

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32682

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650104

研究課題名(和文) 防御から共生への受容体機能変換の生化学的機構

研究課題名(英文) Mechanistic studies on the functional switching of plant LysM receptors from defense to symbiotic responses.

研究代表者

澁谷 直人 (Shibuya, Naoto)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：70350270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の防御応答・共生応答を制御するCERK1/NFR1型の受容体キナーゼは、そのキナーゼドメインのYAQ配列の有無によって下流の共生応答の誘導の可否が左右される。キナーゼドメインのアミノ酸配列のわずかな差異が下流の細胞応答の切り替えにどのようにしてつながるかを検討した結果、YAQ配列の有無による自己リン酸化部位には差異が認められなかった。このことは、この配列の導入によるわずかな立体構造の違いが下流のシグナル伝達因子などの相互作用に大きな影響を及ぼしていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Symbiosis-inducing ability of the kinase domains of CERK1/NFR1 receptor-like kinases relies on the presence of YAQ sequence in their kinase domains. To clarify the background of such "switching" of the downstream responses, autophosphorylation sites of the kinase domain of CERK1 or YAQ-CERK1 were analyzed. Interestingly, no difference was observed between autophosphorylation sites of these proteins, indicating that the structural changes induced by the presence of YAQ sequence itself plays critical roles for the "switching" of the downstream responses.

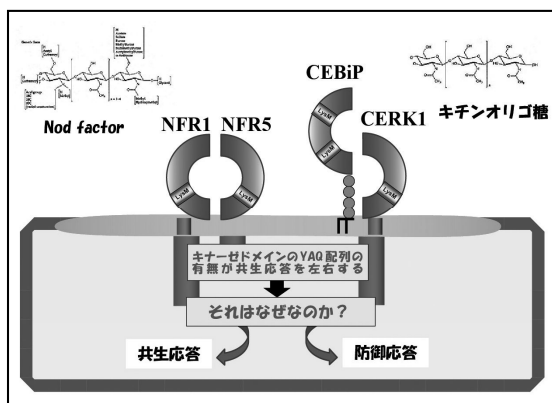
研究分野：生物学、植物分子・生理化学、植物・微生物相互作用・共生

キーワード：植物免疫 共生 LysM受容体 シグナル伝達 自己リン酸化 構造・機能解析

1. 研究開始当初の背景

植物は環境中の微生物と相互作用する際に、(潜在的)病原菌として排除する場合と共生菌として積極的に受け入れる場合とがある。いずれの場合にも、微生物由来のシグナル分子を認識して必要な応答を誘導するシステムが存在しており、防御応答においては、多くの微生物に共通して存在する分子パターン(MAMPs あるいは PAMPs)を対応するパターン認識受容体によって認識することがその第一歩となる。一方、根粒菌・マメ科植物の共生や、植物界により広く分布する共生系である菌根菌共生では、キチンオリゴ糖誘導体である Nod-factor や Myc-factor と呼ばれるシグナル分子を、植物側の受容体が認識することが共生応答の開始につながるとされている。

研究担当者らは、真菌類の代表的な分子パターンであるキチンの受容体分子(細胞外 LysM ドメインを持つ 2 種類の膜タンパク質、CEBiP および CERK1)を世界に先駆けて発見し(*PNAS*, 103, 11086 (2006); 同 104, 19613 (2007); *Plant J.*, 64, 204 (2010); *Plant Cell Physiol.*, 53, 1696 (2012))、その分子認識機構と防御応答制御機構について研究を行ってきた。一方、他のグループによる共生受容体の研究から、Nod-factor や Myc-factor の受容体もキチン受容体と同じグループの LysM 型分子であることが示唆されている(*Nature*, 425, 585 (2003), 同 425, 637 (2003); *Science*, 302, 630 (2003); 同 331, 909 (2011))。これらの結果は、構造的に類似したリガンド・受容体が全く異なる応答(防御応答と共生応答)を誘導することを示しており、どのようにしてそうしたことが可能になったか、これらの進化的関係はどうなっているのかという問題を提起している。



申請者らはこの疑問に答えるため、Nod-factor 受容体(NFR1)とキチン受容体(CERK1)のキメラ分子を利用して、防御応答を共生応答に切り替えるために必要な構造を調べた結果、キナーゼドメインにおける YAQ という 3 アミノ酸の配列が共生応答への切り替えで決定的な役割を果たしていることを見出した(*Plant J.*, 65, 169 (2011))。

このことは、進化の過程で、CERK1 型分子がこの配列を獲得したことで共生応答を可能とするようになったことを示唆するものである。一方、キナーゼドメインにおけるわずか 3 アミノ酸の配列の有無がどのようにして細胞応答のドラステックな変換につながったかに関しては全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、CERK1 への YAQ 配列の導入が防御応答だけでなく、共生応答にもつながり得るようになった理由を、CERK1 キナーゼドメインの生化学的、構造生物学的解析から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 予備的検討から、YAQ 配列の導入によって自己リン酸化の様式(inter/intramolecular phosphorylation)が変化する可能性が示されたことから、種々のタグを付加した CERK1 キナーゼドメインを大腸菌で発現させ、自己リン酸化の様式を詳細に検討する。

(2) YAQ 配列の有無により、in vitro 自己リン酸化部位が変化するかどうかを LC-MS/MS を用いて解析する。

(3) YAQ 配列の導入により変化した自己リン酸化部位が見いだされれば、これらの部位を Ala/Phe 置換した NFR1:YAQ-CERK1 キメラ受容体とミヤコグサ nfr1 変異体毛状根による根粒誘導検定系を利用して共生機能に及ぼす影響を解析する。

(4) YAQ 配列導入による分子間相互作用変化の可能性を酵母ツーハイブリッド、共免疫沈降、BiFC などを利用して解析する。

(4) YAQ 配列導入による立体構造変化を X 線結晶解析、分子モデリングにより解析し、キナーゼの作用機構変換の分子機構に関する知見を得る。

4. 研究成果

(1) さまざまなタグを付加した CERK1 キナーゼドメインタンパク質を用いて自己リン酸化の様式を解析した結果、YAQ を導入した CERK1 に関して、付加したタグの種類によって intramolecular mode と intermolecular mode といった異なる結果が得られた。詳細な解析の結果、YAQ 配列の有無に関わらず自己リン酸化は intermolecular mode で行われることが明らかになった。

(2) YAQ 配列を導入した CERK1 キナーゼドメインと野生型のを in vitro で自己リン酸化させ、トリプシン分解後、LC-MS/MS で自己リン酸化部位を解析、比較した。その結果、共生応答を誘導できない野生型のもの、共生応答を誘導できる YAQ 配列導入 CERK1 との間で自己リン酸化部位の違いは認められなかった。このことは、YAQ 配列導入による共生応答誘導能の獲得は、CERK1 の自己リン酸化を介したのではなく、この配列の導入に

よる立体構造の変化とタンパク間相互作用の変化によるものであることを示唆するものである。

(3)上記の結果から、当初計画の(3),(4)についてはそのままの形で実験を行うことを中止した。一方、CERK1 キナーゼドメインのリン酸化部位の機能解析については引き続き解析を続行し、自己リン酸化部位の中には大別してCERK1のキナーゼ活性の調節を介して下流の細胞応答を制御するものと、キナーゼ活性制御には直接かわらず、恐らくシグナル伝達系因子との相互作用に関わることで下流の応答を制御するものがあることを見出した。後者のリン酸化部位に関しては、当初計画にもあったような、下流のシグナル伝達系因子との相互作用、調節への関わりを検討した結果、下流のシグナル伝達系因子のリン酸化、活性調節に寄与する可能性があることが判明した。

(4)これらの結果から、CERK1 キナーゼドメインの立体構造解析に基づく構造生物学的考察の重要性が明らかになった。このため、X線結晶解析に必要な高純度のタンパク質を十分量調製することを目的に、さまざまな発現系、発現コンストラクトの検討を行った。その結果、現在までに、純度の高いタグ付きタンパク質を十分量調製できる系を構築できた。今後、タグを取り除いて結晶化を進め、構造解析に進む予定である。

(5)これらの検討と並行して、イネにおける菌根菌共生に関わる因子の解析を進めた結果、イネ CERK1(OsCERK1)はシロイヌナズナと異なってキナーゼドメイン中に YAQ 配列をもっており、キチンによる防御応答誘導と同時に菌根菌共生にも不可欠であることを見出した(Miyata et al., 2014)。このことは、単一の受容体キナーゼが MAMP シグナルを介した防御応答と共生シグナル(Myc シグナル、イネにおける実体は不明)双方の認識・応答に不可欠であるという極めて興味深い事実を示している。今後、この系の解析を進めることで、CERK1 型分子による防御応答と共生応答の制御・切り分けの分子機構が明らかになるものと期待される(Shinya et al., 2015)。

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 4 件)

(1) K. Miyata, T. Kozaki, Y. Kouzai, K. Ozawa, K. Ishii, E. Asamizu, Y. Okabe, Y. Umehara, A. Miyamoto, Y. Kobae, K. Akiyama, H. Kaku, Y. Nishizawa, N. Shibuya, T. Nakagawa (2014) Bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant Cell Physiol.*, **55**, 1859-1863. DOI: 10.1093/pcp/pcu129 (査読有)

(2) T. Shinya, T. Nakagawa, H. Kaku and N. Shibuya (2015) Chitin-mediated plant-fungal interactions: catching, hiding and handshaking. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **26**, 64-71. DOI:10.1016/j.pbi.2015.05.032 (査読有)

(3) M. Kohari, K. Yashima, Y. Desaki, N. Shibuya (2016) Quantification of stimulus-induced callose spots on plant materials. *Plant Biotechnol.* **33**, 11-17. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.1120a (査読有)

(4) 賀来華江、渋谷直人 (2015) キチンオリゴ糖は受容体のサンドイッチ型ダイマー形成を介して植物免疫を活性化する、*化学と生物*, **53**, 726-727 (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

(1) H. Kaku, N. Shibuya, Molecular mechanisms of chitin recognition and immune signaling by LysM-receptors. 11th Japan-US seminar: Molecular contact points in host-pathogen co-evolution, 2015年10月26-29日、高松市(招待講演)

(2) 渋谷直人; キチン受容体を介した植物免疫制御機構。2014年9月25日、新潟市、日本応用糖質科学会特別シンポジウム(招待講演)

(3) Naoto Shibuya, Hanae Kaku, Tomonori Shinya, Keiji Kito, Noriko Motoyama, Masahiro Hayafune, Rita Berisio, Alba Silipo, Antonio Molinaro, Koji Yamaguchi, Tsutomu Kawasaki; Ligand recognition, autophosphorylation and signaling by plant chitin receptors. Keystone Symposium "Plant Immunity: Pathways and Translation", 2013年4月7-12日、米国・ビッグスカイリゾート(招待講演)

(4) S. Takahashi, H. Koizumi, T. Miura, K. Yashima, Y. Ishibashi, K. Kito, M. Narusaka, Y. Narusaka, Y. Desaki, H. Kaku, N. Shibuya; An E3 ubiquitin ligase, PUB4, regulates immune signaling through the interaction with Arabidopsis CERK1. 2016年3月18-20日、盛岡市、第57回日本植物生理学会年会

(5) K. Suto, M. Suzuki, M. Shibuya, H. Shimada, N. Motoyama, S. Takahashi, I. Yoshida, S. Matsui, M. Nakashima, M. Ohnishi, K. Kito, Y. Desaki, H. Kaku, N. Shibuya; Identification and functional analysis of phosphorylation sites in Arabidopsis CERK. 2016年3月18-20日、盛岡市、第57回日本植物生理学会年会

(6) Y. Desaki, K. Yashima, M. Kohari, T. Ueda, H. Kaku, N. Shibuya; Membrane traffic components involved in MAMP-triggered callose accumulation in Arabidopsis, 36th New Phytologist Symposium, "Cell biology at the

plant-microbe interface”, 2015年11月29-12日, Eden Hotel Wolff, Munich, Germany,
(7) Y. Desaki, S. Takahashi, K. yashima, H. Koizumi, T. Miura, H. Ishibashi, K. Kito, M. Narusaka, Y. Narusaka, H. Kaku, N. Shibuya; Regulation of immune signaling by an E3 ubiquitin ligase that interacts with Arabidopsis CERK1, 11th Japan-US seminar: Molecular contact points in host-pathogen co-evolution, 2015年10月26-29日、高松市
(8) 小泉春樹、石橋裕子、紀藤圭治、出崎能文、賀来華江、渋谷直人; CERK1によるリン酸化を介したPUB4の機能制御。平成27年度植物感染生理談話会, 2015年8月24-26日、松山市
(9) T. Nakagawa, K. Miyata, T. Kozaki, Y. Kouzai, K. Ozawa, K. Ishii, E. Asamizu, Y. Okabe, Y. Umehara, A. Miyamoto, Y. Kobae, K. Akiyama, H. Kaku, Y. Nishizawa, N. Shibuya; A single LysM receptor kinase, rice OsCERK1, switches rejection or acceptance of infecting microbes. 第16回植物・微生物相互作用の分子機構に関する国際シンポジウム、2014年7月6～10日、ギリシャ、ロードス市
(10) K. Miyata, Y. Kouzai, K. Ozawa, Y. Kobae, H. Kaku, Y. Nishizawa, N. Shibuya, T. Nakagawa; The role of a LysM receptor-like kinase, OsNFR5 for root mycorrhization in *Oryza sativa*. 第16回植物・微生物相互作用の分子機構に関する国際シンポジウム、2014年7月6～10日、ギリシャ、ロードス市

〔図書〕(計 2件)

(1) T. Shinya, Y. Desaki, N. Shibuya (2016) Oligosaccharin receptors in plant immunity. “Research progress in oligosaccharins”, edited by Y. Du and H. Yin, Springer, DOI 10.1007/978-1-4939-3518-5_3.
(2) T. Nakagawa, S. Okazaki, N. Shibuya (2014) Genes Involved in Pathogenesis and Defense Responses. “The Lotus japonicus genome”, edited by S. Tabata and J. Stougaard, Springer, pp163-169.

〔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
渋谷 直人 (Shibuya Naoto)
明治大学農学部 教授
研究者番号：70350270

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：