

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26450055
研究課題名(和文) 抵抗性タンパク質の活性化機構と立体構造の解明

研究課題名(英文) Structural analysis of R protein activation

研究代表者

河野 洋治 (Kawano, Yoji)

横浜市立大学・木原生物学研究所・客員准教授

研究者番号：00406175

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)：抵抗性(R)タンパク質は、重要な細胞内免疫レセプターであるにも関わらず、全長のRタンパク質を精製が困難なことから、シグナル伝達機構や活性化機構はほとんど明らかになっていない。我々はイネ由来のRタンパク質Pitがいもち病菌に対する抵抗性を誘導する重要な因子として機能していることを明らかにしているが、その分子機構は不明だった。本研究で、Rタンパク質の精製系を確立して生化学解析を行い、Pitの活性化機構の解明を試みた。その結果、PitのATP・ADPの結合の違いがPitの分子内相互作用に影響を与えることを明らかにした。さらに、PitのCCドメインが溶液中で多量体を形成していることも見出した。

研究成果の概要(英文)：Although resistant (R) proteins are important intracellular immune receptors that induce the strongest immune response in plants, it is difficult to purify full-length R proteins, so signal transduction and activation mechanisms of R proteins remain largely unclear. We have previously reported that rice R protein Pit confers resistance to rice blast fungus and plays important roles in rice innate immunity. However, it is largely unknown how Pit induces downstream immune responses. In this study, we performed the biochemical analyses using purified the CC domain and the NB-ARC domain of Pit recombinant proteins to clarify activation mechanisms of Pit-1. We found that the exchange of ADP/ATP binding in the NB-ARC domain of Pit influences the intramolecular interaction between the CC domain and the NB-ARC domain of Pit. Moreover, we demonstrated here that the CC domain of Pit forms a dimer and a super oligomer in solution.

研究分野：植物生物学

キーワード：イネ R タンパク質

1. 研究開始当初の背景

植物は病原微生物の侵入を認識し、自らもっている様々な抵抗性反応を発動させ、病原体の増殖を防ぐことが出来る。植物がどのように病原体シグナルを認識し、下流の信号伝達系を活性化しているかについては殆ど明らかにされていない。また、抵抗性タンパク質 (R タンパク質) については、申請者らを含めたグループにより植物の免疫応答を誘導する重要な細胞内免疫レセプターであることが明らかにされているが、まだその詳細な分子機構はわかっていない。

2. 研究の目的

全長の R タンパク質を精製することが困難なことから、R タンパク質のシグナル伝達機構や活性化機構はほとんど明らかになっていない。本研究では、R タンパク質の精製系を確立し、生化学解析と立体構造解析を駆使し、R タンパク質の活性化機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) R タンパク質 Pit へのヌクレオチドの結合の検討
- 2) R タンパク質 Pit の分子内、分子間結合の検討
- 3) 昆虫細胞発現系を用いた R タンパク質発現系の評価

4. 研究成果

1) Pit NB-ARC ドメインのヌクレオチド結合能の解析

R タンパク質は、病原体の侵入を感知する細胞内レセプターとして働き、植物の自然免疫において極めて重要な分子である。R タンパク質は、NB-ARC ドメインにおいて ATP 結合能および ATPase 活性を有し、変異体を用いた解析などから R タンパク質の活性は、ADP、ATP 結合状態と相関が見られている (Tameling *et al.*, 2006)。

本研究において、イネ由来のいもち病菌に対する R タンパク質 Pit の NB-ARC ドメインを大腸菌を用いて発現・精製を行った。そして、Pit の NB-ARC ドメインが ADP 及び ATP との結合能を有することを確認した (図 1)。

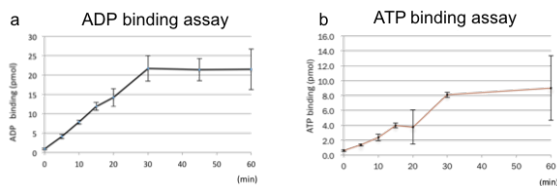


図 1. Pit NB-ARC ドメインと ADP、ATP 結合解析

2) Pit の分子内相互作用の解析

CC-NB-LRR 型の抵抗性タンパク質は、CC

ドメインと NB-ARC ドメイン、NB-ARC ドメインと LRR ドメイン間で分子内相互作用し、ADP、ATP の結合とそれに伴うコンフォメーションの変化によって活性型・不活性型を切り替えると考えられる (Moffett *et al.*, 2002)。そこで、Pit の NB-ARC ドメインの ADP、ATP の結合の違いが Pit の分子内相互作用に影響を与えるかどうかを検討した。

ATP アナログである ATP γ S と ADP をそれぞれ結合させた GST 融合 Pit NB-ARC ドメインを精製し、MBP 融合 Pit CC ドメイン、MBP 融合 Pit LRR ドメインとの相互作用を Pull-down assay により解析した。ADP 結合型の NB-ARC ドメインは、ATP 結合型の NB-ARC ドメインと比較して CC ドメインとの強い結合を示した (図 2a)。したがって、Pit の CC ドメインと NB-ARC ドメインは分子内で相互作用しており、NB-ARC ドメインへの ATP 結合は CC ドメインとの相互作用を弱めることが示唆された。Pit は NB-ARC ドメインでの ATP、ADP との結合により、活性・不活性を調節していることが考えられる。一方、NB-ARC ドメインと LRR ドメインとの相互作用はネガティブコントロールでも結合が見られた (図 2b)。今後、さらなる条件の検討を行う予定である。

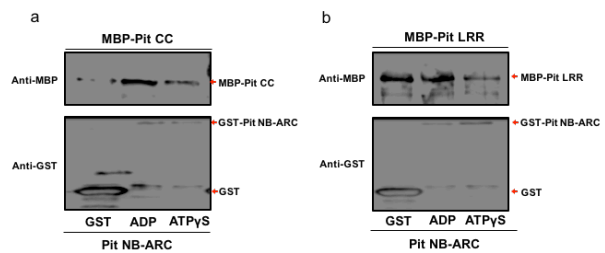


図 2. Pit の分子内相互作用解析

3) R タンパク質の分子間相互作用に関する新規な発見

R タンパク質 MLA10 は二量体を形成することが知られる。MLA10 の CC ドメインの二量体化は転写因子 HvWRKY1 との相互作用や下流へのシグナル伝達に重要であることが示されている (Maekawa *et al.*, 2011; Bai *et al.*, 2012)。CC-NB-LRR 型の R タンパク質の CC ドメインの二量体化は、下流への信号伝達に寄与し、その機能において重要と考えられる。そこで、Pit CC ドメインが溶液中で二量体を形成するかどうか、精製した Pit の CC ドメインを用いて、gel filtration assay により解析した。

Pit CC ドメインの分子量は 18 kDa であるが、ほぼ 2 倍である 30.7 kDa の溶出画分とおおよそ 60 倍に当たる 110 kDa の溶出画分にピークが得られた (図 3)。このことから Pit CC ドメインは溶液中で二量体と約 60 の分子からなる多量体を形成していることが示唆された。特に、この R タンパク質の CC ドメインの多量体化は本研究で初めて

明らかにされたもので、Rタンパク質の活性化機構の解明の分子基盤となる可能性が高い。

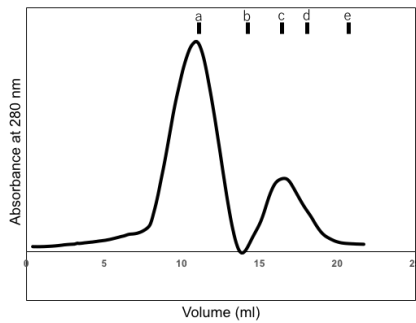


図3. Pit CCドメインを用いたgel filtration assay

4) 組み替えバキュロウイルスの構築

全長のRタンパク質はCCドメイン、NB-ARCドメインそしてLRRドメインの複数の機能ドメインから構成され、大腸菌等での組み替えタンパク質の発現が困難である。本研究では、昆虫細胞中でのバキュロウイルス Sf9 を用いたタンパク質発現法を利用し、Rタンパク質の発現・調整を検討した。本研究で使用するRタンパク質のうちPitのCCドメインは溶液中で多量体を形成することが示唆された(図3)。そこでCCドメインを含む全長だけでなくCCドメインを除くNB-ARC-LRRを発現領域として、pFast-Bac発現ベクターのプロモータの下流に各目的タンパク質の遺伝子を組み込み、発現ベクターを構築した。構築した組換えBacmid DNAをそれぞれSf9昆虫細胞にトランスフェクションし、発現バキュロウイルスを作成した。各ウイルスについて感染培養を数回繰り返して増幅を行い、ウイルスストック溶液が得られた。

5) Rタンパク質の発現

各種のRタンパク質発現バキュロウイルスをSf9細胞に感染させて培養を行い、その発現挙動を調べた。図4は感染培養における昆虫細胞内の各Rタンパク質発現をウェスタンブロットにより分析した結果を示す。ウェスタンブロットの結果、全ての昆虫細胞で目的タンパク質の発現を確認できなかった(図4)。

今後、異なる発現領域や可溶性タグを検討する。

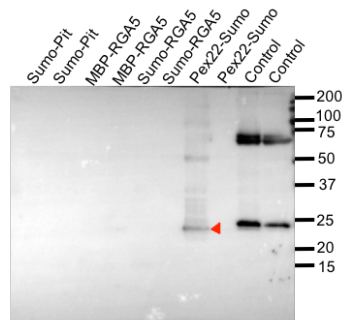


図4. 昆虫細胞におけるRタンパク質の発現

6) イネの免疫反応を制御するRタンパク質Pitの活性化モデルの構築

免疫に関与する動物のNB-LRR型タンパク質は細胞内レセプターとして働き、エフェクターの認識は多量体形成を誘導することが報告されている(Zhang *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015)。本研究における生化学的な解析の結果、PitのはNB-ARCドメインのATP、ADPと結合がPitの分子内相互作用に影響することが示された。また、gel filtration assayからPitは溶液中で多量体を形成していることが示唆された。したがって、PitはATP/ADPの交換によりコンフォメーション変化を引き起こし、多量体を形成することで下流へのシグナルを調節しているのかもしれない。

本研究のスタート時点では不明瞭であったRタンパク質Pitの分子実体を明らかにしつつある(図4)。

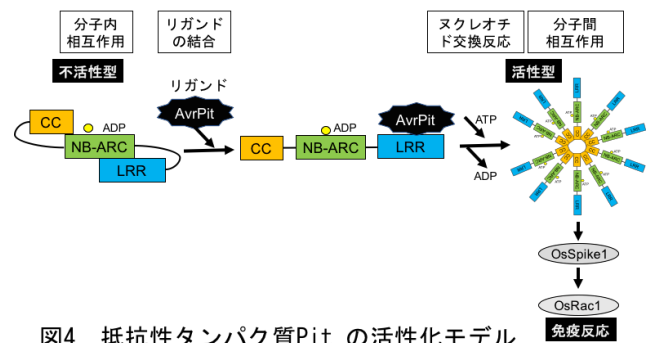


図4. 抵抗性タンパク質Pitの活性化モデル

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9件)

1) Akamatsu, A., Shimamoto, K., Kawano, Y. Crosstalk of Signaling Mechanisms Involved in Host Defense and Symbiosis Against Microorganisms in Rice. *Current Genomics* 17 (4), 297-307. 2016 査読あり

2) Nagano M, Ishikawa T, Fujiwara M, Fukao Y, Kawano Y, Kawai-Yamada M, Shimamoto K. Plasma Membrane Microdomains Are Essential for Rac1-Rboh/H-Mediated Immunity in Rice. *The Plant Cell* 28 (8), 1966-1983. 2016 査読あり

3) Akamatsu, A., Uno, K., Kato, M., Wong, H.L., Shimamoto, K., and Kawano, Y. New insights into the dimerization of small GTPase Rac/ROP guanine nucleotide exchange factors in rice. *Plant signaling & behavior* 10 (7), e1044702. 2015 査読あり

4) Liu, L., Park, C.H., He, F., Nagano, M., Wang, M., Bellizzi, M., Zeng, X., Liu, W.,

Ning, Y., Kawano, Y., and Wang, GL. (2015) The RhoGAP SPIN6 Associates with SPL11 and OsRac1 and Negatively Regulates Programmed Cell Death and Innate Immunity in Rice. *PLoS Pathog* 11 (2), e1004629. 2014 査読あり

5) Kawano, Y. (Corresponding author), Kawano-Kaneko, T., and Shimamoto, K. Rho family GTPase-dependent immunity in plants and animals. *Frontiers in plant science* 5, 522. 2014 査読あり

6) Kosami, K., Ohki, I., Nagano, M., Furuita, K., Sugiki, T., Kawano, Y., Kawasaki, Y., Fujiwara, T., Nakagawa, A., Shimamoto, K., and Kojima, C. The crystal structure of the plant small GTPase OsRac1 reveals its mode of binding to NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 289 (41), 28569-28578. 2014 査読あり

7) Cesari, S., Kanzaki, H., Fujiwara, T., Bernoux, M., Chalvon, V., Kawano, Y., Shimamoto, K., Dodds, P., Terauchi, R. Kroj, T., The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *The EMBO journal* 33 (17), 1941-1959. 2014 査読あり

8) Kawano, Y. (Corresponding author), Fujiwara, T., Yao, A., Housen, Y., Hayashi, K., and Shimamoto, K. Palmitoylation-dependent membrane localization of the rice R protein Pit is critical for the activation of the small GTPase OsRac1. *Journal of Biological Chemistry* 289 (27), 19079-19088. 2014 査読あり

9) Sakane, H., Horii, Y., Nogami, S., Kawano, Y., Kaneko-Kawano, T., and Shirataki, H. α -Taxilin forms a complex with sorting nexin 4 and participates in the recycling pathway of transferrin receptor. *PloS one* 9 (4), e93509. 2014 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

1) Wang, Q., Uno, K., Kosami, K., Shimamoto, K. and Kawano, Y. R protein Pit-1 regulates disease resistance through activation of small GTPase OsRac1 by OsSPIKE1. *Cold Spring Harbor Asia* 2016, 2016. 11. 29 兵庫県 淡路市 夢舞台

2) Kawano, Y. et al., Small GTPase OsRac1

regulates rice immunity through NO and GAPC3, 7th International Rice Blast Conference, 2016. 10. 9. フィリピン マニラ The Bellevue Manila Malacca Lane

3) Kawano, Y., Kosami, K., Su, J., Dang, TT., and Shimamoto, K. S Small GTPase OsRac1-induced S-nitrosylation of GAPC is involved in disease resistance to rice blast fungus. *Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions XVII Congress*, 2016. 7. 16. アメリカ ポートランド Conversion Center

4) Kawano, Y., and Shimamoto, K. R protein Pit-1 regulates disease resistance through activation of small GTPase OsRac1 by OsSPIKE1. 第 57 回 日本植物生理学会年会, 2016. 3. 18. 岩手県 盛岡市 岩手大学

5) Kawano, Y., and Shimamoto, K. R protein Pit-1 regulates disease resistance through activation of small GTPase OsRac1 by OsSPIKE1. 平成 28 年度 日本植物病理学会大会, 2016. 3. 21. 岡山県 岡山市 岡山コンベンションセンター

6) Kawano et al., Small GTPase OsRac1 is a key regulator in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity, 3rd Beijing International Symposium on Molecular Plant Pathology, 2015. 7. 29. 中国 北京北京友谊宾馆瑞宾楼会议室

7) Kawano, Y., and Shimamoto, K. Elucidation of mechanisms of small GTPase OsRac1 activation by R protein Pit through OsSPIKE, 4th International Conference on Biotic Plant Interactions, 2015. 8. 1. 中国 南京

8) Kawano, Y., and Shimamoto, K. Elucidation of mechanisms of small GTPase OsRac1 activation by R protein Pit through OsSPIKE, 第 56 回 日本植物生理学会年会, 2015. 3. 16. 東京 世田谷区 東京農業大学

9) Kawano, Y., and Shimamoto, K. Elucidation of mechanisms of small GTPase OsRac1 activation by R protein Pit through OsSPIKE1 第 55 回 日本植物生理学会年会, 2014. 3. 21 富山県 富山市 富山大学

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/simamoto/140731%20Kawano%20NAIST/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 洋治 (KAWANO YOJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・客員准教授

研究者番号：00406175

(2) 研究分担者

安田 伸子 (YASUDA NOBUKO)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・研究員

研究者番号：00355504

河野 貴子 (KAWANO TAKAKO)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：00378019

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()