

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450066

研究課題名(和文) イネのチロシンリン酸化酵素 BSR1 を介した病害抵抗性応答機構の解析

研究課題名(英文) Characterization of dual-specificity protein kinase BSR1

研究代表者

菅野 正治 (Shoji, Sugano)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 植物・微生物機能利用研究領域
・上級研究員

研究者番号：60242111

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)：イネの BSR1 遺伝子はセリン/スレオニン残基のみならず、チロシン残基をリン酸化する活性を有するタンパク質リン酸化酵素をコードし、イネで過剰発現すると強い複合病害抵抗性が付与される。本研究では、*in vitro* でリン酸化される BSR1 のチロシン残基を同定し、その変異体がタンパク質リン酸化活性やチロシンリン酸化に及ぼす影響を明らかにした。また、BSR1 のタンパク質リン酸化活性が BSR1 過剰発現による複合病害抵抗性に必須であること、チロシンリン酸化が BSR1 の機能発揮に重要であることを明らかにした。複合病害抵抗性にサリチル酸シグナル伝達経路がほとんど関与しないことを示した。

研究成果の概要(英文)：Rice BSR1 is a dual-specificity protein kinase whose overexpression confers disease resistance against multiple pathogens. In this study, we have identified autophosphorylated tyrosine residues in BSR1. We have also mutated each tyrosine residues and examined the effects of mutations on kinase activity and tyrosine phosphorylation of BSR1. By overexpressing kinase-dead or tyrosine-replaced mutant *bsr1*, we have shown that kinase activity is essential for disease resistance and that tyrosine phosphorylation is important for full activity of BSR1 in disease resistance. We have also shown that SA signaling is dispensable for disease resistance conferred by BSR1.

研究分野：植物病理学

キーワード：タンパク質リン酸化 複合病害抵抗性 イネ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物が病害抵抗性を発揮する初期の段階で、病原体のもつ保存性が高い分子 (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) が植物の PAMPs 受容体によって認識され、病害抵抗性応答が誘導される。イネでは、いもち病菌由来 PAMPs の一種であるキチンオリゴマーが、イネ細胞の表面で膜貫通型 PAMPs 受容体 OsCERK1 や CEBiP、LYP4/6 等により認識されると、MAPK カスケードの活性化等の抵抗性応答が誘導されることが報告されている。一方、いもち病抵抗性応答には、サリチル酸 (SA) シグナル伝達経路が重要な役割を果たすことが示されている (Shimono, Sugano *et al.* Plant Cell 2007; Sugano *et al.* Plant Mol. Biol. 2010)。しかしながら、PAMPs 受容体下流におけるシグナル伝達の分子機構、特に SA シグナル伝達の関与については不明な点が多い。

2. 研究の目的

イネの *BSR1* 遺伝子は、チロシンリン酸化活性を持つ細胞質型タンパク質リン酸化酵素をコードし、その過剰発現はイネに強い複合病害抵抗性を付与する。これまでの知見から、*BSR1* は病原体感染を認識する受容体近傍で機能するシグナル伝達因子の一つで、チロシンリン酸化を介して病害応答シグナルをサリチル酸シグナル伝達経路等に伝える役割を担うと推測される。本研究では、イネの病害抵抗性応答における *BSR1* チロシンリン酸化の役割や、シグナル伝達の分子機構を明らかにし、*BSR1* 遺伝子を利用した耐病性育種に必要な基礎知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

イネの病害抵抗性応答における *BSR1* チロシンリン酸化の役割やシグナル伝達の分子機構を解明するため、以下の研究を予定行う。

(1) *BSR1* がチロシンリン酸化されることを明らかにするとともに、*BSR1* による複合病害抵抗性における *BSR1* チロシンリン酸化の役割を明らかにする。

(2) *BSR1* の上流で機能する PAMPs 受容体等の因子を同定し、病原体感染の認識から *BSR1* ヘシグナルが伝えられる機構を解明す

る。

(3) *BSR1* の下流で機能するシグナル伝達因子および転写因子を同定し、*BSR1* から防御応答遺伝子の発現誘導に至るシグナル伝達機構を解明する。

4. 研究成果

(1) *BSR1* チロシンリン酸化と複合病害抵抗性への関与：大腸菌内で過剰発現させたのちに、精製した *BSR1* タンパク質に対し、抗リン酸化スレオニン抗体および抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタン解析を行ったところ、*BSR1* タンパク質が大腸菌内でスレオニンおよびチロシンリン酸化されていた。実験に用いた抗リン酸化チロシン抗体の特異性を確認するために、リン酸化チロシンを含む BSA と抗体を混合したのちにウエスタン解析を行ったところ、*BSR1* のチロシンリン酸化が検出されなかった。また、*BSR1* を脱リン酸化酵素で処理後に、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタン解析を行うと、*BSR1* のスレオニンリン酸化もチロシンリン酸化も検出されなかった。以上の結果から、用いた抗リン酸化チロシン抗体は特異的にリン酸化チロシンを認識することが示された。また、タンパク質リン酸化活性を消失させた変異型 *BSR1*

(*bsr1*-K123M および *bsr1*-D222A) は大腸菌内で発現させると、全くチロシンリン酸化を受けないことから、*BSR1* のチロシンリン酸化は自己リン酸化によることが示された。

大腸菌内でチロシンリン酸化された *BSR1* を LC-MS で解析したところ、3 箇所 のチロシン残基がリン酸化されていた。このうち Tyr 63 (Y63) は、単子葉植物でしか保存されていなかったため、その機能を知るために変異型 *BSR1* (Y63A) を作製した。この変異型 *BSR1* (Y63A) を大腸菌内で過剰発現させ、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタン解析を行ったが、野生型 *BSR1* と有意な差は見られなかった。*BSR1* は少なくとも3つのチロシン残基が自己リン酸化されるので、Y63A 単独の効果は検出できなかったと考えられた。

BSR1 遺伝子をイネで過剰発現させると、いもち病・白葉枯病を含む複数の病害に対する抵抗性が付与される。まず、*BSR1* のタ

ンパク質リン酸化活性が複合病害抵抗性の付与に必要な否かを調べるために、変異型 *BSR1* (*bsr1-K123M*) をイネで過剰発現させ、野生型 *BSR1* の過剰発現体や非組換え体 (日本晴) と比較したところ、いもち病抵抗性は日本晴と同等であった (図 1 A)。一方、白葉枯病抵抗性は、野生型 *BSR1* の過剰発現体と日本晴の間であった (図 1 B)。以上の結果から、*BSR1* のタンパク質リン酸化活性が複合病害抵抗性の付与に重要であることが示された。

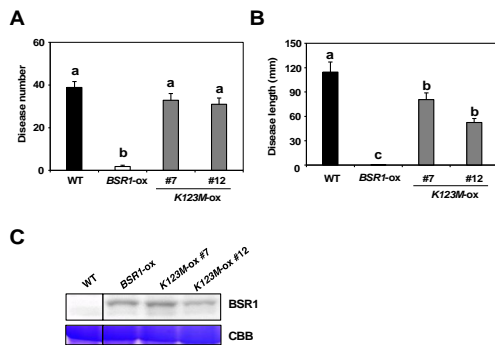


図 1. *BSR1* のタンパク質リン酸化活性は、複合病害抵抗性の付与に重要である

次に、上記のように自己リン酸化を受けるチロシン残基 Y63 の複合病害抵抗性付与における役割を知るために、変異型 *BSR1* (Y63A) をイネで過剰発現させ、野生型 *BSR1* の過剰発現体や日本晴と比較したところ、いもち病抵抗性も白葉枯病抵抗性も、野生型 *BSR1* の過剰発現体と日本晴の間であった (図 2)。

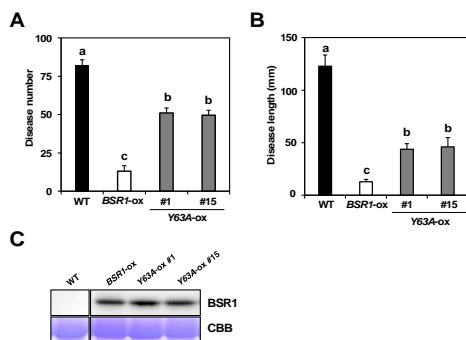


図 2. *BSR1* Y63 は、複合病害抵抗性の付与に重要である

以上の結果から、*BSR1* の Y63 残基は複合病害抵抗性の付与に重要であることが示された。チロシンリン酸化は、タンパク質の

安定性に影響する可能性が知られているので、野生型 *BSR1* あるいは Y63A 過剰発現イネの 4 葉および 5 葉にいもち病菌を接種して経時的にサンプリングした後、タンパク質を抽出して抗 *BSR1* 抗体を用いたウエスタン解析を行った。Y63A 変異により、*BSR1* のタンパク質量は影響を受けなかったことから、Y63 は *BSR1* の安定性には関与しないことが示された。

(2) *BSR1* の上流因子の同定と解析: *BSR1* と相互作用する因子を単離するために、酵母 2-hybrid 法を用いてスクリーニングを行った。Hydroxyproline-rich Glycoprotein が相互作用因子として単離されたので、この遺伝子の発現抑制イネを作製し、いもち病抵抗性を検定したが、野生型に比べ有意な差は見られなかった。

(3) *BSR1* の下流因子の同定とその制御機構の解析: *BSR1* による複合病害応答に SA シグナル伝達経路が関与しているか否かを調べるため、まず *BSR1-ox* イネと SA 分解酵素 (*nahG*) を発現させた *nahG-ox* イネを交配し、*BSR1-ox nahG-ox* イネを作製した。次に、*BSR1-ox nahG-ox* イネにいもち病菌あるいは白葉枯病菌を接種し、これらの病害に対する抵抗性を検定したところ、*BSR1-ox* イネの病害抵抗性と顕著な差が見られなかった。この結果から、*BSR1-ox* による複合病害抵抗性には、SA シグナル伝達がほとんど寄与していないことが示された。同様に、*BSR1-ox WRKY45* 発現抑制イネを作製し、いもち病菌あるいは白葉枯病菌に対する抵抗性を検定したが、*BSR1-ox* イネの病害抵抗性と顕著な差が見られなかった。この結果から、*BSR1-ox* による複合病害抵抗性には、*WRKY45* がほとんど関与していないことが示された。植物ホルモンであるエチレン (ET) も病害抵抗性に関与することが知られているので、*BSR1-ox* イネを ET 阻害剤で前処理し、いもち病菌あるいは白葉枯病菌に対する抵抗性を検定したが、*BSR1-ox* イネの病害抵抗性と顕著な差が見られなかった。この結果から、*BSR1-ox* による複合病害抵抗性には、ET シグナル伝達がほとんど寄与していないことが示された。

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 7 件)

Setsuko Fukushima, Masaki Mori,
Shoji Sugano and Hiroshi Takatsuji
(2016) Transcription Factor WRKY62
Plays a Role in Pathogen Defense and
Hypoxia-Responsive Gene Expression in
Rice. *Plant Cell Physiol.* 57:
2541-2551 (査読有)

Shoji Sugano, Nagao Hayashi, Yasushi
Kawagoe, Susumu Mochizuki, Haruhiko
Inoue, Masaki Mori, Yoko Nishizawa,
Chang-Jie Jiang, Minami Matsui,
Hiroshi Takatsuji (2016) Rice
OsVAMP714, a membrane-trafficking
protein localized to the chloroplast
and vacuolar membrane, is involved in
resistance to rice blast disease.
Plant Mol. Biol. 91: 81-95 (査読有)

Shingo Goto, Fumiko Sasakura-Shimoda,
Mai Suetsugu, Selvaraj M.G, Nagao
Hayashi, Muneo Yamazaki, Manabu
Ishitani, Masaki Shimono, Shoji
Sugano, Akane Matsushita, Tanabata T,
Hiroshi Takatsuji (2015) Development
of disease-resistant rice by
optimized expression of WRKY45.
Plant Biotech. J. 13: 753-765 (査
読有)

Aya Akagi, Setsuko Fukushima, Okada
K, Chang-Jie Jiang, Riichiro Yoshida,
Akira Nakayama, Masaki Shimono,
Shoji Sugano, Yamane H, Hiroshi
Takatsuji (2014) WRKY45-dependent
priming of diterpenoid phytoalexin
biosynthesis in rice and the role of
cytokinin in triggering the reaction.
Plant Mol. Biol. 86: 171-183 (査読有)

Naoki Yokotani, Sato Y, Tanabe S,
Chujo T, Shimizu T, Kenji Okada,
Yamane H, Masaki Shimono, Shoji

Sugano, Hiroshi Takatsuji, Kaku H,
Eiichi Minami, Yoko Nishizawa (2013)
WRKY76 is a rice transcriptional
repressor playing opposite roles in
blast disease resistance and cold
stress tolerance. *J. of Ext. Botany*
64: 5085-5097 (査読有)

Akira Nakayama, Setsuko Fukushima,
Shingo Goto, Akane Matsushita,
Masaki Shimono, Shoji Sugano,
Chang-Jie Jiang, Aya Akagi, Muneo
Yamazaki, Harihiko Inoue, Hiroshi
Takatsuji (2013) Genome-wide
identification of WRKY45-regulated
genes that mediate
benzothiadiazole-induced defense
responses in rice. *BMC Plant Biology*
13: 150 (査読有)

Haruhiko Inoue, Nagao Hayashi, Akane
Matsushita, Liu Xinqiong, Akira
Nakayama, Shoji Sugano, Chang-Jie
Jiang, Hiroshi Takatsuji (2013)
Blast resistance of CC-NB-LRR
protein Pb1 is mediated by WRKY45
through protein-protein interaction.
PNAS 110: 9577-9582 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

Satoru Maeda, Shoji Sugano,
Joseph G. Dubouzet, Naoki Yokotani,
Chang-Jie Jiang, Kenji Oda, Minami
Matsui, Hirohiko Hirochika, Hiroshi
Takatsuj, Masaki Mori (2013、8月27
日) A cytoplasmic kinase gene
provides resistance against major
bacterial and fungal pathogens in
Arabidopsis and rice. 10th
International Congress of Plant
Pathology (北京、中国)

Masaki Mori, Satoru Maeda, Shoji
Sugano, Naoki Yokotani, Nagao
Hayashi, Shingo Goto, Chang-Jie
Jiang, Kenji Oda, Hirohiko Hirochika,
Hiroshi Takatsuji (2013、11月22日)

Broad-spectrum disease resistance by overexpression of rice BSR1 and its application to crop improvement.
11th International Symposium on Rice Functional Genomics (ニューデリー、インド)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 正治 (SUGANO, Shoji)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門
植物・微生物機能利用研究領域・上級研究員
研究者番号：60242111

(2) 研究協力者

森 昌樹 (MORI, Masaki)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門
植物・微生物機能利用研究領域・ユニット長
研究者番号：50192779