異体と *mekk1* 変異体、及び *smn1* 変異体と *mpk4* 変異体をそれぞれ交配し、二重変異体を作製した。これらについて野生型、*mekk1* 変異体、および *mpk4* 変異体を含めて、矮性、細胞死、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 蓄積、防御關連遺伝子の発現の各項目に関して比較を行い、*smn1* 変異による表現型抑制を解析した。*smn1*

変異により、*mekk1* 変異体および *mpk4* 変異体の矮性、細胞死、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 蓄積、防御関連遺伝子の発現表現型はいずれも抑制される傾向となった。

これまでの研究から MEKK1 MKK1,2 MPK4 経路構成因子は相互に結合し、シグナル伝達複合体を形成する可能性が示唆されている。特に MEKK1 は複合体形成の足場タンパク質機能も有すると考えられている。*mekk1* 変異体だけでなく、*mpk4* 変異体の表現型についても *smn1* 変異によって抑制されたことから、シグナル伝達複合体の構成因子が一つでも欠けた場合、複合体の完全性が低下する可能性が考えられる。この完全性低下が何らかの形で認識され、矮性を伴った防御反応表現型につながるとすると、SMN1 はこの過程に関与する可能性が考えられた。

## 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6件)

Ichimura, K., Shinzato, T., Edaki, M., Yoshioka, H., Shirasu, K., SGT1 contributes to maintaining protein levels of MEK2<sup>DD</sup> to facilitate hypersensitive response-like cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 査読有、94 巻、2016、47-52  
DOI:10.1016/j.pmpp.2016.04.00

Nakamura, S., Pourkheirandish, M., Morishige, H., Kubo, Y., Nakamura, M., Ichimura, K., Seo, S., Kanamori, H., Wu, J., Ando, T., Hensel, G., Sameri, M., Stein, N., Sato, K., Matsumoto, T., Yano, M., Komatsuda, T., *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3* Regulates Seed Dormancy in Barley. *Current Biology*, 査読有、26 巻、2016、775-781  
DOI:10.1016/j.cub.2016.01.024

市村和也、田口義人、佐藤幹也、吉岡博文、田中信和、秋光和也、植物免疫応答の分子機構解明に向けた青枯病菌 effectomics アプローチ 植物細菌病談話会論文集、査読無、26 巻、2014、29-37

市村和也、構成的な防御反応を示す *mekk1* 変異体のサプレッサー遺伝子の同定。生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター、(東京農業大学生物資源ゲノム解析センター) 査読無、2 巻、2014、19。

<http://www.nodai-genome.org/download/ngrc/gbasenewsno2.pdf>

Fukumoto, T., Kano, A., Ohtani, K., Inoue, M., Yoshihara, A., Izumori, K., Tajima, S., Shigematsu, Y., Tanaka, K., Ohkouchi, T.,

Ishida, Y., Nishizawa, Y., Tada, Y., Ichimura, K., Gomi, K., Yoo, S.D., Sheen, J., Akimitsu, K. Phosphorylation of D-allose by hexokinase involved in regulation of OsABF1 expression for growth inhibition in *Oryza sativa* L. *Planta*, 査読有、237 巻、2013、1379-1391  
DOI:10.1007/s00425-013-1853-9

Kano, A., Fukumoto, T., Ohtani, K., Yoshihara, A., Ohara, T., Tajima, S., Izumori, K., Tanaka, K., Ohkouchi, T., Ishida, Y., Nishizawa, Y., Ichimura, K., Tada, Y., Gomi, K., and Akimitsu, K. The rare sugar D-allose acts as a triggering molecule of rice defence via ROS generation. *Journal of Experimental Botany*, 査読有、64 巻、2013、4939-4951  
DOI:10.1093/jxb/ert282

(学会発表) (計 25 件)

高木桃子、瀧野康平、Alexander Graf, David Greenshields, 高木宏樹、篠崎一雄、寺内良平、白須 賢、市村和也。シロイヌナズナ MEKK1 経路欠損変異体における表現型への R 遺伝子 SMN1 の関与。平成 28 年度日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21 ~ 23 日 岡山コンベンションセンター(岡山)

永田雅也、中村雅子、瀧澤香、白須 賢、市村和也。植物免疫シグナル伝達における MKK3 上流因子の同定。平成 28 年度日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21 ~ 23 日 岡山コンベンションセンター(岡山)

Takagi, M., Graf, A., Greenshields, D., Takagi, H., Shinozaki, K., Terauchi, R., Shirasu, K., Ichimura, K. Functional interplay between NLR protein SMN1 and MEKK1 pathway in *Arabidopsis*, 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 ~ 20 日 岩手大学(岩手)

Hamano, K., Takagi, M., Graf, A., Greenshields, D., Takagi, H., Shinozaki, K., Terauchi, R., Shirasu, K., Ichimura, K. Loss of function of *SMN1* suppressed constitutive defense phenotypes in MEKK1 pathway mutants, 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 ~ 20 日 岩手大学(岩手)

Kobayashi, T., Kubo, Y., Hio, J., Mizoguchi, T., Graf, A., Takahashi, F., Shinozaki, K., Shirasu, K., Ichimura, K. Two U-box ubiquitin ligases positively contribute to MAMP-responsive MAP kinase pathway in *Arabidopsis*, 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 ~ 20 日 岩手大学(岩手)

瀧野康平、高木桃子、坂田勇、Alexander Graf, David Greenshields, 高木宏樹、篠崎一雄、寺内良平、白須 賢、市村和也。シロイヌナズナ *mekk1* 経路変異体表現型に関与す

る R 遺伝子 *SMN1* の解析. 平成 27 年度日本植物病理学会関西西部会、2015 年 9 月 29 ~ 30 日 あわぎんホール (徳島)

高木 桃子, Alexander Graf, David Greenshields, 高木宏樹, 篠崎一雄, 寺内良平, 白須 賢, 市村和也. シロイヌナズナ *mekk1* 変異体表現型における R 遺伝子 *SMN1* の転写調節. 平成 27 年度日本植物病理学会関西西部会、2015 年 9 月 29 ~ 30 日 あわぎんホール (徳島)

高木桃子, 濱野康平, Alexander Graf, David Greenshields, 高木宏樹, 篠崎一雄, 寺内良平, 白須 賢, 市村和也. シロイヌナズナ MEKK1 経路の欠損により誘導される防御反応表現型に関する解析. 日本植物病理学会創立 100 周年記念大会 (平成 27 年度大会) 2015 年 3 月 28 ~ 31 日 明治大学駿河台キャンパス (東京)

Takagi, M., Hamano, K., Graf, A., Greenshields, D., Takagi, H., Shinozaki, K., Terauchi, R., Shirasu, K., Ichimura, K. *SMN1* is required for dwarf and cell death phenotypes of *Arabidopsis mekk1* and *mpk4*. 第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 ~ 18 日 東京農業大学世田谷キャンパス (東京)

Takagi, M., Hamano, K., Graf, A., Greenshields, D., Takagi, H., Shinozaki, K., Terauchi, R., Shirasu, K., Ichimura, K. Toward elucidating complex regulation of *Arabidopsis* MEKK1 pathway in plant immunity signaling. 第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 ~ 18 日 東京農業大学世田谷キャンパス (東京)

Sato, M., Taguchi, Y., Yoshioka, H., Tanaka, N., Akimitsu, K., Ichimura, K. Molecular Analysis of *Ralstonia solanacearum* GMI1000 Effectors which Suppress HR-like Cell Death Induced by MEK2<sup>DD</sup>. 第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 ~ 18 日 東京農業大学世田谷キャンパス (東京)

Nagata, M., Nakamura, M., Takizawa, K., Shirasu, K., Ichimura, K. Identification of upstream factors of *Arabidopsis* MKK3 involved in plant immunity signaling. 第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 ~ 18 日 東京農業大学世田谷キャンパス (東京)

高木 桃子, Alexander Graf<sup>1</sup>, David Greenshields, 高木宏樹, 篠崎一雄, 寺内良平, 白須 賢, 市村和也. シロイヌナズナ *MEKK1* 遺伝子の欠損により誘導される防御反応表現型に関する解析. 平成 26 年度日本植物病理学会関西西部会 2014 年 9 月 27 ~ 28 日 富山大学五福キャンパス (富山)

濱野康平, 高木桃子, 坂田勇, Alexander Graf, David Greenshields, 高木宏樹, 篠崎一雄, 寺内良平, 白須 賢, 市村和也. シロイヌナズナ *mpk4* 変異体が示す矮性および防御反応表現型における *SMN1* 遺伝子の関与

平成 26 年度日本植物病理学会関西西部会 2014 年 9 月 27 ~ 28 日 富山大学五福キャンパス (富山)

高木桃子, 市村和也, Alexander Graf, David Greenshields, 高木宏樹, 篠崎一雄, 寺内良平, 白須 賢. シロイヌナズナ *MEKK1* 遺伝子の欠損により誘導される防御反応表現型に関する解析. 平成 26 年度日本植物病理学会大会、2014 年 6 月 2 ~ 4 日 札幌コンベンションセンター (札幌)

佐藤幹也, 田口義人, 吉岡博文, 秋光和也, 市村和也. MEK2<sup>DD</sup> 誘導性 HR 様細胞死を抑制する *Ralstonia solanacearum* エフェクター clone10 の解析. 平成 26 年度日本植物病理学会大会、2014 年 6 月 2 ~ 4 日 札幌コンベンションセンター (札幌)

田口義人, 吉岡博, 田中信和, 秋光和也, 市村和也. MEK2-SIPK, WIPK 経路を抑制する青枯病菌エフェクターの解析. 平成 26 年度日本植物病理学会大会、2014 年 6 月 2 ~ 4 日 札幌コンベンションセンター (札幌)

Kubo, Y., Ichimura, K., Hio, J., Mizoguchi, T., Graf, A., Takahashi, F., Shinozaki, K., and Shirasu, K. Two U-box Ubiquitin Ligases Positively Contribute to MAMP-Responsive MAP Kinase Cascade in *Arabidopsis*. 第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 ~ 20 日 富山大学 (富山)

Takagi, M., Ichimura, K., Graf, A., Greenshields, D., Takagi, H., Shinozaki, K., Terauchi, R., and Shirasu, K. Forward Genetic Approach Toward Elucidating Complex Regulation of *Arabidopsis* MEKK1 in Plant Immunity Signaling. 第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 ~ 20 日 富山大学 (富山)

Sato, M., Taguchi, Y., Yoshioka, H., Akimitsu, K., and Ichimura, K. Identification of Novel *Ralstonia solanacearum* GMI1000 Effector Which Suppress HR-like Cell Death Induced by MEK2<sup>DD</sup>. 第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 ~ 20 日 富山大学 (富山)

② Taguchi, Y., Sato, M., Yoshioka, H., Tanaka, N., and Ichimura, K. Functional analysis of *Ralstonia solanacearum* GMI1000 effector which suppresses HR like cell death induced by MEK2<sup>DD</sup> in *Nicotiana benthamiana*. Japanese Solanaceae Genomics Initiative (JSOL) 10th International Symposium on Solanaceae Genomics, 2013 年 11 月 29 ~ 30 日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス (大阪)

② 田口義人, 吉岡博文, 田中伸和, 秋光和也, 市村和也. HR 様細胞死を抑制する青枯病菌エフェクターの機能解析. 平成 25 年度日本植物病理学会関西西部会、2013 年 9 月 26 ~ 27 日 岡山大学 (岡山)

- ②③高木桃子, 市村和也, Alexander Graf, David Greenshields, 高木宏樹, 篠崎一雄, 寺内良平, 白須賢. シロイヌナズナMEKK1遺伝子の欠損により誘導される防御反応表現型に関する解析, 平成25年度日本植物病理学会関西西部会、2013年9月26～27 岡山大学(岡山)
- ②④久保佑太, 市村和也, 樋尾隼平, 溝口剛, AlexanderGraf, 高橋史憲, 篠崎一雄, 白須賢. U-box型ユビキチンリガーゼPUB25, 26はシロイヌナズナMAMP応答性のMEKK1カスケードを促進的に制御する, 平成25年度日本植物病理学会関西西部会、2013年9月26～27 岡山大学(岡山)
- ②⑤佐藤幹也, 田口義人, 吉岡博文, 秋光和也, 市村和也. 構成的活性化型MEK2DDによるHR様細胞死を抑制する青枯病菌エフェクターの選抜, 平成25年度日本植物病理学会関西西部会、2013年9月26～27 岡山大学(岡山)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

香川大学農学部応用生物科学科市村研究室

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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

市村 和也 (ICHIMURA, Kazuya)

香川大学農学部・准教授

研究者番号:70321726