

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660037

研究課題名(和文)新奇無細胞タンパク質合成系を用いたサリチル酸受容体の構造解析

研究課題名(英文) Analysis of salicylic acid receptor produced by novel in vitro translation system

研究代表者

多田 安臣 (Tada, Yasuomi)

名古屋大学・学内共同利用施設等・教授

研究者番号：40552740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：無細胞タンパク質合成系によるタンパク質誘導能の最適化を行った。本研究により、アミノ酸、ATPやGTPの至適濃度を決定した。さらに、転写鑄型作成時に用いる3'UTR配列の至適化を行い、従来1000 bp以上の長い3'UTRを必要とするところを約20 bpまでに削減することに成功した。本配列及び、上記至適条件により、従来のタンパク質合成量と比較し、10倍以上の合成能力を得ることができた。現在本系を用いて、サリチル酸受容体のタンパク質立体構造解析を目的とした大量合成を行っている。

研究成果の概要(英文)：Optimization of in vitro protein synthesis system was performed. We determined the optimum concentrations of amino acids, ATP and GTP used for the wheat germ-derived translation solution. Furthermore, we shortened the 3'UTR sequence attached to an ORF to stabilize in vitro transcribed mRNA. We achieved about 10-fold efficiency in producing any proteins with the above conditions.

研究分野：植物生理学

キーワード：無細胞タンパク質合成系

1. 研究開始当初の背景

サリチル酸(SA)は植物ホルモンの一種であり、細胞内酸化還元状態(レドックス)を動的に変化させることにより植物免疫を活性化する。このSA依存的な誘導抵抗性において転写補助因子であるNPR1は中心的な役割を担っている。申請者は、健全葉においてNPR1はジスルフィド結合を介した非活性のオリゴマーとして存在しているが、免疫応答時にレドックスが変動すると活性型のモノマーが核へと移行することを示した。NPR1は核内でTGAファミリー転写因子と複合体を形成することにより、感染特異的遺伝子群を発現誘導し、全身獲得抵抗性(SAR)と呼ばれる植物特有の獲得免疫を成立させる。

申請者らはDuke大学と共同で、NPR1のパラログであるNPR3及びNPR4がSA受容体であることを明らかにした。NPR3/4はCullin 3コピキチンE3リガーゼのアダプタータンパク質として機能し、SA制御下でNPR1と相互作用することを示した。

NPR1及びそのパラログであるSA受容体は、N末端にBTBドメインとANK、C末端に核移行シグナルを有している。NPR3とNPR4は、NPR1と同様にTGA転写因子と結合することが示され、転写補助因子としての機能的保存性も示唆されていた。これまでに発見された他の植物ホルモン受容体のうち、オーキシンとジャスモン酸受容体はプロテアソームによる分解系を制御するF-boxタンパク質であり、ジベレリン受容体は同分解系の補助的な役割を担うものであった。アブシジン酸受容体は、脱リン酸化酵素阻害タンパク質であり、それ以外のサイトカイニン、エチレン及びブラシノステロイド受容体は細胞膜に局在する受容体型タンパク質キナーゼであった。また、三次元構造上における植物ホルモン認識機構は、オーキシンとジャスモン酸受容体は同族であるため同様であるが、それ以外については明確な類似性はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は植物のSAシグナル伝達の分子機構を構造生物学的視点から明らかにすることにある。しかし、NPR1とそのパラログの全長タンパク質は大腸菌、酵母や昆虫細胞などの異種生物での生産は極めて困難である。そこで、コムギ無細胞系を用いた大量発現系の開発を行い、SA-NPR3/4-NPR1複合体の立体構造をX線結晶構造解析によって明らかにする。

これまでのSA研究はSAシグナル伝達系に変異のある系統を作製し、その原因遺伝子を探る遺伝学的なアプローチが主流であり、構造生物学的な解析は皆無であった。従って、本領域のみならず植物科学への貢献度を考慮にいと、もしSA-NPR3/4-NPR1複合体の立体構造決定に成功すれば、その結果は

他の植物ホルモンと受容体の構造解析と同等の成果になると言える。また、コムギ無細胞タンパク質合成系は大腸菌などより組換えタンパク質の可溶化率に優れているが、その生産量が極めて少ないことが問題点として挙げられる。本系をタンパク質大量合成系として開発することにより、これまで生産が困難であった多様な制御因子の構造解析が可能になる。

SA受容体は何れの植物ホルモン受容体とも構造及び機能面での差異が顕著であると想定されるため、その立体構造解析により、NPR3/4は何故SAを認識できるのか、SAが結合したNPR3は何故NPR1との相互作用が促進され、逆にSA-NPR4複合体はNPR1との結合力を失うのか、NPR1は何故SAとの結合性が弱いのか、などの問題が解決する。すなわち、本研究はSAの受容とシグナル伝達系を理解する上で必須の挑戦的な課題であり、植物ホルモンシグナルのみならず、植物固有の免疫応答機構の理解に多大な貢献が期待される。

しかしながら、NPR1とそのパラログは、構造解析に通常使用される大腸菌、酵母や昆虫細胞でのタンパク質誘導が困難であり、それ故、新奇なタンパク質合成系の開発が必須である。コムギ抽出液は、極めて正確なタンパク質合成が可能であり、理論的にはタンパク質構造解析用の方法論として優れていると考えられている。しかし、大腸菌などに比べタンパク質合成量が著しく低く、立体構造解析に必要なmgレベルでのタンパク質生産は困難であるとされている。そこで本申請では、コムギ無細胞タンパク質合成系を、タンパク質の大容量発現系として開発し、サリチル酸受容体NPR3/4及びNPR1複合体の三次元構造を決定する。

3. 研究の方法

これまでに申請者が開発したコムギ無細胞タンパク質合成系は、論文誌上で報告されている合成系や市販のコムギ胚芽抽出液とタンパク質合成能力の点で同等である1)。すなわち、50 µlスケールのタンパク質誘導系あたり約200 ngのタンパク質合成が可能である。しかしながら、本合成能力では、1 mgのタンパク質を誘導するために最低250 mlの無細胞タンパク質合成系が必要であるため、ルーチンワークとして本系を大容量合成に使用することはコストや労力の観点からも現実味を帯びない。そこで、タンパク質誘導効率を現在の10倍以上まで上昇させることを目的とした。

無細胞タンパク質合成系における主要な改良点は以下の3点である。すなわち、1) アミノ酸、ATPやGTPなどのエネルギーのリサイクル及び最適化、2) mRNAの安定化、3) タンパク質合成阻害システムの除去或いは抑制が挙げられる。1) ATPやGTPは、反応溶液中で時間と共に消費されタンパク質

合成効率を短時間で著しく低下させるので、タンパク質翻訳溶液を透析チューブ内に入れ、外液を大量の ATP やアミノ酸で満たすことにより、恒常的なエネルギー基質の供給が可能になると考えられる。また、クレアチンキナーゼのように ADP から ATP を生成する酵素を添加することにより、安定的に長時間、高エネルギー状態を維持できるものと考えられる。2) *in vitro* でのタンパク質翻訳に供試する mRNA は T7 RNA ポリメラーゼのみを用いて合成するため、3' 端にポリ A が付加されず、その安定性やタンパク質合成効率に疑問が残る。そこで、ランダムな 3' UTR 配列を作成し、最も効率的にタンパク質合成が行われる配列を決定する。2) *in vitro* におけるタンパク質の合成は、時間と共に翻訳システムの活性が低下し、最終的にはエネルギーや基質などが残っている状況でも、翻訳は停止する。これは、タンパク質の合成開始反応に関与する eIF2 などの制御因子がリン酸化されることにより生じると考えられる。2)。そこで、タンパク質合成開始に関与する全ての因子を *in vitro* で作成し、これらを添加することにより、持続的なタンパク質合成系の確立を目指した。

4. 研究成果

コムギ胚芽由来の無細胞タンパク質合成系のタンパク質誘導効率の最適化を行った。本研究により、1) アミノ酸、ATP や GTP 濃度を最適化した。一方、2) eIF2 などのタンパク質合成反応の開始に関与する因子を様々な濃度で添加したが、顕著な影響は認められなかった。最終的に、3) 転写鑄型の 3' UTR 配列の最適化により実験開始時の約 10 倍の合成量向上を達成した。特に、これまで報告されていた 1000 bp 以上の 3' UTR ではなく、20-60 bp 程度の短く、合成効率を上昇させる配列を設定することに成功した。これにより、PCR 法を用いた簡便な転写鑄型作成技術を開発し、特許出願した。

最適化したコムギ胚芽抽出液及び鑄型作成技術を用いて、植物免疫シグナルであるサリチル酸 (SA) 受容体 NPR3 及び NPR4 の結晶構造化を目指した大量合成を試みた。NPR3 及び NPR4 の合成は、大腸菌や酵母を用いた合成方法では多くは不溶化することを確認した。同標的タンパク質の N 末端に 6xHis タグを付加し、小規模 (50 μ l) スケールによる合成を試みたところ、約 3~5 μ g の合成タンパク質を得ることができた。そこで、本系を 1000 倍の 50 ml スケールで誘導したところ、やはり 3~5 mg の誘導タンパク質を得ることができた。AKTA システムにより、ゲル濾過、陰イオン交換カラムに供試し、NPR3 及び NPR4 の精製を行い、結晶構造解析に向けたスクリーニングは、University of Washington の Ning Zheng 博士が行った。現在までに、高分解能の回析が可能な結晶は得られていない。これは、NPR3 と NPR4 が有するシステ

イン残基間の酸化が原因であると考えられるため、これらシステインに変異を導入したタンパク質等を合成し更なる解析を行っている。

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 4 件)

1. Miura K, Tada Y. (2014) Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front Plant Sci.*, 23; 5: 4. eCollection. 査読有り
2. Yoshida H, Hirano K, Sato T, Mitsuda N, Nomoto M, Maeo K, Koketsu E, Mitani R, Kawamura M, Ishiguro S, Tada Y., Ohme-Takagi M, Matsuoka M, Ueguchi-Tanaka M. (2014) DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the indeterminate domain family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(21):7861-7866. 査読有り
3. Kneeshaw S, Gelineau S, Tada Y., Loake GJ, Spoel SH. (2014) Selective protein denitrosylation activity of Thioredoxin-h5 modulates plant Immunity. *Mol Cell.* 56(1):153-162. 査読有り
4. Tokizawa M, Kobayashi Y, Saito T, Kobayashi M, Satoshi I, Nomoto M, Tada Y., Yamamoto YY, Koyama H. (2014) STOP1, CAMTA2 and other transcription factors are involved in aluminum-inducible AtALMT1 expression. *Plant Physiol.* pii: pp.114.256552. 査読有り

[学会発表](計 12 件)

多田安臣：レドックス感受性転写補助因子である NPR1 が制御するサリチル酸依存的植物免疫機構、日本遺伝学会第 86 回大会シンポジウム、シンポジウム「植物レドックス研究の最近のトピック」、長浜バイオ大学、2014 年 9 月 19 日

多田安臣：細胞内レドックス変化に対する植物応答機構の解明、新学術領域研究「植物の環境感覚：刺激受容から細胞応答まで」、第 1 回班会議、東北大学片平キャンパス さくらホール、2014 年 7 月 4 日

多田安臣：サリチル酸シグナルの鍵転写補助因子である NPR1 が制御する転写制御機構に関する研究、形成転換植物デザイン研究拠点、

筑波大学・春日キャンパス・情報メディアユニオン・共同会議室、2014年2月27日

多田安臣：細胞内レドックス変化に対する植物応答機構の解明、新学術領域研究「植物の環境感覚：刺激受容から細胞応答まで」、第2回班会議、京都大学セミナーハウス、2014年2月28日

Yasuomi Tada, Mika Nomoto, Tsukagoshi Hironaka, Tsuyoshi Mori, Nodoka Oka, Takamasa Suzuki, Tomonao Matsushita, Mutsutomo Tokizawa, Yoshiharu Yamamoto, Tetsuya Higashiyama, Steven Spoel: Immune co-factor NPR1 regulates reciprocal interaction between salicylic acid and jasmonic acid-mediated signal pathways, 第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス

Nodoka Oka, Mika Nomoto, Steven Spoel, Tsuyoshi Mori, Yoshiharu Yamamoto, Hironaka Tsukagoshi, and Yasuomi Tada: Glutathionylation regulates both plant innate immunity and senescence (Wednesday and Thursday # 16). Gordon Research Conference Oxidative Stress & Disease The Redox Biology of Age-Related Diseases, 2055 East Harbor Boulevard Ventura California 93001 USA Ventura Beach Marriott, 2015年3月4日

森毅：植物免疫系が調節する生長制御機構の解明 (P2)、新学術領域研究「植物の環境感覚：刺激受容から細胞応答まで」第5回若手の会、山形県山形市蔵王温泉 942 山形蔵王温泉ホテルルーセントタカミヤ、2014年10月20日

森毅、野元美佳、時澤睦朋、山下隼、山本義治、塚越啓央、多田安臣：疾病防御応答の活性化による生長制御機構の解明、日本植物病理学会創立100周年記念大会、明治大学駿河台キャンパス、2015年3月30日

Tomotaka Itaya, Hisashi Kato-Noguchi, and Yasuomi Tada: Rice Allelochemical Momilactone B Causes Abnormal Activation of Flavonoid Biosynthetic Pathway in Arabidopsis (Poster #105). 25th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR), The University of British Columbia, July 31, 2014

野元美佳、Rajinikanth Mohan、塚越啓央、岡和、時澤睦朋、山本義治、Xinnian Dong、多田安臣：植物免疫応答を制御する新奇 NPR1 結合因子の同定 (P-229)、第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014年11月25日~27日

野元美佳：Immune co-activator NPR1 and repressor JAZ target the same transcription factors to fine-tune plant hormone signaling (P-16)、2014年度 IGER 年次報告会、野依記念学術交流館、2014年12月18日

Mika Nomoto, Tsuyoshi Mori, Hironaka Tsukagoshi, Takamasa Suzuki, Nodoka Oka, Tomonao Matsushita, Mutsutomo Tokizawa, Yoshiharu Y. Yamamoto, Tetsuya Higashiyama, Steven H. Spoel, Yasuomi Tada: Salicylic acid and jasmonic acid signal target the same transcription factors to fine-tune plant hormone signaling、第2回国際会議 "The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing"、産業技術総合研究所 臨海副都心センター(別館)、2015年3月13日~15日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称：無細胞タンパク質合成系に用いるための翻訳促進剤及びその利用
発明者：多田安臣、野元美佳
権利者：国立大学法人名古屋大学
種類：特許
番号：2014-46470
出願年月日：2015年03月09日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
多田 安臣 (Yasuomi Tada)
名古屋大学遺伝子実験施設・教授
研究者番号：40552740

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：