

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18649

研究課題名(和文)病原菌エフェクターによるイネの免疫抑制機構の解明

研究課題名(英文) OsRLCK185 targeted by Xanthomonas effector directly regulates MAPK cascade activated by OsCERK1-mediated recognition of chitin in rice

研究代表者

山口 公志 (YAMAGUCHI, Koji)

近畿大学・農学部・助教

研究者番号：20722721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物は病原菌の侵入を細胞膜上の受容体で検知し、MAPKカスケードの活性化を誘導し、様々な防御応答を発動する。一方で、病原菌はエフェクターを細胞内に注入し、宿主の免疫応答を阻害する。本研究では、イネ白葉枯病菌のエフェクターXopYのイネの標的因子OsRLCK185の機能解析を通じ、イネにおける病原菌認識受容体からMAPKカスケードへと情報が伝達される仕組みを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Perception of microbe-associated molecular patterns by host cell-surface pattern recognition receptors triggers the intracellular activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades. Plant bacterial pathogens generally deliver different effector proteins into plant cells. These effector proteins modulate the function of crucial host regulatory molecules and allow bacteria to invade plant cells. So far, we identified OsRLCK185 as interacting proteins of Xanthomonas effector, XopY.

To understand the molecular mechanism of chitin-induced MAPK activation by OsRLCK185, we searched OsRLCK185 interactor and found MAPK kinase kinase OsMAPKKK18. Chitin-induced MAPK activation in the OsMAPKKK11/18 RNAi cells was clearly reduced compared with WT. Thus, it is likely that OsRLCK185 is the component that directly activates OsMAPKKK18 which triggers the activation of MAPK cascade after chitin perception.

研究分野：植物免疫学

キーワード：イネ白葉枯病菌 エフェクター MAPKカスケード イネ

### 1. 研究開始当初の背景

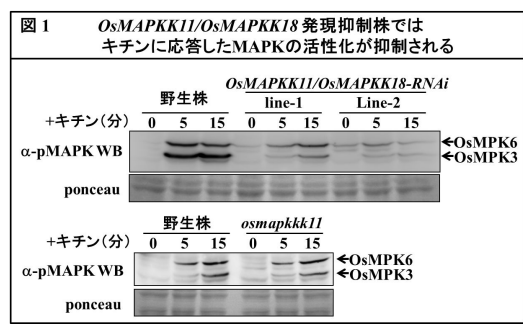
自然界では植物は病原菌と共存しており、そのインターフェイスでは植物と病原菌の攻防が常に繰り返されている。植物は、自身の細胞膜上の病原菌認識受容体を介して、体内に侵入した病原菌の構成成分をリガンドとして認識する。この病原菌の認識に伴い、様々なシグナル伝達経路が迅速に活性化され、多様な免疫応答が誘導される。一方で病原菌は植物の防御反応を抑制するため、進化させた多様なエフェクタータンパク質を宿主細胞内へと送りこみ、エフェクターが宿主の免疫因子の機能を阻害することにより、感染を拡大する。これまで代表者はイネ白葉枯病を引き起こす *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* のエフェクター XopY がイネの免疫を阻害すること、その標的として大きなファミリーを形成する植物特有の受容体型細胞質キナーゼ (Receptor-like cytoplasmic kinase; RLCK) ファミリーに属する OsRLCK185 を同定した。OsRLCK185 はキチンやペプチドグルカンの認識に關与する受容体 OsCERK1 と相互作用し、リガンド依存的に OsCERK1 によってリン酸化され、活性化する。活性化した OsRLCK185 は細胞内の3つのリン酸化転移酵素からなる MAP キナーゼ (MAPK) カスケードの活性化を制御する。しかし、植物では病原菌認識受容体から MAPK カスケードへと情報が伝達される仕組みは全く分かっておらず、植物科学におけるブラックボックスになっていた。

### 2. 研究の目的

(1) 代表者は、OsCERK1 による OsRLCK185 へのリン酸化を XopY が阻害することで、OsCERK1 に依存的な防御応答が抑制されること、一方で XopY が OsRLCK185 によってリン酸化されることを明らかにしている。XopY は既知のタンパク質との相同性が低く、タンパク質の機能予測が難しいため、本研究では XopY と OsRLCK185 との相互作用を詳細に解析し、XopY による OsRLCK185 の活性化の阻害メカニズムを明らかにする。

(2) 代表者は、OsRLCK185 がイネに 75 種類ある MAPKKK の内、OsMAPKKK11 と OsMAPKKK18 に相互作用することを明らかにしていた。OsMAPKKK11 機能欠損株 (*osmapkkk11*) ではキチンに応答した MAPK の活性化は野生株と同様であったが、*OsMAPKKK11/OsMAPKKK18* 発現抑制株 (*OsMAPKKK11/OsMAPKKK18-RNAi*) において、キチンに応答した MAPK の活性化は顕著に減少していた (図1)。この結果から、OsMAPKKK18 がキチンに応答した MAPK の活性の制御において主要な働きをしていることが示唆された。本研究課題では、OsCERK1-OsRLCK185-OsMAPKKK18-OsMCK4-OsMPK3/OsMPK6 のリン酸化転移による活性化調節機構を明らかにすることで、受容体から MAPK カスケードの活性化を繋ぐシグナル伝達機構を世界で初めて明らかにすることを目的

とする。



### 3. 研究の方法

(1) XopY の OsRLCK185 に対する認識機構の解析: OsCERK1 は、キナーゼの活性制御に重要な OsRLCK185 の活性化ループ領域をリン酸化する。一方、XopY はそのリン酸化を阻害することから、XopY が OsRLCK185 の活性化ループ領域に相互作用していることが示唆される。そこで、イネの RLCKVII ファミリーに属する複数の RLCKs と XopY の相互作用解析を通じて、XopY による RLCK の特異的な認識機構を解析する。さらに、相互作用する RLCKs の活性化部位に保存されたアミノ酸部位を同定し、それらのアミノ酸残基を置換し、XopY との相互作用を酵母ツーハイブリッド法により解析することで、XopY による宿主 RLCK の阻害機構を解明する。

(2) OsMAPKKK18 による耐病性誘導機構の解析: 先行研究により、キチンに応答した OsMPK3/OsMPK6 の活性化において、OsMAPKKK18 が主要な働きをしていることが示唆された。そのため、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により OsMAPKKK18 機能欠損変異体を作製する。この機能欠損変異体を用いて、キチンに応答した OsMPK3/OsMPK6 の活性化を解析し、OsMAPKKK18 が OsMPK3/OsMPK6 の MAPKKK として機能していることを明らかにする。さらに、OsMAPKKK18 機能欠損変異体を用いて、キチン認識時に転写が誘導されるマーカー遺伝子の発現を、リアルタイム PCR により解析する。

(3) OsRLCK185 による OsMAPKKK18 へのリン酸化転移活性とそのリン酸化修飾による活性制御機構の解析: これまでの解析から、OsRLCK185 は、OsMAPKKK18 と相互作用することから、OsMAPKKK18 は OsRLCK185 によってリン酸化修飾されることが考えられる。そこで *in vitro* リン酸化アッセイ法を用いて、OsRLCK185 による OsMAPKKK18 へのリン酸化を解析する。

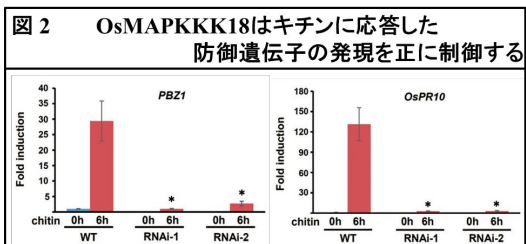
(4) OsMAPKKK18 による OsMCK4 へのリン酸化転移活性の解析: OsMAPKKK18 のキナーゼドメインは MAPKK である OsMCK4 と相互作用する。そこで、OsMAPKKK18 による OsMCK4 へのリン酸化を *in vitro* リン酸化アッセイ法を用いて解析する。これまでの知見から OsMCK4 は活性化ループ領域にあるモチーフ (S/T-X3-5-S/T) のリン酸化により活性化することが明らかになっている。そこで、この

アミノ酸をアラニンに置換した不活性化型 OsMCK4 変異体を OsMAPKKK18 がリン酸化するかを検討する。

#### 4. 研究成果

(1) XopY のイネの宿主ターゲットである OsRLCK185 に対する認識機構の解明を目指し、解析を行った。系統樹解析によると、OsRLCK185 は RLCKVII ファミリーのサブグループ c に属している。酵母ツーハイブリッド法によりイネの RLCKVII ファミリーに属している複数の RLCKs と XopY との相互作用解析をおこなった。その結果、XopY はサブグループ c に属している RLCK と相互作用する一方で、他のサブグループの RLCK とは相互作用を示さなかった。本解析に用いた RLCKs の OsCERK1 によってリン酸化される活性化ループ領域のアミノ酸残基を詳細に比較した結果、相互作用するサブグループ c の RLCK には 5 つのアミノ酸残基が共通して保存されていることが明らかとなった。

(2) OsMAPKKK18 の機能解析を行うために、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により OsMAPKKK18 機能欠損変異体の作製を試みた。イネのカルスを誘導し、複数回の感染を試みたものの、機能欠損株を作出することはできなかった。そこで、OsMAPKKK11/OsMAPKKK18-RNAi 培養細胞を利用して、キチンの応答した免疫反応を解析した。その結果、OsMAPKKK11/OsMAPKKK18-RNAi 培養細胞では、キチンに応答した活性酸素種の産生は野生株と同等であった。一方で、キチン処理時に発現が誘導される防御応答遺伝子である PBZ1 や OsPR10 の発現が顕著に減少していた(図2)。また、キチンに応答した防御応答遺伝子の発現抑制は OsRLCK185 発現抑制培養細胞でも観察されることから、OsMAPKKK18 が OsRLCK185 の下流で働いていることが示唆された。

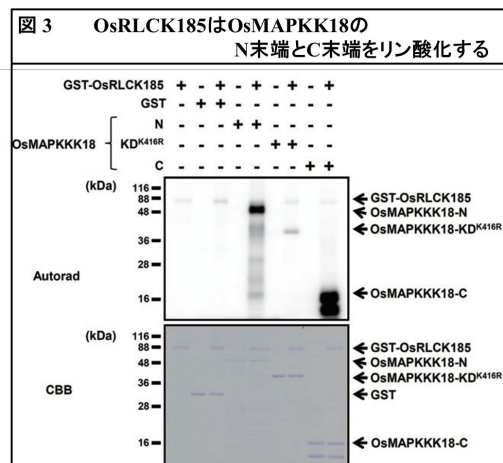


OsMAPKKK11 と OsMAPKKK18 の機能を検討するために、OsMAPKKK11 と OsMAPKKK18 のタンパク質をイネプロトプラストにて発現させた。しかし、OsMAPKKK11 と OsMAPKKK18 のタンパク質を検出することはできなかった。そこで、ニコチアナベンサミアナ葉における一過的なタンパク質の発現系を利用して、OsMAPKKK11 と OsMAPKKK18 を過剰発現させた。その結果、OsMAPKKK18 の過剰発現によって、ニコチアナベンサミアナ葉では細胞死が観察された。このような表現型は、OsMAPKKK11 の過剰発現でも観察され、その程度も

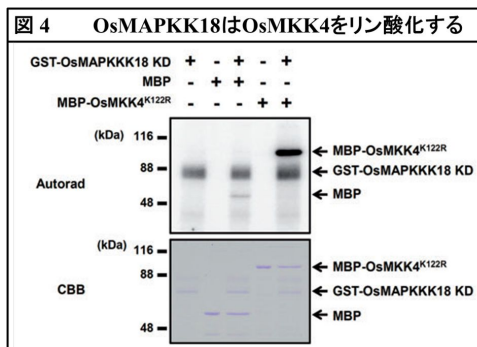
OsMAPKKK18 の過剰発現のものと同様であった。そこで、イネ細胞内での OsMAPKKK11 と OsMAPKKK18 の機能性の違いは内在の遺伝子発現量に起因しているのではないかと考え、イネ培養細胞における OsMAPKKK11 と OsMAPKKK18 の遺伝子発現量を比較した。その結果、OsMAPKKK18 の遺伝子発現は OsMAPKKK11 の遺伝子発現量と比較して約 25 倍高かった。さらに、遺伝子発現データベースの解析からイネの植物体においても OsMAPKKK18 の遺伝子発現量は OsMAPKKK11 の遺伝子発現よりも高いことが明らかとなった。以上の解析により、OsMAPKKK18 がキチンに応答した MAPK の活性制御において主要な働きをしていることが想定された。

(3) これまで酵母ツーハイブリッド法により OsMAPKKK18 が OsRLCK185 と相互作用することを明らかにした。そこで、ニコチアナベンサミアナ葉における一過的なタンパク質の発現系を利用し、OsMAPKKK18 が OsRLCK185 と相互作用するかを BiFC 法により解析した。OsMAPKKK18 の過剰発現は細胞死を誘導するため自己リン酸化活性を無くした不活性化型 OsMAPKKK18K416R を本実験に利用した。その結果、OsMAPKKK18 は OsRLCK185 と細胞膜上で相互作用していた。一方で、RLCKVII ファミリーのサブファミリー a に属する OsRLCK176 と OsMAPKKK18 は相互作用しないことから、OsMAPKKK18 は OsRLCK185 と特異的に相互作用していると示唆された。

次に、*in vitro* リン酸化アッセイ法を用いて、OsRLCK185 による OsMAPKKK18 へのリン酸化を解析した。大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の発現系を利用し、OsMAPKKK18 の全長、N 末端、キナーゼドメイン、C 末端並びに OsRLCK185 のリコンビナントタンパク質を発現、精製した。本実験では OsMAPKKK18 の全長をコードするリコンビナントタンパク質を得ることができなかった。そのため、OsRLCK185 による OsMAPKKK18 の N 末端、キナーゼドメイン、C 末端へのリン酸化の有無を解析した。その結果、OsRLCK185 は OsMAPKKK18 の N 末端と C 末端を強くリン酸化することが明らかとなった(図3)。



(4) *in vitro*リン酸化アッセイ法を用いて、OsMAPKKK18によるOsMCK4へのリン酸化を解析した。大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の発現系を利用し、OsMAPKKK18のキナーゼドメインとOsMCK4のリコンビナントタンパク質を発現、精製した。32P-ATPを利用し、OsMAPKKK18によるOsMCK4へのリン酸化を確認した。その結果、OsMAPKKK18によるOsMCK4へのリン酸化が確認された(図4)。現在、リン酸化部位の解析を進めている。



## 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)

\*Yamada, K., \*Yamaguchi, K., Yoshimura, S., Terauchi A., and Kawasaki T. Conservation of chitin-induced MAPK signaling pathways in rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, in press (2017).

\*Co-first authors. 査読有

\*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., and Kawasaki, T. The Arabidopsis CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation. *EMBO J.*, 35: 2468-2483 (2016).

\*Co-first authors. 査読有

山口公志、川崎努: 耐病性を向上させた次世代イネの作出に向けて、バイオサイエンスとインダストリー、2015, 73(3):206-209.

[学会発表](計 8 件)

Yamaguchi, K and Kawasaki, T. Battle between rice immune system and *Xanthomonas oryzae* effectors. 第58回日本植物生理学会年会、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市) 2017.3.16-18

Yamada, K., Yamaguchi, K., Terauchi, A., Yoshimura, S., Kawasaki, K. Conservation of chitin-induced MAPK activation mechanisms between rice and Arabidopsis. 第58回日本植物生理学会年会・鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市) 2017.3.16-18

Kobayashi, Y., Shirakawa, T., Yamada, K.,

Suizu, S., Tagawa, H., Yamaguchi, K., Kawasaki, T. Antagonistic regulation of pattern-recognition receptor-mediated signaling in plant immunity. 第58回日本植物生理学会年会・鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市) 2017.3.16-18

Yamaguchi, K., Yamada, K., Shirakawa, T., Mine, A., Kobayashi, Y., Fujiwara, M., Ichimura, K., Narusaka, M., Narusaka, Y., Tsuda, K., Kawasaki, T. The CERK1-associated kinase PBL27 regulates chitin-triggered MAPK activation through phosphorylation of MAPKKK5 in Arabidopsis. Cold Spring Harbor Asia Conference, Latest advances in plant development & environmental response, 淡路島(日本) 2016.11.29-12.02

Yamaguchi, Y., Yamada, K., Shirakawa, T., Mine, A., Narusaka, M., Narusaka, Y., Ichimura, K., Tsuda, K., Fukamizo, T., Shibuya, N., Kawasaki, T. PBL27 directly connects between the chitin receptor, CERK1 and MAPK cascade in chitin-triggered immunity. IS-MPMI XVII Congress, ポートランド(アメリカ) 2016. 07.16-07.23

Yamada, K., Yamaguchi, K., Terauchi, A., Ishikawa, K., Kawasaki, T. Conservation of chitin-induced MAPK activation mechanisms between rice and Arabidopsis. IS-MPMI XVII Congress, ポートランド(アメリカ) 2016. 07.16-07.23

山口公志、山田健太、白川友美、川崎努、エフェクターの宿主標的因子を利用した植物免疫シグナル伝達経路の解析、植物感染生理談話会、メルパルク松山(愛媛県・松山市) 2015.8.24-26

Yamaguchi, K., Yamada, K., Shirakawa, T., Kobayashi, Y., Kamei, M., Kawasaki, K. PBL27 directly phosphorylates MAPKKK to activate chitin-induced MAPK cascade in Arabidopsis. The 4th International Conference on Biotic Plant Interactions (ICBPI), 南京(中国) 2015.8.1-3

[図書](計 1 件)

Yamaguchi, K and Kawasaki, T. Chitin-triggered MAPK activation and ROS generation in rice suspension-cultured cells. Springer, *Method Mol Biol.* 1578: 309-316 (2016).

[その他]

雑誌論文 の報道(読売新聞、産経新聞、朝日デジタル、毎日新聞(Web))

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 公志(YAMAGUCHI, Koji)

近畿大学・農学部・助教

研究者番号: 20722721