

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

2017年度 農学研究科

博士学位請求論文 (要旨)

「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」

生命科学専攻
鈴木 丸陽

1 問題意識と目的

土壌に根を下ろす植物は、微生物と接触する機会が多く、潜在的病原菌の脅威に曝されながら生きなければならない。そこで植物は、微生物に保存された分子パターン (Microbe-Associated Molecular Pattern、MAMP) を細胞膜上の受容体で認識することで、侵入を試みる微生物に対して防御応答を誘導し、非自己を排除する能力を獲得してきた。一方、植物は有用共生菌を識別し、積極的に組織・細胞内に受け入れることもわかっており、マメ科植物と根粒菌の共生が知られている。マメ科植物は、根粒菌が分泌する Nod factor と呼ばれるシグナル分子を、細胞膜上の受容体で認識することで、その受け入れを開始するとされる。

当研究室は、真菌の細胞壁構成成分で MAMP の 1 つであるキチン (キチンオリゴ糖) の応答に必須な CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1) とそれと直接相互作用する下流のシグナル伝達因子をシロイヌナズナで同定・解析してきた。CERK1 は、細胞外にキチンオリゴ糖の結合に関わる LysM ドメインをもち、細胞内にキナーゼ構造を有する LysM 型受容体様キナーゼである。興味深いことに、Nod factor はキチン骨格を有し、その受容体である NFR1 は CERK1 のホモログであることが明らかにされている。そのため、構造的に類似した微生物分子・受容体分子が、相反する応答 (防御応答と共生応答) を制御することがわかってきた。

当研究室および他の研究グループの解析から、CERK1 は細胞内ドメインを自己リン酸化したのち、その直下のシグナル伝達因子をリン酸化することで、防御応答系を起動・制御することが明らかになっている。しかし CERK1 が自己リン酸化でどのように活性化し、直下のシグナル伝達因子をリン酸化できるようになるかはわかっておらず、CERK1 によるシグナル伝達活性化機構は不明な点が多い。

またミヤコグサの *nfr1* 変異体に、NFR1 の細胞内ドメインを CERK1 の細胞内ドメインに置換した NFR1-CERK1 キメラ分子を導入した形質転換体では、根粒菌共生が観察されないものの、CERK1 細胞内ドメインに NFR1 に特徴的な 3 アミノ酸配列 (YAQ) を導入した NFR1-CERK1 (YAQ) キメラ分子を導入した形質転換体では、根粒菌共生が観察されることが明らかにされ、相反する応答の切り換えが細胞内ドメインのわずかな違いで決定されることが示された。しかし、こうした違いがどのようにして応答の切り換えにつながるかはわかっていない。

そこで本研究では、CERK1 の自己リン酸化を介した CERK1 自身と下流のシグナル伝達系活性化機構の解明と、CERK1 型分子の細胞内ドメインの構造と防御・共生応答の切り換え機構に関する知見を得ることを目的として研究を行った。

2 構成および各章の要約

本研究は、4 章で構成され、第 1 章では、CERK1 細胞内ドメイン中のシグナル伝達に関わる自己リン酸化部位の探索と同定を目指した。第 2 章では、第 1 章で同定されたリン酸化部位の、より詳細な機能解析を進めた。第 3 章では、構造生物学的な観点から CERK1 細胞内ドメインを解析するため、X 線結晶構造解析に用いるタンパク質試料の発現および精製系の確立を目指した。第 4 章では、CERK1 ホモログである NFR1 の細胞内ドメインの構造が機能に与える影響を明らかにすることを目指した。

第 1 章では、CERK1 のシグナル伝達起動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た。このため、大腸菌発現系 (*in vitro*) およびベンサミアナタバコ一過的発現系 (*in vivo*) で調製した CERK1 細胞内ドメインタンパク質 (CERK1_{cyt}) および CERK1 タンパク質を用いて、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、CERK1 の *in vitro/in vivo* リン酸化部位を計 42 か所同定した。また、これらのリン酸化部位が CERK1 のキチン誘導性のシグナル伝達に関わる部位であるかを調べるために、セリン残基 (S)、スレオニン残基 (T) 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 *cerk1* 変異体に形質転換し、キチン誘導性の防御応答の復帰を評価した。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置換した一アミノ酸置換 CERK1 形質転換体で、キチン誘導性の防御応答のわずかな復帰あるいは復帰の消失が観察され、これら 5 か所 (Y428, T473, T479, S493, T573) のリン酸化部位が CERK1 のシグナル伝達に関わることが示唆された。また、CERK1 は 2 量体化して防御応答を開始することがわかっているが、2 量体化と自己リン酸化の関連は明らかになっていなかった。そこで、大腸菌発現系で調製した CERK1_{cyt} を用いて自己リン酸化モードを解析したところ、CERK1 は分子間で自己リン酸化することが示された。よって、CERK1 は 1 分子のキチンを介してホモダイマー化し、互いにリン酸化し合うことで、シグナル伝達を起動することが示唆された。

第 2 章では、第 1 章で同定された CERK1 の 5 か所の自己リン酸化部位に着目し、これらの部位の CERK1 およびシグナル伝達の活性化における機能を明らかにすることを目指し、詳細な解析を行った。受容体様キナーゼはアミノ酸残基の段階的なリン酸化で、キナーゼを活性化させ、直下のシグナル伝達因子をリン酸化できるようにするとされている。そこで、CERK1 の 5 か所の自己リン酸化部位が、どの段階で機能するかを明らかにすることとした。まず、大腸菌発現系で、それぞれのリン酸化部位をアラニンあるいはフェニルアラニン残基に置換した CERK1_{cyt} を調製し、CERK1 自身およびモデル基質である MBP (Myelin Basic Protein) に対するリン酸化能を評価した。その結果、CERK1 (T479A)_{cyt} では両方の活性が消失し、T479 のリン酸化は自己リン酸化による CERK1 のキナーゼの活性化に関わることが明らかになった。また、CERK1 (T573A)_{cyt} では、自身および MBP に対するリン酸化の低下が観察され、T573 のリン酸化が CERK1 の連続的な自己リン酸化によるキナーゼ活性の亢進に関わることが示唆された。一方、CERK1 (Y428F)_{cyt}、CERK1 (T473A)_{cyt}、CERK1 (S493A)_{cyt} では、自己リン酸化および 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示唆された。

一方、ベンサミアナタバコ一過的発現系を用いて、Y428、S493 についてさらに解析を行った。その結果、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、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 自身のリン酸化に関わるリン酸化部位であることが示唆された。この結果は、*in vitro* の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ている。また、CERK1 (S493A) では、野生型と同程度の自己リン酸化能が観察され、S493 が CERK1 自身のリン酸化能に関与しないことが示唆された。そこで大腸菌発現系で調製した CERK1 (S493A)_{cyt} を用いて、CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化を評価したところ、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た。一方で CERK1 (S493A)_{cyt} は CERK1 の分子間リン酸化能に影響を与えたため、進めた解析だけでは S493 の機能を限定することはできないことが示された。本章の解析を通じて、CERK1 はそれぞれのアミノ酸残基のリン酸化を通じて段階的にキナーゼ活性を亢進し、下流のシグナル伝達因子をリン酸化するようになることが示された。

第 3 章では、CERK1 の活性化機構を構造生物学的に解析するため、CERK1 細胞内ドメインの X 線結晶構造解析を目指し、その解析に用いる試料の調製系の確立を行った。X 線結晶構造解析を行うためには、高純度かつ数 mg の目的タンパク質が必要である。そこで、大腸菌発現系および複数のアフィニティークロマトグラフィー精製を検討した結果、高純度な CERK1_{cyt} を調製できる系を確立した。また、そのタンパク質で結晶化条件を検討したところ、2 つの条件で CERK1_{cyt} 様の結晶が確認された。今後は、それらの結晶片が CERK1 であることを確認し、X 線結晶構造解析を行う予定である。

第 4 章では、CERK1 ホロモグで、Nod factor の受容体である NFR1 の細胞内ドメインの構造が、その機能

に与える影響を明らかにすることを目的に、複数の解析を進めた。その結果、ベンサミアナタバコ過剰発現系で調製したNFR1分子とそのパートナー分子であるNFR5の共免疫沈降法を用いた相互作用解析から、NFR1とNFR5の相互作用は、NFR1-CERK1キメラとNFR5の相互作用よりも強いことが見出された。この結果は、CERK1/NFR1型分子の細胞内ドメイン構造の違いがNFR5との相互作用に影響を与え、結果としてこれらの分子の共生応答能の有無につながる可能性を示すものである。

以上のように本研究では、CERK1の自己リン酸化に着目した解析から、CERK1およびその下流のシグナル伝達系活性化機構の理解につながる重要な知見を得ることができた。また、CERK1型分子の細胞内ドメインの構造の違いがその生物機能に与える影響について、重要で新たな視点を提供することができた。