

図2

翻訳開始コドンATG (+1)の変異により、本来の転写開始点 (-36)からのmRNAからはHis3が翻訳されないが、HMO1欠失により転写開始点が-215にシフトするとATG (-156)が利用可能となり、N末に余分な配列が付加されたHis3が作られる。

ク質の翻訳が起こり、同培地での生育が可能となった。

スクリーニングでは、酵母野生株に対し変異源 EMS (2%) 処理を行った後に、このレポータープラスミドを形質転換し、ヒスチジン欠損培地に塗布し、生育してきたコロニーを選択した。His3 タンパク質阻害剤である 3-AT (0.2 mM) を含む同培地にて擬陽性のコロニーを除いた後、残りの変異株を野生株と掛け合わせて四分子解析を行い、His⁺ の形質が 2:2 で分離したものを候補として、酵母ゲノムライブラリーを用いて原因遺伝子の同定を行った。その結果、いくつかの変異株については HMO1 遺伝子に変異が入っていることが確認された。他には、転写関連因子ではなく、翻訳関連因子の変異が複数同定されたが、これらの株ではおそらく開始コドンの認識に異常が起こり、欠失させた本来の開始コドン付近の ATG 類似配列から機能を持った His3 タンパク質が作られてしまったと推測される。これらの変異は生育の高温感受性を伴っているため、以後はこれを指標に判別・除去することが可能である。現在、残りの株についてライブラリースクリーニングや、全ゲノムシーケンズ解析などの手法により、原因となる変異の同定を継続して行っている。

一方、同様の改変型 RPS5 プロモーターを酵母の URA3 遺伝子につないだレポータープラスミドを別途作成した。URA3 遺伝子産物は、ウラシルの生合成に必須であると同時に、5-FOA という薬剤を細胞内で毒に変換するため、このレポータープラスミドを持つ HMO1 欠損株は、Ura3 を発現し、5-FOA を含む培地で生育不能となる。この株に対して、HMO1 遺伝子破壊株から作成したマルチコピーライブラリーや、ヒト培養細胞 (HeLa 細胞) の

cDNA を酵母で発現誘導可能なライブラリー (構築済) を形質転換し、5-FOA 含有培地にて生育可能なコロニーを選択することにより、Hmo1 と同様の、あるいは重複した機能を持つ因子の探索が可能であり、現在これらのスクリーニングを実施している最中である。

【今後の予定】

上記のスクリーニングで取得された因子、及びその変異株については今後、ノーザン法やプライマー伸長法、ChIP 法など多角的な手法を駆使することにより、RPS5 やその他の RPG プロモーターへの結合や、遺伝子破壊による RPG の転写量、及び転写開始点の変化、Hmo1 や PIC、ヌクレオソームの結合量や位置の変化を調べ、それらが目的とする因子であるかを検討していく予定である。これらの解析によって、申請者の見出した新しい転写開始点決定機構の分子基盤の解明が進むと期待できる。

謝 辞

最後に、本研究を行うにあたり、ご援助を頂きました農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Warner, J. R. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 437-440 (1999)
- 2) Kasahara, K., Ohtsuki, K., Ki, S.W., Aoyama, K., Takahashi, H., Kobayashi, T., Shirahige, K., & Kokubo, T. *Mol Cell Biol.* **27**, 6686-6705 (2007)
- 3) Kasahara, K., Ki, S.W., Aoyama, K., Takahashi, H., & Kokubo, T. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1343-1357 (2008)
- 4) Kasahara, K., Ohya, Y., & Kokubo, T. *Nucleic Acids Res.* **39**, 4136-4150 (2011)

病原体レセプター抵抗性タンパク質による耐病性の制御機構の解明

奈良先端科学技術大学院大学 河野洋治

抵抗性タンパク質は、病原体の侵入を感知する細胞内レセプターとして働き、過敏細胞死や酸化的バーストを伴う植物の中で最も強い免疫応答を誘導する。抵抗性タンパ

ク質は農業上重要であり、新潟県のほぼ全域では抵抗性遺伝子を導入したコシヒカリが食用として栽培され、耐病性が増したことにより、コメ収量の増加に貢献している。現在までに、主に遺伝学的手法を用いて、抵抗性タンパク質による免疫に関与する分子の同定が試みられ、シャペロンタンパク質 Hsp90、コシャペロンタンパク質 RAR1, SGT1 などが報告されている。これらの分子は、抵抗性タンパク質の安定性の制御が主な機能であり、シグナル伝達機構や

活性化機構は説明できない。したがって、抵抗性タンパク質は、重要な細胞内レセプターであるにも関わらず、その活性化機構は不明であった。申請者の所属する研究室では、これまでに、低分子量 G タンパク質イネ *OsRac1* が活性酸素の産生、過敏細胞死を誘導し、耐病性に関与することを明らかにしている (Kawano *et al.*, Rice, 2010)。また、*OsRac1* が抵抗性タンパク質の安定性に関わる Hsp90, RAR1, SGT1 等と複合体を形成することを明らかにしている。我々は、本研究で以下の知見を得た。

1) 抵抗性タンパク質のシグナル伝達に関する新たな知見

植物は、病原菌の感染をレセプターを介して認識し、様々な抵抗性反応を誘導する。この反応は動物における自然免疫応答と似ていることから「植物自然免疫反応」と呼ばれる。植物自然免疫反応を引き起こすための病原菌の認識は2種類のレセプターによって行われており、そのひとつは膜貫通型レセプターであり、病原菌の持つさまざまな細胞成分を認識する。このタイプのレセプターは動物の自然免疫に関与する TLR (Toll-like receptor) と構造が似ている。もう一つは、抵抗性遺伝子産物 (以下、抵抗性タンパク質) が病原体を認識する細胞内型レセプターとして働くことが知られている。現在、抵抗性タンパク質がどのような複合体を形成し、下流のシグナル伝達系を制御しているかはほとんど明らかになっていない。我々はこれまでに植物免疫の分子スイッチである低分子量 GTP 結合タンパク質 *OsRac1* がイネの抵抗性タンパク質を介した抵抗性反応において重要な役割を果たしていることを明らかにしている。最近、*OsRac1* の相互作用分子の探索を行ったところ、いもち病菌の抵抗性タンパク質である Pit を同定した (図1: Kawano *et al.*, Cell Host Microbe, 2010)。Pit による抵抗性に *OsRac1* が関与するか否か、*OsRac1* の発現抑制イネを用いて検討したところ、*OsRac1* 発現抑制イネでは Pit を介した抵抗性が抑制され、顕著にいもち病の病斑が大き

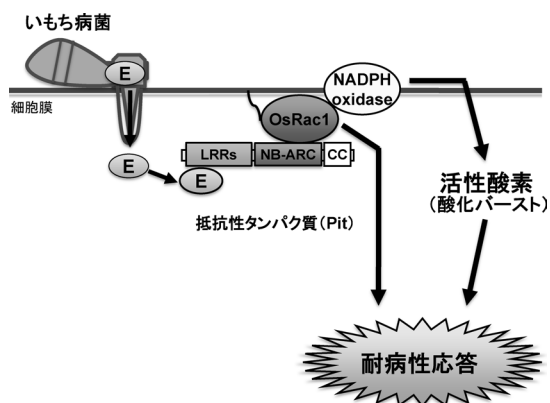


図1 抵抗性タンパク質 (Pit) による *OsRac1* の活性化

くなっていることが確認された。活性型の Pit や *OsRac1* をタバコで過剰発現すると、過敏反応や活性酸素産生などの耐病性特有の反応が観察された。この活性型 Pit による過敏反応や活性酸素産生は、ドミナントネガティブ型 *OsRac1* によって抑制された。*OsRac1* の活性化をモニタリングした結果、Pit 活性化型変異体は、*OsRac1* を活性化することが明らかになった。以上の結果から、*OsRac1* は Pit の下流で過敏反応死や活性酸素の産生を制御することにより、耐病性を制御することが示唆された。本研究成果は、世界に先駆けて抵抗性タンパク質による耐病性誘導の分子メカニズムを明らかにしたものである。

2) *OsRac1* による防御関連遺伝子の制御機構の解明

OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構を明らかにする目的で、恒常的活性型 *OsRac1* により発現誘導がされる転写因子を検索したところ、basic helix-loop-helix 型転写因子である Rac Immunity 1 (RAI1) を得た。RAI1 が耐病性に関与するか否かを感染実験により検討した。RAI1 のアクティベーションタグラインは、顕著に耐病性が向上しており、RAI1 が耐病性に関与する分子であることが明らかになった (図2: Kim *et al.*, Plant Cell Physiol., 2012)。RAI1 により発現が調節される遺伝子をマイクロアレイを用いて単離を試み、*PAL1* と *OsWRKY19* を同定した。RAI1 のアクティベーションタグラインでは、*PAL1* と *OsWRKY19* の発現が上昇し、反対に、RAI1 RNAi 個体では発現が減少した。さらに、ゲルシフトアッセイにより、RAI1 が *PAL1* と *OsWRKY19* のプロモーター部位に直接結合することも見出した。以上の結果から、RAI1 は *PAL1* と *WRKY19* のプロモーター部位に直接結合して、

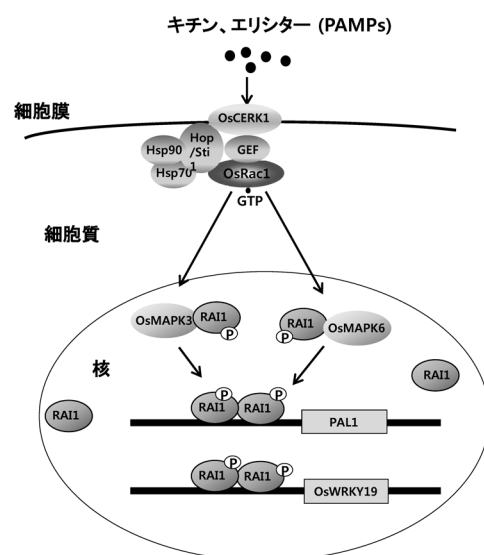


図2 *OsRac1* による防御関連遺伝子の制御機構

それらの遺伝子発現調節をしていることが明らかになった。MAPK3とMAPK6によるbasic helix-loop-helix型転写因子SPEECHLESSのリン酸化が気孔形成に重要であることが知られている。SPEECHLESSと同様に、RAI1がMAPK3とMAPK6に直接相互作用することを明らかにした。さらに、OsRac1とMAPK3及びMAPK6も複合体を形成することを見出した。PAL1とOsWRKY19のプロモーターを用いたレポーターアッセイにより、MAPK3あるいはMAPK6依存的に、PAL1とOsWRKY19の発現が誘導されることを明らかにした。以上の結果から、OsRac1はMAPK3あるいはMAPK6によるリン酸化を介して転写因子RAI1の活性を調節し、PAL1とOsWRKY19の発現を調節することが示唆された。

3) 抵抗性タンパク質の細胞内局在に関する新たな知見

抵抗性タンパク質は、病原体を認識する細胞内レセプターとして働くことが知られている。現在、抵抗性タンパク質の細胞内局在の分子メカニズムや耐病性反応と局在との関連に関してはほとんど明らかになっていない。本研究で、NB-LRR型抵抗性タンパク質Pitの細胞内局在の分子メカニズムを明らかにする目的で、Pit上に存在する細胞膜の局在化に関与するシグナル配列を探索し、パルミトイル化修飾のコンセンサス配列を発見した。抵抗性タンパク質Pitの野生型は細胞膜上に局在するが、パルミトイル化コンセンサス配列の変異体は、細胞膜への局在の効率が減少した。したがって、パルミトイル化がPitの細胞膜局在に重要であることが明らかになった。これまでに、恒常的活性型Pit変異体は、細胞死や活性酸素の産生を誘導することを明らかにしている。この恒常的活性化型変異体にパルミトイル化コンセンサス配列の変異を入れた二重変異体は、細胞死や活性酸素の産生が減少していた。さらに、パルミトイル化変異体は、OsRac1に対する相互作用が減少していることも見出した。以上の結果から、パルミトイル

化を介してPitが細胞膜にアンカーすることがOsRac1との相互作用に重要であり、細胞膜上でのPitによるOsRac1の活性化が免疫誘導に重要であることが示唆された。

論 文

- Kim SH, Oikawa T, Kyojima J, Wong HL, Umemura K, Kishi-Kaboshi M, Takahashi A, Kawano Y, Kawasaki T, and Shimamoto K. The bHLH Rac Immunity1 (RAI1) Is Activated by OsRac1 via OsMAPK3 and OsMAPK6 in Rice Immunity. *Plant Cell Physiol.* **53**(4): 740–54, 2012
- Kaneko-Kawano T, Takasu F, Honda N, Sakumura Y, Ishii S, Ueba T, Eiyama A, Okada A, Kawano Y, Suzuki K. Dynamic Regulation of Myosin Light Chain Phosphorylation by Rho-kinase. *PLoS ONE* **7**(6): e39269, 2012
- Horii Y, Nogami S, Kawano Y, Kaneko-Kawano T, Ohtomo N, Tomiya T, and Shirataki H. Interaction of alpha-taxilin localized on intracellular components with the microtubule cytoskeleton. *Cell Struct Funct.* 2012 in press
- Kawano Y, Akamatsu A, Hayashi K, Housen Y, Okuda J, Yao A, Nakashima A, Takahashi H, Yoshida H, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K. Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate immunity. *Cell Host Microbe* (Cell Press). **7**(5): 362–75, 2010
- Kawano Y, Chen, L, and Shimamoto K. The function of Rac small GTPase and associated proteins in rice innate immunity. *Rice*, 2010, **3**: 112–121

著 書

- 河野洋治, 島本 功: 植物免疫受容体の最前線 GTP結合タンパク質 OsRac1を中心として 細胞工学 **29**(10): 1030–1034, 2010
- 河野洋治, 島本 功: 低分子量Gタンパク質Rac/Ropファミリーによる植物免疫の制御機構 共立出版, 99–104, 2010

新聞掲載

- 日経産業新聞 平成22年 5月20日(朝)掲載
日刊工業新聞 平成22年 5月20日(朝)掲載
奈良新聞 平成22年 5月20日(朝)掲載
科学新聞 平成22年 6月11日(朝)掲載

食品中の高機能物質・プロアントシアニジンの機能を解明する化学生物学的研究

大阪電気通信大学工学部応用化学科 齊藤安貴子

研究の目的

「医食同源」というように昔から親しんでいる食品は健康に良いとされる。しかし、何故健康によいのか、そして本当に安全なのか、化学的に証明されているものは少ない。食品に含まれる活性物質は、長期に摂取して効果を発揮し、

大量に摂取しても排泄、または、迅速に分解される。これは、動物が長い年月をかけて取得した機構であろう。

しかし今、これらが何故活性を発現するのかを化学的に証明・理解し・利用する必要に迫られている。なぜなら、高価な医薬品が家庭の経済、国家の経済を圧迫し、人が健康に生きていく事すら難しい世の中になりつつあるといえるからである。また、生活習慣病等のように、半永久的に服薬を余儀なくされる病気が増え、その副作用が問題となってきた。申請者は、これからは、「病気の予防薬」が必要であり、それには昔ながらの食品由来の化合物が「副