

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22570052

研究課題名(和文)植物免疫に関わるイネキチンエリシター受容体の構造と機能に関する研究

研究課題名(英文)The structure-function relationships of rice chitin elicitor receptors in plant innate immunity

研究代表者

賀来 華江(KAKU, HANAE)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：70409499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：植物は、微生物のもつ特有の分子(MAMPs/PAMPs)を認識して、様々な防御応答を誘導する。これまで我々は真菌の細胞壁構成多糖であるキチンの断片がMAMPとして機能することを報告してきた。本研究では構造の異なる2種類のLysM受容体(CEBiPとOsCERK1)の複合体形成がイネキチンシグナル応答系に重要であり、CEBiPが糖リガンドの主要な結合分子であること、またCEBiPの特定のLysMドメイン及びアミノ酸残基がキチンの結合に関与することを明らかにした。さらに我々はCEBiPがサンドイッチ型に糖リガンドを挟むように二量体形成することがシグナル応答系の起動に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plants have the ability to recognize microbe/pathogen-associated molecular patterns (MAMPs/ PAMPs) and initiate various defense responses. Chitin, a major component of fungal cell wall, is a representative fungal MAMP and triggers defense signaling in a wide range of plant species. We identified two types of LysM-receptors, CEBiP and OsCERK1, which play important roles for chitin oligosaccharide-induced defense signaling in rice. In this study, we found that the heteromeric receptor complex of CEBiP and OsCERK1 is essential to activate its downstream signaling in rice and GPI anchored protein, CEBiP, is a major protein for ligand perception. We also found that one of the LysM domains in the extracellular region and the isoleucine residue in position 122 are the critical site/position for chitin binding in CEBiP. We also indicated that the sandwich typed dimerization of CEBiP is required for chitin mediated signal transduction in rice.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子・生理科学

キーワード：イネ キチン受容体 MAMP キチンオリゴ糖 CEBiP OsCERK1 防御応答 過剰発現

1. 研究開始当初の背景

植物は動物のようなマクロファージを中心とした自然免疫系やリンパ球を介した獲得免疫系を持っていない。しかし、植物は病原菌の細胞表層を構成する分子や病原菌が分泌するさまざまな分子（エリシター）を認識して防御応答を開始する能力をもつことが知られている。近年、これまでエリシターと呼ばれてきた分子の多くが動物の自然免疫で Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns (PAMPs/MAMPs) と呼ばれる分子群と共通する構造や位置づけをもち、また、植物の基礎的病害抵抗性で重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

我々は、イモチ病菌を含む多くの菌類の細胞壁に共通して存在する MAMP の一つであるキチンに注目し、この断片がイネ培養細胞において活性酸素生成、防御応答関連遺伝子の発現、抗菌性物質の合成などの多様な防御応答を誘導する強いエリシター活性をもつことは明らかにした（Shibuya & Minami, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2001）。これらの防御応答は、キチンオリゴ糖の重合度（6量体以上）と構造に高い特異性を示し、イネ細胞にはキチンオリゴ糖エリシターに対する特異的受容体が存在すると確信した。これまで我々はこの応答系に関わる2種類の LysM 受容体(CEBiP(Chitin elicitor binding protein, Kaku *et al*, *PNAS*, 2006)と OsCERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1)を同定した。しかしこれらの受容体分子の詳細な特性、受容体の糖鎖認識メカニズム及びそのシグナル応答系の起動との関連性が不明である。

2. 研究の目的

我々はイネにおける CEBiP 及び OsCERK1 受容体の特性とそのリガンド受容の分子機構を明らかにすることを目的として解析を行い、この研究により得られた成果が、高機能型のキチンオリゴ糖エリシター受容体の開発につながり、植物自身のもつ免疫能力を強化し、化学農薬に頼らない「安全・安心」な耐病性植物（作物）の作出を可能にし、今後の食糧問題の解決につながると期待している。

3. 研究の方法

イネキチン受容体である OsCERK1 の C 末側に Myc を付加したイネ形質転換体

(OsCERK1-Myc) を作製した。この OsCERK1-Myc の膜画分を用い、免疫沈降法により CEBiP との複合体形成の可能性について調べた。

イネの膜画分を単離し、ホスホリーパゼ C による処理を行い、CEBiP 及び OsCERK1 型分子の特性解析を行った。

CEBiP の糖鎖認識に関わる部位を検索するため、CEBiP の細胞外領域にある複数の LysM をそれぞれ欠失させた変異体あるいは、非キチン結合性の CEBiP 型分子のものを入れ替えた変異体タンパク質をベンサミアナタバコの葉で一過的に発現させ、それらの CEBiP 改変タンパク質のキチンオリゴ糖への結合性を親和性標識実験にて調べた。

受容体キナーゼ型構造を持つ OsCERK1 のキチンに対する結合活性の有無は、コロロイダルキチンとの結合反応性により測定した。

シロイヌナズナ CERK1 の X 線構造解析の情報に基づいて、CEBiP の分子モデリングを行い、リガンドドッキングシミュレーションを行い、CEBiP のリガンド結合に関わるアミノ酸残基を推測し、それらのアミノ酸残基をアラニンに置換することにより、キチンに対する結合活性について解析した。

4. 研究成果

CEBiP が GPI アンカータンパク質であり、受容体キナーゼ型 OsCERK1 と異なる構造を持ち、この両分子が、協同してイネのキチンシグナル応答系の起動に重要である事を明らかにした。

CEBiP の細胞外領域に局在する複数 LysM ドメイン (LysM) 中の中央にある LysM がキチンの結合に活性を持つことを明らかにし、また、CEBiP の C 末端側の 80 アミノ酸残基を削除したベンサミアナタバコ発現変異体においても、キチンリガンドに対する結合性を保持していた。

OsCERK1 がコロロイダルキチンに結合する活性を持たず、構造的相同性の高いシロイヌナズナ AtCERK1 とは異なる性質であることを明らかにした。このことは植物間には、キチンエリシターシグナルの受容形態に違いがある応答系が存在するという重要な知見を得た。

分子モデリングにより作成された CEBiP 受容体とリガンドとのドッキングシミュレーション解析を行った結果、キチンの結

合に関わるアミノ酸残基を推測した。特定のアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体タンパク質の解析の結果、122番目のイソロイシン残基がリガンドの結合に重要であることを明らかにした。またイソロイシンの側鎖の鎖長の変化がリガンドの結合性に深くかわることを明らかにした。

イネのキチン受容体であるCEBiPはGPIアンカータンパク質である。このCEBiPの細胞膜における動態を調べるために、キチン結合活性が保持され、且つCEBiPの細胞外領域に蛍光タンパク質(GFP)が付加可能な部位の探索を行った。その結果、キチンオリゴ糖との親和性標識実験から、キチン結合能を保ちながら、蛍光タンパク質が付加可能な2つの部位を見つけることができた。またスプリットYFPをそれぞれ付加したCEBiPをベンサミアナタバコ発現させた結果、YFPタンパク質の融合による蛍光を観察することを明らかにした。この実験により、細胞膜におけるCEBiPおよびOsCERK1の複合体形成の解析の可能性をしめした。

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 9 件)

M. Hayafune, R. Berisio, R. Marchetti, A. Silipoc, M. Kayama, Y. Desaki, S. Arimaa, F. Squegliab, A. Ruggierob, K. Tokuyasud, A. Molinaroc, H. Kaku, N. Shibuya, Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有, 2014, 111, E404-E413.

Y. Kouzai, K. Nakajima, M. Hayafune, K. Ozawa, H. Kaku, N. Shibuya, E. Minami, Y. Nishizawa, CEBiP is the major chitin oligomer-binding protein in rice and plays a main role in the perception of chitin oligomers, Plant Mol. Biol., 査読有, 2014, 84, 519-528.

Y. Kouzai, H. Kaku, N. Shibuya, E. Minami, Y. Nishizawa, Expression of the chimeric receptor between the chitin elicitor receptor CEBiP and the receptor-like protein kinase Pi-d2 leads to enhanced responses to the chitin elicitor and disease resistance against Magnaporthe

oryzae in rice, Plant Mol. Biol., 査読有, 2013, 81, 287-295.

Y. Desaki, I. Otomo, D. Kobayashi, Y. Jikumaru, Y. Kamiya, B. Venkatesh, S. Tsuyumu, H. Kaku, N. Shibuya, Positive crosstalk of MAMP signaling pathways in rice cells, PLOS ONE, 査読有, 2012, 7, e51953.

T. Shinya, N. Motoyama, A. Ikeda, M. Wada, K. Kamiya, M. Hayafune, H. Kaku and N. Shibuya, Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in Arabidopsis and rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants, Plant Cell Physiol., 査読有, 2012, 53, 1696-1706.

S. Tanabe, N. Ishii-Minami, K. Saitoh, Y. Otake, H. Kaku, N. Shibuya, Y. Nishizawa, E. Minami, The role of catalase-peroxidase secreted by Magnaporthe oryzae during early infection of rice cells, Mol. Plant-Microbe Int., 査読有, 2011, 24, 163-171.

T. Nakagawa, H. Kaku, Y. Shimoda, A. Sugiyama, M. Shimamura, K. Takanashi, K. Yazaki, T. Aoki, N. Shibuya, H. Kouchi, Plant J., 査読有, 2011, 65, 169-180.

K. Kishimoto, Y. Kouzai, H. Kaku, N. Shibuya, E. Minami, Y. Nishizawa, Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus Magnaporthe oryzae in rice, Plant J., 2010, 64, 343-354.

T. Simizu, T. Nakano, D. Takamizawa, Y. Desaki, N. Ishii-Minami, Y. Nishizawa, E. Minami, K. Okada, H. Yamane, H. Kaku, N. Shibuya, Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice, Plant J., 査読有, 2010, 64, 204-214

[学会発表](計 44 件)

招待講演

賀来華江、Rita Berisio、Antonio Molinaro、渋谷直人、植物のキチンエリクターを介した病原菌認識機構、第55回日本植物生理学会年会、2014.3.18-20
渋谷直人、賀来華江、植物キチン受容体のリガンド認識、活性化とシグナル伝達、平成25年度植物感染生理談話会、2014.8.19-21

N. Shibuya, H. Kaku, T. Shinya, K. Kito, N. Motoyama, M. Hayafune, R. Berisio, A. Silipo, A. Molinaro, K. Yamaguchi, T. Kawasaki.、Ligand recognition, autophosphorylation and signaling by

plant chitin receptors、KEYSTONE SYMPOSIA Plant immunity: Pathways and Translation、2013.4.7-12

N. Shibuya, H. Kaku, T. Shinya, T. Shimizu, T. Nakagawa, N. Motoyama, Chitin Receptors in Plant Immunity、XVth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions、2012.7. 29-8.2

N. Shibuya, H. Kaku, Identification and functional studies of chitin receptors in rice and Arabidopsis、東京大学生物生産工学研究センター国際シンポジウム「植物バイオテクノロジーの将来展望」、2011.11.15

T. Shinya, H. Kaku and N. Shibuya, Characterization of receptor proteins using affinity cross-linking with biotinylated ligands、MCGS Network Symposium、2011.10.14-16

N. Shibuya, H. Kaku, Identification and functional studies of chitin receptors in rice and Arabidopsis、MCGS Network Symposium、2011.10.14-16

渋谷直人、賀来華江、キチン認識と植物免疫、第 52 回日本植物生理学会年会、2011.3.20-323

賀来華江、渋谷直人、Two types of LysM receptors, CEBiP and CERK1/OsCERK1, play critical roles for plant innate immunity、第 1 回「植物-微生物共生と窒素固定」アジア国際会議、2010.9.21-9.24

賀来華江、渋谷直人、キチン受容体の認識を介した植物免疫応答、第 2 2 回日本比較免疫学会、2010.8.2-8.4

渋谷直人、賀来華江、パターン認識受容体を介した植物免疫制御機構、第 22 年度日本植物病理学会、2010.4.18-4.20

学会発表

早船真広、出崎能丈、加山実祐、谷本匠、R. Berisio, R. Marchetti, A. Silipo, F. Squeglia, A. Ruggiero, 徳安健, A. Molinaro, 渋谷直人、賀来華江、イネキチン受容体 CEBiP のリガンド認識機構、第 55 回日本植物生理学会年会、2014.3.18-20

岡本和樹、佐藤洋輔、早船真広、渋谷直人、賀来華江、イネ原形質膜上におけるキチンエリシター受容体の特性解析、平成 25 年度植物感染生理談話会、2014.8.19-21

早船真広、出崎能丈、加山実祐、R. Berisio, R. Marchetti, A. Silipo, F. Squeglia, A. Ruggiero, 徳安健, A. Molinaro, 渋谷直人、賀来華江、イネ LysM 型受容体 CEBiP の 2 量体形成がキチン防御応答系の起動に重要である、平

成 25 年度植物感染生理談話会、2014.8.19-21

M. Hayafune, M. Kayama, K. Kamiya, S. Arima, T. Shinya, R. Berisio, N. Shibuya, H. Kaku, Functional analysis of LysM domains in rice chitin receptors、KEYSTONE SYMPOSIA Plant immunity: Pathways and Translation、2013.4.7-12

早船真広、神谷光太、藤井琢磨、加山実祐、新屋友規、R. Berisio、渋谷直人、賀来華江、イネ LysM 型キチン受容体 CEBiP の糖鎖認識機構の解析、第 54 回日本植物生理学会年会、2013.3.21-23

中道研地、出崎能丈、大友一平、中谷容子、成澤知子、香西雄介、青柳伸代、西澤洋子、南栄一、賀来華江、渋谷直人、イネキチン受容体キナーゼ OsCERK1 の過剰発現は植物免疫応答を強化する、第 54 回日本植物生理学会年会、2013.3.21-23

H. Kaku, M. Hayafune, Y. Sato, D. Takamizawa, T. Shimizu, T. Shinya, N. Shibuya、Plant innate immunity mediated by rice LysM receptors、10th International Symposium on Rice Functional Genomics、2012.11.26-29

賀来華江、早船真広、加山実祐、有馬祥子、神谷光太、新屋友規、R. Berisio、渋谷直人、イネキチン受容体 CEBiP の糖鎖認識機構の解析、第 31 回日本糖質学会年会、2012.9.17-20

新屋友規、元山記子、早船真広、神谷光太、島田日加瑠、谷本匠、賀来華江、渋谷直人、シロイヌナズナとイネにおけるキチン認識機構の共通性と差異、平成 24 年度植物感染生理談話会、2012.8.30-9.1

谷本匠、佐藤圭、中島正登、村上弘祐、新屋友規、神谷光太、賀来華江、渋谷直人、ベンサムアナタバコー過剰発現系を用いた CERK1 のホモ複合体形成および自己リン酸化の解析、平成 24 年度植物感染生理談話会、2012.8.30-9.1

早船真広、加山実祐、有馬祥子、青砥大樹、神谷光太、新屋友規、Rita Berisio、岡田憲典、山根久和、渋谷直人、賀来華江、イネキチン受容体 CEBiP の糖鎖認識に関わる LysM の解析、平成 24 年度植物感染生理談話会、2012.8.30-9.1

T. Nakagawa, H. Kaku, H. Kouchi, N. Shibuya, The expression of defense-related genes are attenuated by symbiotic cascades、XVth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions、2012.7. 29-8.2

T. Shinya, N. Motoyama, M. Hayafune, K. Kamiya, H. Shimada, T. Tanimoto, H. Kaku and N. Shibuya, Different receptor

- systems regulate chitin signaling in Arabidopsis and rice, XVth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012.7. 29-8.2
- T. Shinya, N. Motoyama, M. Hayafune, K. Kamiya, H. Shimada, T. Tanimoto, H. Kaku and N. Shibuya, Different receptor systems regulate chitin signaling in Arabidopsis and rice, XVth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012.7. 29-8.2
- M. Hayafune, S. Arima, M. Kayama, K. Kamiya, T. Shinya, K. Okada, H. Yamane, N. Shibuya, H. Kaku, Functional analysis of LysM motifs in rice chitin receptor CEBiP, XVth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012.7. 29-8.2
- H. Kaku, Y. Sato, K. Sato, D. Takamizawa, T. Shinya, M. Hayafune, N. Shibuya, Characterization of rice chitin elicitor receptor complex, XVth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012.7. 29-8.2
- 早船真広、有馬祥子、加山実祐、青砥大樹、本田千智、神谷光太、新屋友規、岡田憲典、山根久和、澁谷直人、賀来華江、イネキチン受容体 CEBiP の糖鎖認識に関わる LysM ドメインの解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012.3.16-3.18
- 新屋友規、元山記子、早船真広、神谷光太、谷本匠、鳴坂真理、鳴坂義弘、賀来華江、澁谷直人、シロイヌナズナのキチン認識における LysM 型受容体の役割、第 53 回日本植物生理学会年会、2012.3.16-3.18
- 香西雄介、賀来華江、澁谷直人、南栄一、西澤洋子、イネのキチンオリゴ糖受容体 CEBiP の変化によるもち病抵抗性の向上、第 53 回日本植物生理学会年会、2012.3.16-3.18
- 佐藤圭、佐藤洋輔、高見澤大介、清水健雄、新屋友規、澁谷直人、賀来華江、イネキチンエリシター受容体複合体の解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012.3.16-3.18
- ⑲ H. Kaku, D. Takamizawa, Y. Sato, T. Shimizu, M. Hayafune, N. Shibuya, Plant innate immunity mediated by the perception of chitin fragments through rice LysM receptors, KEYSTONE SYMPOSIA, 2012. 3.4-3.9
- ⑳ H. Kaku, D. Takamizawa, Y. Sato, T. Shimizu, M. Hayafune, N. Shibuya, Plant innate immunity mediated by the perception of chitin fragments through rice LysM receptors, KEYSTONE SYMPOSIA, 2012. 3.4-3.9
- ㉑ 新屋友規、元山記子、長田友彦、池田あさひ、賀来華江、澁谷直人、シロイヌナズナの植物免疫におけるキチン認識機構、第 84 回日本生化学会大会、2011.9.21-24
- ㉒ Y. Desaki, I. Otomo, D. Kobayashi, Y. Jikumaru, Y. Kamiya, B. Venkatesh, S. Tsuyumu, H. Takatsuji, H. Kaku and N. Shibuya, MAMP-mediated priming and synergy: Closely related positive crosstalk of signaling cascade for effective mobilization of defense responses, MCGS Network Symposium, 2011.10.14-16
- ㉓ T. Shinya, N.o Motoyama, T. Osada, A. Ikeda, H. Kaku and N. Shibuya, Chitin recognition machinery for immune responses in Arabidopsis, MCGS Network Symposium, 2011.10.14-16
- ㉔ 賀来華江、高見澤大介、清水健雄、佐藤洋輔、早船真広、澁谷直人、2 種類の異なるイネキチン受容体とその相互作用解析、第 30 回日本糖質学会、2011.7.11-7.13
- ㉕ 香西雄介、岸本久太郎、賀来華江、澁谷直人、南栄一、西澤洋子、キチンオリゴ糖応答性の変化によるイネの菌類病抵抗性増強の試み、第 52 回日本植物生理学会年会、2011.3.20-3.23
- ㉖ 高見澤大介、清水健雄、早船真広、佐藤圭、澁谷直人、賀来華江、2 種類の異なるイネキチン受容体とその相互作用解析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011.3.20-3.23
- ㉗ 元山記子、新屋友規、長田友彦、池田あさひ、賀来華江、澁谷直人、シロイヌナズナの植物免疫におけるキチン認識機構、第 52 回日本植物生理学会年会、2011.3.20-3.23
- ㉘ 新屋友規、出崎能丈、大友一平、早船真広、Anja Kombrink, Bart Thomma, Nicholas Talbot, 賀来華江、澁谷直人、植物のキチン認識系を阻害する真菌 LysM 型エフェクターの解析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011.3.20-3.23
- ㉙ 大友一平、出崎能丈、賀来華江、澁谷直人、イネに対する細菌リボ多糖のエリシター活性部位の解析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011.3.20-3.23
- ㉚ 賀来華江、高見澤大介、清水健雄、早船真広、澁谷直人、イネキチンエリシター受容体複合体の解析、農芸化学会関東支

部会、2010.10.9

- ③ 新屋友規、元山記子、長田友彦、池田あさひ、賀来華江、渋谷直人、シロイヌナズナの植物免疫におけるキチン認識機構、農芸化学会関東支部会、2010.10.9

〔図書〕(計 5 件)

渋谷直人、賀来華江、植物キチン受容体のリガンド認識、活性化とシグナル伝達、植物感染生理談話会論文集、48, 1-7, 2013

賀来華江、新屋友規、渋谷直人、LysM受容体を介した植物免疫応答、化学と生物、50, 52-58, 2012

賀来華江、渋谷直人、植物免疫に関わるキチンエリシター受容体、生化学、83, pp 31-36, 2011

Kaku H, Shibuya N, Chitin receptor for plant innate immunity, Kohwa printing, Genome-enabled integration of research in plant-pathogen systems, pp259-268, 2011

清水健雄、賀来華江、渋谷直人、微生物分子パターン受容体、共立出版、「植物のシグナル伝達 分子と応答」, pp45-51, 2010

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

賀来華江 (KAKU Hanae)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：70409499

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

渋谷直人 (SHIBUYA Naoto)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：70350270