

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780088

研究課題名（和文）植物の受容体型キナーゼによる病原菌感染認識と過敏反応誘導の解析

研究課題名（英文）The analysis of recognition of pathogen infection and induction of hypersensitive reaction by plant receptor-type protein kinases

## 研究代表者

澤野 頼子（SAWANO YORIKO）

東京医科歯科大学・教養部・准教授

研究者番号：00571077

研究成果の概要（和文）：植物は病原菌への防御反応の1つとして、病原体由来の分子（エリシター）を認識し、過敏反応（HR）を引き起こす。本研究では、HR誘導への関与が報告されているシステインリッチ受容体型キナーゼ（CRK）の病原菌認識機構の解析を行った。酵母破碎物中にCRKと相互作用するエリシター候補成分を見出し、X線結晶構造解析によりCRKの立体構造を決定するとともに核磁気共鳴を用いた解析により相互作用に関わる部位を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Plants recognize molecules derived from pathogen, elicitor, and cause hypersensitive response (HR) as one of protective reaction against pathogen. Plant cysteine-rich receptor-like kinases have been reported to relate the induction of HR, and its recognition mechanism of pathogen was analyzed in this study. A candidate for elicitor, interacted with CRK, was found in yeast homogenate, and 3-D structure of CRK was solved by X-ray crystallography and the interaction site of CRK was identified by nuclear magnetic resonance spectroscopy.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2300000	690000	2990000
2011年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：受容体型キナーゼ、植物病原菌、エリシター、X線結晶構造解析、核磁気共鳴解析、相互作用解析

## 1. 研究開始当初の背景

植物は病原体に対する誘導抵抗性として、感染部位の細胞死を伴う過敏反応（HR）を引き起こす。HRは植物におけるプログラム細胞死の代表的な例として知られ、BaxやBcl-2, Bcl-xLによって制御されるミトコンドリアの機能不全を介して引き起こされ

るなど、動物のプログラム細胞死と一部共通したメカニズムによって支配されていることが分かっている（Qiao *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 2002; Takabatake *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 2007）。しかしながら、植物が病原菌の感染を認識し、細胞にHR誘導シグナルを伝達する一連のメカニズムについては

断片的な理解しか得られていない。

植物の環境応答において重要な受容体型キナーゼ (RLK) ファミリーの中で HR の誘導に関与するサブファミリーとして、Cystein-rich RLK (CRK) が報告されている (Chen, *Plant Physiol.*, 2001)。CRK は、特徴的な C-X8-C-X2-C モチーフをもつ DUF26 ドメインからなる細胞外領域と膜貫通セグメント (TM) を挟んだ細胞質側のキナーゼドメインによって構成されている。*Arabidopsis* においては、40 以上の CRK 遺伝子 (アミノ酸配列相同性は互いに 26 ~ 67%程度) が、第 1 染色体や第 4 染色体上に確認されており、その中で第 4 染色体にコードされている CRK5, CRK13 は、*Pseudomonas syringae* などの病原性細菌に対して特異的に HR を誘導し、サリチル酸 (SA) や感染特異的 (PR) タンパク質などを蓄積して生体防御反応を引き起こす (Acharya *et al.*, *Plant J.*, 2007; Chen *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 2004)。また、CRK13 については、細菌由来エリシターとして知られているフラジェリン N 末端ペプチド flg22 に対しても同様の応答が観察されている (Acharya *et al.*, *Plant J.*, 2007)、CRK13 が flg22 をリガンドとして認識し、受容体として HR 誘導に機能しているかは不明である。一方、植物は、植物病害の約 8 割を引き起こす糸状菌などの真菌に対しても HR を誘導する感染防御機構を備えていなければならないが、CRK の関与については不明である。

研究代表者らはこれまでに、イチョウ種子から単離した DUF26 ドメインを有する抗真菌タンパク質 Gnk2 が植物病原菌 *Fusarium culmorum* や *F. oxysporum* などの真菌に対して特異的な増殖阻害を示し (Sawano *et al.*, *Biol. Chem.*, 2007)、X線結晶立体構造解析 (Miyakawa *et al.*, *Proteins*, 2009) および NMR による相互作用解析から真菌の細胞壁を構成するマンナンに特異的に結合することを明らかにした (未発表データ)。Gnk2 のアミノ酸配列を *Arabidopsis* 由来の CRK のアミノ酸配列と比較したところ、第 4 染色体にコードされている CRK よりも、第 1 染色体にコードされている CRK に対して高い相同性を有していた。第 1 染色体にコードされている CRK は、Gnk2 のマンナン認識に重要なアミノ酸残基を高度に保存していることから、真菌細胞壁を構成するオリゴ糖をエリシターとして認識し、真菌に対して特異的に HR を誘導する可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

*Arabidopsis* の CRK 遺伝子は、主に第 1 染色体 (3 種類) と第 4 染色体 (37 種類) 上に存在している。これまでの研究から、第 4 染色体にコードされている CRK5, CRK13 は細菌の感染特異的に HR を誘導し、CRK13 ではフラジェリン N 末端ペプチド flg22 に対しても同様の応答が観察されている。そこで、CRK5, CRK13 の細胞外領域と flg22 などの細菌由来エリシターとの相互作用を *in vitro* で検出し、CRK5, CRK13 をノックダウンさせた培養細胞にこれらエリシターを作用させたときの HR 応答を検出することで、CRK5, CRK13 が flg22 などのエリシターを認識する受容体として HR 誘導に機能することを明らかにする。

また、植物病害の約 8 割を占める糸状菌を含む真菌に対して感染特異的に HR を誘導する可能性が考えられる第 1 染色体上の CRK 遺伝子 *CRK1*, *CRK2*, *CRK3* (これら遺伝子がコードするタンパク質をまとめて CRK1-3 と表記する) に着目し、CRK1-3 の細胞外領域と真菌細胞壁を構成するオリゴ糖エリシターとの相互作用を *in vitro* で検出し、また、CRK1-3 を個別にノックダウンさせた培養植物細胞にオリゴ糖エリシターを作用させたときの HR 応答を検出することで、CRK1-3 が真菌細胞壁オリゴ糖エリシターを認識する受容体として HR 誘導に機能することを明らかにする。

さらに、各 CRK の細胞外領域の立体構造、及びそのリガンドとなるエリシターとの複合体構造を決定することで、CRK 細胞外領域のエリシター認識の特異性についての構造基盤を明らかにする。得られた CRK 単体と複合体の構造を比較することによって、CRK が細胞内に HR シグナルを伝達するメカニズムの手掛かりが得られる可能性も期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) CRK 細胞外領域とエリシターの *in vitro* 相互作用解析

第 4 染色体にコードされている CRK の中で *CRK5*, *CRK13* は *P. syringae* の感染に応答して転写量の増大が認められており、*CRK13* の発現応答と HR 誘導反応は細菌由来エリシター flg22 によっても同様に引き起こされる。このため、細菌感染特異的な HR 誘導に関与する *CRK5*, *CRK13* と flg22 の相互作用を *in vitro* 相互作用解析によって明らかにする。具体的には、大腸菌あるい

は酵母等を宿主として利用して CRK 細胞外領域の大量・高純度調製系を構築する。相互作用解析には核磁気共鳴 (NMR) やタグタンパク質を用いたプルダウンアッセイを利用する。また、第 1 染色体にコードされている CRK1-3 についても同様に、細胞外領域の大量・高純度調製系を構築し、そのリガンド候補として真菌細胞壁オリゴ糖エリシター等を用いて、NMR やプルダウンアッセイにより相互作用を解析する。そして、結合の特異性が認められたエリシターと CRK の組み合わせについて、NMR を用いて相互作用部位を同定する。

## (2) CRK 細胞外領域の立体構造解析

各 CRK 細胞外領域単体、(1)でそれらと結合が確認されたエリシターとを混合して、結晶化スクリーニング試薬を用いて結晶化条件を探索する。結晶が得られた条件で、沈殿剤濃度、pH などを変化させて結晶化条件を最適化する。得られた結晶については、放射光施設のビームラインを利用して高分解能の X 線回折データを取得する。位相決定には、アミノ酸配列の相同性が認められる Gnk2 の立体構造 (PDB ID: 2E79) を用いた分子置換法を試み、必要に応じて、Se-Met 置換体を調製して多波長異常分散法 (MAD) による位相決定を試みる。(1)の結果と合わせて、立体構造上での相互作用部位の位置を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) CRK 細胞外領域とエリシターの *in vitro* 相互作用解析

第 1 染色体にコードされている CRK2 の細胞外領域の C 末端ドメイン (CRK2-ECD2) について、大腸菌での大量発現系を構築し、精製法を確立し、エリシターの探索を行った。His タグ融合 CRK2-ECD2 タンパク質に対して酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の菌体破砕物を添加したところ、Ni カラムに対する吸着性が変化し、*S. cerevisiae* に含まれる物質と相互作用する可能性が示唆された。その物質との相互作用部位を同定するため、<sup>15</sup>N 標識 CRK2-ECD2 を調製し、NMR 解析により主鎖の帰属を行った後、*S. cerevisiae* 破砕物添加前後の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルの化学シフト変化を観察した。その結果、この物質は CRK2-ECD2 の C 末端部のβストランドを構成すると予測される領域と強く相互作用することが示された。さらに、相互作用する物質を探索するため、CRK2-ECD2 に *S. cerevisiae* の細胞壁を構成するマンナン等の糖成分を添加して <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを観察したが、相互作用は認められなかった。

以上のように、CRK2 のエリシター候補成分が *S. cerevisiae* 分解物に含まれることを明らかにした。

一方、第 4 染色体にコードされている CRK5 および CRK13 の細胞外領域の C 末端ドメインについて、大腸菌での大量発現系を構築し、精製法を確立した。CRK5 と CRK13 を過剰発現させた植物では、病原性細菌 *Pseudomonas syringae* の感染および細菌の鞭毛タンパク質フラジェリン由来ペプチド flg22 により HR 誘導が促進されることが知られているため、GST 融合 flg22 を発現・精製し、GST プルダウンアッセイにより CRK5 あるいは CRK13 の細胞外領域ドメインと flg22 との相互作用解析を行ったところ、どちらについても相互作用は認められなかった。

## (2) CRK 細胞外領域の立体構造解析

CRK2 の細胞外領域の C 末端ドメイン (CRK2-ECD2) について、結晶化スクリーニングにより良質な結晶を得て、大型放射光施設 Photon Factory BL17A で X 線回折データの収集を行い、イチョウ種子由来抗真菌タンパク質 Gnk2 の結晶構造 (PDB ID: 2E79) をモデルとした分子置換法により位相を決定し、分解能 2.79 Å で立体構造を決定した。CRK2-ECD2 は 5 本の β ストランドからなる一枚の逆並行 β シートと 2 本の α ヘリックスからなる構造を形成していた。また、CRK に共通に保存されている C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>2</sub>-C モチーフはジスルフィド結合を形成し、本タンパク質の安定化に寄与していることが分かった。この結果と (1) の結果を合わせると、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 破砕物中の成分と相互作用する CRK2-ECD2 の部位が立体構造上で判明し、この領域がエリシター認識部位となる可能性が示唆された。

## 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 2 件)

- ① Xue YL, Miyakawa T, Sawano Y, Tanokura M., Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of dioscorin from *Dioscorea japonica*., *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. Vol.68(Pt 2), 2012, pp.193-195. 査読有
- ② Xue YL, Miyakawa T, Sawano Y, Tanokura M., Cloning of genes and enzymatic characterizations of novel dioscorin isoforms from *Dioscorea japonica*., *Plant Sci*., Vol.183, 2012, pp.14-19. 査読有

〔図書〕（計 1 件）

Hatano K, Miyakawa T, Sawano Y, and Tanokura M, Academic Press, Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention (Preedy, V. R., Watson, R. R. and Patel, V. B.eds.), 2011, 527-534

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤野 頼子 (SAWANO YORIKO)

東京医科歯科大学・教養部・准教授

研究者番号：00571077

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：