

平成18年度 学術創成研究費 研究終了報告書（事後評価用）

平成18年3月31日

ふりがな	しまもと こう		所属研究機関・ 部局・職	奈良先端科学技術大学院大学・ バイオサイエンス研究科・教授				
研究代表者 氏名	島本 功							
研究課題名 (英訳名)	プロテオミクスを基盤とした植物分子育種 Proteomics-based molecular plant breeding							
研究経費 (千円未満切捨)	年度	研究経費(千円)		使用内訳(千円)				
		交付額	支出額	設備備品費	消耗品費	旅費	謝金等	その他
	平成13年度	80,000	80,000	50,520	13,880	3,600	5,000	7,000
	平成14年度	80,000	80,000	41,500	28,100	2,700	750	6,950
	平成15年度	80,000	80,000	4,300	47,200	3,600	700	24,200
	平成16年度	70,000	70,000	44,750		2,850	17,800	4,600
	平成17年度	70,000	70,000	37,495		3,300	28,000	1,205
総計	380,000	380,000						
研究組織(研究代表者及び研究分担者)								
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担(研究実施計画に対する分担事項)					
島本 功	奈良先端科学技術大学院大学・ バイオサイエンス研究科・教授	植物分子 遺伝学	耐病性における G タンパク質シグナリングの機能的プロテオミクスと研究統括					
高山 誠司	奈良先端科学技術大学院大学・ バイオサイエンス研究科・教授	植物間 情報学	受容体型キナーゼを介した植物細胞情報伝達系のプロテオミクス					
小泉 望	奈良先端科学技術大学院大学・ バイオサイエンス研究科・助教授	植物分子 生物学	シロイヌナズナにおける糖応答のプロテオミクス					
田坂 昌生	奈良先端科学技術大学院大学・ バイオサイエンス研究科・教授	分子 植物学	重力屈性の初期過程のプロテオーム解析					
中島 敬二	奈良先端科学技術大学院大学・ バイオサイエンス研究科・助教授	植物分子 生物学	微少管細胞骨格と耐塩性のプロテオミクス					
明石 欣也	奈良先端科学技術大学院大学・ バイオサイエンス研究科・助手	植物分子 生理学	プロテオミクスによる乾燥耐性植物の分子機構の解明					
関根 政実	石川県立大学・ 生物資源環境学部・助教授	植物分子 生物学	植物の細胞周期制御における環境ストレス応答					
森川 弘道	広島大学大学院・ 理学研究科・教授	植物分子 生理学	植物の二酸化窒素同化機構のプロテオミクス					
平野 久	横浜市立大学木原生物学 研究所・ 大学院総合理学研究科・教授	植物工学 ・蛋白質 化学	コムギタンパク質機能ネットワークのプロテオーム解析					

当初の研究目的

これまで個々の遺伝子レベルで研究されてきた植物のストレス応答を、タンパク質レベルで総合的に解析し、植物の環境応答ネットワークの全体像を明らかにすることを目的とする。本研究の第一の目標は、高等植物のプロテオミクス解析法を確立することにある。具体的には、プロテオミクス解析に適したタンパク質資料の調整法の確立、高解像度の二次元電気泳動法の確立、最新の質量分析装置を用いた高速タンパク質同定法の確立、リン酸化などのタンパク質修飾の解析、タンパク質同士の相互作用の解析、が挙げられる。第二の目標は、こうしたプロテオミクス解析法を確立した後、その成果として得られる多数の有用遺伝子を利用して、これまで進展の遅かった悪環境耐性植物の分子育種を促進することにある。

研究成果の概要

研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。

1. 植物の免疫機構を制御するタンパク質複合体の同定

植物は病原性微生物から身を守るために高度に制御された免疫システムを持っている。過去10年ほどの間分子遺伝学的な研究が活発に行われてきた結果、植物の免疫反応に関わる多数の遺伝子が主にシロイヌナズナにおいて同定されて来た。しかし、それら遺伝子産物の分子レベルの相互作用や生化学的な機能についてはまだあまり理解されていない。本プロジェクトにおいてプロテオミクスの方法を用い、初めて植物免疫の制御に関わるタンパク質複合体の存在を明らかにすることができた。

低分子量 G タンパク質 Rac は植物免疫の分子スイッチである。

これまで一連の研究からイネの低分子量 G タンパク質 (Rac GTPase、Rop と呼ぶ) が植物免疫の主要なスイッチであることをさまざまな実験によって示してきた。活性酸素生成、ファイトアレキシン合成、防御遺伝子の発現、リグニン合成、MAPK の活性化など植物の免疫応答でみられる重要な反応は Rac によって引き起こされることを明らかにした。

OsRac1 を含むタンパク質複合体の同定

イネの Rac GTPase のひとつ OsRac1 を用い、これに結合するタンパク質の同定を以下の方法を用いて行った。

アフィニティークロマトグラフィー： GTP あるいは GDP を結合した OsRac1 を吸着させたビーズを持ったカラムにイネ培養細胞の抽出液を流し、その後カラムに吸着したタンパク質を電気泳動によって分離した後、質量計による解析によってタンパク質を同定した。この方法で新規な植物免疫に関わる因子を多数発見することができた。

共免疫沈降法： イネの培養細胞を用い、抗体によって OsRac1 を含むタンパク質複合体を沈降させその中に含まれているタンパク質を解析した。抗体が得られている RAR1, SGT1, HSP90, HSP70 が OsRac1 タンパク質複合体に含まれるか検討した。その結果これらのタンパク質は OsRac1 タンパク質複合体に含まれることが分かった。さらに、OsRac1 タンパク質複合体に含まれるタンパク質を網羅的に解析するために、抗体によって沈降させたタンパク質をすべて質量計により解析した。この実験においても興味深いタンパク質を多数同定した。

酵母 two hybrid および in vitro 結合実験： 上記の実験で得られた新規なタンパク質について

研究成果の概要 つづき

酵母 two hybrid および in vitro 結合実験を行い、OsRac1 や他のタンパク質との相互作用を解析した。こうしたプロテオーム解析によって得られたタンパク質の機能については主に RNAi や過剰発現などの方法を用い解析を行った。

タンパク質複合体「Defensome」はふたつの植物免疫経路を制御する。

OsRac1 複合体の解析から現在我々は植物免疫を制御するタンパク質複合体に関するひとつのモデルを得ている。そのモデルのポイントは、PAMP を介した免疫応答も R タンパク質を介した応答もいずれも Rac GTPase を含む複合体によって制御されているということである。この根拠はまず、R タンパク質がこの複合体に含まれていること。次に、RAR1, SGT1, HSP90 など R タンパク質の下で働くとしてきたタンパク質がこの複合体にすべて含まれること。我々は、この OsRac1 複合体が植物の免疫を制御するタンパク質複合体であると考えており、“Defensome”(ディフェンゾーム)と呼ぶことを提唱している。予備実験から Defensome は 700 kD 以上の大きな複合体であることが示唆されている。

2. イネ培養細胞における防御反応の二次元電気泳動法によるプロテオーム解析

耐病性誘導の分子スイッチである低分子量 G タンパク質 Rac1 の信号伝達系を解析するために、2次元電気泳動・質量分析計を用いたプロテオーム解析を行なった。活性型 Rac やスフィンゴ脂質エリシターによってタンパク量が変化する 271 個のタンパク質を同定した。それらの中には、耐病性に関わる多くの因子が含まれていた。興味深いことに、エリシターで誘導されるタンパク質のうち、87%のタンパク質は活性型 Rac により誘導されることがわかった。このことから、Rac の耐病性信号伝達における重要な役割が確認された。

3. イネ細胞死変異体のプロテオーム解析

イネ細胞死変異体のひとつである *cdr2* に関して、プロテオーム解析を行い、変異体において特異的に発現するタンパク質を多数同定した。その中には、耐病性関連タンパク質、シャペロン、代謝酵素などが含まれていた。

4. 乾燥強光ストレス耐性のプロテオーム解析

乾燥強光耐性能の高い C_3 植物である野生種スイカを用いて、葉および根における乾燥強光ストレス応答性タンパク質をプロテオーム手法により網羅的に解析した。LC-MS/MS 解析の結果、葉においては、葉緑体 ATP 合成酵素 サブユニットやシトクロム *b₆f* 複合体 Rieske サブユニットなど、光合成反応を担う基本因子が乾燥強光ストレス条件下でダイナミックにその動態を変化させ、チラコイド膜の電子伝達を制御し光傷害を回避していることが示された。また根では、乾燥ストレス初期の根成長促進段階と、ストレス後期の根組織小型化/木質化段階において、それぞれ異なるタンパク質群が誘導されていた。これらのことから、乾燥ストレスの程度に依存して、ストレス回避または防御機構を機能させる根の分子応答の全体像が植物で初めて示された。

5. 二酸化窒素暴露に反応して発現するタンパク質のプロテオーム解析

タバコを NO₂ 暴露すると PR (pathogenesis-related) タンパク質が特異的にニトロ化されることが、二次元電気泳動法、ウェスタンブロット法および MS/MS 解析により明らかとなった。NO₂ 暴露したシロイヌナズナでは、抗ニトロチロシン抗体と反応するスポットは 7 個存在し、これらはいずれも光合成酸素発生錯体を構成するタンパク質であった。

特記事項

この研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。

植物の代表的なストレスである、病原微生物に対する応答(植物免疫)の分子機構に関して大きなブレイクスルーとなる成果を得ることができた。これまでの植物免疫の研究が遺伝学的方法に偏っていたため、多数単離されている耐病性関連遺伝子の遺伝学的な上下関係は明らかになっていたがその生化学的な分子機構についてはほとんど知られていなかった。さらに、植物免疫のキー因子である NBS-LRR 型の耐病性遺伝子(R 遺伝子)の機能については長い間謎のままである。こうした状況の中で、我々は最初に RacGTPase が植物免疫の分子スイッチであることを多くの実験から明らかにした。その後、アフィニティークロマトグラフィー、酵母 two hybrid 法、共免疫沈降法を用い RacGTPase と相互作用するタンパク質をプロテオミクスの方法を用いて多数同定することができた。さらに in vitro 結合実験を用いてタンパク質相互作用を確認した。さらに新たに同定した新規なタンパク質の植物免疫における機能は RNAi によりトランスジェニック植物を作成し解析した。一連の研究から、植物免疫を制御するタンパク質複合体 defensome は Rac GTPase を分子スイッチとして含み、RAR1-SGT1-HSP90 や Sti1/HOP などのシャペロンからなる。さらに scaffold タンパクである RACK1 を Rac のエフェクターとして持ち、MAPK6 を含んでいる。さらに重要なことは Rac GTPase は NBS-LRR 型の耐病性タンパク質の NBS モチーフと直接結合することで R タンパク質に入った病原菌からのシグナルを Rac に伝えることができる。病原体に由来する Avr 因子はおそらく耐病性タンパク質の LRR モチーフと結合し defensome を活性化する。また PAMPs は他のレセプターを介して Rac を活性化すると考えられる。活性化

した defensome は細胞膜中の NADPH oxidase と結合し活性酸素を生成し、また CCR 酵素を活性化しリグニン生成する。その他にも MAPK カスケード、ファイトアレキシン合成経路、防御遺伝子の発現を活性化する。今後は defensome に含まれる新規な因子をさらに探索するだけでなく、defensome の構成タンパク質の動態を FRET などのイメージング技術を用いて明らかにしてゆく予定である。

植物免疫を制御するタンパク質複合体”Defensome”

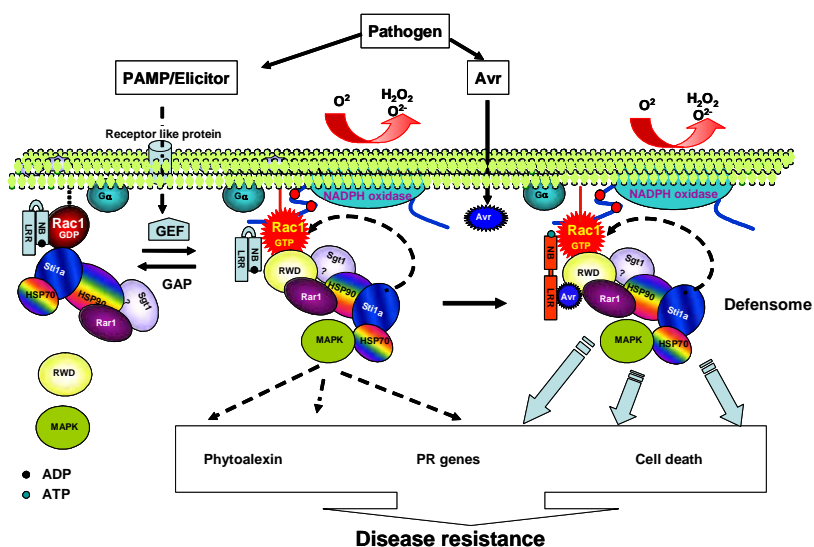


図1. 病原体に由来する2種類の因子によってDefensomeは活性化される。PAMPsによってRac1が活性化され、さらにAvrによってNBS-LRR タンパク質が活性化され、さらに強い活性化が引き起こされる。活性化されたDefensomeはPR遺伝子、細胞死、ファイトアレキシン合成などを活性化し耐病性を獲得する。

研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）及び国際会議、学会等における発表状況について、3頁以内に収めて記入してください。

Fujiwara M, Umemura K, Kawasaki T, Shimamoto K. Proteomics of Rac GTPase signaling reveals its predominant role in elicitor-induced defense response of cultured rice cells. **Plant Physiol.** 140: 734-745, 2006.

Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, Hasegawa K, Wakabayashi K, Takahashi H, Umemura K, Umezawa T, Shimamoto K. Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 103: 230-235, 2006.

Lieberherr D, Thao NP, Nakashima A, Umemura K, Kawasaki T, Shimamoto K. A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice 1[w]. **Plant Physiol.** 138: 1644-1652, 2005.

Tsunezuka H, Fujiwara M, Kawasaki T, Shimamoto K. Proteome analysis of programmed cell death and defense signaling using the rice lesion mimic mutant cdr2. **Mol Plant Microbe Interact.** 18: 52-59, 2005.

Wong HL, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K, Shimamoto K. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. **Plant Physiol.** 135:1447-1456, 2004.

Takahashi A, Kawasaki T, Wong HL, Suharsono U, Hirano H, Shimamoto K. Hyperphosphorylation of a mitochondrial protein, prohibitin, is induced by calyculin A in a rice lesion-mimic mutant cdr1. **Plant Physiol.** 132: 1861-1869, 2003.

Suharsono U, Fujisawa Y, Kawasaki T, Iwasaki Y, Satoh H, Shimamoto K. The heterotrimeric G protein alpha subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 99: 13307-13312, 2002.

Shimamoto K, Kyozuka J. Rice as a model for comparative genomics of plants. **Annu Rev Plant Biol.** 53: 399-419, 2002.

Ono E, Wong HL, Kawasaki T, Hasegawa M, Kodama O, Shimamoto K. Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 98: 759-764, 2001.

Iwakawa H, Shinmyo A, and Sekine M. *Arabidopsis* CDKA;1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. **Plant J.** 45: 819-831, 2006.

Nakai T, Kato K, Shinmyo A and Sekine M. *Arabidopsis* KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. **FEBS Lett.** 580: 336-340, 2006.

研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）及び国際会議、学会等における発表状況について、3頁以内に収めて記入してください。

Takahara K, Akashi K and Yokota A. Purification and characterization of glutamate N-acetyltransferase involved in citrulline accumulation in wild watermelon. **FEBS J.** 272: 5353-5364, 2005.

Nanasato Y, Akashi K, Yokota A. Co-expression of cytochrome b561 and ascorbate oxidase in leaves of wild watermelon under drought and high light conditions. **Plant Cell Physiol.**, 46: 1515-1524, 2005.

Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, Yokota A. Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 323: 72-78, 2004.

Yokota A, Kawasaki S, Iwano M, Nakamura C, Miyake C, Akashi K. Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon. **Anal. Bot.** 89: 1-8, 2002.

Shang C, Sassa H and Hirano H. The role of glycosylation in the function of a 48-kDa glycoprotein from carrot. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 328: 144-149, 2005.

Hanada K and Hirano H. Interaction of a 43-kDa receptor-like protein with a 4-kDa hormone-like peptide in soybean. **Biochemistry** 43: 12105-12112, 2004.

Islam N, Lonsdale M, Upadhyaya N. M, Higgins T. J, Hirano H and Akhurst R. Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis. **Proteomics** 4: 1903-1908, 2004.

Shang C, Shibahara T, Hanada K, Iwafune Y and Hirano H. Mass spectrometric analysis of posttranslational modifications of a carrot extracellular glycoprotein. **Biochemistry** 43: 6281-6292, 2004.

Shibahara T, Kawasaki H and Hirano H. Mass spectrometric analysis of expression of ATPase subunits encoded by duplicated genes in the 19S regulatory particle of rice 26S proteasome. **Arch. Biochem. Biophys.** 421: 34-41, 2004.

Fukuda M, Islam N, Woo S.-H., Yamagishi A, Takaoka M and Hirano H. Assessing matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a means of rapid embryo protein identification in rice. **Electrophoresis** 24: 1319-1329, 2003.

Hanada K, Nishiuchi Y and Hirano H. Amino acid residues on the surface of soybean 4-kDa peptide involved in the interaction with its binding protein. **Eur. J. Biochem.** 270: 2583-2592, 2003.

研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について、3頁以内に収めて記入してください。

Islam N, Takaoka M, Sassa H, Kawasaki H and Hirano H. Characterization of low molecular weight starch granule associated protein in common wheat by proteomic approaches. **J. Electrophoresis** 47: 43-49, 2003.

Islam N, Tsujimoto H and Hirano H. Wheat proteomics: Relationship between fine chromosome deletion and protein expression. **Proteomics** 3: 307-316, 2003.

Islam N, Tujimoto H and Hirano H. Proteome analysis of diploid, tetraploid and hexaploid wheat: towards understanding genome interactions in protein expression. **Proteomics** 3: 549-557, 2003.

Yamazaki T, Takaoka M, Katoh E, Hanada K, Sakita M, Sakata K, Nishiuchi Y and Hirano H. A possible physiological function and the tertiary structure of a 4-kDa peptide in legumes. **Eur. J. Biochem.** 270: 1269-1276, 2003.

Islam N, Woo, S. -H., Tsujimoto H, Kawasaki H and Hirano H. Proteome approach as an efficient means to identify seed proteins and their fine gene location in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Proteomics** 2: 1146-1155, 2002.

Shibahara T, Kawasaki H and Hirano H. Identification of the 19S regulatory particle subunits from the rice 26S proteasome. **Eur. J. Biochem.** 269: 1474-1483, 2002.

Woo, S.-H., Fukuda M, Islam N, Takaoka M, Kawasaki H and Hirano H. Efficient peptide mapping and its application to identify embryo proteins in the rice proteome analysis. **Electrophoresis** 23: 647-654, 2002.

Shoji T, Narita N.N, Hayashi K, Asada J, Hamada T, Sonobe S, Nakajima K and Hashimoto T. Plant-specific microtubule-associated protein SPIRAL2 is required for anisotropic growth in Arabidopsis. **Plant Physiol.** 136: 3933-3944, 2004.

Prieto R and Hashimoto T. Interaction of Arabidopsis membrane proteins with SPIRAL1. **Plant Biotechnol.** 21: 261-267, 2004