

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580060

研究課題名(和文) 植物の病害抵抗性を制御する新規MAPKカスケードの確立と防除技術への応用

研究課題名(英文) MKD1, a novel MAPKKK, is required for disease resistance against Fusarium Species.

研究代表者

西内 巧(Nishiuchi, Takumi)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号：20334790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：植物の環境ストレス応答には、タンパク質のリン酸化リレーでシグナルを伝達するMAPK(mitogen-activated protein kinase)カスケードが中心的な役割を担っている。MAPKカスケードでは、MAPKKK、MAPKK、MAPKと順次リン酸化され、シロイヌナズナのMAPKK及びMAPKについては機能解明が進んでいるが、MAPKKKのほとんどは機能未知である。本研究では、シロイヌナズナのMAPKKKの1つであるMKD1により制御されるMAPKカスケードを明らかにし、赤かび病菌等の植物病原菌に対する抵抗性に重要な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：MAPKKK delat-1 (MKD1), a novel Raf-like MAPKKK, was isolated as a subunit of a complex including the Arabidopsis transcription factor AtNFXL1. An MKD1-dependent cascade positively regulates disease resistance against PstDC3000 and the trichothecene mycotoxin-producing fungal pathogen *Fusarium sporotrichioides*. MKD1 directly interacted with MKK1 and MKK5 in vivo, and phosphorylated MKK1 and MKK5 in vitro. Correspondingly, *mkk1* mutant and MKK5RNAi transgenic plants showed enhanced susceptibility to *F. sporotrichioides*. MKD1 was required for full activation of two MAPKs (MPK3 and MPK6) by the T-2 toxin. Finally, quantitative phosphoproteomics revealed that an MKD1-dependent cascade controlled phosphorylation of a disease resistance protein, SUMOs, and a mycotoxin-detoxifying enzyme. Our findings reveal that the MKD1-MKK1/MKK5-MPK3/MPK6-dependent signalling cascade plays an important role in plant immune responses against both bacterial and fungal phytopathogens.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：MAPK Rafキナーゼ 植物病原菌 赤かび病菌 トリコテセン系かび毒 植物の病害抵抗性

1. 研究開始当初の背景

(1)赤かび病菌(*Fusarium graminearum* etc.)は、ムギ類等を宿主とする病原糸状菌であり、減収だけでなく、作物へのトリコテセン系カビ毒の汚染により、人畜に下痢や嘔吐などの重篤な健康被害を引き起こし、世界的に非常に大きな問題となっている。

(2)代表者らは、植物の赤かび病抵抗性における分子機構を明らかにするため、本菌に羅病性であるシロイヌナズナを用いて、トリコテセンが植物への感染過程で病原性因子として作用することに着目し、研究を進めていた。

(3)その課程で、赤かび病菌に対する植物の抵抗性に関わる新規のシグナル伝達因子として、MAPK カスケードの最上流に位置するMAPKKKであるシロイヌナズナのMKD1を見出した。生化学的な解析から、MKD1の下流に位置するMPAKKやMAPKが示唆されていた。*ストレス等をMAPKKK MAPKK MAPKとリン酸化反応で伝えるシグナル伝達経路

2. 研究の目的

本研究で計画した具体的な研究項目は、以下の3つである。

MKD1の下流のMAPKKやMAPKにおける赤かび病抵抗性への関与についての解析

MKD1カスケードを構成するタンパク質間の細胞内相互作用の解析

MKD1カスケードによってリン酸化される標的タンパク質の同定

(1)生化学的な解析から、MKD1の下流のMAPKK及びMPAKの候補を得られていた。酵母Two Hybrid法を用いて、MKD1と全MAPKKとの相互作用について解析し、MKD1がMKK1/2/5と相互作用し、キナーゼアッセイにより、MKD1によるMKK1/5のリン酸化を明らかにした。*mkd1*変異体を用いて、病害抵抗性に関わるMPK3/4/6のそれぞれに特異的な抗体で免疫沈降した後に、ゲル内リン酸化法を行い、MKD1がMPK3/6のリン酸化に関わることを明らかにしている。以上の生化学的な解析結果から、MKD1(MAPKKK) MKK1/5(MAPKK) MPK3/6というMKD1カスケードが推定された。

(2)本研究の第1の目的は、この推定されたMKD1カスケードが、*in vivo*において実際に機能しているかどうかを明らかにすることである。具体的には、計画により、MKK1/5及びMPK3/6の各変異体における赤かび病抵抗性について解析し、MKD1カスケードにおける各キナーゼの機能を明らかにする。また、計画により、MKD1とMKK1/5、並びにMKK1/5とMPK3/6が、細胞内で相互作用するかどうかを明らかにする。これらの解析から、MKD1カス

ケードを構成するMAPKK及びMAPKを確定し、植物の病害抵抗性に関わる新規のMAPKカスケードを確立させる。

(3)本研究の第2の目的は、MKD1カスケードの標的タンパク質からの赤かび病に対する抵抗性に関わる新規因子の同定することである。具体的には、計画により、MKD1カスケードによるリン酸化タンパク質を包括的に同定し、これらの遺伝子について逆遺伝学的な解析を試みる。

一連の解析により、MKD1カスケードにおけるMAPKKやMAPK、標的リン酸化タンパク質の機能を明らかにし、病原糸状菌の抵抗性に関わる植物の新たなシグナル伝達経路を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) <遺伝学によるMKD1カスケードのMAPKK及びMAPKの機能解析>

MKD1の下流のMAPKKやMAPKの赤かび病抵抗性における機能を解明するため、各変異体等の花を用いて、赤かび病菌の接種試験を行う。MKD1カスケードのMAPKKであるMKK1とMAPKであるMPK3,6については、リソースセンターからT-DNA挿入変異体の分譲を受け、T-DNA挿入のホモ個体を取得する。一方、MKK5は入手可能なT-DNA挿入変異体がないため、RNAiによる発現抑制株を作出する。各変異体と野生型の花に赤かび病菌(*F. graminearum*)を接種し、接種花における病徴観察、トリパンブルー染色による菌糸進展の観察、質量分析計によるトリコテセン系カビ毒(デオキシニパレノール)の定量分析により、各変異体における赤かび病抵抗性を評価することで、各キナーゼの機能を明らかにする。

(2) <蛍光タンパク質再構築(BiFC)法によるMKD1カスケードのキナーゼ間の細胞内相互作用解析>

MKD1カスケードを構成するタンパク質間の細胞内相互作用について解析するために、2つに分断したYFPタンパク質について、YFPのN末側とMKD1タンパク質を融合させたタンパク質を発現する植物と、YFPのC末側とMKK1/5の各タンパク質を融合させたタンパク質を発現する植物を作製しそれらを交配し、分断されたYFP融合タンパク質を共に発現する形質転換植物を作製する。MKD1とMAPKKの融合タンパク質同士が細胞内で相互作用すれば、YFPが再構成されることで、蛍光が検出される。

前年度の結果を受けて、MAPKKの二重変異体等の必要な多重変異体を作製し、MKDカスケードの構成因子間の機能重複について解析を行う。

(3) <リン酸化プロテオーム解析によるMKD1

カスケードの標的タンパク質の同定>

野生型、各変異体の花に赤かび病菌接種及び疑似処理を行う。

抽出した全タンパク質あるいは核タンパク質から、カラムを用いてリン酸化タンパク質を精製

精製タンパク質を蛍光ラベルし、2次元電気泳動によりディファレンシャル解析

菌接種により、野生型と各変異体でリン酸化状態の異なるタンパク質を質量分析計により同定

以上より、各変異体によって、リン酸化されるタンパク質の共通性と特異性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) < 遺伝学による MKD1 カスケードの MAPKK 及び MAPK の機能解析 >

MKD1 の下流に位置すると推定される MAPKK である MKK1 及び MKK5, また MAPK である MPK3 と MPK6 について、T-DNA 挿入ホモ変異体を作製した。また、MAPKK である MKK5 については、RNAi による発現抑制株を作製した。これらについて、赤かび病菌を孢子を接種し、野生株との比較解析を行ったところ、mkk1 変異体と RNAi :MKK5 形質転換体では、mkd1 変異体と同様に野生株に比べて赤かび病に対する抵抗性が低下しており、MKD1 の下流に MKK1/MKK5 が位置することが強く示唆された。一方、mpk3 と mpk6 変異体については、野生株と比べて顕著な差異は見られなかったことから、MPK3 と MPK6 の機能重複、あるいは他の MAPK の関与が示唆された。

(2) < MKD1 カスケードのキナーゼ間の相互作用解析 >

BiFC を用いて、各キナーゼ間の細胞内相互作用について調べたところ、MKD1 と MKK1 及び MKK5 がシロイヌナズナの細胞質や核において相互作用することが明らかとなった。これらの結果から、MKD1(MAPKKK) MKK1/5(MAPKK) は、*in vivo* においても機能していることが示唆された。

また、MKD1 が *in vitro* において MKK1/5 をリン酸化し、さらに MKD1 による MKK1/5 のリン酸化部位と MKK1/5 自身の自己リン酸化部位が異なることから、MKD1 が MKK1/5 を基質とするリン酸化酵素であることを明らかにした。

(3) < リン酸化プロテオーム解析による MKD1 カスケードの標的タンパク質の同定 >

mkd1 変異体と野生型のそれぞれに、赤かび病菌が産生するトリコテセンを処理して抽出したタンパク質から、リン酸化タンパク質を精製し、iTRAQ を用いてリン酸化タンパク質

発現定量解析を行った。その結果、mkd1 変異体では、野生株と比べて、病害抵抗性に関わると思われる R タンパク質や SUMO タンパク質などの発現が顕著に減少していた。一方で、HSP90 等のタンパク質の安定性に関わるシャペロンが発現量が増加しており、MKD1 が、タンパク質の品質保持にも関与していることが示唆された。

(4) 他の MAPKKK とのクロストークについての解析

MKD1 と同様に Raf キナーゼファミリーに属する幾つかの MAPKKK との多重変異体を作製し、表現型を解析したところ、MKD1 と EDR1 の二重変異体は、気孔周辺の細胞に細胞死が見られ、加齢とともに拡大していくという表現型を示すことが明らかとなった。この結果から、MKD1 と他の Raf キナーゼが、病害抵抗性だけでなく、非生物的ストレス応答や細胞死にも関与していることが明らかとなった。

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 2 件)

Asano, T., Miwa, A. and Nishiuchi, T. The Secreted Antifungal Protein Thionin 2.4 in *Arabidopsis thaliana* Suppresses the Toxicity of a Fungal Fruit Body Lectin from *Fusarium graminearum*. PLoS Pathogens. 2013;9(8):e1003581. doi:10.1371/journal.ppat.1003581.

(査読有)

Asano, T., Kimura, M., and Nishiuchi, T. The defense response in *Arabidopsis thaliana* against *Fusarium sporotrichioides* Proteome Science, 2012;10:61. doi: 10.1186/1477-5956-10-61. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

Tomoya Asano, Takumi Nishiuchi, Two Raf-like MAPKKKs (MKD1 and EDR1) regulate cell death in *Arabidopsis thaliana*. 日本分子生物学会第 36 回年会, 2013 年 12 月 3~6 日, 神戸ポートアイランド、神戸

西内 巧, 赤かび病抵抗性に関わる植物の新規制御因子の機能解析、日本植物病理学会植物感染生理談話会、2013 年 8 月 21 日、粟津温泉法師、石川

西内 巧, 赤かび病抵抗性植物の作出によるカビ毒低減化の試み、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学、京都

三輪晃敬、浅野智哉、西内巧、ムギ類赤かび病抵抗性に関わるシロイヌナズナの

MAPKKK の機能解析、平成 24 年度日本植物病理学会大会、2012 年 3 月 28 日、福岡国際会議場、福岡

Tomoya Asano, Takumi Nishiuchi, A novel MAP kinase cascade in Arabidopsis plays a crucial role in disease resistance to *Fusarium sporotrichioides*. 12th International Symposium on Plant Protein Phosphorylation. September 15, 2011, University of Tübingen, Germany

〔図書〕(計 2 件)

Nishiuchi, T. Plant responses to *Fusarium* metabolite. In Brown, DW and Proctor, RH (eds) *Fusarium: genomics, molecular and cellular biology*. Horizon Scientific Press, UK, p.165-178 (14 pages), (2013)

西内巧、モデル植物を活用した赤かび病抵抗性植物の作出と防除技術への応用、月刊化学工業 <特集> 次世代ライフサイエンスの最前線, 63: 12-17 (6ページ), (2012)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: カビ毒低減機能を有する植物の作成方法およびその利用

発明者: 西内巧、浅野智哉、高原浩之

権利者: 金沢大学、石川県立大学

種類: 特許 特願番号 2014-012581

出願年月日: 2014/01/27

国内外の別: 国内

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

西内 巧 (NISHIUCHI, Takumi)

研究者番号: 20334790

金沢大学学際科学実験センター
准教授

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

古賀博則 (KOGA, Hironori)

研究者番号: 60290079

石川県立大学生物資源環境学部

教授