

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450056

研究課題名(和文) OsRac1が制御するイネ免疫システムの新規因子MD-2に関する研究

研究課題名(英文) Research of MD-2 protein in rice innate immunity system mediated by OsRac1.

研究代表者

藤原 正幸 (FUJIWARA, Masayuki)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・特任助教

研究者番号：70403350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我が国の主要作物であるイネ、その免疫システムを制御する因子としてOsRac1が存在、活性酸素産生タンパク質や免疫受容体らと複合体を形成し、さまざまなシグナル調整を行っていることがわかってきた。本研究課題では活性型OsRac1とのみ相互作用するものとしてMD-2脂質認識タンパク質を単離した。このタンパク質について詳細な解析を行ったところ、活性型OsRac1の細胞死誘導に関係していること、病原体刺激による細胞外へ分泌されること、リン酸化酵素と相互作用することを発見した。本研究成果はイネ本来が持つ免疫システムを解明する上で有用な知見となり、未来型生物農薬の開発に大きく寄与できるものである。

研究成果の概要(英文)：OsRac1, a small GTPase in rice, is involved in regulation of NADPH oxidase producing reactive oxygen species during oxidative burst and initiation of cell death during innate immune responses. Recently, we have tried to isolate OsRac1-interacting proteins by various methods. These results revealed the signaling network of OsRac1, named the Defensome network, which is composed of immune receptors. In this study, we isolated MD-2-related lipid recognition proteins as OsRac1 interacting proteins by immunoprecipitation and mass spectrometric analysis. This interaction were found only in constitutively active OsRac1 rice cultured cells, not found in negatively active OsRac1. Our studies revealed that MD-2 protein related cell death and secreted outside of the cell by pathogen stimulus. Furthermore we found that MD-protein interact with phosphorylation related proteins.

研究分野：植物病理

キーワード：イネ 植物免疫 分泌タンパク質 相互作用 質量分析 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

我が国の主要作物であるイネに関する研究は長い歳月をかけて行われているが、未だにイモチ病による年間被害額は数百億円に達する。被害を防ぐために農薬散布を行い続けていると、環境破壊につながるだけでなく、薬剤の効果が薄れ、次第に耐性能力を備えた菌が生まれるといった悪循環が生じてしまう。効果的で最小限の農薬散布を行うことで被害を抑えることが求められるが、そのためには、イネ自身が持つ免疫システムを根本から理解する解析、研究が必要である。その結果イネ免疫システムを誘導するような抵抗性誘導型の農薬の開発や、イネが自身の体内で作る抗菌タンパク質などが新規の農薬として用いられるようになるかもしれない。これらの研究、開発のシステムが確立されれば持続可能な農業可能になると考えられる。

2. 研究の目的

イネ免疫システムを制御することが知られている OsRac1 タンパク質がある。このタンパク質は細胞死関連のタンパク質や抵抗性タンパク質、病原体因子に対する受容体などと複合体を形成し、外部からの刺激に応じて、免疫システムを調整していることがこれまでに明らかになっている。この OsRac1 の新たな相互作用因子として脂質認識能を持つ MD-2 タンパク質というものが単離された。MD-2 タンパク質は動物に関する情報はよく知られており、ヒト MD-2 タンパク質は細菌の表面から放出されるリポ多糖を認識し、敗血症の引き金となることがわかっている。本研究課題ではこの MD-2 タンパク質に注目し、イネの免疫応答経路上でどのような機能を有し、どのようなタンパク質と関連、相互作用しているか等の知見を得ることを目的とした。制御因子 OsRac1 の相互作用因子である MD-2 タンパク質について調べることはイネ免疫システムの全容解明に向けた一つのピースを埋めることになり、未来型農薬の開発に寄与できると考えている。

3. 研究の方法

発見当時は機能未知であった MD-2 タンパク質に関する情報を得るために、MD-2 タンパク質にタグを付加したものを発現する形質転換イネを作出することを試みた。遺伝子導入、発現が確認されたカルス由来の培養細胞を作出し、これを病原体応答を調べるための研究材料とした。この培養細胞にイネイモチ病菌の細胞壁成分であるキチンエリシター（イモチ病菌感染時に起こる免疫応答と同様の反応が起こる物質）を処理し、MD-2 遺伝子の発現量とタンパク質の量に変化が認められるかどうかについて調べた。

作出した MD-2 発現イネ培養細胞を用いた免疫沈降を行うことで MD-2 タンパク質と相互作用する新規因子の探索を試みた。実験方法はタグ抗体を結合させたマグネットビーズ

を MD-2 発現イネ培養細胞のタンパク質抽出液に加え、反応させることで MD-2 タンパク質と相互作用するタンパク質を単離精製した。精製後、タンパク質電気泳動を行い、そこから切り出したゲル中のタンパク質をプロテアーゼ消化し、得られたペプチドを質量分析装置で解析し、マススペクトルデータをイネゲノムデータベースに対する検索することでタンパク質同定を行った。質量分析により同定された候補タンパク質については、さらに別の手法での相互作用を確認するために、酵母ツーハイブリッド法を用いた相互作用実験を行った。

活性型 OsRac1 を *Nicotiana benthamiana* 葉にアグロインフィльтраーション法を用いて一過的に発現させると激しい細胞死を引き起こすが、相互作用因子として単離された MD-2 タンパク質単独、もしくは活性型 OsRac1 と同時に同場所で発現させた場合どのような変化が生じるかについて調べてみた。

さらに蛍光タンパク質を融合して発現する MD-2 遺伝子を野生型イネ培養細胞由来のプロトプラスト細胞に一過的に導入、発現させ、その局在様式に関する解析を行った。

4. 研究成果

培養細胞に対するエリシター処理実験をおこなった結果、エリシター処理 30 分後で劇的にタンパク質量が減っていることが分かった。しかし、この時の遺伝子発現量を調べてみたところ明らかに増加しているといった相反する結果が認められた。この謎を解明するために培養細胞の培地中に含まれる MD-2 タンパク質を調べたところ、エリシター処理 30 分後に大量に存在していることが確認された。これら結果から、MD-2 タンパク質は通常細胞内に存在し、OsRac1 をはじめいくつかのタンパク質と相互作用、もしくは単独で存在しているが、病原体などの外部からの刺激を認識すると積極的に細胞外へ分泌し、周囲の細胞へシグナルを伝達する、いわゆるセカンドメッセンジャーとしての役割を有していることが示唆された。また、付加するタグの大きさや付加する位置を変えてみたところ、25kDa 以上のタグでは分泌能力が弱まり始めること、N 末端に付加した場合には分泌が認めれなくなったことから N 末端側に分泌に必須な配列が存在していると考えられた。

OsRac1 相互作用因子として単離された MD-2 タンパク質が他にどのようなタンパク質と相互作用しているかどうかの知見を得るためにタグ融合 MD-2 タンパク質発現するイネ培養細胞を用いて、免疫沈降を行い、質量分析装置により共沈降してきたタンパク質の同定を行った。その結果、リン酸化酵素などをはじめいくつかのリン酸化関連タンパク質が含まれていることが明らかになった。そこで、それら相互作用について酵母ツーハイブリッド法を用いて確認実験をしたところ、

MAPKKK と強く相互作用することを確認することができた。これら結果から、MD-2 タンパク質はイネ細胞内において、リン酸化経路上のタンパク質と何らかの関連を持つことが示唆された。OsRac1 や免疫受容体もシグナル伝達においてリン酸化がその役割において重要な機能を果たしていることがこれまでの研究成果から明らかとなっているため、本発見は今後の解析において大きな知見となりうると考えている。

MD-2 遺伝子をアグロインフィルトレーション法により、*N. benthamiana* 葉に一過的に導入、発現させてその表現型を評価する実験を行った。その結果、単独では表現型が表れなかった。活性型 OsRac1 単独のものを *N. benthamiana* に一過的発現した場合、葉は激しい細胞死を引き起こす。そこで MD-2 を OsRac1 と一緒にアグロインフィルトレーションして共発現してみたところ、OsRac1 単独で誘導される激しい細胞死が抑制されることがわかった。

蛍光タンパク質遺伝子 (GFP) と MD-2 遺伝子を連結させた遺伝子をイネ培養細胞由来のプロトプラストに一過的に導入し、蛍光顕微鏡下での観察を行うことにより、MD-2 が細胞内でどのような局在様式をとっているかについて調べた。その結果、MD-2 は細胞膜上に局在することが観察された。また細胞膜上の所々でドット状の強い蛍光シグナルも所々観察された。この観察結果は MD-2 の C 末端側に GFP を融合させた MD-2:GFP でのみ観察された結果であり、N 末端に融合させた GFP:MD-2 ではぼんやりしたシグナルが細胞膜全体で認められたものの、MD-2:GFP で観察された局所的な強いシグナルは認められなかった。エリシター処理を行った後の細胞外分泌は MD-2:GFP でのみ確認されたことから、細胞膜上で観察されたドット状の強いシグナルは、細胞外への分泌経路上のものが蛍光顕微鏡下で観察されたものと考えられる。本研究結果から、新規因子として単離された MD-2 タンパク質は OsRac1 と相互作用することで OsRac1 により誘導される細胞死を抑制すること、病害応答により細胞外へ分泌されるといった興味深い結果が得られた。細胞外でなんらかの機能を果たしているという研究結果は、将来の新しい農薬開発にも寄与できると考えられ、非常に興味深いものである。これら研究結果と未来型農薬としての提案は平成 29 年度 基盤研究(C) 「未来型農薬としての MD-2 タンパク質の可能性」に採択していただいた。

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 3 件)

1. Disulfide proteomics of rice cultured cells in

response to OsRac1 and probenazole-related immune signaling pathway in rice. Morino K., Kimizu M., Fujiwara M. Proteome Sci. 15:6 (2017) (査読有)

2. Plasma membrane microdomains are essential for Rac1-RbohB/H-mediated immunity in rice. Nagano M., Ishikawa T., Fujiwara M., Fukao Y., Kawano Y., Kawai-Yamada M., Shimamoto K. Plant Cell 28:1966-1983 (2016) (査読有)

3. The Arabidopsis CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation. Yamada K., Yamaguchi K., Shirakawa T., Nakagami H., Mine A., Ishikawa K., Fujiwara M., Narusaka M., Narusaka Y., Ichimura K., Kobayashi Y., Matsui H., Nomura Y., Nomoto M., Tada Y., Fukao Y., Fukamizo T., Tsuda K., Shirasu K., Shibuya N., Kawasaki T. EMBO J. 35:2468-2483 (2016) (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 藤原正幸, イネ免疫機構を制御するタンパク質複合体のプロテオーム解析 バイオサイエンス技術セミナー in 新潟, 2017.2.17, 新潟県新潟市. (招待講演)
2. 藤原正幸, 深尾陽一郎, 島本功 イネ免疫システムにおける脂質認識タンパク質の機能解析 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015.3.16-18, 東京都世田谷区.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 正幸 (FUJIWARA, Masayuki)
慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特
任助教

研究者番号：70403350

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()