

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780349
 研究課題名（和文） 植物のキチンオリゴ糖エリシター受容体タンパク質の構造と機能
 研究課題名（英文） Structure and function relationships of the extracellular domains of the plant chitin elicitor receptors.
 研究代表者
 大沼 貴之（OHNUMA TAKAYUKI）
 近畿大学・農学部・講師
 研究者番号：60446482

研究成果の概要（和文）：植物は移動することができないために、病害虫の攻撃から退避できない。しかし、植物体内では病原菌感染に抵抗するシステムを備えており、それらは植物免疫と呼ばれている。本研究では、植物の細胞表面において植物病原菌細胞壁由来成分であるキチンオリゴ糖を認識する受容体（キチンオリゴ糖エリシター受容体）がどのようにオリゴ糖を認識し、その情報を細胞内に伝えているかを明らかにするために、受容体細胞外ドメインの機能構造解析を試みた。

研究成果の概要（英文）：Plants need to confront a great variety of fungal pathogens for their survival. In response to fungal attacks, plants have evolved various defense mechanisms, known as a plant innate immunity, to thwart or limit these infections. In this study, we tried to clarify relationships between structure and function of extracellular domains of the plant chitin elicitor receptors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：境界農学

科研費の分科・細目：応用分子細胞生物学

キーワード：キチンオリゴ糖、エリシター、受容体

1. 研究開始当初の背景

植物は、一定の場所から移動することができず、病害虫による攻撃から退避することができない。しかし、少なくとも植物病原菌の感染に対して、植物免疫と呼ばれる抵抗システムを備えており、本研究開始当初その分子機構が明らかにされつつあった。研究を開始する段階までに、植物病原菌の細胞壁の構成成分であり、病害抵抗性を誘導するキチンオリゴ糖エリシターに対する植物細胞表面の受容体として、2種の受容体遺伝子 CERK1 (Chitin elicitor receptor kinase 1) と CHRK1 (Chitinase-related receptor kinase 1) が同定されていた。また、直接キチンオリゴ糖エリシターの受容を担う受容

体タンパク質の細胞外ドメインは、アミノ酸配列の相同性解析の結果から LysM ドメインとクラス V 型キチナーゼドメインであることが明らかにされた。一方申請者は LysM ドメインをもつ植物キチナーゼを単離し、ITC（等温滴定熱量計）や NMR（核磁気共鳴分析計）による解析の結果、このドメインがキチン結合ドメインとして機能する糖質結合モジュールであることを報告していた。また、植物のクラス V 型キチナーゼの結晶構造解析に初めて成功し、その立体構造を明らかにしていた。

2. 研究の目的

植物病原菌の植物への感染時、キチンオリ

ゴ糖エリシターの受容によって開始される一連の病害応答の分子メカニズムの解明は、受容体遺伝子の同定により端緒を得た。本研究では LysM ドメインとクラス V 型キチナーゼの構造骨格を有し、植物の細胞表面において直接キチンオリゴ糖エリシターの結合に関与する受容体の細胞外ドメインの立体構造を決定するべく、それらの組換え型タンパク質を調製すること、結晶化と結晶構造解析およびキチンオリゴ糖結合様式を明らかにすることを目的とした。これまでにキチンオリゴ糖の受容体の機能解析に関する研究は、専ら受容体遺伝子に変異をもつ植物の表現型から推測されるに留まっている。それ故、X 線結晶構造解析によりエリシター受容体とキチンオリゴ糖の相互作用機構を原子レベルの解像度で決定すること、また生化学的および物理化学的実験手法により両者の結合の詳細を調べることにより、エリシターの受容から、受容の情報を細胞内へと伝達する仕組みを理解できるものと考えられた。

3. 研究の方法

(1) Thioredoxin-LysM ドメイン融合タンパク質の発現および融合タンパク質のキチン結合活性評価

CHRK1 の細胞外に存在する三つの LysM ドメイン (LysM1~3) とチオレドキシンの融合タンパク質を発現するプラスミドを構築し、大腸菌 BL21 (DE3) により発現させた。可溶性タンパク質として発現された各融合タンパク質のキチンビーズに対する結合活性を調べた。

(2) プロテアーゼを用いた融合タンパク質の切断後、カラムクロマトグラフィーにより LysM2 を単離することは困難であった。このことから、LysM2 をキチン結合ドメイン-インテリンとの融合タンパク質として発現させた後、DTT によるキチンカラム上での on column プロテインプライシングによって LysM2 の単離を行った。

(3) 安定同定体 ^{15}N ラベル化 LysM2 の調製、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル測定およびキチンオリゴ糖滴定実験

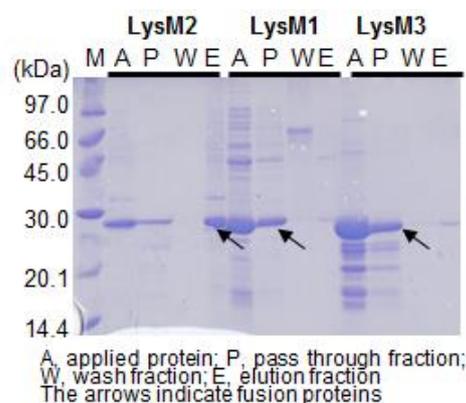
^{15}N NH_4Cl を含む M9 最小培地で LysM2 融合タンパク質を発現させ、 ^{15}N ラベル化 LysM2 を精製した。0.1 mM になるように LysM2 を濃縮後、NMR による ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル測定を行った。また、NMR サンプルに徐々キチンオリゴ糖を添加し、NMR シグナルの変化を調べた。

(4) CHRK1 細胞外ドメインの発現系の構築 Thioredoxin との融合タンパク質として CHRK1 細胞外ドメインを発現させた。様々な大腸菌株を用いて発現条件の検討を行った。融合タンパク質の精製は Ni アフィニティクロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマト

グラフィーによって行った。

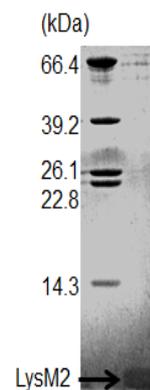
4. 研究成果

(1) Thioredoxin-LysM ドメイン融合タンパク質とキチンビーズとの結合実験を行った結果、N 末端側から 2 番目の LysM ドメイン (LysM2) のみが elution fraction に検出され、キチンと比較的強く結合することがわかった (図 1)。最近 (2012 年)、Liu らは CERK1 の細胞外ドメインとキチンオリゴ糖 4 糖との複合体構造を X 線結晶構造解析により決定した。複合体構造において、キチンオリゴ糖は LysM2 にのみ結合していることがわかった。以上のことから、CERK1 の細胞外に存在する三つの LysM ドメインの内、少なくとも LysM2 はキチンオリゴ糖に対する結合能を示すことがわかった。



(図 1) チオレドキシリン-LysM 融合タンパク質のキチン結合能評価

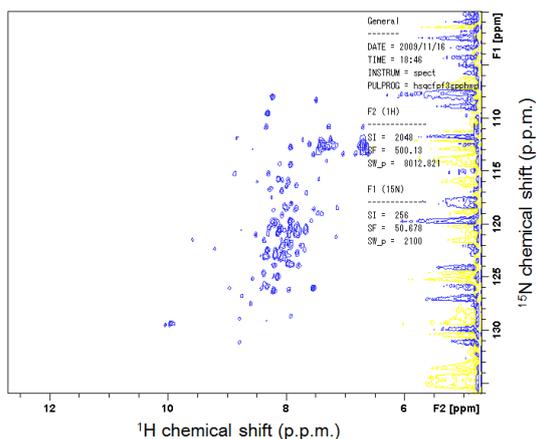
(2) LysM2 をキチン結合ドメイン-インテリンとの融合タンパク質として発現させた後、DTT によるキチンカラム上での on column プロテインプライシングを行うことにより、LysM2 を電気泳動的に単一にまで精製するスキームを構築した (図 2)。この精製スキームはプロテアーゼを使用しないで目的タンパク質を融合タンパク質から単離することができることから、LysM ドメインの様な分子量が小さく、またプロテアーゼの非特異的分解を受けやすいタンパク質の単離法として有効であることがわかった。



(図 2) LysM2 の精製

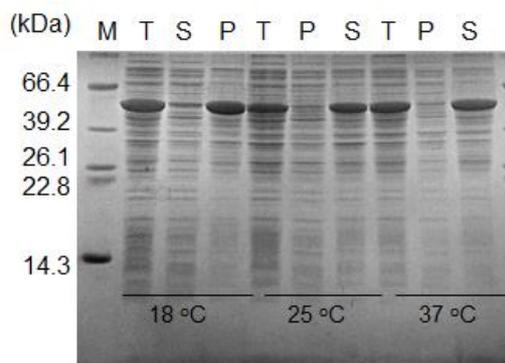
(3) ^{15}N ラベル化 LysM2 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した (図 3)。次に LysM2 溶液にキチンオリゴ糖 6 糖を徐々に加えていき、LysM2 のアミノ酸残基に由来する NMR シグナルが糖濃度依存的に変化するかどうか調べ

た。その結果幾つかのシグナルの濃度依存的な移動がみられたことから、本実験で作製した LysM2 にキチンオリゴ糖 6 糖が結合することが示唆された。また、溶液状態での相互作用が確認されたことから、今後 LysM2 の ^{15}N および ^{13}C によるラベル化、LysM2 の三次元 NMR 測定、NMR シグナルの各アミノ酸残基への帰属と NMR シグナルの変化量の定量を行うことにより、結合様式の詳細が明らかになるものと思われた。



(図 3) LysM2 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

(4) CHRK1 細胞外ドメイン単独を大腸菌を用いて発現させることはできなかった。そのため Thioredoxin との融合タンパク質 (Trx-CHRK1) として発現させた。発現用の大腸菌株として、Origami (DE3)、Rosetta2 (DE3) および BL21 (DE3) を用いた結果、Rosetta2 (DE3) および BL21 (DE3) でのみ Trx-CHRK1 の過剰発現が確認された。また、BL21 (DE3) を用いて低温 (18 °C) で発現させた時のみ、可溶性タンパク質として発現されることがわかった (図 4)。



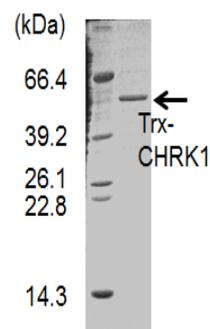
T, total protein; P, insoluble protein; S, soluble protein.

(図 4) 異なる温度での Trx-CHRK1 の BL21 (DE3) による発現

可溶性各分に発現された Trx-CHRK1 は、Ni アフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより、電気泳動的

に均一なまでに精製した (図 5)。この精製 Trx-CHRK1 はそのままもしくはプロテアーゼ処理によるタグ除去後、結晶化やキチンオリゴ糖との相互作用解析に利用できるものと思われた。

(図 5) Trx-CHRK1 の精製



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 1 件)

1. Arakane Y, Taira T, Ohnuma T, Fukamizo T. Chitin-related enzymes in agro-biosciences. *Curr Drug Targets*. 13, 442-470, 2012. (査読有) DOI: 10.2174/138945012799499721

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

大沼 貴之 (OHNUMA TAKAYUKI)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：60446482

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：