

LysM型受容体様キナーゼCERK1のシグナル伝達制御機構に関する研究

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-07-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 丸陽 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/10291/19577 |

2018年 2 月 1日

「博士学位請求論文」審査報告書

審査委員 (主査) 農学部 専任 教授

氏名 _____ ⑩

(副査) 農学部 専任 教授

氏名 _____ ⑩

(副査) 農学部 専任 准教授

氏名 _____ ⑩

1. 論文提出者 鈴木 丸 陽

2. 論文題名

(邦文題) 「LysM 型受容体様キナーゼ CERK1 のシグナル伝達制御機構に関する研究」
(欧文訳) (Molecular mechanism of the regulation of immune signaling by the LysM receptor-like kinase CERK1)

3. 論文の構成

本論文は次の4章、序論、総合考察および謝辞と文献により構成されている。

序論

第1章 CERK1自己リン酸化部位の同定とリン酸化部位の生物学的評価

第2章 CERK1 自己リン酸化部位の生化学的機能評価

第3章 CERK1 細胞内ドメインの X線結晶構造解析に向けた試料調製系の確立

第4章 CERK1 型分子の細胞内ドメインの違いが機能に与える影響の評価

総合考察

4. 論文の概要

植物が持つ、MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern, 微生物固有の分子パターン) 認識に基づく防御応答機構は、多くの潜在的病原菌に対する抵抗性に寄与していると考えられ、農業的・生物学的観点から世界的に注目を集めています。これらの微生物由来の MAMPs は植物の原形質上にある受容体による認識・受容を起点に、シグナル伝達系が活性化され、最終的に活性酸素の生成、防御応答遺伝子の発現や抗菌性物質の誘導などの様々な防御応答が誘導され、微生物の感染を阻止します。このような MAMPs を介する防御機構は、動物の自然免疫と類似することから、近年「植物免疫」という言葉が定着してきています。これまで MAMP に対する植物受容体は、細胞外領域のモチーフ構造により3つのグループに大きく分類されています。LRR (ロイシンリッチリピート) を

細胞外領域にもつ細菌の鞭毛フラジエリン受容体 (FLS2) や翻訳伸長因子 (EF-Tu) の受容体 (EFR) 等の LRR 型受容体は、ペプチドを含むタンパク質性 MAMPs を認識しており、ヒトの自然免疫の代表的な Toll-like receptor (TLR) 群も細胞外領域に類似する LRR を持っています。一方、当研究室が同定した LysM (Lysin motif) ドメインを細胞外領域にもつ受容体 (LysM 受容体) は、キチンやペプチドグリカンなどの糖質性 MAMPs の認識に関わっており、現段階では LysM 型受容体は哺乳動物の免疫系には見出されておらず、植物に特徴的な受容体であると考えられています。

キチンは真菌の細胞壁の主要な構成成分の一つであり、MAMP として広範囲の植物に対して防御応答を誘導することが知られています。当研究室ではこれまでキチンに着目して、その認識・応答に関わる LysM 型受容体/共受容体 (CEBiP, CERK1) や受容体直下流の因子を同定してきました。この過程で、イネとシロイヌナズナにおいて、イネでは OsCEBiP、シロイヌナズナでは CERK1 のようにキチン受容の主体となる分子が異なるものの、細胞内シグナリングの起点となるのは、いずれも LysM 型受容体キナーゼである CERK1 分子であることを明らかにしています。一方、Os/CERK1 分子が細菌 (バクテリア) の MAMP であるペプチドグリカン応答にも関与していることが示されており、また *cerk1* 変異体では真菌だけでなく細菌に対する抵抗性も低下することからも、CERK1 が植物免疫機構において中心的な分子の一つであることがわかってきました。さらに、病原菌が分泌する複数のエフェクターが CERK1 のシグナル伝達系をターゲットにしていることが明らかになっており、病原菌側の解析からも CERK1 を介した防御応答の起動が植物免疫において重要であることが示されています。

一方、ミヤコグサにおいて、CERK1 と高いアミノ酸配列の相同性をもつ NFR1 は、Nod factor の受容体であり、根粒菌共生応答に関わる重要な分子であります。興味あることに CERK1 と NFR1 の細胞内領域は、高い構造的類似性を持つにもかかわらず、防御と共生の相反する応答の制御に関わっています。これまでシロイヌナズナ CERK1 の細胞内領域に、NFR1 のもつ特徴的な 3 アミノ酸配列 (YAQ) を導入することにより、CERK1 の細胞内領域に、本来保有していない根粒菌との共生応答活性が付与されることを見せました。しかし、どのようにこの相反する両極の応答系の切替えを制御しているのかについてはまだ不明であります。

本論文では、シロイヌナズナ CERK1 受容体の細胞内領域に注目し、キチン防御シグナル伝達の活性化に関わるリン酸化部位を網羅的に探索し、特定されたリン酸化部位のより詳細な機能解析を行うとともに、CERK1 の細胞内領域の構造解析に向けた結晶化試料の調製技術の確立および LysM 型様受容体の類似する細胞内領域は、受容体複合体の形成に重要な影響を与える知見を報告しています。

序論では、本研究の背景となる植物免疫機構について概説し、さらに本研究で取り上げた微生物分子パターン (MAMPs) であるキチンオリゴ糖に対する植物の LysM ドメインを持つ受容体及びその関連する分子、また最新の植物における共生菌との共生応答に関わる LysM 受容体の研究概略および防御応答と共生応答のシグナル系の切り替えについても言及しています。

第1章では、CERK1細胞内ドメイン中でシグナル伝達に関わる自己リン酸化部位の網羅的探索とキチンシグナル応答の活性化に関わるリン酸化部位の同定を中心に論じています。第2章では、第1章で同定された5か所のリン酸化部位のより詳細な機能解析を進めています。第3章では、構造生物学的な観点から CERK1細胞内ドメインの解析を行うため、X線結晶構造解析に用いるタンパク質試料の調製・精製手法の確立を目指しました。第4

章では、CERK1ホロモグであるNFR1の細胞内領域の構造の変異がどのように機能に影響を与えるのか明らかにすることを目指しています。

第1章では、CERK1のシグナル伝達活性化機構の解明を目的に、CERK1のシグナル伝達に関わる自己リン酸化部位の同定を目指しています。CERK1のリン酸化部位の網羅的な解析方法として、大腸菌発現系 (in vitro 系) およびベンサミアナタバコー過的発現系 (in vivo 系) で調製した CERK1 細胞内ドメインタンパク質 (CERK1cyt) および CERK1 タンパク質を用いて、LC-MS/MS 解析を行いました。その結果、CERK1 の in vitro/in vivo リン酸化部位を合わせて 42 か所を同定しました。これらのリン酸化部位がほんとに生物学的意味を持つかどうかを解析するために、セリン (S)、スレオニン (T) 残基のリン酸化部位をアラニン残基 (A) に、チロシン残基 (Y) をフェニルアラニン残基 (F) に、それぞれ置換した CERK1 をシロイヌナズナ *cerk1* 変異体に形質転換した導入変異体を作成し、キチン誘導性防御応答の復帰を指標に用いて評価した。その結果、CERK1 の 428 番目のチロシン残基、473、479 および 573 番目のスレオニン残基、493 番目のセリン残基をほかのアミノ酸残基に置換した CERK1 形質転換体では、キチン誘導性の防御応答の著しい低下あるいは消失が観察され、これら 5 か所 (Y428, T473, T479, S493, T573) のアミノ酸残基が CERK1 キチンシグナル伝達に関わることが示唆された。また、CERK1 のホモ 2 量体形成が防御応答の開始はすでに明らかになっていますが、大腸菌発現系で調製した CERK1cyt の解析により、CERK1 が トランスリン酸化活性を持つことが示し、すなわち、“分子間リン酸化反応” がシグナル伝達の起動に関与することを示唆しました。

第2章では、CERK1の同定された5か所のリン酸化部位に着目し、より詳細な機能解析を行いました。これまで受容体様キナーゼは細胞内領域にあるアミノ酸残基の段階的なリン酸化によりキナーゼが活性化され、受容体の直下のシグナル伝達因子のリン酸化をするとされています。大腸菌発現系を用いて、それぞれのリン酸化部位をアラニン残基あるいはフェニルアラニン残基に置換した CERK1cyt を調製し、CERK1 自身および MBP (Myelin Basic Protein) を基質としたリン酸化への活性を評価しました。その結果、CERK1 (T479A) cyt では両方の基質に対してリン酸化活性が完全に消失し、このことは T479 が CERK1 のキナーゼ活性本体に関わる重要なリン酸化残基であることが明らかになりました。また、CERK1 (T573A) cyt では、CERK1 自身および MBP に対するリン酸化活性の低下が観察され、T573 のリン酸化が CERK1 の継続的な自己リン酸化に関わるキナーゼ活性の従事していること示唆されました。一方、CERK1 (Y428F) cyt、CERK1 (T473A) cyt、CERK1 (S493A) cyt では、CERK1 および MBP のリン酸化には影響がみられず、これらの3か所はキチンシグナル応答には関与するが、CERK1 自身のリン酸化には関わらないことが考えられました。そこで、さらにベンサミアナタバコー過的発現系を用いて、Y428、S493 について解析を行いました結果、CERK1 (Y428F) では、大腸菌発現タンパク質を用いた解析結果と異なり、CERK1 における自己リン酸化活性が消失することが観察され、この Y428 が CERK1 のキナーゼ自身のリン酸化に関わる残基であることが示唆されました。この結果は、これまで常法で用いられている in vitro 解析だけではリン酸化部位の機能を正しく評価できない場合があることを示しました。また、CERK1 (S493A) では、野生型を用いた実験と同程度の CERK1 への自己リン酸化活性が観察され、S493 が CERK1 自身のキナーゼ活性に関与しないことが示唆されました。そこで大腸菌発現系で調製した CERK1 (S493A) cyt を用いて、CERK1 直下流のシグナル伝達因子へのリン酸化について評価をおこなった結果、シグナル伝達因子のリン酸化の低下が観察され、下流のシグナル伝達因子のリン酸化に関わる可能性が示されましたが、一方で CERK1 (S493A) cyt は CERK1 の分子間リン酸化能に影響がみられたため、S493 の機能は慎重に考察する必要があることも示されました。本章の解析を通じて、CERK1 のキチンシグナル伝達の活性化に関わ

る複数のリン酸化残基を見出しました。

第3章では、CERK1の活性化機構を構造生物学的視野からの解析を行うために、CERK1細胞内領域のX線結晶構造解析を目指し、その解析に用いる高純度で可溶性試料を高収量に得られる調製系の確立を行っています。大腸菌発現系を用い、目的タンパク質における標識タグの種類、培養条件の検討および複数のアフィニティークロマトグラフィー精製方法について検討を重ねて、CERK1cytを高純度に調製できる系を確立しました。また、結晶化条件を検討し、2つの異なる条件でCERK1cyt様結晶が確認されています。今後は、それらの結晶片についてさらに解析を進め、X線結晶構造解析への可能性についても検討を行います。

第4章では、CERK1と高い構造的相同性をもつNod factorの受容体であるNFR1に着目し、CERK1とNFR1の細胞内領域のNFR1-NFR5受容体複合体の形成に与える影響について解析を進めています。ベンサミアナタバコ一過的発現系で共発現させたNFR1分子とNFR5との共免疫沈降法を用いた相互作用解析により、NFR1とNFR5の相互作用は、細胞外領域にNFR1と細胞内領域にCERK1を融合させたキメラ分子とNFR5の相互作用よりも強いことを見出しました。これらの解析はCERK1/NFR1型分子の細胞内領域の構造の違いがNFR5との相互作用に影響を与えることを明らかにしました。

総合考察では、第1章から第4章までの研究結果をまとめ、本研究の意義を総括しています。

5. 論文の特質（または研究の特質）

本論文は、植物の基礎的病害抵抗性において、もっとも重要な役割を果たしています。受容体に焦点をおき、特にLysM受容体ガリガンドの認識・受容後、どのように受容体本体が活性化し、下流因子にシグナル伝達するのかというシグナル伝達経路の“起点”に着目した研究であります。これまで受容体の活性化に関わるリン酸化部位の報告は多く報告されていますが、しかし、本論文のように受容体のリン酸化部位を網羅的に解析した報告はほとんどない。本論文の特質は、網羅的解析手法を用いて、シロイヌナズナCERK1受容体の細胞内領域のリン酸化部位の解析により、受容体のキチンシグナル応答系に関わる複数アミノ酸残基を同定し、これらのアミノ酸残基のリン酸化もつ生物学的特性と機能について解析を行いました。この中で受容体のキナーゼ本体の活性化に直接に関わるリン酸化部位、受容体の継続的リン酸化段階に寄与するリン酸化部位や下流因子のリクルートに関わるリン酸化部位を明らかにしました。また防御応答に関わる多くの受容体に保存されている機能が不明なアミノ酸残基を明らかにし、さらにリン酸化部位の解析に用いられる通常のIn vitro解析法では、機能を明確できないリン酸化部位があることを示しました。また本研究はCERK1の細胞内領域の構造生物学的に解析をおこなうため、高純度で可溶性目的タンパク質を高収量に得る精製技法の開発を行い、目的タンパク質のX線結晶構造解析への可能性を導きました。また、この構造生物学的な解析手法の開発はCERK1の細胞内領域に、ある特定の3アミノ酸残基配列(YAQ)の導入による共生応答活性の獲得がどのような構造の変化によるのかという防御と共生応答の切り替え機構の解明において大きく貢献すると考えられます。本論文は、近年急速に発展しつつある植物のMAMPs受容体研究にきわめて重要な知見を提供するものであり、植物免疫の機構、防御と共生応答の切り替の理解だけに留まらず、高い病害抵抗性をもつ作物や新たな共生機能を付加した機能性を高めた植物の開発の基礎・応用の両面において重要な知見を提供できるという特質を持っています。

6. 論文の評価（または研究の評価）

本論文の主要な第1章および第2章の一部は日本植物生理学会の国際科学誌「Plant

and Cell Physiology」および米国オンライン科学誌「Plant Signaling & Behavior」の筆頭執筆者として論文をまとめており、さらに本論文の研究成果を国際エンドトキシンおよび先天性免疫学会の国際科学誌「Innate Immunity」の総説に分担執筆者として執筆しています。これらの論文は本分野の研究に大きな影響を与え、極めて重要な成果を得た論文と評価されています。

7. 判 定

本学位請求論文は、農学研究科において必要な研究指導を受けたうえ提出されたものであり、本学学位規程の手続きに従い、審査委員全員による所定の審査及び最終試験に合格したので、博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定する。

以 上