

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780334

研究課題名(和文)キチンを介した微生物認識機構の共通性と差異

研究課題名(英文) Similarities and differences in chitin-mediated recognition of microbes between plant species

研究代表者

新屋 友規 (SHINYA, TOMONORI)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：80514207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：真菌細胞壁の主要な成分の一つであるキチンは、植物による認識後、植物免疫機構を活性化することが知られている。本研究では、植物のキチンを介した微生物認識機構において、シロイヌナズナ・イネの2種のモデル植物の間で、キチン受容体複合体の構成因子や、それら構成因子の分子特性が異なることを示した。また、シロイヌナズナキチン受容体直下でキチンシグナル伝達に關与する受容体様細胞質キナーゼPBL27の特性解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Chitin is a major structural component of fungal cell walls and its perception triggers plant immune responses. Comparative analysis of chitin receptors in two model plants, Arabidopsis and rice, indicated species-specific differences in components of the receptor complex and their molecular characteristics. We also demonstrated that receptor-like cytoplasmic kinase PBL27 is an immediate downstream component of AtCERK1 signaling pathway in Arabidopsis.

研究分野：農学

キーワード：植物免疫 イネ シロイヌナズナ キチン 受容体 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

植物と外敵となる微生物との間には、感染・防御をめぐる様々な攻防が行われている。植物が微生物を非自己として識別し、植物免疫機構を活性化することは、この攻防の植物側の初期の重要なステップである。そのため、微生物認識に関わる受容体の発見は、植物-微生物間のインターフェースでの攻防の分子メカニズムを理解するひとつの契機となった(Boller et al., 2009)。また、微生物認識に関する受容体は、基礎研究としてだけでなく、受容体を利用した高機能植物の開発という観点でも注目されてきていた(Lacombe et al., 2010)。

微生物認識に関わる受容体として、キチン受容体 CEBiP (膜受容体)、CERK1 (膜貫通型受容体キナーゼ) は、特に真菌の認識に関わる受容体として世界で初めて単離されており、植物の真菌に対する防御応答において重要な役割を果たしていることが明らかになっていった (Kaku et al., 2006, Miya et al., 2008) (図1)。また複数の微生物が、植物表面での感染を成立させるために、キチン認識系を妨害する因子 (エフェクター) を産生していることが、複数の研究で明らかにされつつあった (de Jonge et al., 2010, Mentlak et al., 2012)。この様な点からも、キチン受容体は真菌に対する感染-防御の決定において重要な役割があると考えられ、多くの研究が推進されていた。

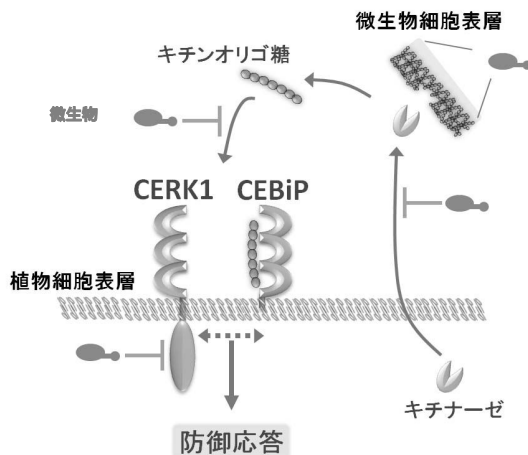


図1. 植物のキチン受容体を介した植物-微生物の相互作用

植物は微生物細胞壁より遊離したキチンオリゴを受容体で認識することで微生物を検知する。対して微生物もこの認識系を攪乱する分子を有しており、植物と微生物との間の分子レベルの攻防が起こっている。

我々はキチン認識系の解析として、シロイヌナズナ・イネ・マメ等のキチン認識機構において、キチン認識に重要な因子の同定・解析を行ってきた (Kaku et al., 2006, Miya et al., 2008, Fliegmann et al., 2011)。その結果、モデ

ル植物であるシロイヌナズナとイネの間で、キチン認識に関わる分子機構に違いがあることを示唆する結果が得られた。植物に広く存在するキチン認識系が、植物間で違いがあることは非常に興味深く、この点の解析は、病原菌に対する防御に重要なキチン受容体の理解を深めるだけでなく、先に述べたような、キチン認識系を妨害するエフェクターを含めた、キチン受容体に関連する研究に対しても重要な知見を提供する事が期待された。

一方で、キチン受容体による微生物認識後、細胞内のどのような因子を活性化し、一連の防御応答に至るのか、不明な点も多かった。特に、キチン受容体によって検出された微生物の認識において、どのように細胞外から細胞内にシグナルが伝達されるのか、また、受容体直下で機能する因子を明らかにすることが期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナとイネにおいて、キチン認識に関わると想定される分子の生化学的、生物学的機能解析を行い、シロイヌナズナ・イネのキチン認識機構に関わる分子を明確にする。また、認識に関わる分子の特性解析を行うことで、シロイヌナズナ・イネそれぞれのキチン認識の分子機構を明らかにすることを目的とした。

キチン受容体直下の因子の解析として、イネキチン受容体 OsCERK1 直下で機能する受容体様細胞質キナーゼ OsRLCK185 が報告された (Yamaguchi et al., 2013)。本研究では OsRLCK185 のシロイヌナズナのホモログである受容体様細胞質キナーゼ PBL27 に着目して特性解析を行うこととした。

以上のように、植物のキチン認識系の分子メカニズムおよびその下流のシグナル伝達系を明らかにしていく。さらに、代表的なモデル植物であるシロイヌナズナ・イネのキチン認識機構および受容体直下因子の比較解析から、キチン認識機構の植物種間の共通性・特殊性を見出すことを試みた。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ CEBiP 型分子のキチン認識系における役割の解析

シロイヌナズナにおいて、CERK1 型分子がキチン認識に必須であることは既に明らかであったが、CEBiP 型分子の関与は不明であった。そこで本研究では、3 種ある CEBiP 型分子の中からキチン結合性を示す分子を見出し、そのノックアウト変異体の解析を行った。さらに、3 種存在するシロイヌナズナ CEBiP 型分子を全て欠損した三重変異体の作出を行い、キチン応答性への影響および、病原菌に対する抵抗性を調べることで、CEBiP 型分子の役割を示す。応答解析については、活性酸素種の蓄積や防御応答遺伝子の発現により評価した。

(2) シロイヌナズナおよびイネの CERK1 型分子の細胞外ドメインの機能解析

シロイヌナズナおよびイネの CERK1 型分子の細胞外ドメインの機能解析として、キチン結合性を解析した。シロイヌナズナ・イネ CERK1 型分子を、それぞれベンサミアナタバコを用いて発現したのち、膜画分を可溶化し、コロイダルキチンを用いたキチン結合性解析により、キチン結合能を評価した。一方で、キメラ受容体（細胞外シロイヌナズナ AtCERK1/細胞内イネ OsCERK1 またはその逆）を用いて AtCERK1 細胞外ドメインの機能解析を行った。シロイヌナズナ *cerk1* ノックアウト変異体に、前述のキメラ受容体およびイネ OsCERK1 を発現させるコンストラクトを形質転換し、活性酸素生成を指標にキチン応答解析を行った。

(3)シロイヌナズナ CERK1 直下で機能する受容体様細胞質キナーゼ PBL27 の解析

PBL27 の特性解析として、局在解析、相互作用解析、および *pbl27* ノックアウト変異体の解析を行った。細胞内局在は、PBL27-GFP をベンサミアナタバコで発現し、蛍光顕微鏡観察により解析した。相互作用解析では、PBL27 および CERK1 をベンサミアナタバコで共発現し、免疫沈降法、BiFC 法により解析を行った。*pbl 27* ノックアウト変異体を用いたキチン応答解析として、活性酸素種の蓄積、カロース蓄積、防御応答遺伝子の発現により評価した。

さらに、PBL27 が他のエリシター認識に関与するのかどうかを明らかにするため、バクテリア由来の代表的なエリシターである、フラジェリンによって誘導される防御応答への関与を調べた。*pbl 27* ノックアウト変異体を用いて、フラジェリンのエリシター活性に重要な 22 アミノ酸ペプチドである *flg22* に対する一連の防御応答を解析した。一方で、フラジェリン受容体である FLS2 の直下で機能することが知られている膜受容体 BAK や受容体様細胞質キナーゼ BIK1 について、PBL27 やキチン応答との関与を調べた。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ CEBiP 型分子のキチン認識系における役割の解析

シロイヌナズナにおいては、CERK1 型分子がキチン認識に必須であることは明らかにされていたが、CEBiP 型分子の寄与は不明であった。また、3 種存在する CEBiP 型分子（LYM1, LYM2(AtCEBiP), LYM3）のキチン結合性の評価の実験から、LYM2 のみがキチン結合性を有することを明らかにしていた。そこで、シロイヌナズナのキチン認識機構における CEBiP 型分子の関与を明らかにするために、キチン結合能のある CEBiP 型分子である LYM2 の欠損変異体を含め、3 種のそれぞれの CEBiP 型分子の欠損変異体、3 種全ての CEBiP 型分子を欠損させた 3 重変異体を用い

てキチン応答解析を行った。活性酸素種の蓄積や防御応答遺伝子の発現により評価した結果、いずれの変異体においても野生型と比較してキチン応答性に変化がなかった。また、AtCEBiP 過剰発現体を用いて、活性酸素種の蓄積を解析したところ、同様に、キチン応答性は野生型と比較して変化がなかった。

イネの CEBiP のノックダウン変異体では、キチン応答性が低下するのに対して、シロイヌナズナの CEBiP 型分子のノックアウト変異体では、本実験で調べた限りのキチン応答性解析では影響は認められなかった。一方でシロイヌナズナの LYM2 は、イネ CEBiP と同等のキチンオリゴ糖に対する親和性を示すことを明らかにしている。このように、シロイヌナズナとイネは、いずれも構造およびキチン結合能において類似した分子を有するが、キチン認識系への寄与において差異が認められた。

さらにシロイヌナズナ LYM2 が何らかの機能を有するか明らかにするために、キチン応答性解析に加えて抵抗性への寄与について解析を行った。真菌に対する抵抗性試験を行ったところ、シロイヌナズナ CEBiP 欠損変異体では、野生型と比較して病斑形成が促進されたことから、シロイヌナズナ CEBiP は抵抗性に関わる何らかの機能を有していることが示唆された。

(2) シロイヌナズナおよびイネの CERK1 型分子の細胞外ドメインの機能解析

シロイヌナズナ、イネの CERK1 型分子である AtCERK1 および OsCERK1 は、ノックアウト/ノックダウン変異体の解析から、キチン認識に寄与する重要な分子であることは明らかになっていた。これら CERK1 型分子の機能解析として、細胞外ドメインのキチン結合能を、コロイダルキチンを用いて評価した。その結果、AtCERK1 がコロイダルキチンに結合したのに対して、イネ OsCERK1 はコロイダルキチンに対して結合能を示さなかった。

シロイヌナズナ *cerk1* ノックアウト変異体にイネ OsCERK1 を発現させた場合、キチン応答は認められなかった。さらにキメラ受容体（AtCERK1 細胞外ドメイン/ OsCERK1 細胞内ドメイン、またはその逆）を、シロイヌナズナ *cerk1* ノックアウト変異体にて発現させ、活性酸素生成を指標にキチン応答解析を行った。その結果、細胞外ドメインにキチン結合性を有する、「AtCERK1 細胞外ドメイン/ OsCERK1 細胞内ドメイン」は、キチンオリゴ糖処理による活性酸素種の産生誘導が認められたが、逆の「OsCERK1 細胞外ドメイン/ AtCERK1 細胞内ドメイン」ではキチンオリゴ糖による活性酸素種の産生誘導は認められなかった。

(3)シロイヌナズナおよびイネのキチン認識機構の共通性・差異

キチン認識系において、シロイヌナズナ・

イネとも構造的に類似した蛋白質を有しているが、イネが CEBiP/OsCERK1 の 2 種の受容体を必要とするに対して、シロイヌナズナの CEBiP 型分子はキチン応答に関与せず、CERK1 が単独で受容体として機能する可能性を示した。植物に広く存在するキチン認識系が、シロイヌナズナとイネの間で違いがあることは非常に興味深い。他の植物のキチン認識系が、シロイヌナズナ・イネのどちらのタイプであるのか明らかにすることは、今後の課題である。

(4) シロイヌナズナ AtCERK1 直下で機能する受容体様細胞質キナーゼ PBL27 の解析

キチン受容体の直下で機能する受容体様細胞質キナーゼについて解析を行った。既に報告のあった、イネキチン受容体 OsCERK1 直下で機能する受容体様細胞質キナーゼ OsRLCK185 のホモログである、シロイヌナズナ PBL27 に着目して解析を行った。その結果、PBL27 は原形質膜に局在しており、AtCERK1 の細胞内ドメインと相互作用することを明らかにした。次に、*pbl27* ノックアウト変異体を用いた解析より、キチン誘導性のカロース蓄積や防御関連遺伝子発現を含む、複数のキチン応答が低下したが、活性酸素種の蓄積誘導には影響が認められなかった。一方で、PBL27 がキチン以外の植物免疫シグナルに関して機能を有しているかどうか解析を進めたところ、フラジェリン受容体 FLS2 を介したシグナリングへの関与は限られていると考えられた。これらのことから、PBL27 は AtCERK1 直下で、キチンシグナル伝達に機能する受容体様細胞質キナーゼであることが示唆された。そこで、AtCERK1 の細胞内ドメインにより、PBL27 が直接リン酸化されていることが明らかになった。実際、シロイヌナズナにキチン処理した際に見られる、PBL27 のリン酸化が、*cerk1* ノックアウト変異体では観察されなかった。以上の結果より、シロイヌナズナ PBL27 はイネ OsRLCK185 と同様にキチン受容体 CERK1 の直下でキチンシグナル伝達に寄与していることが明らかになった (図 2)。

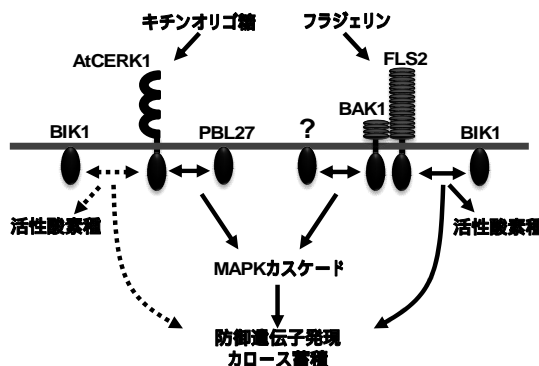


図2 シロイヌナズナ AtCERK1 直下で機能する受容体様細胞質キナーゼ PBL27

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5件)

新屋友規、渋谷直人、(2015) 植物免疫と細胞壁、植物の生長調節、Vol.50、印刷準備中、査読有

Shinya T., Yamaguchi K., Desaki Y., Yamada K., Narisawa T., Kobayashi Y., Maeda K., Suzuki M., Tanimoto T., Takeda J., Nakashima M., Funama R., Narusaka M., Narusaka Y., Kaku H., Kawasaki T., Shibuya N., (2014) Selective regulation of chitin-induced defense response by the Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinase PBL27. Plant J. 79, 56-66. 査読有 doi: 10.1111/tpj.12535.

Narusaka Y., Shinya T., Narusaka M., Motoyama N., Shimada H., Murakami K. and Shibuya N. (2013) Presence of LYM2 dependent but CERK1 independent disease resistance in Arabidopsis. Plant Signal Behav. 8, e25345. 査読有 doi: 10.4161/psb.25345.

Shinya T., Motoyama N., Ikeda A., Wada M., Kamiya K., Hayafune M., Kaku H., Shibuya N., (2012) Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in Arabidopsis and rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants. Plant Cell Physiol. 53, 1696-1706. 査読有 doi: 10.1093/pcp/pcs113.

[学会発表](計24件)

Shinya T., Yamaguchi K., Desaki Y., Yamada K., Narisawa T., Kobayashi Y., Maeda K., Suzuki M., Tanimoto T., Takeda J., Nakashima M., Funama R., Narusaka M., Narusaka Y., Kaku H., Kawasaki T., Shibuya N., Selective regulation of chitin-induced defense response by the Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinase PBL27, XVI IS-MPMI, Rhodes, Greece (July 6-10, 2014)

新屋友規、山口公志、出崎能丈、山田健太、鈴木丸陽、船間亮汰、中島正登、小林佳弘、竹田潤、賀来華江、川崎努、渋谷直人:AtRLCK1 による CERK1 を介したキチンシグナリングの選択的な制御. 第 55 回日本植物生理学会年会、富山大学、富山(2014年3月18-20日)

新屋友規、山口公志、出崎能丈、成澤知子、前田佳菜子、小林佳弘、鈴木丸陽、谷本匠、竹田潤、船間亮汰、山田健太、鳴坂真理、鳴坂義弘、賀来華江、川崎努、渋谷直人“MAMPs シグナリングにおける受容体様細胞質キナーゼ AtRLCK1 の機能解析”平成 25 年度 日本植物病理学会 関西支部会、岡山大学、岡山(2013年9月26-27日)

新屋友規、山口公志、出崎能丈、成澤知子、前田佳菜子、小林佳弘、鈴木丸陽、谷本匠、十文字純一、竹田潤、船間亮汰、山田健

太、鳴坂真理、鳴坂義弘、賀来華江、川崎努、
渋谷直人“キチングナリングに関する受
容体様細胞質キナーゼ AtRLCK1 の機能解析”
平成 25 年度植物感染生理談話会、北陸粟津
温泉 法師、石川 (2013 年 8 月 19-21 日)

Shibuya N., Kaku H., Shinya T., Kito K.,
Motoyama N., Hayafune M., Berisio R., Silipo A.,
Molinaro A., Yamaguchi K., Kawasaki T., Ligand
recognition, autophosphorylation and signaling
by plant chitin receptors., Keystone Symposia,
Plant Immunity: Pathways and Translation, Big
Sky, Montana, USA (April 7-12, 2013)

小林佳弘、丸山卓也、森田杏実、元山記
子、出崎能丈、新屋友規、賀来華江、Guillaume
Tena, Jen Sheen、渋谷直人“MPK3/MPK6 によ
って制御されるキチン応答の解析” 第 54 回
日本植物生理学会年会、岡山大学、岡山(2013
年 3 月 21-23 日)

新屋友規、山口公志、成澤知子、前田佳
菜子、小林佳弘、鈴木丸陽、谷本匠、十文字
純一、竹田潤、船間亮汰、山田健太、出崎能
丈、鳴坂真理、鳴坂義弘、賀来華江、川崎努、
渋谷直人“キチングナリングに関する受
容体様細胞質キナーゼ AtRLCK1 の機能解析”
第 54 回日本植物生理学会年会、岡山大学、
岡山 (2013 年 3 月 21-23 日)

Kaku H., Hayafune M., Sato Y., Takamizawa
D., Shimizu T., Shinya T., Shibuya N., Plant
innate immunity mediated by rice LysM
receptors., 10th International Symposium on Rice
Functional Genomics, Chiang Mai, Thailand
(November 26-29, 2012)

賀来華江、早船真広、加山実祐、有馬祥
子、神谷光太、新屋友規、Rita 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、鹿児
島市民文化ホール、鹿児島(2012 年 9 月 17-20
日)

谷本匠、佐藤圭、中島正登、村上弘祐、
新屋友規、神谷光太、渋谷直人、賀来華江 “ベ
ンサミアナタバコー過的発現系を用いた
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、
休暇村近江八幡、滋賀(2012 年 8 月 28-9 月 1
日)

早船真広、加山実祐、有馬祥子、神谷光
太、新屋友規、Rita Berisio、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、休暇村近江八幡、滋賀(2012 年
8 月 28-9 月 1 日)

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、休暇村近江八幡、滋賀(2012
年 8 月 28-9 月 1 日)

Shibuya N., Kaku H., Shinya T., Shimizu T.,
Nakagawa T. and Motoyama N., Chitin
Receptors in Plant Immunity., XV International
Congress on Molecular Plant-Microbe
Interactions, Kyoto, Japan, (July 29-2August 2,
2012)

Shinya T., Motoyama N., Hayafune M.,
Kamiya K., Shimada H, Tanimoto T., Kaku H.
and Shibuya N., Different receptor systems
regulate chitin signaling in Arabidopsis and rice,
XV International Congress on Molecular
Plant-Microbe Interactions, Kyoto, Japan, (July
29-2August 2, 2012)

〔図書〕(計 1 件)

新屋友規、渋谷直人、キチン・キトサ
ンの生物活性と利用、菌類の事典 人間社会
編、朝倉書店 (2013) 532-533

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新屋 友規 (SHINYA TOMONORI)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：80514207