

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850232

研究課題名(和文)膜ラフトによる植物免疫制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of plant immunity by membrane rafts

研究代表者

長野 稔(NAGANO, Minoru)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：80598251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜上には膜ラフトと呼ばれる脂質・タンパク質集積ドメインが点在している。本研究ではイネにおいて病害応答時に一時的に膜ラフトに存在する免疫タンパク質の同定、及び機能解析を行った。まず、病害応答時の活性酸素種の産生を担うNADPHオキシダーゼの中で、OsRbohBとOsRbohHの2つが一時的に膜ラフトに局在するタンパク質であることを同定し、中でもOsRbohBがイネいもち病耐性に必須であることを示した。また、質量分析装置を用いたプロテオーム解析により、63個の新規の病害応答性一過的膜ラフトタンパク質候補を同定し、その中で4つのタンパク質の細胞膜局在を確認した。

研究成果の概要(英文)：In plasma membrane, membrane rafts, in which lipids and proteins accumulate, exist. In this study, I identified immune proteins that transiently exist in membrane rafts during defense responses in rice and analyzed their function. In NADPH oxidases that produce reactive oxygen species, OsRbohB and OsRbohH move to membrane rafts in response to chitin elicitor, and OsRbohB is essential for the resistance to rice blast fungus. In addition, our proteome analysis identified 63 proteins that transiently exist in membrane rafts after the treatment of chitin. In these proteins, I confirmed that 4 proteins localized in the plasma membrane

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：膜ラフト 植物免疫 スフィンゴ脂質 イネ 耐病性

1. 研究開始当初の背景

植物免疫の初期応答には、細胞膜に局在するタンパク質が非常に重要である。近年、細胞膜上には膜ラフトと呼ばれる小さく強固な脂質・タンパク質集積ドメインが点在することが明らかになってきた。膜ラフト上には多数の免疫タンパク質が存在するため、植物免疫に膜ラフトが重要な役割を果たすと考えられているが、実際に膜ラフトが植物の耐病性に関与しているのか、タンパク質が膜ラフトに局在する意味は何かなど、未解明の点が多かった。

研究代表者はこれまでに膜ラフト主要形成脂質であるスフィンゴ脂質を改変することにより、恒常的に膜ラフトが減少したイネ(品種:金南風)を作出した。この膜ラフト減少イネを用いることにより、病害応答時において NADPH オキシダーゼである OsRboh と低分子量 G タンパク質 OsRac1 の膜ラフトへの局在量が増大することにより、活性酸素種(ROS)の産生が促進され、いもち病菌に対する抵抗性が増すという可能性を示した。Rboh はイネに 9 つ存在(OsRbohA-OsRbohI)し、これまでのプロテオーム解析から OsRbohH がイネカルスにおける病害応答性膜ラフトタンパク質である可能性が示唆されているが、これまで機能に関する報告はない。また、OsRboh や OsRac1 と同様に病害に反応して膜ラフトに局在するタンパク質が存在する可能性があるが、ほとんど報告がなかった。

2. 研究の目的

本研究は、植物の自然免疫機構における膜ラフトの重要性をさらに明らかにすることを目的として、病害応答性膜ラフトタンパク質の同定とその機能及び膜ラフトとの関係性を解明する。

3. 研究の方法

(1) 病害応答性膜ラフト局在型 OsRboh の同定と機能解析

OsRbohH が膜ラフトに局在する病害応答性の NADPH オキシダーゼであるか解析する。また、OsRac1 との関係についても解析を行う。

(2) 新規の病害応答性膜ラフトタンパク質の同定と機能解析

プロテオーム解析を用いて新規の病害応答性膜ラフトタンパク質を同定し、同定したタンパク質の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 病害応答性膜ラフト局在型 OsRboh の同定と機能解析

これまでのプロテオーム解析により膜ラフトに局在する可能性が示唆された OsRbohH が免疫に関与するか解析するため、RNAi 法を用いた OsRbohH のノックダウンイネカルス(OsRbohH-KD)を作製し

た。OsRbohH-KD に対して病害応答を引き起こす病原体の細胞壁成分キチンを処理したところ、ROS の産生量が野生型(WT)イネカルスと変化がなかった。この原因を明らかにするため、9 つの OsRboh すべての発現量を OsRbohH-KD において調べた結果、OsRbohB の発現量が異常に上昇していることが明らかになった。OsRbohB はこれまでに植物免疫との関係が示唆されている(Wong et al., Plant Cell, 2007)。そこで、RNAi 法により OsRbohH と OsRbohB を同時にノックダウンしたイネカルス系統(OsRbohB/H-KD)を作製し、キチン処理を行った。その結果、ROS の産生量が WT の半分程度にまで減少し、OsRbohB と OsRbohH がキチンに応答する病害応答性 NADPH オキシダーゼである知見を得ることができた。

イネにおける各 OsRboh の発現組織を特定するために組織別発現解析を行った結果、OsRbohH はカルスで発現が強く植物体(葉)ではほとんど発現していない一方、OsRbohB は逆にカルスでの発現はほとんどないが植物体で発現量が多いことが明らかになった。そこでイネ植物体の耐病性に関与する OsRboh を明らかにするために、RNAi 法によって OsRbohB のノックダウンイネ植物体(OsRbohB-KD)を作出した。非親和性のいもち病菌(race 007.0)接種試験を行った結果、WT と比較して病班長が拡大しいもち菌の増殖量が多いなど感受性が高まっている結果を得た。従って、OsRbohB がイネ植物体における免疫に重要な NADPH オキシダーゼであることが明らかになった。

さらにイネ耐病性との関連を明らかにするために、イネ免疫において分子スイッチとして中心的な働きをする OsRac1 との相互作用解析を行った。これまでに OsRac1 は OsRbohB と相互作用することが報告されている(Wong et al., Plant Cell, 2007)。OsRbohH、及び系統関係の近い OsRbohI が OsRac1 と相互作用するか酵母ツーハイブリッド解析を行った結果、OsRbohB と同様に OsRbohH と OsRbohI も GTP 結合型 OsRac1 と相互作用することが明らかになった。さらに OsRboh と OsRac1 との細胞膜上での詳細な共局在性を証明するために、全反射照明蛍光顕微鏡(TIRFM)を用いた観察を試みた。一過の発現系では GFP-OsRbohB の発現が弱く観察が困難であったため、恒常的に GFP-OsRbohB と mCherry-OsRac1 を同時に発現するイネ、及びシロイヌナズナ形質転換系統を作出したが、過剰な ROS を産生するためか植物体が非常に矮小となり観察が困難であった。一方、OsRbohB と OsRbohH のマイクロドメイン局在を明らかにするために、OsRbohB/H-KD カルスから膜ラフトを含む画分である

detergent-resistant membrane (DRM) を抽出し、特異抗体を用いたイムノプロット解析を行った結果、OsRbohB/H-KD では OsRboh が全く検出されなかった。従って、OsRbohB と OsRbohH がイネカルスにおける膜ラフト局在 NADPH オキシダーゼであることが明らかになった。

(2) 新規の病害応答性膜ラフトタンパク質の同定と機能解析

新規の病害応答性膜ラフトタンパク質を同定するために、キチンを 0 分、10 分、30 分処理したイネカルスからそれぞれ DRM を抽出し、LC-Orbitrap を用いたプロテオーム解析を行った。この際、DRM に存在する膜ラフトタンパク質以外のアーティファクトを除外するため、膜ラフト減少イネ (OsFAH1/2-KD; Nagano et al., Plant Cell, 2016) に対しても同様の実験を行い、比較対象とした。その結果、キチン処理 0 分では 274 タンパク質、10 分では 342 タンパク質、30 分では 298 タンパク質を膜ラフトタンパク質として同定し、その中でキチン処理 10 分もしくは 30 分で増加するタンパク質を 125 タンパク質同定した。それらは、キチン処理前から 10 分・30 分後と増加し続けるタンパク質は 1 個、10 分後に増加した後その量が 30 分後に変わらないタンパク質は 15 個、10 分後に一時的に増加し 30 分後には元の量に戻るタンパク質は 63 個、10 分後には変化がないが 30 分後に増加するタンパク質は 45 個、10 分後には一時的に減少するが 30 分後には処理前より増加するタンパク質は 1 個であった。OsRboh や OsRac1 と同様に病害にตอบสนองして一過的に膜ラフトに局在する 63 タンパク質のうち、耐病性に関連が示唆される 4 タンパク質に対して蛍光タンパク質融合タンパク質を作製しその局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、細胞膜局在であることが確認できた。

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)

Ishikawa Y., Miyagi A., Haishima Y., Ishikawa T., Nagano M., Yamaguchi M., Hihara Y. and Kawai-Yamada M. Metabolic analysis of NAD kinase-deficient mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. J. Plant Physiol., 査読有, vol. 205, 105-112, 2016, doi: 10.1016/j.jplph.2016.09.002.

Nagano M., Ishikawa T., Fujiwara M., Fukao Y., Kawano Y., Kawai-Yamada M. and Shimamoto K. Plasma

membrane microdomains are essential for Rac1-RbohB/H-mediated immunity in Rice. Plant Cell, 査読有, vol. 28(8), 1966-83, 2016, doi: 10.1105/tpc.16.00201.

Yamauchi T., Shiono K., Nagano M., Fukazawa A., Ando M., Takamura I., Mori H., Nishizawa NK., Kawai-Yamada M., Tsutsumi N., Kato K. and Nakazono M. Ethylene biosynthesis is promoted by very-long-chain fatty acids during lysigenous aerenchyma formation in rice roots. Plant Physiol., 査読有, vol. 169(1), 180-193, 2015, doi: 10.1104/pp.15.00106.

Liu J., Park CH., He F., Nagano M., Wang M., Bellizzi M., Zhang K., Zeng X., Liu W., Ning Y., Kawano Y. and Wang GL. The PhoGAP SPIN6 associates with SPL11 and OsRac1 and negatively regulates programmed cell death and innate immunity in rice. PLoS Pathog., 査読有, vol. 11(2), e1004629, 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004629.

Kosami K., Ohki I., Nagano M., Furuita K., Sugiki T., Kawano Y., Kawasaki T., 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 to NADPH oxidase. J. Biol. Chem., 査読有, 289(41), 28569-28578, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.603282.

Nagano M., Ishikawa T., Ogawa Y., Iwabuchi M., Nakasone A., Shimamoto K., Uchimiya H. and Kawai-Yamada M. Arabidopsis Bax inhibitor-1 promotes sphingolipid synthesis during cold stress by interacting with ceramide-modifying enzymes. Planta, 査読有, vol. 240(1), 77-89, 2014, doi: 10.1007/s00425-014-2065-7.

Kawai-Yamada M., Nagano M., Kakimoto M. and Uchimiya H. Plastidic protein Cdf1 is essential in Arabidopsis embryogenesis. Planta, 査読有, vol. 239(1), 39-46, 2014, doi: 10.1007/s00425-013-1966-1.

[学会発表](計 10 件)

長野稔、石川寿樹、島本功、川合真紀、細胞膜マイクロドメインはイネ免疫を制御する。第 29 回植物脂質シンポジウム、大阪大学豊中キャンパス(大阪府豊中市)、2016 年 11 月 25-26 日

長野稔、島本功、川合真紀、細胞膜マイクロドメイン局在型 NADPH オキシダー

ぜはイネ免疫に關与する。第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）2016 年 9 月 25-27 日

Nagano M., Ishikawa T., Shimamoto K. and Kawai-Yamada M. 2-hydroxy sphingolipids are essential for the formation of plasma membrane microdomains and innate immunity in plants. 22nd International Symposium on Plant Lipids, Goettingen (Germany), July 3-8, 2016

長野稔、島本功、川合真紀、イネの細胞膜マイクロドメインに局在する NADPH オキシダーゼは自然免疫に關与する。第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学（岩手県盛岡市）2016 年 3 月 18-20 日

長野稔、石川寿樹、藤原正幸、島本功、川合真紀、細胞膜マイクロドメインは NADPH オキシダーゼを解して植物免疫を制御する。BMB2015、神戸ポートランド（兵庫県神戸市）2015 年 12 月 1-4 日
Nagano M., Ishikawa T., Ukawa T., Fujiwara M., Shimamoto K. and Kawai-Yamada M. 2-hydroxylation of sphingolipid fatty acids is essential for the formation of plasma membrane microdomains and innate immunity in plants. 26th International Conference on Arabidopsis Research, Paris (France), July 5-9, 2015

Nagano M., Fujiwara M., Fukao, Y., Shimamoto K. and Kawai-Yamada M. Analysis of transitional proteins to plasma membrane microdomains under rice immune response. 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（東京都世田谷区）2015 年 3 月 16-18 年

Nagano M., Ishikawa T., Fujiwara M., Fukao Y., Kawano M., Kawai-Yamada M. and Shimamoto K. Sphingolipids are essential for rice innate immunity through the formation of plasma membrane microdomains. Gordon Research Conferences – Plant Lipids: Structure, Metabolism & Function, Galveston (USA), February 1-6, 2015

長野稔、石川寿樹、藤原正幸、深尾陽一朗、河野洋治、川合真紀、島本功、スフィンゴ脂質が形成する細胞膜マイクロドメインはイネ免疫機構を制御する。日本植物学会第 78 回大会、明治大学生田キャンパス（神奈川県川崎市）2014 年 9 月 12-14 年

Nagano M., Ishikawa T., Fujiwara M., Fukao Y., Kawano Y., Kawai-Yamada M. and Shimamoto K. Sphingolipid-derived plasma membrane microdomains regulate

innate immunity in rice. Plant Biology 2014, Portland (USA), July 12-16, 2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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
埼玉大学理工学研究科環境制御システムコース遺伝子環境工学研究室
<http://park.saitama-u.ac.jp/~geneenvtech/index.html>
埼玉大学戦略的研究部門グリーン・環境領域
<http://gr-en.saitama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 稔 (NAGANO, Minoru)
埼玉大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：80598251

(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

()