Review

植物病害抵抗性R蛋白質の分子制御機構

能年義輝・市村和也・白須 賢

植物に病害を与える病原菌は，植物細胞内にエフェクターとよばれる蛋白質を注入してその防御機構を撹乱・回避することで感染を可能にしている．これに対し植物は，抵抗性蛋白質(R蛋白質)を含む複合体による，病原体の特異的認識と抵抗性発現により耐性を獲得する機構を備えている．近年，R蛋白質複合体構成因子の単離および生化学的解析を基盤として，その活性化メカニズムの理解が急速に深まっている．本稿では，R蛋白質の機能に必要なシャペロン様複合体を形成するRAR1，SGT1，HSP90を中心に，R蛋白質複合体とその機能発現の分子メカニズムについて概説する．

Key words R蛋白質　PAMPs　細胞死　シャペロン　ユビキチン

はじめに

自然界には多くの微生物が存在するが，植物はこれらに感染することは多くない．植物は，細胞壁などによる物理的遮蔽や抗菌性物質による化学的防御に加え，PAMPs*1と総称される多くの微生物に共通に存在する物質を感知することでその接触を認識し，basal defenseとよばれる抵抗性反応を誘導して耐性を発揮する(各種の植物免疫応答の定義は**コラム**を参照)．一方，特殊な蛋白質分泌装置によりエフェクターとよばれる蛋白質を注入することでbasal defenseを撹乱あるいは回避し，細胞内へ侵入・感染する能力をもつ微生物は植物病原体と位置づけられ，これらの一部は農業上の甚大な被害の原因ともなっている．

植物病原体には，バクテリア，カビ，線虫，ウイルスなどが存在するが，同一種の宿主植物であっても，品種Aは抵抗性を示すが品種Bは感染性を示すといったように，非常に高い特異性を示す．この特異性は，宿主植物の病害抵抗性(*Resistance, R*)遺伝子と，それと対をなす病原体の遺伝子とのアリル特異的な遺伝的相互作用によって規定されており，Florの“遺伝子対遺伝子説”として知られている[1]．抵抗性農作物品種の育種過程では，結果的にこの*R*遺伝子座がもち込まれている場合がほとんどである．これまでに多くの*R*遺伝子がクローニングされてきたが，それらの多くは，分子中央部のヌクレオチド結合部位(nucleotide-binding site；NBS)とC末端のロイシンリッチリピート(leucine-rich repeat；LRR)ドメインを含む，NBS-LRRとよばれる細胞質局在型の蛋白質をコードしていた(**図1**)．細胞質型NBS-LRR型のR蛋白質のほかにも，細胞外LRRドメインで構成される細胞膜貫通型LRR型のR蛋白質がいくつか知られており，これらはキナーゼドメインを含むものと含まないものに分類される．病原体認識には，これら両方の型のR蛋白質のもつ高度に多様化したLRRドメイン部分が主要な役割をはたしている[1]．シロイヌナズナゲノムには約150のNBS-LRR型*R*遺伝子の存在が確認され，それらの多くはクラスターをなして存在し，頻繁な組換えによる高度な多型を示していて，これは病原体認識の多様性の源になっていると考えられている[2]．

病原菌は植物感染に際し，その病原性を発揮するため植物細胞内に数多くのエフェクター蛋白質を注入するが[3]，R蛋白質は病原体のエフェクター蛋白質と直接または間接的に結合することでその侵入を認識して活性化され，植物免疫反応を誘導する(**図2**)．病原体の種類に

Yoshiteru Noutoshi，Kazuya Ichimura，Ken Shirasu，英国John Innesセンター Sainsbury研究所，理化学研究所植物科学研究センター 植物免疫研究グループ　E-mail：ken.shirasu@psc.riken.jp
Molecular mechanisms of plant disease resistance protein

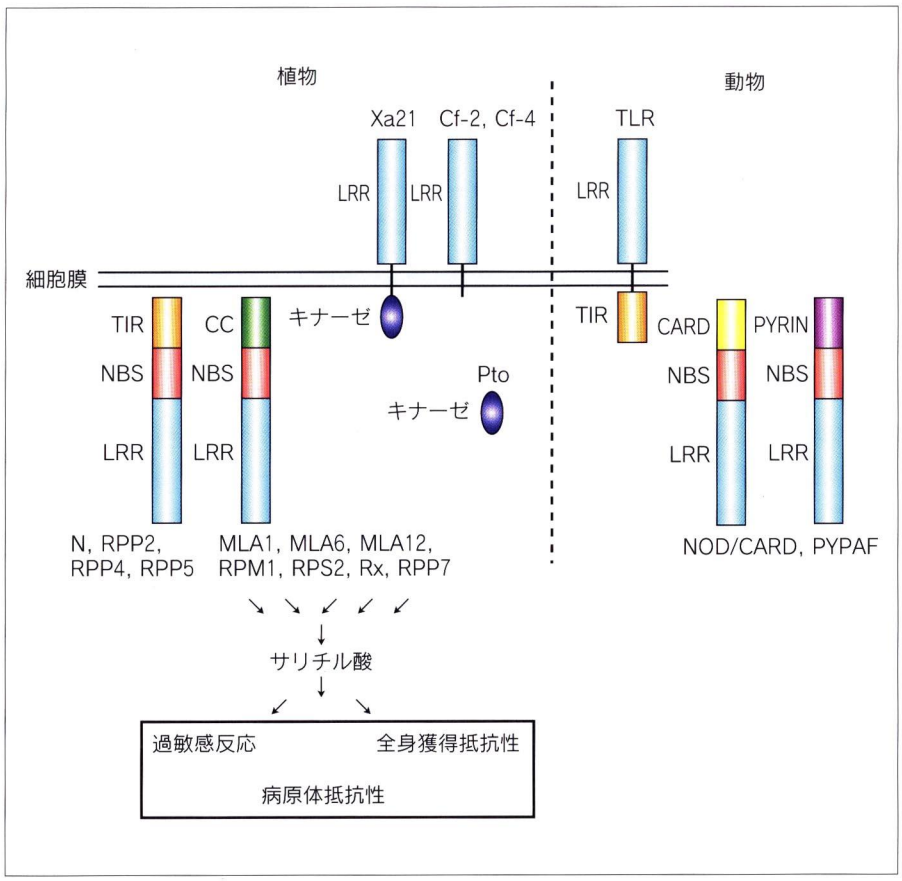


図 1　植物の R 蛋白質と動物における類似蛋白質との構造比較

植物の病原菌認識にはたらく R 蛋白質には，細胞質型 NBS-LRR 型の R 蛋白質と細胞膜貫通型 LRR 型の R 蛋白質が存在する．どのような型の R 蛋白質であっても，サリチル酸を介した過敏感細胞死と，それに続く全身獲得抵抗性反応を含む抵抗性発現機構が導かれることから，共通の下流シグナルの存在が予想されている．細胞膜貫通型 LRR 型 R 蛋白質は動物の Toll 様受容体(Toll-like receptor；TLR)と，また，細胞質型 NBS-LRR 型 R 蛋白質は NOD(nucleotide-binding oligomerization domain)蛋白質と，構造的類似性を示す．これらの動物の蛋白質もまた病原体を感知する受容体として機能しており，アポトーシスを誘導するカスパーゼの活性化やサイトカイン誘導にかかわる転写調節因子 NF-κB の活性化などの免疫応答シグナルを伝達する役割をはたしている．細胞質型 NBS-LRR 型蛋白質は，その N 末端構造の違いにより，コイルドコイルドメイン(CC)をもつ CC-NBS-LRR 型，もしくは，Toll-インターロイキン 1 受容体(Toll-interleukin 1 receptor；TIR)ドメインをもつ TIR-NBS-LRR 型の 2 種類に区別される．

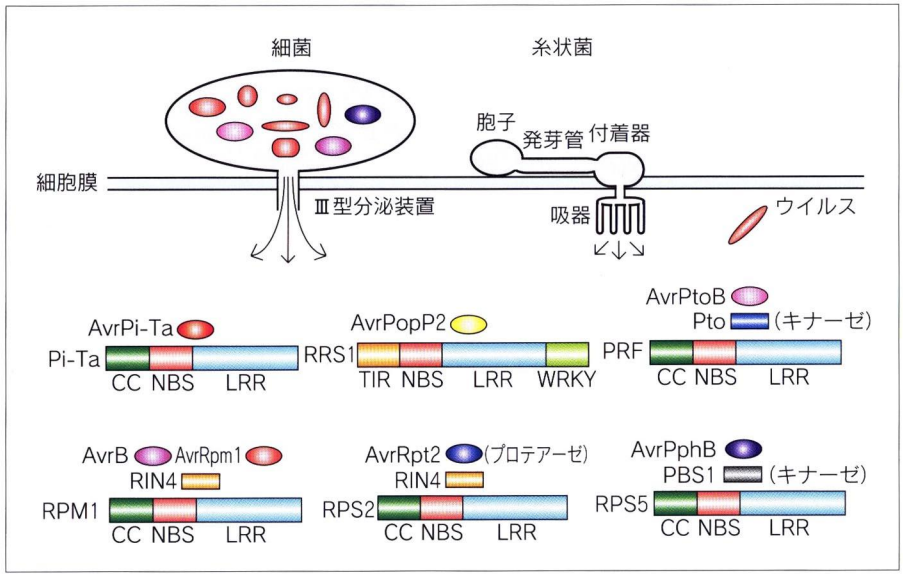


図 2　エフェクター蛋白質の放出と R 蛋白質による病原体由来蛋白質の認識機構

細菌では，Ⅲ型分泌装置により植物細胞内に約 30 ほどのエフェクター蛋白質を放出する．糸状菌では，吸器からの分泌蛋白質が R 蛋白質に認識される[39]．エフェクター蛋白質は basal defense を妨害し，病原体の感染を容易にする．たとえば，AvrRpt2 はプロテアーゼであり，basal defense の制御因子 RIN4 を分解する．エフェクター蛋白質の標的となる Pto および PBS1 はキナーゼであり，宿主のリン酸化制御を抑制すると考えられる．R 蛋白質は，これらエフェクター蛋白質と直接的または間接的に結合することで感染を認識して活性化し，防御応答を誘導する．

＊1　PAMPs：pathogen-associated molecular patterns，病原体関連分子パターン．多くの細菌などに共通に存在し，動植物の細胞自律的な防御反応を誘導する物質の総称．具体的には，リポ多糖類といった糖鎖やフラジェリンなどのペプチドが知られており，これらは植物では basal defense とよばれる基礎的レベルの防御応答を誘導する．

よらず*R*遺伝子による抵抗性反応は著しく類似しており，植物は植物ホルモンのひとつであるサリチル酸の蓄積を介して，過敏感反応(hypersensitive response；HR)とよばれる一連の防御応答を誘導する(図1)．これらは，H_2O_2やO_2^-など活性酸素中間体の生成，イオンチャネルの活性化，さまざまな防御関連遺伝子の転写誘導，抗菌物質の蓄積，そして，感染細胞およびその周囲の細胞死からなる．この過敏感反応により，侵入した病原体を感染部位に封じ込めることで病原体の増殖を抑制し，さらに，感染部位以外には全身獲得抵抗性(systemic acquired resistance；SAR)とよばれる防御反応を誘導することにより，さらなる感染に備える抵抗性を得る．

抵抗性反応の共通性とともに，R蛋白質の構造的類似性からも，R蛋白質を介した耐病性獲得機構には共通のシグナル伝達経路が存在していると予想されている．この10年ほどのあいだに，多くのグループがこの伝達経路を解明すべく，遺伝学的アプローチ，つまり，病原抵抗性変異体の単離とその原因遺伝子のクローニングを進めてきたが，この過程で得られた新規の遺伝子は意外に多くはない．この理由としては，シグナル伝達経路が予想以上に短いか，多くの複数の遺伝子が機能を同じくするか，変異体が致死にいたるものが多いか，などが考えられる．本稿では，筆者らの研究室でクローニングされた遺伝子を中心として，R蛋白質複合体の機能と活性化のメカニズムについて考察する．

オオムギのうどんこ病抵抗性反応を用いた遺伝学的なアプローチにより，*R*遺伝子を介した病原体抵抗性応答に必須な遺伝子として*RAR1*遺伝子がクローニングされた．*RAR1*遺伝子は，多くのNBS-LRR型*R*遺伝子を介した抵抗性に広く必要とされる遺伝子であることがわかり，多様な*R*遺伝子シグナル伝達の収束部分を制御する因子としてはじめてクローニングされたものとなった．RAR1結合蛋白質としてSGT1およびHSP90が同定され，これらもまたNBS-LRR型*R*遺伝子シグナル伝達に必要な因子であることがわかった．さらに，RAR1は，SGT1とHSP90を介してR蛋白質と直接に結合し，複合体を形成していることが明らかになった．これらの発見により，R蛋白質を含むエフェクター蛋白質認識複合体の形成，維持，そして，下流へのシグナル伝達の分子メカニズムが推測されつつある．

Column

各種の植物免疫応答の定義

basal defense

微生物に対して非特異的に発動される抵抗性反応で，最近，急速にその理解が進みつつある．PAMPsの認識により誘導され，防御関連遺伝子の発現誘導と抗菌性物質の蓄積が誘導される．シロイヌナズナにおけるフラジェリンの認識には膜貫通型受容体キナーゼFLS2がかかわっており，下流のMAPキナーゼカスケードを介して転写調節因子WRKY蛋白質ファミリーの活性化を制御すると考えられている[36]．病原体の放出するエフェクター蛋白質の標的解明というアプローチにより，その制御機構が明らかにされつつある．

gene-for-gene resistance

植物に対する感染性をもつ病原体に対して発動される特異的な抵抗性反応．多くの場合，病原体が放出するエフェクター蛋白質とR蛋白質の特異的認識機構によって規定される．防御関連遺伝子発現に加え感染細胞に急速な過敏感反応細胞死が誘導され，これがbasal defenseとの違いとなっている．DNAマイクロアレイ解析により，basal defenseとgene-for-gene resistanceでは発現誘導される遺伝子の種類には大差はなく，その強度と速度が著しく異なっていることがわかっている[37]．

non-host resistance

ある植物種に対しては感染性を発揮する病原体であっても，別の植物種に対しては病原性を示さない場合が多い．このような種に依存した抵抗性のことをさす．この種依存性もまた遺伝的に規定されている場合があり，現在，解析されつつある．種特異的な物理的遮蔽やR蛋白質を介した抵抗性反応，また，その両方からなるものが示唆されているが，まだその機構の全体像はみえていない[38]．

I. R蛋白質による抵抗性発現を制御する因子

1. RAR1

オオムギ *rar1* 変異体は，うどんこ病菌(*Blumeria graminis* f sp. *hordei*)に対する抵抗性を喪失した変異体として単離された[4]．*rar1* 変異体は，過敏感反応による細胞死とそれにさきだって観察される H_2O_2 の生成が認められず，このことは，*RAR1* 遺伝子が抵抗性応答シグナルの初期段階に関与していることを示している[5](図3)．そののち，シロイヌナズナ *rar1* 変異体の単離，タバコの *RAR1* 遺伝子のサイレンシング実験により，卵菌類，細菌，ウイルスといった多くの病原体に対する抵抗性発現においても *RAR1* 遺伝子の機能が必須であることがわかった[6,7]．これらの研究結果は，*RAR1* 遺伝子は単子葉・双子葉の両植物種において多様な *R* 遺伝子を介した抵抗性反応に関与していることを示している．*RAR1* 遺伝子は，システイン残基とヒスチジン残基に富む約60アミノ酸残基からなるCHORDドメインを2つ，タンデムに配した推定分子量25.5Kの蛋白質をコードしており，酵母を除く真核生物全般に単一コピー遺伝子として存在する(図4a)．線虫においては，*RAR1* 遺伝子ホモログである *Chp* 遺伝子のサイレンシング実験により生殖細胞の発達不全と胚性致死をひき起こすことから，細胞機能に必須な役割をはたしていることがわかっている[5]．さらに，コウジカビの *Chp* 遺伝子欠損株では二倍体が形成できないという表現型を示すが，一倍体においては *Chp* 遺伝子は必要ないことがわかっており，カビなどでは細胞機能には必須でないと考えられている[8]．シロイヌナズナ *rar1* 欠損変異体では植物免疫不全以外の表現型はみつかっておらず，植物において *RAR1* 遺伝子は生育に不可欠な機能ははたしていないようである[7]．

2. SGT1

RAR1をベイトとした酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより，SGT1が単離された[9]．SGT1は，酵母の細胞周期制御に必須なSGT1の植物オルソログで，真核生物全般に広く保存されており，植物の *SGT1* 遺伝子は酵母 *sgt1* 変異体を相補できる．SGT1はTPRドメイン，CSドメイン，SGSドメインという高度に保存された3つのドメインで構成され(図4a)，RAR1のCHORD-IIドメインとSGT1のCSドメインが相互作用する(図4b)．*SGT1* 遺伝子のサイレンシング実験の結果，*R* 遺伝子である *MLA6* 遺伝子，*Rx* 遺伝子，*N* 遺伝子を介したうどんこ病やウイルスに対する病害抵抗性反応に必須であることがわかった[10]．シロイヌナズナには2つの *SGT1* 遺伝子ホモログ，*SGT1a* 遺伝子と *SGT1b* 遺伝子が存在するが，*sgt1b* 変異体の解析により *SGT1b* 遺伝子はべと病菌(*Hyaloperonospora parasitica*)に対する

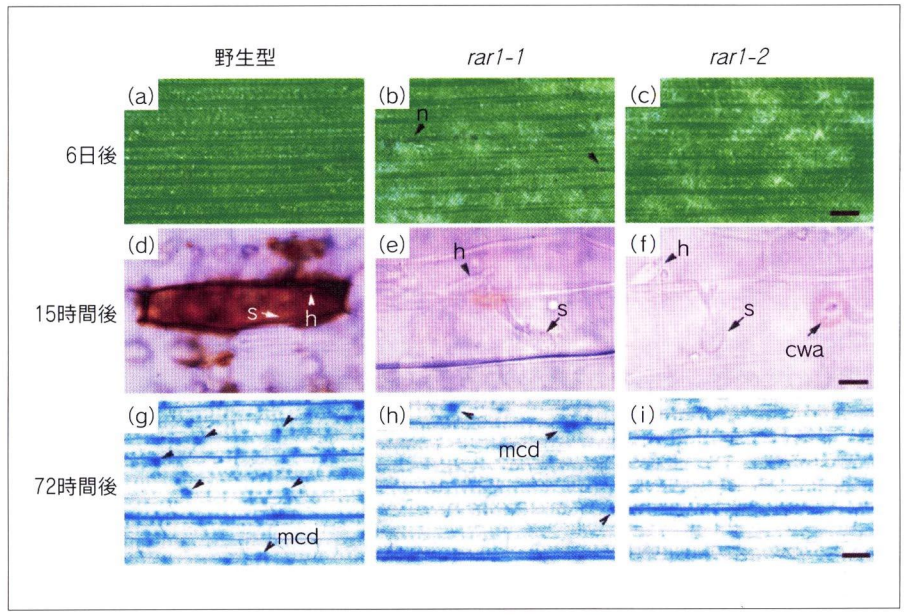


図3　オオムギ *rar1* 変異体と野生型のうどんこ病感染に対する表現型
AvrMla12エフェクター蛋白質を発現するうどんこ病菌の接種に対するオオムギの表現型．(a)，(d)，(g)は野生型，(b)，(e)，(h)は *rar1-1* 変異体，(c)，(f)，(i)は *rar1-2* 変異体．(a)，(b)，(c)は感染6日後の葉身．*rar1* 変異体では菌糸の増殖が白い斑点として確認できる．バーは200 μm．(d)，(e)，(f)は感染15時間後のDAB染色による H_2O_2 の検出．野生型には感染に伴う H_2O_2 の産生が確認されるが，*rar1* 変異体にはみられない．バーは50 μm．(g)，(h)，(i)は感染72時間後のトリパンブルー染色による死細胞の検出．野生型には葉肉細胞の過敏感反応細胞死が確認される(矢印)．バーは100 μm．
[文献5より許可を得て転載]

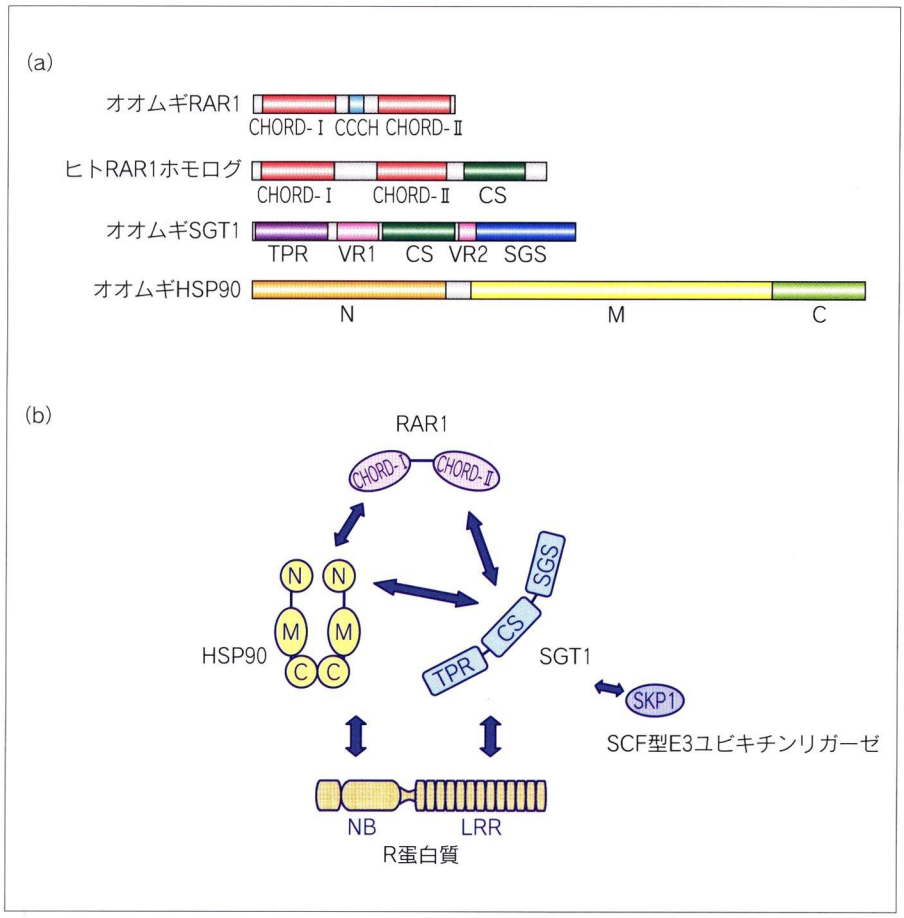


図4 RAR1，SGT1，HSP90の一次構造と相互作用地図
(a) オオムギにおけるR蛋白質複合体構成因子RAR1，SGT1，HSP90と，ヒトRAR1ホモログのドメイン構造．植物のRAR1には，2つのCHORDドメイン(CHORD-Ⅰ，CHORD-Ⅱ)のあいだに高度に保存された，CCCH残基を含む約20アミノ酸残基のモチーフが存在する．ヒト，ショウジョウバエ，線虫のRAR1にはCSドメインが存在するが，これは，植物においてはRAR1結合蛋白質であるSGT1にみられる．
(b) RAR1，SGT1，HSP90およびR蛋白質とのドメイン間相互作用の関係．RAR1-SGT1-HSP90複合体は互いに複雑に相互作用し，シャペロン様複合体を形成する．R蛋白質とはSGT1，HSP90を介して結合している．植物SGT1はまた，酵母SGT1と同様に，SKP1と相互作用することがわかっており，R蛋白質複合体として以外の別の役割が示されている．実際，SGT1は植物ホルモンであるオーキシン応答における，SCF^{TIR1}を介したAux/IAA標的蛋白質の分解に関与することがわかっている[40]．

R 遺伝子(*RPP2* 遺伝子，*RPP4* 遺伝子，*RPP5* 遺伝子，*RPP7* 遺伝子)を介した抵抗性にも必須であることがわかった[11,12]．また，*rar1 sgt1b* 二重変異体の解析により，*RAR1* 遺伝子と *SGT1b* 遺伝子は *RPP5* 遺伝子を介した抵抗性に相加的に関与することが明らかとなった[11]．一方，*sgt1a* 変異体については病害抵抗性に関する表現型は見いだされていないが，*SGT1a* 遺伝子の過剰発現が *sgt1b* 変異体を相補しうることを確認している(Azevedoら；未発表)．さらに，*sgt1a sgt1b* 二重変異体は致死を示すことから，酵母同様に，生育に必須な生理機能への関与が示された．RAR1は生育に必須ではないことから，SGT1はRAR1よりも多機能であると考えられる．

3. HSP90

HSP90は分子シャペロンとして知られるが，SGT1と同様の手法により，RAR1結合蛋白質として単離・同定された[13](図4a)．RAR1は，CHORD-Ⅰドメインを介してHSP90のATPaseドメインを含むN末端領域と相互作用する．一方，HSP90はSGT1のCSドメインとも結合する(図4b)．免疫沈降実験により，HSP90とRAR1およびSGT1との *in vivo* での結合が確かめられている[14]．HSP90阻害剤であるゲルダナマイシンを処理した植物では，*R* 遺伝子 *RPS2* を介した抵抗性が失われた．また，シロイヌナズナゲノムに4つ存在する *HSP90* 遺伝子ホモログのひとつ *HSP90-1* 遺伝子の破壊株では，*RPS2* 遺伝子による抵抗性が弱まっていることがわかった[13]．さらに，*R* 遺伝子 *RPM1* を介した抵抗性は，もうひとつの *HSP90* 遺伝子ホモログである *HSP90-2* 遺伝子のATPaseドメインへのミスセンス変異導入によって喪失する[14]．タバコ *HSP90* 遺伝子のサイレンシング実験により，*Pto* 遺伝子，*Rx* 遺伝子，*N* 遺伝子を介した抵抗性にも必須であることがわかり，HSP90もまた，多くの病害抵抗性応答に関与していることが示された[15]．

II. RAR1-SGT1-HSP90 複合体の役割

1. RAR1-SGT1-HSP90 複合体と R 蛋白質の相互作用

分子量 108 K の R 蛋白質 MLA1 は，非感染葉細胞においては分子量 700～800 K の画分に観察される[16]．また，RPM1 は分子量 440～1,500 K の画分に存在することから，R 蛋白質は定常状態においてヘテロ多量体を形成しているようである[17]．酵母ツーハイブリッド実験により，SGT1 と MLA1 との結合が確認された[18]．また，*in vivo* 免疫沈降実験において，R 蛋白質 Bs2 と SGT1 との結合が示されている[19]（図 4 b）．一方，HSP90 が RPM1 や N と結合することも示されている[14,20]．以上の結果から，RAR1-SGT1-HSP90 複合体は R 蛋白質と直接的に相互作用して，①R 蛋白質複合体形成と安定化，②R 蛋白質複合体のエフェクター蛋白質認識後の活性化制御，③負の制御因子の除去もしくは正の制御因子の動員や活性化による下流シグナルの調節，のいずれかの過程を制御している可能性が考えられる．

2. R 蛋白質安定化

最近になって，RAR1 や SGT1 が R 蛋白質の安定性を規定していることがわかってきた．たとえば，RPM1，Rx，MLA1，そして，MLA6 の蛋白質量が *rar1* 変異体で著しく低下していることが発見された[18,21]（**図 5**）．また，*SGT1* 遺伝子のサイレンシング植物においても Rx 量の低下が確認された．一方，*hsp 90-2* 変異体においては RPM1 量が減少しており[14]，*HSP 90* 遺伝子のサイレンシング植物においても Rx の蓄積レベルが減少する[15]．これらのことは，RAR1-SGT1-HSP90 複合体が R 蛋白質の安定化に関与している可能性を示している．*MLA1* 遺伝子と *MLA6* 遺伝子は同じ遺伝子座に存在し，高い相同性を示す *R* 遺伝子であるにもかかわらず，*rar1* 変異により *MLA6* 遺伝子を介した抵抗性反応は欠失するが，*MLA1* 遺伝子の抵抗性には影響がみられない[18]．それは，*rar1* 変異体では MLA1，MLA6 の蛋白質量はともに低下するが，その MLA6 の存在量は MLA1 に比して少ないことが原因だろう（図 5 a）．R 蛋白質量の違いと *rar1* 変異によって失われる抵抗性の一致を考慮すると，十分な抵抗性反応の発現にはある一定量以上の R 蛋白質が必要であるものと考えられる．したがって，RAR1，SGT1，HSP90 のそれぞれの各 R 蛋白質の安定化に対する関与の度合いの差が，抵抗性表現型への違いとなって現われているのだろう．また，細胞にとって害となりうる不要な抵抗性反応を防ぐため，R 蛋白質量の厳密な調節が重要であるのかもしれない．

3. 蛋白質分解系とのかかわり

SGT1 は，植物細胞内において少なくとも 2 つの複合体形成に関与していると考えられている．ひとつは RAR1-SGT1-HSP90 複合体で，もうひとつは SCF（Skp1-Cullin-Fbox）型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体である（図 4 b）．酵母 SGT1 は，SCF 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体，セントロメア結合因子 3（centromere-binding factor3；CBF3）キネトコア複合体，そして，アデニルシクラーゼとの複合体に含まれており，その多機能性が示されている．E3 ユビキチンリガーゼは特定の基質をユビキチン化してプロテアソームによる分解の標的とし，さまざまな生理現象にかかわる多くの蛋白質の安定化や活

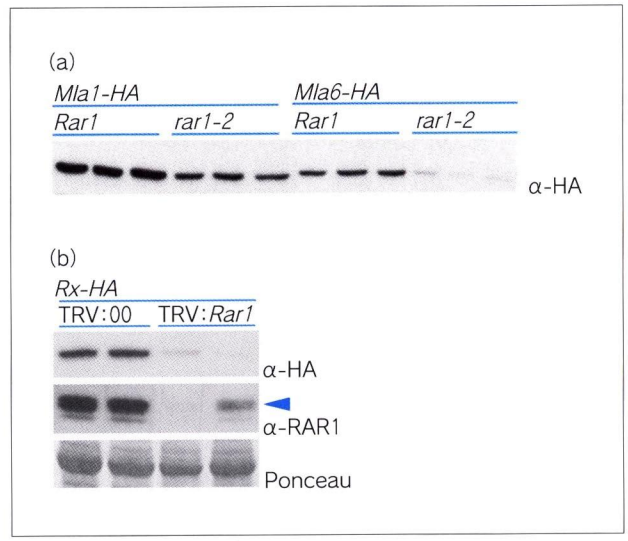


図 5　*rar1* 変異体における R 蛋白質量の低下
(a) オオムギにおける MLA1 および MLA6 の HA タグ付加蛋白質のウェスタンブロットによる検出．*rar1* 変異体背景において，MLA1 および MLA6 の蛋白質レベルの低下が認められ，*RAR1* 遺伝子の R 蛋白質安定化への関与が示された．*rar1* 変異は *MLA1* 遺伝子の抵抗性には影響しないが，*MLA6* 遺伝子の抵抗性は失われることから，ある一定量の R 蛋白質が抵抗性発現に必要なのではないかと考えられる．
(b) タバコにおける HA タグ付加 Rx 蛋白質のウェスタンブロットによる検出．*RAR1* 遺伝子サイレンシング植物において，Rx 蛋白質レベルの低下がみられる．*RAR1* 遺伝子サイレンシングにおいては *Rx* 遺伝子を介した抵抗性が喪失するが，それは Rx の不安定化が原因であることがわかる．[文献18より許可を得て転載]

性化の制御に広範な役割をはたしている．*SKP1* 遺伝子のサイレンシング実験によりタバコモザイクウイルスに対する *N* 遺伝子の抵抗性が失われることがわかり，SCF複合体の *R* 遺伝子誘導型抵抗性への関与が示されている[22]．

また，SGT1 は COP9 シグナルソームの構成要素である CSN4，CSN5 とも相互作用する[9,22]．COP9 シグナロソームは進化上，真核生物に高度に保存されており，26S プロテアソームの 19S 制御サブユニット lid との有意な類似性を示し，SCF 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体の活性調節を介してユビキチン依存的蛋白質分解を制御する．COP9 のサブユニットのうちの 2 つ，CSN3 と CSN8 をコードする遺伝子のサイレンシングにより，*N* 遺伝子を介したタバコモザイクウイルスへの抵抗性が失われた[22]．これらのデータは，病原体抵抗性シグナル伝達へのユビキチン化の関与を強く示唆している．植物の SGT1 は，抵抗性制御蛋白質群を特異的な SCF 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体を介して，26S プロテアソームにより分解する役割をはたしているのではないだろうか．この場合，標的蛋白質は病害抵抗性を負に制御する因子，もしくは，R 蛋白質それ自身であろう．実際，R 蛋白質 RPM1 は抵抗性反応において急速に分解される[23]．これは，病原体侵入を受けたごく少数の細胞のみに過敏感反応が限られるようにするための脱感作制御なのかもしれない．

III. R 蛋白質の活性化メカニズム，“リガンド-レセプター型”と“ガード型”

1. リガンド-レセプター型

Flor の“遺伝子対遺伝子説”によれば，R 蛋白質はレセプターとして病原体の生産するリガンドを直接に認識すると考えられる．リガンドに変異が起こった病原体は認識を避けられるために増殖するが，一方では *R* 遺伝子にも変異が起こり，新しく変異の起こったリガンドを認識できる植物が生き残る．つまり，植物側にも病原体側にも，その相互作用を規定する遺伝子座に多くの多型がみられることになる．これはレセプターとリガンドが直接に相互作用することを示唆している．このような例は植物とカビなどの病原体では多くみられる．

2. ガード型

R 蛋白質が病原菌のエフェクター蛋白質を直接に認識するリガンド-レセプター型に対し，ほかの蛋白質を介してエフェクター蛋白質を認識するものはガード型とよばれる．たとえば，ジャガイモ X ウイルス耐性を与える Rx の生化学的解析から分子内相互作用が示されているが，この結合は Rx に認識されるウイルスコート蛋白質の存在下で解離する(**図 6** a)．また，シロイヌナズナの R 蛋白質 RPM1 と RPS2 は，RIN4 という蛋白質を介してエフェクター蛋白質である AvrRpm1 と AvrRpt2 をそれぞれ認識する[24,25](図 2)．RIN4 は AvrRpm1 を注入するトマト斑葉細菌病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)の感染にともなってリン酸化され，RPM1 はこの修飾を認識し活性化すると考えられている(図 6 b)．一方，AvrRpt2 はシステインプロテアーゼであり RIN4 を切断する．*RIN4* 遺伝子のノックアウト変異体が RPS2 を活性化することから，RPS2 は AvrRpt2 による RIN4 の分解を認識しているようである[26](図 6 c)．つまり，R 蛋白質(守る側として guardian)は，病原体のエフェクター蛋白質によって標的とされうる細胞内蛋白質(守られる側として guardee，この場合，RIN4)と結合することでこれをガードしており，その変化を病原体侵入のシグナルとして認識することで活性化し，抵抗性反応を発動していると考えられる[17]．

もうひとつの例としては，RPS5 のケースがあげられる．シロイヌナズナ RPS5 は同じくトマト斑葉細菌病のエフェクター AvrPphB を認識するが，この認識にはプロテインキナーゼである PBS1 を必要とする(図 2)．AvrPphB はシステインプロテアーゼであり，直接の基質である PBS1 を切断する．つまり，RPS5 は AvrPphB の侵入を PBS1 の分解という形で認識しているようである[27]．

このように，多くの R 蛋白質が細胞内蛋白質をガードしていてその分解または修飾を認識しているとすれば，これらの細胞内蛋白質を欠損した変異体は R 蛋白質がつねに活性化状態になり，細胞死を誘発する表現型を示すはずである．また同時に，それをガードする R 蛋白質に変異があれば，その細胞死の表現型は抑制されるはずである．この例がシロイヌナズナ細胞死変異体 *bon1/cpn1* の解析から得られている[28]．*bon1/cpn1* 変異体は恒常的な抵抗性反応と矮小化を示す変異体であ

り，その表現型は*R* 遺伝子 *SNC1* の欠失によって抑圧される．BON1/CPN1 は細胞膜近傍に局在するリン脂質結合蛋白質 copine をコードしているが，なんらかの病原体エフェクター蛋白質によって標的とされるのか，あるいは，SNC1 によって直接的にガードされているかは，いまのところ不明である(図 6d)．

また，別の事例として，シロイヌナズナ細胞死変異体 *slh1* があげられる[29]（**図 7**）．*slh1* 変異体は恒常的な防御応答を示す変異体で，*SLH1* 遺伝子は青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)に対する抵抗性を付与する R 蛋白質 RRS1-R をコードしている．RRS1-R/SLH1 蛋白質は細胞質型 NBS-LRR 型 R 蛋白質であるが，その C 末端に WRKY ドメインが融合している(図 2)．この WRKY ドメインをもつ蛋白質は転写因子様蛋白質として植物に広く存在し，大きなファミリーを形成している．このファミリーの多くは病害抵抗性反応において転写誘導され，防御応答への関与が示唆されている．*slh1* 変異は WRKY ドメインへの 1 アミノ酸残基挿入変異であり，WRKY ドメインはなんらかのメカニズムによって N 末端の TIR-NBS-LRR ドメインの活性化を負に制御していると

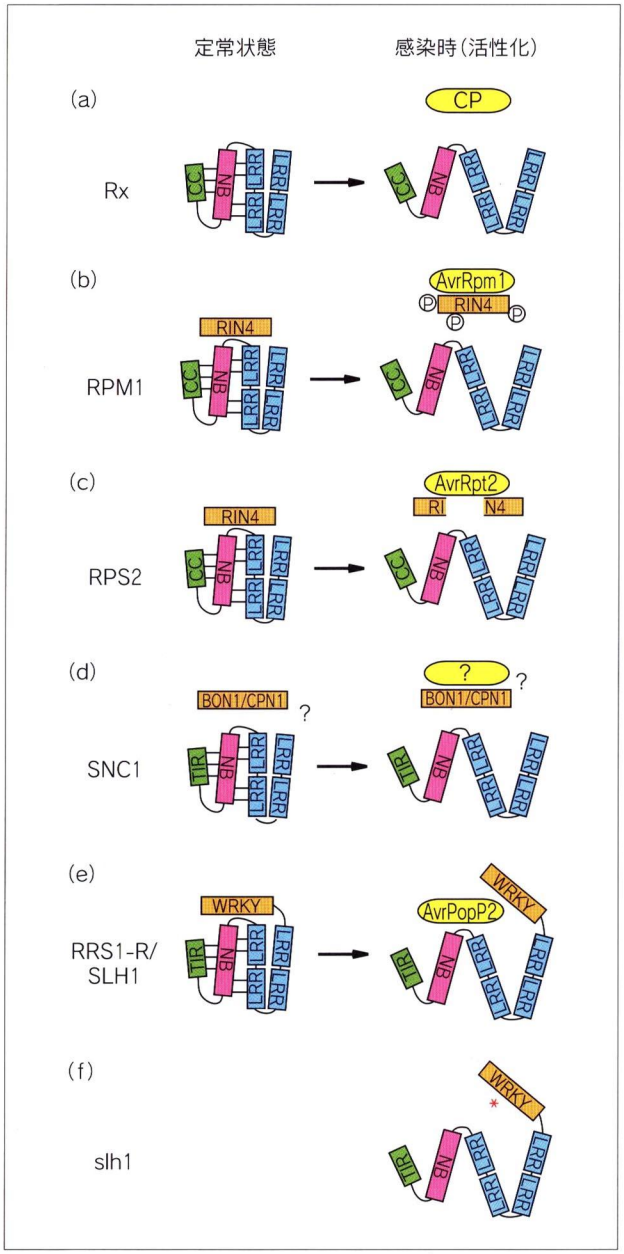


図 6　R 蛋白質の分子内ドメイン間相互作用とガード仮説

(a) ジャガイモ X ウイルス耐性を与える Rx の生化学的解析により，CC-NBS 間および NBS-LRR 間の分子内相互作用が示された．この結合は，Rx に認識されるウイルスコート蛋白質(CP)の存在下で解離することから，この分子内コンフォメーション変化が活性化にかかわると考えられる[41]．

(b) RPM1，および，(c) RPS2 は，RIN4 との結合によって安定化されており，エフェクター蛋白質による RIN4 のリン酸化(b)，または，分解(c)により，R 蛋白質が活性化する．病原体は植物の basal defense を制御する RIN4 を攻撃し，一方で，植物は RIN4 を監視することで病原体の侵入を感知するという関係がみえる．これらのデータから，R 蛋白質はある種の細胞内蛋白質をつねにガードしており，病原体を間接的に認識して活性化するのではないかというガード仮説が提唱されている．

(d) BON1/CPN1 の変異により，SNC1 を介した抵抗性反応が活性化する．BON1/CPN1 は SNC1 を負に制御する因子であるといえる．BON1/CPN1 が直接的に SNC1 と結合するかどうか，また，なんらかのエフェクター蛋白質によって標的とされているかどうかは不明である．

(e) および (f) TIR-NBS-LRR-WRKY 型の RRS1-R/SLH1 は AvrPopP2 と直接に相互作用する[42] (e)．WRKY ドメイン上の *slh1* 変異により自己活性化が導かれることから(f)，ガード仮説に照らしあわせると，TIR-NBS-LRR ドメインの分子内相互作用が WRKY ドメインによって安定化されていると考えられる．

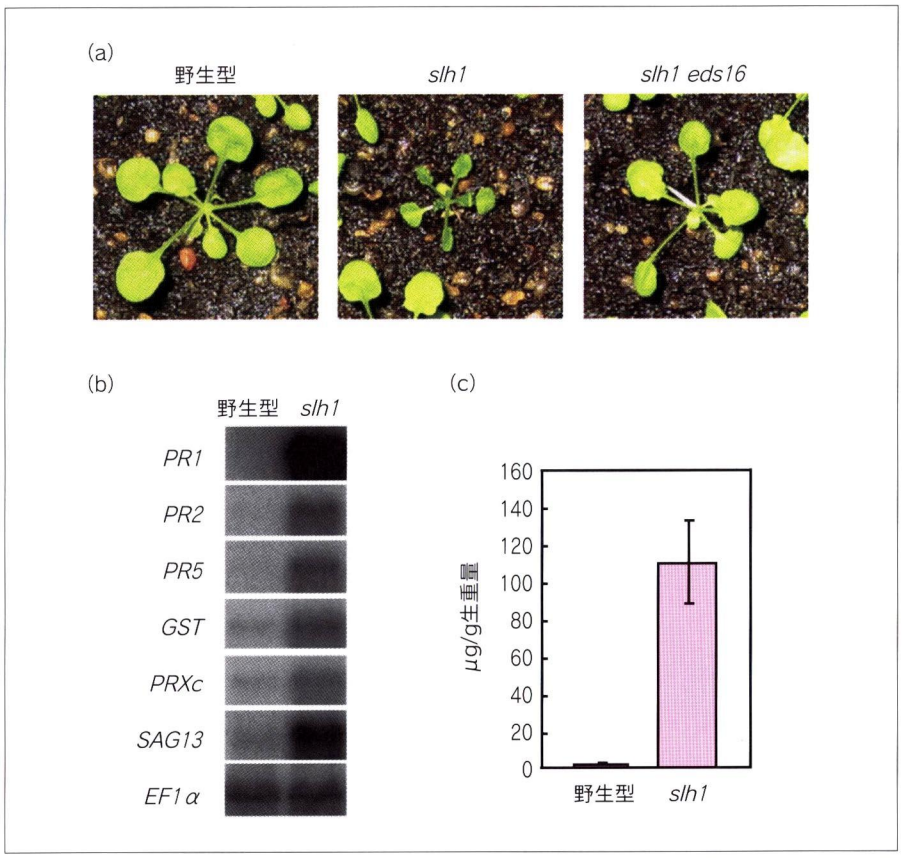


図7 シロイヌナズナ細胞死変異体 *slh1* の表現型
(a) *slh1* 変異植物体の表現型．*slh1* 変異体は恒常的な病害抵抗性応答と細胞死を誘導し，矮小化と致死性を示す．サリチル酸欠損変異である *eds16* 変異体との二重変異により *slh1* 変異体の表現型は抑圧されることから，病害抵抗性応答におけるサリチル酸の重要性がわかる．
(b) *slh1* 変異体のノーザンブロット解析．病害抵抗性応答のマーカー遺伝子群の恒常的発現が認められる．植物の病害抵抗性においては，抗菌性蛋白質群をコードする *PR*（pathogenesis-related，病原性関連）遺伝子，酸化的ストレス応答に関与するグルタチオン-*S*-トランスフェラーゼ(GST)とペルオキシダーゼ(PRXc)の遺伝子，老化関連遺伝子のひとつ *SAG13* 遺伝子などが発現誘導される．
(c) *slh1* 変異体における全サリチル酸量の測定．R蛋白質を介した病害抵抗性応答においてはサリチル酸が誘導され，これは下流シグナルの発現に必須である．
［文献29より許可を得て転載］

いうことがわかる．*slh1* 変異によりSLH1のWRKYドメインがそのDNA結合能を失うことから，ひとつの可能性として，SLH1はそのWRKYドメインでつねにDNAに結合して病原体抵抗性反応を抑制していることが考えられるが，その一方で，ガード仮説に照らしあわせてみると別の可能性も考えられる．つまり，WRKYドメインはguardeeとしてTIR-NBS-LRRドメインと相互作用して守られているが，*slh1* 変異によってこの結合が阻害されるとN末端ドメインが活性化してしまう，というモデルである(図6e，f)．

最近の研究により，RIN4は植物においてbasal defenseの制御にかかわっていることがわかった[30]．病原体は植物防御機能に重要な役割をはたす因子のひとつであるRIN4を標的とし，その防御応答を撹乱・抑制することで，自身の侵入に容易な環境を得ることになる．これと一致して，細菌のエフェクター蛋白質のひとつであるAvrPtoBも宿主防御応答を抑える能力があることがわかっている[31]．WRKY蛋白質ファミリーも，植物防御において重要な役割をはたしていることを考慮すると，R蛋白質によって守られているとしても不思議ではない．病原体エフェクター蛋白質の標的分子guardeeの単離は，すなわち，新たな植物防御因子の同定につながることとなろう．

Ⅳ．ロゼッタストーン原理からみえる蛋白質相互作用

線虫のRAR1ホモログは2つのCHORDドメインのほかにCSドメインをもっており，一方，高等植物ではこのドメインはRAR1と相互作用するSGT1に見いだされる(図4a)．このように，ある種においてはひとつの蛋白質にみられる2つのドメインが，ほかの種においては2つの別々の蛋白質に存在する例が知られている．このような場合，2つのドメインは物理的および機能的に関連している確率が高く，ロゼッタストーン原理とよばれている[32]．

実際，オオムギやシロイヌナズナのRAR1に存在するCHORD-ⅡドメインはSGT1のCSドメインと相互作用する．前述のR蛋白質RRS1-R/SHL1は典型的なR蛋白質にWRKYドメインが融合した構造で，類似のR蛋白質はシロイヌナズナゲノムにもうひとつあり，また，イネにおいても同様の蛋白質が確認される．これら

の存在は，WRKYドメインがR蛋白質に近いところで機能している可能性を示しているのかもしれない．また，シロイヌナズナのMAPキナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)であるMEKK4は，TIR-NBS-LRRドメインとWRKYドメインをもつ蛋白質である．この蛋白質の機能は明らかになっていないが，MAPキナーゼカスケードそしてWRKYドメインとR蛋白質との機能相関も考えられる．このようなロゼッタストーン原理を基にした病害抵抗性に関連する蛋白質の推定も，今後の解析のひとつの手段になりうるのではなかろうか．実際，タバコにおいて，MAPKKK α を含むMAPキナーゼカスケードがR蛋白質によって起こる過敏感反応を正に制御していることがわかっている[33]．また，シロイヌナズナMAPキナーゼのMPK4はSARの負の制御因子であり[34]，MKS1を介してWRKYファミリー蛋白質と相互作用することが知られている[35]．これらの制御因子群はR蛋白質複合体中で制御されているのかもしれない．今後の検証により，病害抵抗性応答の制御メカニズムがより詳細に理解されることが期待される．

おわりに

動的な免疫細胞をもたない植物は，すべての細胞において多様なR蛋白質群を配備し，病原菌の侵入に備えている．つまり，植物免疫反応は細胞自律的(cell autonomous)であり，R蛋白質を介した自己の細胞死という劇的な生理変化を利用して病害微生物への耐性を得ている．したがって，R蛋白質のあやまった制御は過敏感反応細胞死の自己活性化につながり，自身にとって有害となる．実際，R蛋白質の変異による細胞死変異体は全身的な激しい生育阻害と矮小化を示し致死となる．また，*Rx* 遺伝子，*RPM1* 遺伝子，*RPS2* 遺伝子，*PRF* 遺伝子といった *R* 遺伝子の過剰発現によっても病害抵抗性応答が誘導されることが知られており，R蛋白質量の制御も重要であることがわかる．このように，不適当な活性化を抑え，適当な刺激に対する急速でかつ一過的な活性化を実現するために，R蛋白質の高度な制御機構が必要とされるが，RAR1-SGT1-HSP90複合体はそのシャペロン様機能により，R蛋白質複合体の会合，活性化，また，下流へのシグナル伝達の制御を行なっていると考えられる．

植物病害抵抗性応答は，実用的見地からの重要性にもかかわらず，まだまだ大きな未知領域をかかえている．工夫を凝らした遺伝学的アプローチ，生化学的解析，細胞生物学的解析によってこれらの問題が解決されてゆくであろう．筆者らは，プロテオミクス，メタボロミクス，ケミカルジェネテクス(化学遺伝学)を中心にして，蛋白質レベルでのスイッチング機構解明と，新規遺伝子および低分子化合物の同定を通じ，植物免疫システムの分子機構の研究を展開していきたいと考えている．

文献

1) Dangl, J. L., Jones, J. D.：*Nature*, 411, 826-833(2001)
2) Meyers, B. C. *et al*.：*Plant Cell*, 15, 809-834(2003)
3) Kjemtrup, S., Nimchuk, Z., Dangl, J. L.：*Curr. Opin. Microbiol*., 3, 73-78(2000)
4) Torp, J., Jorgensen, J. H.：*Can. J. Genet. Cytol*., 28, 725-731(1986)
5) Shirasu, K. *et al*.：*Cell*, 99, 355-366(1999)
6) Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar, S. P.：*Plant J*., 30, 415-429(2002)
7) Muskett, P. R. *et al*.：*Plant Cell*, 14, 979-992(2002)
8) Sadanandom, A. *et al*.：*Eukaryot. Cell*, 3, 984-991(2004)
9) Azevedo, C. *et al*.：*Science*, 295, 2073-2076(2002)
10) Peart, J. R. *et al*.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 10865-10869(2002)
11) Tor, M. *et al*.：*Plant Cell*, 14, 993-1003(2002)
12) Austin, M. J. *et al*.：*Science*, 295, 2077-2080(2002)
13) Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., Shirasu, K.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11777-11782(2003)
14) Hubert, D.A. *et al*.：*EMBO J*., 22, 5679-5689(2003)
15) Lu, R. *et al*.：*EMBO J*., 22, 5690-5699(2003)
16) Shirasu, K., Schulze-Lefert, P.：*Trends Plant Sci*., 8, 252-258(2003)
17) Belkhadir, Y., Subramaniam, R., Dangl, J. L.：*Curr. Opin. Plant Biol*., 7, 391-399(2004)
18) Bieri, S. *et al*.：*Plant Cell*, 16, 3480-3495(2004)
19) Leister, R.T. *et al*.：*Plant Cell*, 17, 1268-1278(2005)
20) Liu, Y. *et al*.：*J. Biol. Chem*., 279, 2101-2108(2004)
21) Tornero, P. *et al*.：*Plant Cell*, 14, 1005-1015(2002)
22) Liu, Y. *et al*.：*Plant Cell*, 14, 1483-1496(2002)
23) Boyes, D. C., Nam, J., Dangl, J. L.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 15849-15854(1998)
24) Mackey, D., Holt, B. F. 3rd, Wiig, A., Dangl, J. L.：*Cell*, 108, 743-754(2002)
25) Mackey, D. *et al*.：*Cell*, 112, 379-389(2003)
26) Belkhadir, Y. *et al*.：*Plant Cell*, 16, 2822-2835(2004)
27) Shao, F. *et al*.：*Science*, 301, 1230-1233(2003)
28) Yang, S., Hua, J.：*Plant Cell*, 16, 1060-1071(2004)
29) Noutoshi, Y. *et al*.：*Plant J*., 43, 873-888(2005)
30) Kim, M. G. *et al*.：*Cell*, 121, 749-759(2005)
31) Abramovitch, R. B. *et al*.：*EMBO J*., 22, 60-69(2003)
32) Marcotte, E. M. *et al*.：*Science*, 285, 751-753(1999)

33) del Pozo, O., Pedley, K. F., Martin, G. B.：*EMBO J.*, 23, 3072-3082 (2004)
34) Petersen, M. *et al.*：*Cell*, 103, 1111-1120 (2000)
35) Andreasson, E. *et al.*：*EMBO J.*, 24, 2579-2589 (2005)
36) Asai, T. *et al.*：*Nature*, 415, 977-983 (2002)
37) Tao, Y. *et al.*：*Plant Cell*, 15, 317-330 (2003)
38) Lipka, V. *et al.*：*Science*, 310, 1180-1183 (2005)
39) Ellis, J., Catanzariti, A. M., Dodds, P.：*Trends Plant Sci.*, 11, 61-63 (2006)
40) Gray, W. M., Muskett, P. R., Chuang, H. W., Parker, J. E.：*Plant Cell*, 15, 1310-1319 (2003)
41) Moffett, P., Farnham, G., Peart, J., Baulcombe, D. C., *EMBO J.*, 21, 4511-4519 (2002)
42) Deslandes, L. *et al.*：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 8024-8029 (2003)

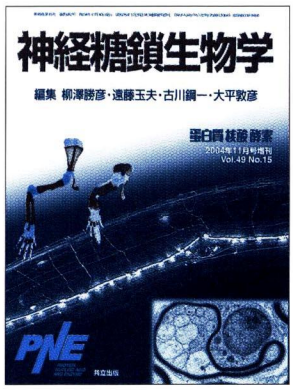
白須 賢

略歴：1993年 米国California大学Davis校遺伝学科Ph.D修了，1993年 米国Salk研究所 ポスドクフェロー，1996年 英国John Innesセンター Sainsbury研究所 研究員，2000年 同 グループリーダーを経て，2005年より理化学研究所植物科学研究センター グループディレクター． **研究テーマ**：植物免疫の分子機構の解明． **関心事**：アフリカ． **抱負**：植物免疫を中心としたIntegrated Biologyを展開したい．

蛋白質 核酸 酵素　◆2004年11月号増刊　Vol. 49 No. 15◆

神経糖鎖生物学

編集：柳澤勝彦・遠藤玉夫・古川鋼一・大平敦彦



A4変型判・222頁
定価3,600円(税込)

共立出版

CONTENTS

I. 総　論
神経生物学における糖鎖研究の意義と展望

II. 特別寄稿
挑発する脳――糖鎖神経化学今昔／今浦島の目に映る日本の科学研究制度――「束の間の幻影」／日本糖鎖科学コンソーシアム（JCGG）の設立

III. 糖鎖と神経・筋機能
ショウジョウバエ神経発生における糖鎖の役割／糖鎖の機能を線虫 *C. elegans* の神経系で探る／糖鎖と神経特異的ユビキチンリガーゼ 他

IV. 遺伝子改変マウスを用いた機能解析
ガングリオシド合成酵素ノックアウトマウスにおける神経機能解析／神経機能維持におけるIgスーパーファミリー糖蛋白質ベイシジンの役割 他

V. 糖鎖と神経・筋疾患，病態モデル
O-マンノース型糖鎖不全による先天性筋ジストロフィー／福山型先天性筋ジストロフィーとαジストログリカノパチー／アミロイドβ蛋白質重合とガングリオシド 他