

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650106

研究課題名(和文)次世代複合体ダイナミクス解析で紐解く植物-病原体相互作用ネットワーク

研究課題名(英文) Interactomics of plant-pathogen interaction

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物の免疫システムおよび病原体の感染戦略の理解は、抵抗性作物の分子育種そして病原体制御技術の開発に繋がる。現在の最重要課題は、免疫システムの制御因子およびエフェクターの同定にある。そこで、病原体を感染させた植物細胞において、病原体由来の因子と相互作用する因子を網羅的に調べる技術の確立を行った。本技術確立の鍵となる、解析する材料の調製法、そしてプロテオーム解析技術の最適化・確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：Identification of pathogen effectors and their targets in host plants are important subjects for understanding plant immunity to improve disease resistance. We have optimized and established the proteomics method to identify effectors and their targets all at once.

研究分野：植物プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス エフェクター

1. 研究開始当初の背景

植物は、パターン認識受容体 (PRR) を用いて、微生物の保存性の高い細胞成分を認識することで、広範の病原体に対する抵抗性を発揮する (PRR-triggered immunity: PTI)。一方、病原体は多数のエフェクタータンパク質を分泌し、PTI システムを標的として抑制することで感染を成立させる。

これまで PTI システム制御因子の同定を目指し、遺伝学的手法に基づくスクリーニングが精力的に行われてきたが、PRR 下流の制御因子は殆ど同定されていない。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遺伝学的手法の限界が議論されている。最近の病原体エフェクターの研究は、エフェクターを分子プローブとした手法が、PTI システム制御因子の同定に有効であることを示した。ゲノム解析技術の進化は、病原体の持つエフェクター候補の探索を可能にしたが、作用機が明かされたエフェクターの数は少なく、アミノ酸配列からの機能推定も難しい。つまり現時点では、ゲノム情報のみでは、実際のエフェクターおよびその標的の推定は極めて難しい。そこで、まず個々のエフェクター候補因子の免疫応答への作用を調べることでエフェクターを同定し、その上で標的因子の同定を試みる流れの研究が盛んになってきている。しかし、同定効率に著しく難がある。

2. 研究の目的

病原体を感染させた植物細胞において、病原体由来の因子と相互作用する因子を網羅的に調べる技術を確立することで、エフェクターと PTI システム制御因子を同時に効率よく同定できると考えた。最近、申請者らが得意とするショットガンプロテオミクス技術を利用し、細胞内でのタンパク質複合体のダイナミクスを解析する方法論が生み出された。そこで本研究課題では、この方法を確立・応用することで、病原体感染に伴う植物細胞内でのタンパク質複合体の変動を解析し、エフェクターと標的因子 (PTI システム制御因子) の複合体の一斉同定を試みる。

3. 研究の方法

植物と病原体の組み合わせは数多くあるが、均一かつ同調的に感染させるシステムが確立されている、シロイヌナズナとトマト斑葉病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pto DC3000) の相互作用を解析する。シロイヌナズナは、Pto DC3000 をパターン認識受容体 (PRR) を用いて認識し、PRR を活性化する。ところが Pto DC3000 は、シロイヌナズナに感染することが出来る。つまり、Pto DC3000 のエフェクターは、PRR の活性化にともなう抵抗性反応を阻害している。エフェク

ターとの相互作用を検証する際に、PRR 活性化にともなう植物側の状態変化も考慮する必要があると考えられる。そこで、エフェクターを注入できない変異体 Pto DC3000 hrcC- を利用することで、3つのコンディションを比較し、エフェクターの標的因子の同定を試みる。

4. 研究成果

この解析系で最も重要な点の1つは、植物細胞へのエフェクターの注入効率にある。例えば、シロイヌナズナに Pto DC3000 を接種した際に、10%の細胞にしかエフェクターが注入されなければ、標的因子の10%しか相互作用による影響を受けないことになる。そうすると、データ解析は煩雑になり、検出感度の面で問題が生じることも考えられる。そこで、注入効率 (感染効率) が100%に近づくようにシステムの最適化を行った。Pto DC3000 に AvrRPM1 因子を持たせると、シロイヌナズナは速やかに細胞死を誘導するため (過敏感細胞死)、Pto DC3000 AvrRPM1 接種にともなう細胞死を見ることで、エフェクターの注入効率を知ることができる。そこでこの系を用いて、エフェクターの注入効率が高い感染条件、また解析に適する接種後の時間帯を見出した。

解析の成功には、質の高い定量的プロテオームデータの取得も重要である。そこで、LC-MS システムやデータ解析手法の最適化・確立を平行して行った。その成果として、確立した解析システムを利用した研究の成果を原著論文として5本発表した。それら以外にも、オオムギうどんこ病菌のエフェクター候補因子、ピクトリンの標的因子の同定などにも成功した。Pto DC3000 のエフェクターおよびその標的因子の同定は解析中である。

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5件)

Cifuentes M, Jolivet S, Cromer L, Harashima H, Bulankova P, Renne C, Crismani W, Nomura Y, Nakagami H, Sugimoto K, Schnittger A, Riha K, Mercier R (2016) TDM1 regulation determines the number of meiotic divisions, *PLoS Genetics.*, Feb 12; 12(2):e1005856. doi: 10.1371/journal.pgen.1005856. (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)

〔学会発表〕(計 18 件)

香口智宏、和原未季、武井博、菅井維之、野村有子、小林括平、西口正通、山岡直人、中神弘史、八丈野孝「オオムギうどんこ病菌の付着器分泌型エフェクター候補の解析」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 23 日

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

兼市大輝、桑田啓子、斎藤隆一郎、中神弘史、中屋敷均、土佐幸雄、眞山滋志、秋光和也、多田安臣「エンバクの細胞表面に存在するチオレドキシンは宿主特異的毒素ピクトリンの標的である」平成 27 年度日本植物病理学会大会、明治大学駿河台キャンパス・東京、2015 年 3 月 30 日

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

兼市大輝、中神弘史、斎藤隆一郎、中屋敷均、土佐幸雄、眞山滋志、多田安臣「エンバクの細胞表面に存在するチオレドキシンはエフェクターピクトリンの標的である」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

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

八丈野孝、菅井維之、野村有子、佐藤繭子、若崎真由美、香口智宏、小林括平、

西口正通、豊岡公德、中神弘史、山岡直人「オオムギうどんこ病菌の付着器から分泌されるエフェクタータンパク質の同定」日本植物病理学会関西部会、富山、2014年9月27-28日

Nakagami H, Phosphoproteomics as a tool to unravel plant signal transduction pathways, Symposium 'The cutting edge of photoreponse mechanisms: photoreceptor and signaling mechanism' at the 78th Annual Meeting of the Botanical Society of Japan, Meiji University, Kawasaki, Sep 12, 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

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