

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770038

研究課題名（和文） タンパク質の切断をうけて機能する AtNFXL1 による植物の新規防御応答機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of novel defense response system in plant by AtNFXL1 through digestion of protein

研究代表者

浅野 智哉 (ASANO TOMOYA)

金沢大学・学際科学実験センター・博士研究員

研究者番号：00377409

研究成果の概要（和文）：AtNFXL1 タンパク質は Zn finger ドメイン上で切断され、N80 と C62 のタンパク質としてそれぞれ核と細胞質で機能することを明らかにした。さらに、AtNFXL1 タンパク質はムギ類赤かび病菌に対して負の制御因子として機能し、その抵抗性には AtNFXL1 の全てのドメインが重要な役割を果たす事を明らかにした。そして、AtNFXL1 タンパク質の N80 は転写因子として、C62 は MAKKK と直接相互作用し、MAP キナーゼシグナル伝達経路を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：AtNFXL1 protein is digested on Zn finger domain, and acts as two proteins of N80 and C62 in nuclear and cytosol, respectively. Furthermore, AtNFXL1 proteins acts as negative regulator, all of domains on AtNFXL1 protein plays important role to resistance of Fusarium species. N80 of AtNFXL1 protein acts as transcription factor. On the other hand, C62 is interact with MAPKKK, and regulate novel MAP kinase cascade.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ, AtNFXL1, MKD1 トリコテセン, 病害抵抗性, ムギ類赤かび病菌

## 1. 研究開始当初の背景

ムギ類赤かび病菌は、宿主である植物に感染する際にトリコテセンと呼ばれる毒素を産生する。トリコテセンは植物病原性因子とし

て作用するだけでなく、マイコトキシンとして動物にも作用することから、トリコテセンによって汚染されている作物を食べると人間や家畜は中毒症状を引き起こす。このため

にトリコテセンによる作物の汚染は世界中で問題となっている。これまでに当研究室では、トリコテセンがシロイヌナズナにおいて、植物病原性因子として作用するだけでなく、防御応答を誘導するエリシター活性があることを明らかにしている。さらに申請者は、シロイヌナズナをトリコテセンで処理すると、ヒトの免疫応答に関与する転写因子 NF-X1 に似た *AtNFXL1* の発現量が顕著に上昇することを明らかにしている。

*AtNFXL1* は、核移行シグナル、RING finger、9つの NF-X1 type Zn finger だけでなく、イネの生育阻害を引き起こすウイルスのカプシドタンパク質に類似している配列が5回繰り返された Rice Yellow Stunt Virus Similarity Sequence in *AtNFXL1* (RYVS) リピートや核外移行シグナル、プロリンに富む領域が存在する。これまでに申請者は、植物ホルモンの1種であるサリチル酸シグナル経路を介して、*AtNFXL1* が植物病原菌に対する防御応答を制御することを明らかにしているが、*AtNFXL1* の詳細な分子メカニズムはよくわかっていない。ヒトの *NF-X1* は、2種類の転写産物が存在し、完全長のタンパク質は転写活性化因子として、C末端側が欠損したタンパク質は転写抑制因子として機能することが知られている。ところが *AtNFXL1* は、*NF-X1* とは異なり翻訳領域にはイントロンが存在しない上に、ノザン解析でもシングルバンドで検出されることから、スプライシングバリエーションは存在しないと考えられる。そこで申請者は、*AtNFXL1* は、*NF-X1* とは異なる植物特有の分子機構でトリコテセンに対する応答を制御していると予想し、RYVS リピートあるいは、核外移行シグナル周辺の領域を認識する抗体を作製しウエスタンブロット解析を行った。その結果、*AtNFXL1* は、それぞれ 80 kD(N80)と

62 kD(C62)の2つの異なるタンパク質として検出された。また、それぞれの抗体を使用した間接蛍光抗体法の実験から、N80 は核に、C62 は細胞質に局在した。さらに、C62 タンパク質複合体を精製し、構成因子を同定したところ、新規 MAPKKK(MKD1)と結合していることが明らかとなった。これらの結果から *AtNFXL1* は、切断され2つのタンパク質となり、N80 は転写因子として、C62 はシグナル伝達を制御する因子として機能すると予想した。

## 2. 研究の目的

*AtNFXL1* の N80 が転写因子として、C62 が MAP キナーゼカスケードの制御因子として機能することを明らかにすることを目的とした。*AtNFXL1* には多くのドメインが存在するが、トリコテセンによって誘導される防御応答において、それぞれのドメインがどのように関与しているかはよくわかっていない。そこで、各ドメインを欠損させた *AtNFXL1* を作製し、*atnfxl1* 変異体に導入し相補性検定を行った。*AtNFXL1* のホモログが転写因子として報告されていること、さらに N80 が核に局在したことから、N80 は転写因子として機能すると推測している。そこで、酵母を用いた転写活性化能の実験を行い、N80 が転写因子として機能するかを調べる。MKD1 は防御応答の負の制御因子である EDR1 に類似していることから、MKD1 もトリコテセンに対する負の制御因子である可能性が考えられた。そこで、*mkd1* 変異体を用いてトリコテセンに対する感受性を調べ、その機能を明らかにするとともに、*atnfxl1* 変異体との二重突然変異体を作製し、*AtNFXL1* と MKD1 の機能の関係を明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

AtNFXL1は、約80 kDと約62 kDの2つのタンパク質に切断されることが明らかとなっていることから、Zn finger ドメインの内部で切断されると予想できるが、どのアミノ酸で切断されるかを同定することは困難と予想される。そこで、切断部位を同定するために、AtNFXL1の各ドメインを欠損させたAtNFXL1を *atnfxl1* 変異体で発現させ、ウェスタンブロット解析を行うことでAtNFXL1の切断箇所を限定した。また同時に、それらの形質転換体におけるトリコテセンに対する感受性を調べる事により、AtNFXL1のどのドメインがトリコテセンによって誘導される防御応答において機能しているかを明らかにした。

N80は転写因子として機能すると予想している。そこで酵母のGAL4の実験系を使用し、転写活性化能を調べ、AtNFXL1のどの領域が転写制御に重要であるかを同定した。

C62の機能を明らかにする為に *mkd1* 変異体のトリコテセンに対する感受性を調べた。また、*atnfxl1 mkd1* 二重突然変異体を作製し、それらについてもトリコテセンに対する感受性を調べる事で、両遺伝子の遺伝学的関係についても明らかにした。

C62が制御するMAPキナーゼカスケードを同定するために、トリコテセン処理した野生型と *mkd1* 変異体からリン酸化タンパク質を精製し、二次元電気泳動を行い差のあるタンパク質を同定した。この実験はリン酸化タンパク質を精製し解析を行うことから、二次元電気泳動に利用できるタンパク質の量が非常に少ないと予想され、従来の染色法では差をみることができない可能性が高い。そこで、少量のタンパク質で、さらに同じゲル上で差を比較することができる Ettan DIGE 法により差のあるタンパク質を同定し、質量分

析計においてそれら差のあるタンパク質を同定することにより、MKD1がどのようなタンパク質をリン酸化しているかを調べた。これらの解析により、C62がどのような既知の防御応答に関与するMAPキナーゼカスケードを制御しているかを明らかにした。これまでにAtNFXL1が、植物病原菌である *Pseudomonas syringae* (バクテリア) に対して負の制御因子として機能することが明らかとなっているが、ムギ類赤かび病菌に対してAtNFXL1がどのように機能するかはよくわかっていない。そこで、ムギ類赤かび病菌に対する *atnfxl1* 変異体の病害抵抗性を調べた。さらに、AtNFXL1の各ドメインを欠損させた形質転換体を使用し、ムギ類赤かび病菌に対する病害抵抗性を調べることによって、N80とC62がそれぞれムギ類赤かび病菌に対してどのような機能をもっているかを調べた。

### 4. 研究成果

AtNFXL1のN80とC62の切断部位の同定を行うために、各ドメインを欠損させたAtNFXL1を *atnfxl1* 変異体で発現させ、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、Zn finger ドメインを含まない領域ではタンパク質の切断が認められなかった。このことからAtNFXL1タンパク質は、Zn finger ドメインの領域で切断されていることが明らかとなった。次に、それらの形質転換体を利用し、トリコテセンによる防御応答を調べた。どの領域を欠失させた形質転換体においてもトリコテセンの応答は相補できなかったことから、トリコテセンによって誘導されるAtNFXL1の防御応答はAtNFXL1の全てのドメインが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

次に、*atnfxl1* 変異体におけるムギ類赤か

び病菌に対する病害抵抗性について調べたところ、*atnfxl1* 変異体は野生型に比べてムギ類赤かび病菌に対して病害抵抗性が強くなった。そして、各ドメインを欠失させた形質転換体ではその表現型を相補出来なかった。これらの結果は、AtNFXL1 は、ムギ類赤かび病菌に対する病害抵抗性に対して重要な役割を果たしており、全てのドメインが重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

AtNFXL1 の N80 の転写活性化能を調べるために、酵母の GAL4 の実験系を使用し転写活性化能を調べた。その結果、AtNFXL1 の Zn finger ドメインが転写活性可能をもつことが明らかとなった。またこれまでに、N80 は核に局在することを明らかにしている。これらの結果から、N80 は転写因子として機能することが示唆された。

トリコテセンによって誘導される防御応答において、C62 も重要な役割を果たしている予想されるが、機能を推測できるようなドメインは存在しないことから、AtNFXL1 タンパク質複合体を精製し、新規 MAPKK である MKD1 を同定した。次に、AtNFXL1 と MKD1 が直接相互作用するかを調べた。酵母 two-hybrid 解析や免疫沈降の解析から、C62 と MKD1 は直接相互作用することを明らかにした。さらに、Bimolecular fluorescence complementation の解析により、AtNFXL1 と MKD1 は、根端部分では細胞質と核で、それ以外の器官では細胞質のみの領域で相互作用することを明らかにした。

次に MKD1 の機能を調べるために、*mkd1* 変異体のトリコテセンに対する感受性を調べた。その結果、*mkd1* 変異体はトリコテセンに対して感受性が低下することが明らかとなった。さらに、*mkd1* 変異体においてムギ類赤かび病菌に対する病害抵抗性につい

て調べたところ、病害抵抗性は減少した。これらの結果は、AtNFXL1 と MKD1 が相対する結果であることを示している。そこで、*atnfxl1 mkd1* 二重突然変異体を作製しトリコテセンに対する感受性を調べたところ、*atnfxl1 mkd1* 二重突然変異体の表現型は、*atnfxl1* の表現型を示し、*mkd1* の表現型は観察されなくなった。この結果は、AtNFXL1 と MKD1 が遺伝学的に相互作用している事を示している。

これは、AtNFXL1 と MKD1 が遺伝学的に相互作用しており、両者は協調して新規の病害抵抗性に関与すると考えられる。

## 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 3 件)

- ① Sogabe, Y., Nakamura, H., Nakagawa, T., Hasegawa, S., Asano, T., Ohta, H., Yamaguchi, K., Mueller, M., J., Kodama H., and Nishiuchi, T., Visualization of Wound-induced Root-to-Shoot Communication in *Arabidopsis*, Plant Signaling Behavior, in press, 査読有
- ② Hasegawa, S., Sogabe, Y., Asano, T., Nakagawa, T., Nakamura, H., Kodama, H., Ohta, H., Yamaguchi, K., Mueller, M., J., and Nishiuchi, T., Gene Expression Analysis of Wounding-Induced Root-to-Shoot Communication in *Arabidopsis thaliana*, Plant Cell and Environmental, 34(2011), 705-716, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Asano, T., Mizuno, H., Yamaguchi, K. and Nishiuchi, T., A novel MAP kinase cascade in *Arabidopsis* plays a crucial role in disease resistance to *Fusarium sporotrichioides*, Plant Biology 2010, 2010. 8. 3, Palais des

Congress de Montreal (Canada)

- ② Asano, T., Mizuno, H., Yamaguchi, K. and Nishiuchi, T., *Arabidopsis* plants are susceptible to *Fusarium sporotrichioides* producing type A trichothecene phytotoxins, The 20<sup>th</sup> International Conference on Plant Growth Substances, 2010 7. 30, Palau de Congressos de Tarragona (Spain)
- ③ Asano, T., Sasaki, R., Kato, T., Kimura, M., Koga H., and Nishiuchi, T., *Arabidopsis* plants are susceptible to *Fusarium sporotrichioides* producing type A trichothecene phytotoxins, 21<sup>st</sup> International Conference on Arabidopsis Research, 2010. 6. 7, Pacifico Yokohama (Kanagawa Prefecture)
- ④ 浅野智哉, 水野宏美, 幸節健, 町田泰則, 山口和男, 西内巧, トリコテセン産生菌 *Fusarium sporotrichioides* に対して病害抵抗性因子として機能する *Arabidopsis thaliana* の新規MAPKKKの機能解析, 第51回日本植物生理学会, 2010年3月18日, 熊本大学 (熊本県)
- ⑤ Asano, T., Mizuno, H., Kosetsu, K., Machida, Y., Yamaguchi, K. and Nishiuchi, T., Functional analysis of a novel MAPKKK induced by *Fusarium* phytotoxin trichothecenes, 第32回日本分子生物学会, 2009年12月10日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑥ Asano, T., Mizuno, H., Yamaguchi, K. and Nishiuchi, T., Functional analysis of a novel MAPKKK induced by *Fusarium* phytotoxin trichothecenes, Plant biology 2009, 7. 19, Hawaii Convention Center (USA)

[図書] (計 1 件)

- ① Asano, T., and Nishiuchi, T., Humana press, Methods in Molecular Biology, 2011, p225-233

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 赤かび病抵抗性植物の作製方法およびその利用

発明者: 西内 巧、浅野 智哉、加藤 智朗

権利者: 国立大学法人 金沢大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-15302

出願年月日: 2011 年 1 月 27 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~gene/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅野 智哉 (ASANO TOMOYA)

金沢大学・学際科学実験センター・博士研究員

研究者番号: 00377409

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし