

植物-微生物相互作用を制御する低分子量Gタンパク質Rac/ROPの役割

赤松 明

1. はじめに

植物とそれを取り巻く土壤微生物との関係は非常に複雑であり、植物にとってそれらの微生物は敵（病原微生物）にも味方（共生微生物）にもなりうる存在である。近年、活発に行われているメタゲノム解析によって、根圏（根近傍の土壤環境；rhizosphere）には多くの病原菌や植物と共生する微生物が同定されており、植物がこのような土壤微生物叢の中から、病原微生物と共生微生物を区別する機構、もしくは共生微生物が植物の防御応答を巧みに避ける機構が存在するのではないかと考えられている。これまでに、植物が共生微生物を認識した際に、病原菌に対する防御応答が弱まり、共生微生物の感染に有利な状況を作り出しているなどの報告がされているが、現在までの研究からは、それらを制御する機構の解明には至っていない。2000年以降、植物防御応答、共生応答分野における遺伝学的解析により、植物が微生物を認識する機構や、それにより誘導されるシグナル伝達機構について数多くの知見がもたらされてきた。それらにより明らかになってきたことは、防御応答と共生応答では、いくつもの点で非常によく似た機構、中には共通の分子を利用しているものもあるということであった。たとえば、病原菌由来の物質キチン（*N*-acetylchitooligosaccharide）は、イネの免疫受容体OsCERK1とOsCEBiPのヘテロ二量体によって認識され防御応答を誘導する。最近の研究から、OsCERK1は、共生菌である菌根菌との共生応答に対しても機能することが明らかとなっている¹⁾。また、その他にも、病原菌認識後に誘導されるCa²⁺濃度の一過的な変動や活性酸素種（reactive oxygen species：ROS）の産生は共生応答においても誘

導されることなどが知られている^{2,3)}。このように両方の応答において機能を担っている因子の中で我々が注目しているのは、植物の低分子量Gタンパク質ROP（Rho-like GTPases from plants；本稿ではRac/ROPと記述する）である。ROPは、動物におけるRhoスーパーファミリーに属するRacサブファミリーと非常によく似た遺伝子である。動物細胞においてRacは、細胞周期、細胞骨格の再構築や細胞接着などさまざまなイベントで重要な役割を果たしている。植物においてもRac/ROPは、花粉管の伸長や葉表皮細胞の形態形成、細胞分裂、細胞極性などにも関与していることが明らかとなっている重要な因子である⁴⁾。本稿では、植物が獲得してきた微生物に対する防御応答と共生応答における低分子量Gタンパク質Rac/ROPの役割について概説する。

2. 植物防御応答におけるRac/ROPの役割

動物が持つ免疫システムを作り上げているのは、Toll様受容体（Toll-like receptor：TLR）に代表される細胞膜受容体によって病原微生物を認識することで誘導される先天性の自然免疫と、抗原抗体反応で知られる後天性の獲得免疫である。一方で、獲得免疫を持たない植物は、細胞膜受容体によって病原微生物が幅広く共通して持つ物質（pathogen-associated molecular patterns：PAMPs）を認識し、汎用性が高く即効性のある応答を誘導する。これは動物の自然免疫に非常によく似たシステムであり、PAMP誘導免疫（PAMP-triggered immunity：PTI）と呼ばれる（図1A）⁵⁾。自然界に無数に存在する病原微生物の多くが植物に感染することができない最大の理由は、このPTIによる防御応答が存在するためである。しかしながら、一部の病原菌は、PTIによる防御応答を抑制・攪乱し、自身の感染に優位な状況を生み出すために、エフェクタータンパク質と総称されるタンパク質を植物の細胞内（ときにはアポプラスト）に送り込む。それに対して、植物側もエフェクタータンパク質を認識するための細胞内受容体を獲得し、植物-微生物間での特異性がより高まった防御応答を誘導することができる⁵⁾。この応答がエフェクター誘導免疫（effector-triggered immunity：ETI）であり、植物側の細胞死を伴う非常に強力なものであることが知られている（図1A）。植物は、このような2段階の防御システムを巧みに

関西学院大学理工学部生命学科植物共生工学研究室（〒669-1337 兵庫県三田市学園2-1 関西学院大学理工学部生命学科）

The role of the small GTPase Rac/ROP in plant-microbe interactions

Akira Akamatsu (Department of Bioscience, Kwansei Gakuin University, 2-1 Gakuen, Sanda 669-1337, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900394

© 2018 公益社団法人日本生化学会

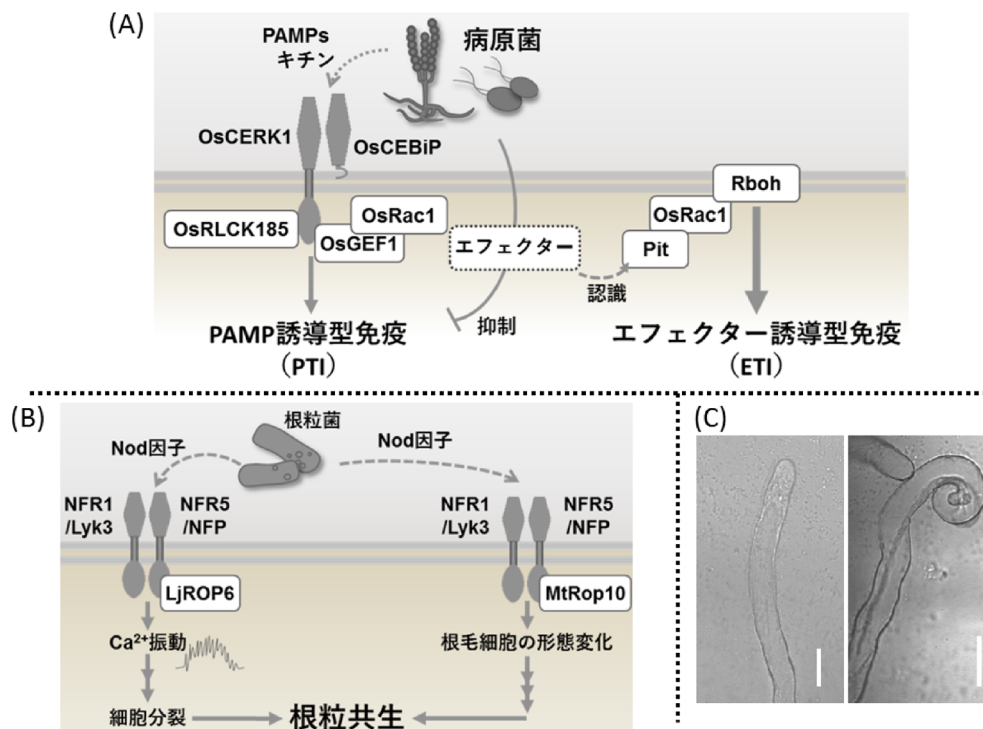


図1 植物の低分子量Gタンパク質Rac/ROPを介した微生物に対する応答

(A) イネの免疫受容体であるOsCERK1およびOsCEBiPは、真菌由来のキチンを認識する。OsCERK1の細胞内キナーゼドメインは、OsRacGEF1をリン酸化し、そのOsRacGEF1によってOsRac1が活性化される。OsCERK1のリン酸化ターゲットとしてOsRLCK185も知られており、OsRacGEF1と協調してPAMP誘導免疫 (PTI) を引き起こす。それに対し、病原菌は、エフェクタータンパク質を植物細胞に放出し、PTIの阻害を図る。一方で、PitなどのRタンパク質によってエフェクターを認識することができた場合は、OsRac1を介してより強いエフェクター誘導免疫 (ETI) が引き起こされる。(B) ミヤコグサのNod因子の受容体NFR1, NFR5 (タルウマゴヤシにおけるLYK3およびNFP) がLjROP6を介し、根粒の形成を誘導する。また、根粒菌の感染過程で起こる根毛の形態変化に対しては、タルウマゴヤシのMtROP10が機能する。これらにより根粒共生が成立し、根粒内で窒素固定が起こる。(C) タルウマゴヤシの根毛細胞。根粒菌が感染していない根毛細胞(左)に比べ、根粒菌が感染した細胞(右)では先端の丸まりと、細胞の中央を通る感染糸を観察することができる (スケールバー: 20μm)。

使い微生物と対峙している。我々は、イネ (*Oryza sativa*) のRac/ROPであるOsRac1が、これら両方の防御システムにおいて機能することを明らかにしている。

1) PTIにおけるOsRac1の機能

植物のPAMPs受容体の大部分は、細胞内に機能的なキナーゼドメインを有する受容体型キナーゼ (receptor-like kinase: RLK) とキナーゼドメインを持たない受容体型タンパク質 (receptor-like protein: RLP) に分類される。カビなどの真菌が植物の葉などの上に付着した場合、キチンが植物にPAMPsとして認識され、植物側はPTIを誘導する。イネのキチン受容体OsCERK1 (RLK) やOsCEBiP (RLP) は、細胞外のLysMドメインによってキチンを認識し、OsCERK1の細胞内キナーゼドメインによって情報を伝達する⁶⁾。我々は、質量分析や組換えタンパク質を用いた解析によって、OsCERK1のキナーゼドメインがRac/ROPの活性化因子であるOsRacGEF1のC末端領域をキチ

ン依存的にリン酸化することを明らかにした⁷⁾。リン酸化されたOsRacGEF1によってOsRac1が活性化されるかどうかは、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) を利用したタンパク質センサーRaichu (ライチュー) により解析した。Raichuは、二つの蛍光タンパク質CFPとYFPの間に、OsRac1とCRIBモチーフ (活性型Rac1のみが結合可能) を含むプローブであり、OsRac1の活性化の状態によってFRETが起こる割合が変化する。これらは、京都大学の松田道行先生らのグループによって動物細胞用に開発されたものを植物細胞用に改良したものである。このセンサーとOsRacGEF1の擬似リン酸化変異体を利用することで、OsRacGEF1がOsRac1の直接の活性化因子であることが明らかとなった⁷⁾。さらに、イネの細胞にキチンを処理すると3分以内という非常にすばやいたイミングでOsRac1が活性化していくことも明らかとなっている。そのため、PTIにおいて最初期に誘導されることが報告されているCa²⁺の細胞質への流入やROSの

産生などの現象に対しても OsRac1 が関与していると考えられている。また、活性化した OsRac1 の下流では、*PAL1* や *PBZ1* といった複数の防御応答関連遺伝子の転写が誘導されることも確認されている⁸⁾。

イネにおいてキチン受容によるシグナル伝達を担うリン酸化のターゲット因子には、OsRacGEF1 の他にも受容体型の細胞質キナーゼ (receptor-like cytoplasmic kinase : RLCK) である OsRLCK185 が知られている⁹⁾。組換えタンパク質を用いた解析から OsRLCK185 も、OsCERK1 のキナーゼドメインによって直接リン酸化を受け、キチンを処理した細胞では、OsRLCK185 が5分以内にリン酸化されることも報告されている。こうしたことから、RLK の下流では、Rac/ROP を含む複数のシグナル伝達経路が存在し、植物の PTI を制御しているものと考えられる。これは、PTI 応答が画一的にならず、病原菌エフェクターによる阻害効果を軽減させるためにも重要なことであると考えられる。

2) ETIにおけるOsRac1の機能

前述したように、PTI による汎用性と即効性を兼ね備えた植物防御応答を病原菌は進化的に獲得したエフェクタータンパク質によって回避しようとする。それに対して、植物はそれらに対する受容体タンパク質、R タンパク質 (resistance protein : R protein) をコードする遺伝子として R 遺伝子を獲得してきた。イネにおいては、いもち病菌に対する R 遺伝子として *Pit* や *Pi-a* などが同定されている⁸⁾。*Pit* や *Pi-a* を含む多くの R タンパク質は、核酸結合ドメイン (nucleotide-binding domain : NB) とロイシンリッチリピート (leucine rich repeat domain) を有する。OsRac1 は、この *Pit* の核酸結合ドメインとイネの細胞膜上で直接的に相互作用している¹⁰⁾。そして、Raichu プローブを利用した解析や GST-CRIB (活性化型の Rac のみを検出するための生化学的な解析法) によって、*Pit* が OsRac1 を活性化に寄与することが示されている。しかしながら、詳細な活性化メカニズムは不明のままであり、今後の課題となっている。活性化された OsRac1 の下流では、OsRbohB (respiratory burst oxidase homologs B) により ROS の産生が誘導されており、結晶構造解析や酵母ツーハイブリット法から RBOH タンパク質の二つの EF-hand モチーフを持つ N 末端領域に OsRac1 が直接結合することなどが明らかとなっている¹¹⁾。また、ROS のスカベンジャーである *MT2b* の発現が OsRac1 によって抑制されることから、ETI 経路における ROS の産生に OsRac1 が重要な役割を担っていることがうかがえる。また、*Pit* 以外の R タンパク質も Rac/ROP とともに機能することが明らかとなっている。タバコモザイクウイルスが持つエフェクタータンパク質 P50 を認識し、ETI を引き起こす R タンパク質として N が同定されている。P50 と

N を同時にタバコの葉で発現させると、ETI が誘導され細胞死が起こる。しかし、OsRac1 のドミナントネガティブ変異体を同時に発現させると、それらは抑制されることから、N を介した ETI 経路においても Rac/ROP が機能していると考えられる⁸⁾。さらには、トマトの R タンパク質 Pto がトマト斑葉細菌病菌 (*Pseudomonas syringae*) のエフェクタータンパク質 AvrPto を認識することで誘導される細胞死も、OsRac1 のドミナントネガティブ変異体によって抑制される⁸⁾。これらのことなどからも、幅広い植物種において Rac/ROP が ETI に機能していると考えられる。

3. 共生応答メカニズム

前述したように土壌中には数多くの共生微生物も存在していることが明らかとなってきたが、それら一つ一つを種として同定し、植物との相互作用メカニズムを理解することができるようになるには、さらなる時間が必要である。そのような中で例外として、根粒菌と菌根菌は共生が成立する機構について、分子レベルでの知見が多く蓄積している。本稿では、宿主植物の Rac/ROP が共生関係構築のために機能することが報告されているマメ科植物と根粒菌の共生について述べる。

根粒菌は主にマメ科植物に感染し、宿主植物の根に根粒と呼ばれる共生器官を植物とともに作り出す。「ともに」と記したのは、根粒を形成する過程の多くは植物細胞由来であるが、根粒の形成には根粒菌の感染が必要不可欠であるためである。根粒の中では、根粒菌によって大気中の窒素が固定され、植物の生長に不可欠な窒素源として植物側に提供される。一方で、植物は光合成によって作り出した糖を根粒菌に利用してもらうことで、相利共生関係を築いている。これまでのマメ科植物の遺伝学的解析から、根粒共生が成立する際には、大きく分けて二つのシグナル伝達経路が重要であると考えられている。一つは、根粒形成のための細胞分裂を誘導する経路である。根粒菌が分泌する Nod 因子 (リポキオリゴ糖) が細胞膜受容体によって認識されると、受容体→核内での Ca^{2+} 振動→種々の遺伝子発現→植物ホルモン・サイトカニンの産生という順序によって、根の内部 (皮層細胞) での細胞分裂が誘導され根粒が形成される (図 1B)。もう一つの経路は、根粒菌が植物体内への感染・侵入することを制御するものである。根粒菌を細胞内部に受け入れるために宿主植物の根毛細胞は、劇的な形態変化を起こし、根粒菌を定着させるための空間 (感染ポケット) を作り出す。ここに定着・増殖した根粒菌は、根の中心へと感染を進める (図 1B)。つまり、根粒菌とマメ科植物の共生は、「根粒の形成」と「根粒菌の感染」の二つが成功した際に成立するのである²⁾。

マメ科のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) では Nod 因子受

容体として、RLK型のNFR1およびNFR5が同定されている。ミヤコグサのRac/ROPであるLjROP6は、NFR5と相互作用することが酵母ツーバイブリット法や共免疫沈降法によって示されている¹²⁾。また、RNAiによる*LjROP6*発現抑制体では根粒形成の鍵転写因子である*NIN* (nodule inception) の遺伝子発現や根粒数も顕著に抑制されることなどから、共生受容体によるNOD因子受容の直後で機能することが示唆されている¹²⁾。同じマメ科のタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) のMtROP10は、LjROP6とは異なり根粒菌の感染過程で起こる根毛細胞の形態変化で機能している。根粒菌がマメ科植物の根に感染する際、根毛細胞の先端が脱極性を起こし肥大化し、その後、再び伸長を開始、最終的には根毛の先端がカーブしワラビの穂先のような構造となり、その中心にできる感染ポケットに根粒菌が感染する (図1C)。MtROP10の恒常的活性型変異体では、根毛細胞が野生型に比べると短く膨らんだ形態を示し、根粒菌を感染させると根毛細胞の形態変化を正常に誘導できない¹³⁾。また、MtROP10はタルウマゴヤシの共生受容体NFPと相互作用し、かつ、根毛細胞内での局在も先端部位の細胞膜上に限定されていることから、根粒菌感染時の形態変化にとって重要である。また、Rac/ROPの活性化因子であるMtROPGEF2の過剰発現体では、MtROP10の恒常的活性変異体と同じような短く膨らんだ根毛が観察されることから、MtROPGEF2はMtROP10を活性化因子であると予想されている¹⁴⁾。さらに、根粒菌感染時の根毛細胞において、MtROPGEF14の遺伝子発現も上昇することが明らかとなっており、MtROP10との関係性の解明が期待される¹⁵⁾。このように、共生シグナル伝達経路においても、Rac/ROPは受容体の直接的な下流因子として機能している。共生応答においては、根粒形成、根毛細胞の形態変化、あるいは感染糸の伸長などにも関与していると予想されるため、病原菌に対する応答よりも、さらに複合的にRac/ROPの機能を利用していると考えられる。

4. おわりに

冒頭でもふれたように、植物が病原微生物と共生微生物に対してそれぞれ異なる対応をとる機構に強い関心が寄せられている。本稿で紹介したように、Rac/ROPは防御応答と共生応答の両方で機能している。おそらく、免疫受容体と共生受容体 (複合体) に異なるRac/ROPが結合しており、それぞれの経路の一部として振る舞っている。進化の過程で植物が防御応答機構をもとに共生応答機構を獲得した際に、重複した受容体遺伝子が変異を受け共生受容体となったのと同様に、Rac/ROPもまた共生応答特異的に機能するものが生まれたのではないかと推察する。今後、Rac/ROPが機能する場所やタイミング、相互作用因子との関

わり合い方を解明できれば、防御応答、共生応答の両方の研究の進歩に大きく貢献できるだろう。

19世紀にルイ・パスツールは病原微生物が人類のすぐ側に存在するものであることを示し、ピーターラビットの作者でもあるビアトリクス・ポターらによって地衣類が菌類と藻類との共生体であることが提唱された。それから多くの時間が流れた現在、さまざまな最新の研究手法と多くの知見が我々の手の届くところにある。彼らが驚くような植物-微生物相互作用の新たな一面を発見できれば幸せである。

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学・植物分子遺伝学研究室、故・島本功先生の研究室で行われたものです。この場をお借りして、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Zhang, X.W., Dong, W.T., Sun, J.H., Feng, F., Deng, Y.W., He, Z.H., Oldroyd, G.E.D., & Wang, E.T. (2015) The receptor kinase CERK1 has dual functions in symbiosis and immunity signalling. *Plant J.*, **81**, 258–267.
- 2) Oldroyd, G.-E. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 252–263.
- 3) Cardenas, L., Martinez, A., Sanchez, F., & Quinto, C. (2008) Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant J.*, **56**, 802–813.
- 4) Feher, A. & Lajko, D.B. (2015) Signals fly when kinases meet Rho-of-plants (ROP) small G-proteins. *Plant Sci.*, **237**, 93–107.
- 5) Jones, J.-D.-G. & Dangl, J.-L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323–329.
- 6) Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., et al. (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J.*, **64**, 204–214.
- 7) Akamatsu, A., Wong, H.L., Fujiwara, M., Okuda, J., Nishide, K., Uno, K., Imai, K., Umemura, K., Kawasaki, T., Kawano, Y., et al. (2013) An OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 module is an essential early component of chitin-induced rice immunity. *Cell Host Microbe*, **13**, 465–476.
- 8) Kawano, Y., Kaneko-Kawano, T., & Shimamoto, K. (2014) Early signaling network in rice PRR-mediated and R-mediated immunity. *Front. Plant Sci.*, **5**, 522.
- 9) Yamaguchi, K., Yamada, K., Ishikawa, K., Yoshimura, S., Hayashi, N., Uchihashi, K., Ishihama, N., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Tsuge, S., et al. (2013) A Receptor-like Cytoplasmic Kinase Targeted by a Plant Pathogen Effector Is Directly Phosphorylated by the Chitin Receptor and Mediates Rice Immunity. *Cell Host Microbe*, **13**, 347–357.
- 10) Kawano, Y., Akamatsu, A., Hayashi, K., Housen, Y., Okuda, J., Yao, A., Nakashima, A., Takahashi, H., Yoshida, H., Wong, H.-L., et al. (2010) Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate

immunity. *Cell Host Microbe*, **7**, 362–375.

- 11) Wong, H.-L., Pinontoan, R., Hayashi, K., Tabata, R., Yaeno, T., Hasegawa, K., Kojima, C., Yoshioka, H., Iba, K., Kawasaki, T., et al. (2007) Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell*, **19**, 4022–4034.
- 12) Ke, D., Fang, Q., Chen, C., Zhu, H., Chen, T., Chang, X., Yuan, S., Kang, H., Ma, L., Hong, Z., et al. (2012) The small GTPase ROP6 interacts with NFR5 and is involved in nodule formation in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.*, **159**, 131–143.
- 13) Lei, M.-J., Wang, Q., Li, X., Chen, A., Luo, L., Xie, Y., Li, G., Luo, D., Mysore, K.-S., Wen, J., et al. (2015) The small GTPase ROP10 of *Medicago truncatula* is required for both tip growth of root hairs and nod factor-induced root hair deformation. *Plant Cell*, **27**, 806–822.
- 14) Riely, B.K., He, H., Venkateshwaran, M., Sarma, B., Schraiber, J., Ane, J.M., & Cook, D.R. (2011) Identification of legume Rop-GEF gene families and characterization of a *Medicago truncatula* RopGEF mediating polar growth of root hairs. *Plant J.*, **65**, 230–243.
- 15) Breakspear, A., Liu, C., Roy, S., Stacey, N., Rogers, C., Trick, M., Morieri, G., Mysore, K.-S., Wen, J., Oldroyd, G.E., et al. (2014) The root hair “infectome” of *Medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for Auxin signaling in rhizobial infection. *Plant Cell*, **26**, 4680–4701.

著者寸描

●赤松 明 (あかまつ あきら)



関西学院大学理工学部生命科学科助教。
バイオサイエンス博士（奈良先端科学技術大学院大学）。

■略歴 2013年奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士課程修了。同年奈良先端科学技術大学院大学博士研究員。14年ジョン・イネスセンター（英国）博士研究員。15～16年同センター（英国）JSPS海外特別研究員。17年

より現職。

■研究テーマと抱負 大学院時代から植物-微生物相互作用を軸とした研究を行っている。扱う植物は、イネ、タルウマゴヤシ、ミヤコグサ。扱う微生物は、いもち病菌、根粒菌、菌根菌と常に遷移している。今後は、これまでの扱われることが無かったような研究対象にも目を向けていきたい。

■ウェブサイト <http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~takeda/>

■趣味 美味しいコーヒーを綺麗な風景の中で楽しむこと。