

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06226

研究課題名(和文)植物の進化初期に派生した単一 LRR 受容体が制御する細胞内情報伝達の解明

研究課題名(英文)Research of signal transduction mechanism by sole LRR-type receptor in primitive red algae

研究代表者

奥田 哲弘 (Okuda, Satohiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：90727702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：単細胞紅藻シゾンにおける、一回膜貫通型細胞膜受容体タンパク質の発現・精製方法の検討をおこない、昆虫培養細胞-バキュロウイルスを用いた発現系を利用することで、立体構造解析に向けたタンパク質結晶化スクリーニング、タンパク質間相互作用解析に十分な品質のタンパク質を得ることができた。また、カイコ幼虫-バキュロウイルスを用いたタンパク質発現系も検討し、昆虫培養細胞を用いては困難だったタンパク質を発現させることにも成功した。このことから、植物タンパク質研究においても、カイコ幼虫-バキュロウイルスを用いたタンパク質発現系は昆虫培養細胞発現系の代替手法として使用できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物タンパク質研究において、試験管内で生化学的解析をおこなうためには、質的、量的に安定したタンパク質発現・精製系を確立することは重要である。本研究では、昆虫培養細胞-バキュロウイルス系、カイコ幼虫-バキュロウイルス系を用いることで、タンパク質立体構造解析やタンパク質間相互作用解析に使用可能な品質のタンパク質を安定して得る方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The expression and purification methods of the sole transmembrane receptor in primitive red algae *Cyanidioschyzon merolae* has been developed. I obtained the proteins of sufficient quality and quantity for protein crystallization screening and protein-protein interaction analysis with baculovirus-insect cell expression system. In addition, we used baculovirus-silkworm protein expression system and successfully obtained the proteins that were difficult to express in the insect cell system. These results indicate that the protein expression system using silkworm and insect cells is useful for 3D structural analysis and protein-protein interaction assays in plant research.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：受容体 シグナル伝達 シゾン カイコ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は、独自の細胞膜受容体を数多く持ち、細胞外シグナルに応じた細胞内情報伝達機構を確立してきた。タンパク質構造モチーフの1つである Leucine-rich repeats ドメイン (LRR) は、原核・真核生物を問わず自然免疫に関わり、真核生物では受容体の細胞外領域で様々な情報分子の認識を担う。特に植物では、LRR を細胞外領域にもつ受容体 (LRR 受容体) が多く、細胞自身が分泌するオートクリン様式のリガンド受容を含め、様々な環境、状態、極性などの情報伝達に機能する。これまでに、高等植物の多様な LRR 受容体のなかでいくつかの機能が明らかになりつつあるが、受容体がどのようにシグナル分子を受けとり、細胞内へと情報を伝えて応答を制御するのか、その一連のシグナル伝達の時空間的な分子作用機序はいまだ不明な点が多い。単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) は、真核生物として最小のゲノム構造をもち、タンパク質コード遺伝子 4775 個のうち単一の LRR 受容体をもつが、その役割は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、LRR 受容体のシグナル受容およびシグナル伝達における構造とダイナミクスの解明である。本研究では単一 LRR 受容体をもつシゾンを用いることで、LRR 受容体のシグナル受容に始まる一連のシグナル伝達から細胞応答に至るまでの連続した分子カスケードの実態を、混線なく詳細に明らかにできる。

これまでの研究では、どのように受容体がリガンド結合するかをタンパク質構造レベルで明らかにするとともに、何分子のリガンドが結合したのち何ミリ秒で一連の細胞応答が行われるかというダイナミクスを明らかにし、1分子レベルで時空間的に受容体 - リガンド情報伝達の分子実態を解明した先例はない。本研究では、シゾンを用いて受容体の構造生物学的解析とライブセルイメージング解析の研究基盤を確立する。そして、単一 LRR 受容体の機能とタンパク質構造について、高等植物で多様な機能展開をする LRR 受容体と比較することで、受容体がどのような分子進化をしていくのか調べることを目指した。さらに、LRR 受容体を中心として情報伝達因子を網羅的に解析し、受容体がシグナル分子を受容したのち、いかにして細胞内へと情報を伝えるのか、1分子レベルで超解像ライブイメージングを行なうことで受容体 - リガンドのシグナル伝達のダイナミクスを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

シゾンの細胞膜受容体のシグナル伝達解明にむけて、本研究ではまず公開されたゲノムデータ、発現データベースを *in silico* で解析し、一回膜貫通型の細胞膜局在と予測されるタンパク質を選抜する。なかでも LRR ドメインを有する受容体様タンパク質 (LRR 受容体) に対して、候補遺伝子の発現抑制・欠失株を作製・観察する。さらに、組み換えタンパク質を発現・精製し、細胞外の各ドメインの立体構造を明らかにするために、X 線結晶構造解析をおこなう。LRR 受容体と共同して機能するタンパク質を同定するため、候補となる細胞膜局在タンパク質に対して、分子間相互作用解析をおこなう。そして、LRR 受容体と相互作用タンパク質についても、蛍光タンパク質を付加した遺伝子導入株を作成し、ライブイメージングをおこない、細胞膜受容体のシグナル分子機構のダイナミクスの一端を解明することを目指す。

4. 研究成果

【シゾン細胞膜局在タンパク質候補の選抜】

公開されたシゾンのゲノムデータ情報より、細胞膜局在と予測されるタンパク質の絞り込みをおこなった。その結果、わずか 13 個が細胞膜局在を有すると予測され、そのうち 1 つが細胞外ドメインに LRR を有する (図 1)。これを単一 LRR 受容体タンパク質として解析を進めた。

【LRR 受容体の組換えタンパク質の発現・精製】

バキュロウイルス-昆虫培養細胞を用いたタンパク質発現系により、LRR 受容体細胞外ドメインの組換えタンパク質を得た (図 2A)。LRR 受容体は LRR ドメインと 2 つの Eph rec ドメインから構成されるが、昆虫培養細胞を用いたタンパク質発現系では、細胞外ドメイン全体は発現できたものの、各ドメインについては発現困難であった。そのため、バキュロウイルス-カイコ幼虫を用いたタンパク質発現系を検討したところ、LRR ドメイン単独 (LRR)、LRR ドメインと 1 つの Eph rec ドメイン (LRR - Eph rec)、LRR ドメインと 2 つの Eph rec ドメインをもつ細胞外ドメイン全体 (LRR - 2x Eph rec) を発現することがで

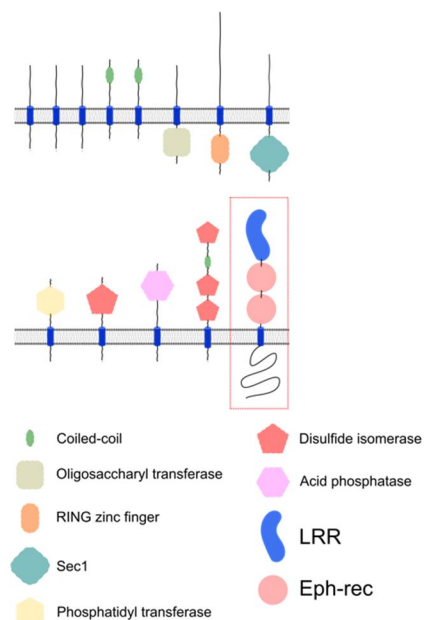


図1. シゾンの細胞膜タンパク質群
単一受容体は LRR, Eph--recドメインをもつ。

きた(図2B)。そして、His タグ、Strep タグに対する2段階のアフィニティー精製をおこなうことで、X線結晶化スクリーニング、生化学的な分子間相互作用解析に十分な品質のタンパク質を得ることができた(図2C)。さらに、分子間相互作用解析のセンサーチップに固相化するため、Avi タグを付加したLRR-2x Eph recを発現させることもできた。ただし、センサーチップへの固相化を安定しておこなうには不十分な結果が得られ、今後の更なる検討が必要であると考えられた。また、タンパク質結晶化スクリーニングについても、現在までに十分な結晶を得ることができていないため、更なる条件検討が必要であると考えられる。

残念ながら、本申請期間にはLRR受容体の*in vivo*機能解析、タンパク質立体構造解析には至らなかったものの、本申請により、生化学的解析に向けた様々な技術・知見の蓄積が得られたことから、今後もこれらを活かして目標の達成を目指していく予定である。

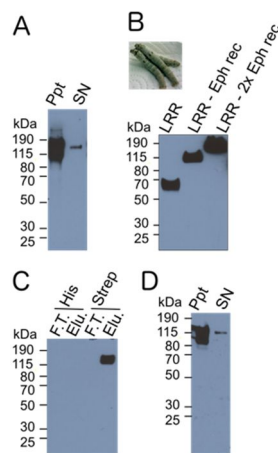


図2 LRR受容体の組換えタンパク質発現 (A) バキュロウイルス-昆虫培養細胞系を用いた、LRR受容体細胞外ドメインのタンパク質発現。(B) バキュロウイルス-カイコ幼虫を用いたタンパク質発現。LRRドメイン単独 (LRR)、LRR, Eph recドメイン (LRR - Eph rec)、細胞外ドメイン全体 (LRR - 2x Eph rec)。(C) LRR - 2x Eph recについて、Hisタグ、Strepタグに対する2段階のアフィニティー精製。F.T., 非結合画分、Elu., 溶出画分。(A) バキュロウイルス-昆虫培養細胞系を用いた、Aviタグ融合LRR - 2x Eph recのタンパク質発現。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 奥田 哲弘	4. 巻 34
2. 論文標題 X線結晶構造解析から捉えた受容体のペプチドリガンド認識機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Morphology	6. 最初と最後の頁 29-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5685/plmorphol.34.29	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okuda Satohiro	4. 巻 144
2. 論文標題 Molecular mechanisms of plant peptide binding to receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170614 - 170614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.peptides.2021.170614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥田 哲弘, 外山 侑穂, 八廣 遥斗, 渡部 八雲, 松田 直大, 長江 拓也, 砂川 勇太, 須田 峻, 金 星月, 鈴木 孝征, 東山 哲也
2. 発表標題 植物の配偶子誘引における多様なメカニズム
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥田 哲弘
2. 発表標題 X線結晶構造解析から視えた受容体のシグナル伝達
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satohiro Okuda
2. 発表標題 Research in Mix-lab; Plant and Structural Biology
3. 学会等名 WPI-ITbMワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関