

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

明治大学大学院農学研究科

2017 年度

博士学位請求論文

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

Molecular mechanism of the regulation of immune
signaling by the LysM receptor-like kinase CERK1

学位請求者 生命科学専攻

鈴木 丸陽

「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」

要旨	i
序論	1
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	11
第 1 節 緒論	11
第 2 節 実験方法	13
1. コンストラクトの作製	13
2. 大腸菌発現タンパク質の調製	22
3. <i>in vitro</i> キナーゼアッセイ	22
4. フォスファターゼ処理	23
5. ベンサミアナタバコの育成	23
6. ベンサミアナタバコでのタンパク質の一過的発現法	23
7. ベンサミアナタバコで発現させた CERK1-3HA の調製	24
8. CERK1 タンパク質発現評価に用いたシロイヌナズナの膜画分の調製	24
9. タンパク質サンプルの電気泳動と検出	25
10. シロイヌナズナの形質転換	28
11. 形質転換体の選抜	30
12. 形質転換した <i>CERK1</i> 遺伝子配列のシーケンス解析	31
13. 活性酸素応答解析	32
14. 防御応答関連遺伝子の発現誘導解析	33

第 3 節 実験結果	35
1. 大腸菌発現系で調製した CERK1 細胞内ドメインタンパク質のリン酸化能の評価	35
2. CERK1 自己リン酸化モードの解析	37
3. CERK1 の <i>in vitro</i> 自己リン酸化部位同定のための試料の評価	40
4. CERK1 の <i>in vivo</i> 自己リン酸化部位同定のための試料の評価	42
5. CERK1 の <i>in vivo/in vitro</i> 自己リン酸化部位の同定	44
6. CERK1 の <i>in vivo</i> チロシンリン酸化の評価	46
7. シロイヌナズナ相補実験系を用いた自己リン酸化部位の機能解析	48
第 4 節 考察	71
第 2 章 CERK1 自己リン酸化部位の生化学的機能評価	79
第 1 節 緒論	79
第 2 節 実験方法	80
1. コンストラクトの作製	80
2. ベンサミアナタバコ一過的発現系を利用した細胞死評価	82
3. ベンサミアナタバコで発現させた CERK1-3HA の調製	82
4. 6×His タグ融合タンパク質の精製法	83
第 3 節 実験結果	84
1. <i>in vitro</i> キナーゼアッセイ系を用いた CERK1 の T479 の機能解析	84
2. <i>in vitro</i> キナーゼアッセイ系を用いた CERK1 の T573 の機能解析	87
3. <i>in vitro</i> キナーゼアッセイ系を用いた CERK1 の T473 の機能解析	90
4. <i>in vitro</i> キナーゼアッセイ系を用いた CERK1 の Y428 の機能解析	92
5. 細胞死を指標にした CERK1 の Y428 の機能解析	94
6. <i>in vivo</i> 発現タンパク質を用いた CERK1 の Y428 の機能解析	97
7. <i>in vitro</i> キナーゼアッセイ系を用いた CERK1 の S493 の機能解析	100
8. <i>in vivo</i> 発現タンパク質を用いた CERK1 の S493 の機能解析	102

9.	CERK1 による直下のシグナル伝達因子のリン酸化評価系の構築	104
10.	シグナル伝達因子のリン酸化を指標にした CERK1 の S493 の機能解析	107
11.	CERK1 の S493 が自己リン酸化モードに与える影響の評価	109
第 4 節 考察		111
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		119
第 1 節 緒論		119
第 2 節 実験方法		120
1.	コンストラクトの作製	120
2.	MBP タグ融合タンパク質の精製	121
3.	Thrombin 処理による MPB タグの切断条件	121
4.	精製タンパク質の結晶化条件の検討法	122
第 3 節 実験結果		123
1.	GST-CERK1(D441V)cyt-6His タンパク質の精製と評価	124
2.	MBP-CERK1(D441V)cyt-6His タンパク質の精製と評価	126
3.	Thrombin プロテアーゼによる MBP タグの切断とその影響	128
4.	界面活性剤の添加による可溶性 CERK1(D441V)-6His の保持条件の検討	130
5.	アルギニン添加による CERK1(D441V)-6His タンパク質の凝集阻害の条件検討	132
6.	アルギニン濃度と可溶性 CERK1(D441V)-6His 量の評価	134
7.	Thrombin 処理条件と可溶性 CERK1(D441V)-6His 量の評価	136
8.	CERK1(D441V)cyt-6His の調製と評価	138
9.	CERK1(D441V)cyt-6His の結晶化条件の検討	140

第4節 考察	142
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	145
第1節 緒論	145
第2節 実験方法	146
1. コンストラクトの作製	146
2. ベンサミアナタバコの膜画分を用いた共免疫沈降法	146
第3節 実験結果	147
1. CERK1(YAQ)の <i>in vitro</i> 自己リン酸化部位同定のための試料の評価	147
2. CERK1(YAQ)の <i>in vitro</i> 自己リン酸化部位の同定	149
3. CERK1 と NFR1 の細胞内ドメインの違いが共生受容体複合体に 与える影響の評価	151
第4節 考察	155
総合考察	159
抗体リスト	169
LC-MS/MS 解析結果	170
謝辞	178
引用文献	180

要旨

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替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替え

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・共生応答の切替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 ホロモグである 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過発現系 (*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旨とし、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なるとされている。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過剰発現系を用いて、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 CERK1cyt 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 CERK1cyt 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一過的発現系で調製した 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。

序論

世界の人口は増加し続けており、2025年には80億人を突破すると予想される一方、穀物増産速度は人口増加速度に達しないことが予測され、将来的な食料不足の懸念から、さまざまなアプローチによって食料生産量の増大を目指す必要に迫られている(1, 2)。同時に、リン・窒素肥料および殺虫剤・殺菌剤等の農薬の使用を基盤とした従来の農業は、土壌や海洋汚染などの環境負荷の原因になることから、それらの使用の低減化が求められており、環境保全・安全を守りつつ農業生産量の維持・向上が可能な新たな農業技術の開発が期待されている(3)。

植物は動物同様、光・温度・重力・病害虫など様々な環境ストレスを認識・応答できるように進化したことで、種を繁栄させ続けることができている。植物がもつ環境ストレス認識・応答系の1つに、微生物認識に基づく防御応答系があり、植物は個々の細胞で微生物を認識し、防御応答を誘導することで、非自己の侵入を防ぐ能力を獲得した(4)。近年、植物のこうした微生物に対する防御応答系は、動物の免疫機構と類似することが明らかにされ、“植物免疫系”と呼ばれるようになってきた(5)。

一方、植物は微生物を排除するだけでなく、共生微生物を積極的に組織・細胞内に取り込むことで高機能化し、環境に適応する能力も持っている(6, 7)。マメ科植物の根粒菌共生が有名で、マメ科植物はバクテリアである根粒菌を組織内に誘導し、根粒菌が大気中の窒素をアンモニアに変換する環境を与えることで、マメ科植物はアンモニアを獲得し旺盛に成育することが知られる(8)。また、植物と微生物の共生は普遍的な現象で、多くの陸上植物が菌根菌と呼ばれる共生菌を受け入れることも知られている(9-12)。

以上のような植物の微生物認識・応答系の仕組みは、植物微生物の相互作用の理解がここ20年で劇的に進んだことで、明らかになりつつある(13-15)。近年、植物の微生物認識に基づく防御応答系の人為的制御で、病害抵抗性の増強が可能であることや、作物に共生微生物を接種することで、植物の栄養吸収の効率化、環境ストレス耐性の付与が可能であることが示され、植物の微生物相互作用システムの利用が、従来の農薬や肥料に代わる新たな農業技術の1つとして注目されてきている(6, 16)。そのため、より効率的で効果的な農業技術基盤の開発の観点から、植物の微生物認識に基づく防御応答、共生応答システムのより詳細な理解が期待されている。

植物は、微生物の固有の分子パターン(Microbe/Pathogen-Associated Molecular Pattern, MAMP/PAMP)を細胞膜上のPRR(Pattern Recognition Receptor)で認識す

ることで、防御応答を誘導し微生物の感染を阻止する能力を持っている (5)。本免疫系は、MAMP/PAMP Triggered Immunity (MTI/PTI) と呼ばれる (Fig. 1)。MTI/PTI は、バクテリアの鞭毛タンパク質であるフラジェリンを認識する PRR が同定されたことで、その存在が明らかになった (17)。その後、バクテリアの翻訳伸長因子である EF-Tu の PRR や (18)、真菌の細胞壁成分であるキチンの PRR などが同定され (19)、MTI/PTI は多様な微生物分子の認識に基づくことが示された。多くの潜在的病原菌に共通する分子という MAMP の特徴から、その認識に基づく MTI/PTI は抵抗性崩壊リスクの少ない防御応答機構であると考えられている (20)。また、多様な植物で MTI/PTI の存在が示されたことで、MTI/PTI は植物免疫系の基盤であると認知されるようになった (5)。その応答では、活性酸素種の一過的な生成や、ファイトアレキシンのような抗菌性物質の生成、細胞壁の強化に関わるとされるカロースの蓄積などが誘導されるのが一般的で、微生物の侵入・感染阻止には十分な効果を持つとされる (4)。

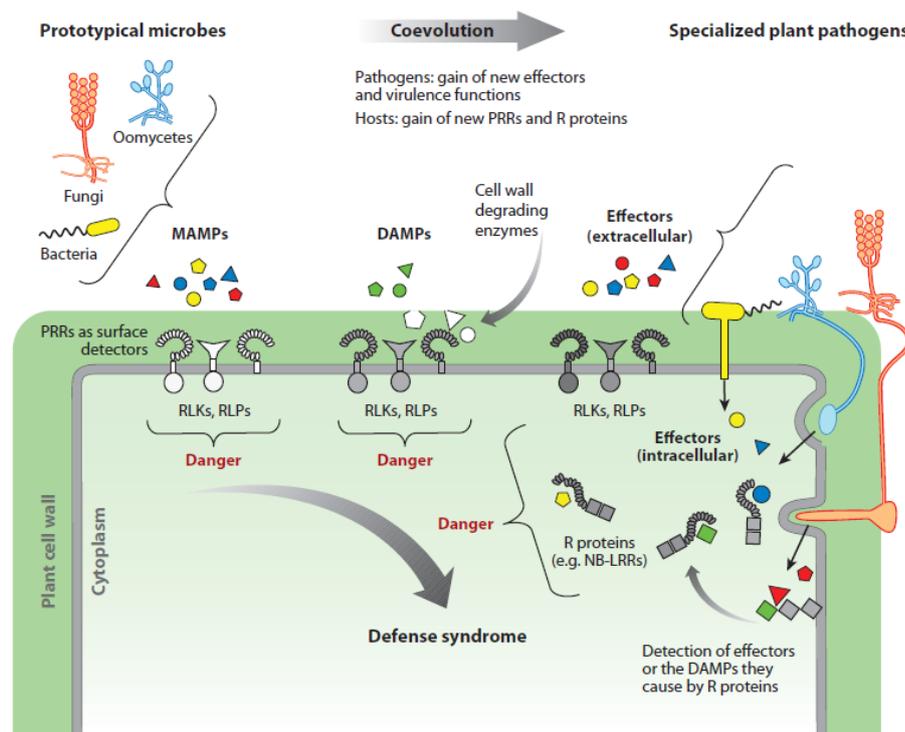


Fig. 1 植物免疫系の模式図

(Thomas Boller and Georg Felix, Annu. Rev. Plant Biol. 2009 より引用)

植物は、MAMP 認識に基づく免疫系と Effector 認識に基づく免疫系をもつ。

植物は、MAMP/PAMP 以外にも、病原菌が MTI/PTI などの植物免疫系を阻害する目的で分泌する病原性促進因子 (Effector) を認識することで、防御応答を誘導する能力を持つことも知られる (Fig. 1) (4, 5)。これは ETI (Effector-Triggered Immunity) と呼ばれ、1960 年代に Flor によって提唱された植物の抵抗性(R)遺伝子と病原菌の非病原性 (Avr) 遺伝子の 1 遺伝子対応で植物と病原菌の罹病関係が決まるとする“gene-for-gene theory”に基づいている (21)。ETI は特定の Effector に対して、その受容体を持った植物のみで誘導される免疫系であるため、病原菌に対する認識範囲が狭く、新規 Effector の獲得や、その欠損・変異による崩壊リスクも知られている (22, 23)。現在までに多数の Effector が同定され、植物のアポプラスト中に放出されるものや、細胞内に注入されるものが知られており、前者は細胞表面受容体を介して認識され、後者は細胞内受容体である NLR (Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat Receptor) を介して認識されることがわかっている (24)。また、一部の Effector は直接植物の受容体で認識されるが、多くは防御応答を起動する分子と直接相互作用しないことから、植物は Effector のターゲットとなる分子をモニターすることで、間接的に病原菌の感染を認知し、防御応答を誘導する、巧みな認識機構を持っているとする説が提唱され、“guard theory”として広く受け入れられている (25, 26)。ETI では、病原菌の封じ込めを目的とした感染部位の積極的な細胞死や、全身に抵抗性を誘導する全身獲得抵抗性などの応答が誘導されることが一般的で、MTI/PTI の応答に比べて強力な防御応答であると知られる (5)。

MTI/PTI と ETI は認識する分子や、その誘導する応答の特徴から区別されてきたが、異なる制御系ではなく、共通したシグナル伝達因子に関わることもわかっている (27, 28)。近年、特定の病原菌だけが持つと考えられていた Effector の中に、種に広く保存されたものも存在し、ある種の微生物分子パターンとして、植物の細胞表面受容体で認識されることもわかってきている(29)。さらに、MAMP/PAMP の中には、ETI 様の防御応答を誘導するものもあり、また、一部の ETI では典型的な細胞死応答が誘導されないことも明らかにされ、MAMP/PAMP と Effector および MTI/PTI と ETI の区別が曖昧になってきた (5, 30-32)。

そこで最近では、微生物由来の分子が認識される場所と、認識に関わる植物のタンパク質によって植物免疫を便宜的に区別し、MAMP をはじめ、アポプラスト中の Effector や傷害応答で生じた DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern) などのパターン分子を認識する細胞膜上の受容体を PRR と再定義し、その免疫系を PTI (PRR-

Triggered Immunity) や surface immunity と呼び、植物の細胞質内に注入された Effector の認識・応答機構を NTI (NLR-Triggered Immunity) や intracellular immunity とするようになってきている (33)。

一方、植物の共生微生物の認識・応答系は、植物免疫系ほどの多様な解析例はないが、マメ科植物による根粒菌の認識・応答系が植物の共生系のモデルとして研究されている。マメ科植物による根粒菌の受け入れは、細胞膜上の受容体で、根粒菌が分泌する共生応答誘導因子の Nod factor を認識することで開始される (Fig. 2) (13, 31, 34, 35)。また、それをきっかけに根粒菌が根毛で巻き込まれ、マメ科植物組織内に誘導されたのち、根粒と呼ばれる器官中で窒素固定を行うことがわかっている (36)。Nod factor で誘導される応答は PTI 応答と真逆であるが、細胞膜上の受容体で認識されるという点は PTI に類似している (37, 38)。実際に、PRR が Nod factor の受容体と高い相同性を持つことがわかっており、植物免疫系の転用で、マメ科植物は根粒菌共生能を獲得したと考えられている (39)。またある種の根粒菌は、植物の細胞内に Effector を注入することで、Nod factor 認識系の下流のシグナル伝達経路を活性化し、Nod factor 認識を介さずにマメ科植物と共生することが明らかにされ、植物の NTI と類似した機構で根粒菌共生関係が成立することもわかっている (13, 40) (Fig. 2)。

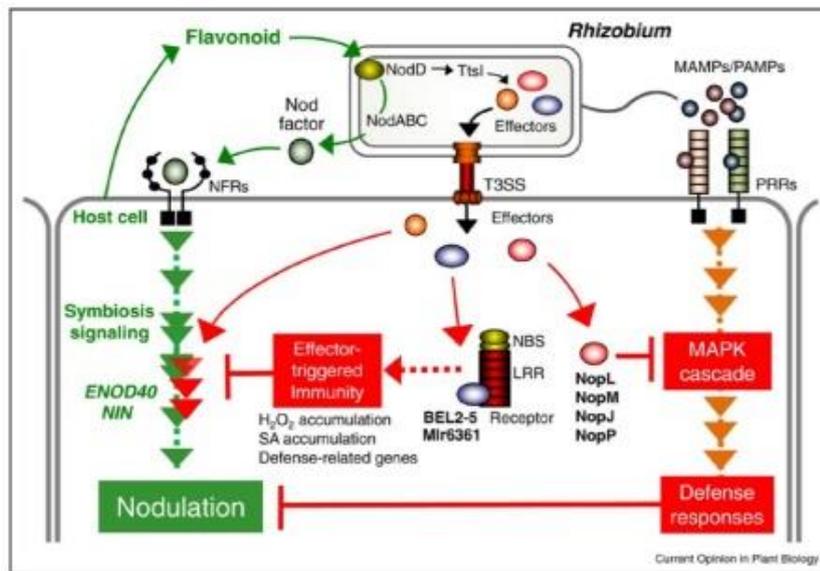


Fig. 2 マメ科植物の根粒菌共生起動システムの模式図

(Hiroki Miwa and Shin Okazaki, Current Opinion in Plant Biology 2017 から引用)

マメ科植物の根粒菌共生は、Nod factor 認識もしくは Effector 認識で起動する。

こうした植物の微生物認識・応答系の理解から、植物がどのようにして同様のプラットフォームで潜在的病原菌と共生微生物を厳密に識別し、その応答を制御するかという新たな問題も提起された (41)。そのため微生物分子を認識する受容体と、その下流のシグナル伝達系の解析は盛んに行われている。特に、個々の細胞で微生物を認識する植物にとっては、細胞表層が微生物との最初の接触面で、植物免疫系の基盤をなす MTI/PTI の足場となっていることから、細胞膜上の微生物認識・応答系は、過熱する研究分野の 1 つである (42)。

これまでに多数の微生物分子と、その認識・応答に関わる細胞膜上の受容体および受容体様タンパク質が同定され、そのシグナル伝達系が解析されてきた (Fig. 3) (33)。中でも、バクテリアの MAMP であるフラジェリンの認識・応答系の理解は進んでいる。シロイヌナズナにおいては、フラジェリンの N 末端に保存された 22 アミノ酸 (flg22) がその受容体である FLS2 (Flagellin Sensitive 2) によって認識されることがわかっている (43, 44)。FLS2 は細胞外に LRR (Leucine-Rich Repeat) ドメインを持ち、細胞内にキナーゼ活性を有する受容体様キナーゼ (Receptor Like Kinase, RLK) である (17)。flg22 認識・応答系の起動は FLS2 だけでなく、コレセプターで LRR-RLK の BAK1 (Brassinosteroid Insensitive 1-Associated Receptor Kinase 1) も関わるということが明かにされ、FLS2 と BAK1 は相互作用することがわかっている (45, 46)。立体構造解析からは、FLS2 に受容された flg22 が、BAK1 の N 末端と相互作用し、FLS2 と BAK1 間の接着剤のように機能することが示されており、FLS2-BAK1 複合体の安定化で防御応答系が起動するとされる (47)。また、シロイヌナズナに対して flg22 を処理すると、その直後の FLS2 と BAK1 の細胞内ドメインでリン酸化が起こることから (48)、flg22 による FLS2-BAK1 の複合体形成で、FLS2 および BAK1 の細胞内ドメインの自己リン酸化が誘導され、FLS2 および BAK1 の活性化につながり、シグナル伝達系が起動すると考えられている。

flg22 認識・応答系では、FLS2-BAK1 下流のシグナル伝達系の理解も進んでおり、BAK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子として受容体様細胞質キナーゼの BIK1 (Botrytis-Induced Kinase 1) が同定されている (49, 50)。FLS2-BAK1 複合体によってリン酸化された BIK1 は、その下流で活性酸素生成を担う RBOHD (Respiratory Burst Oxidase Homolog Protein D) をリン酸化して活性化することがわかっており、flg22 認識から活性酸素生成までの一連の防御応答系がわかってきている (51)。

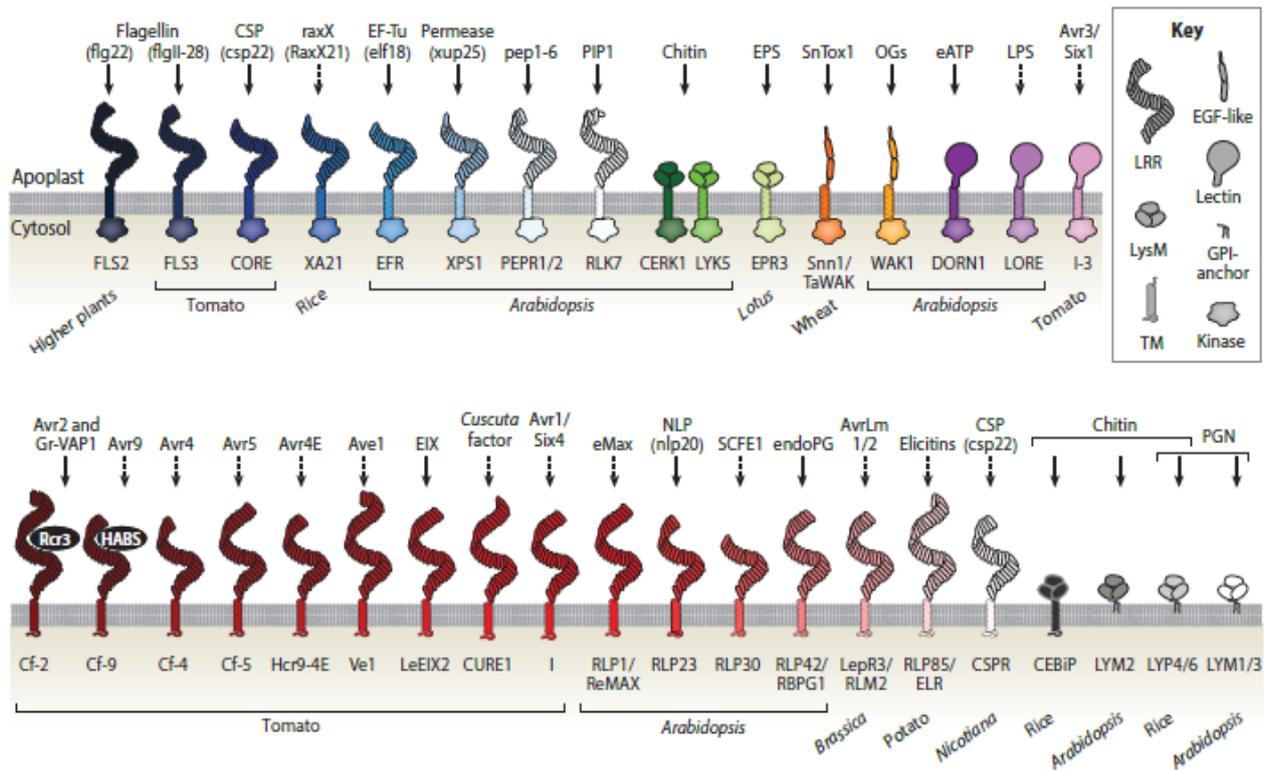


Fig. 3 同定された PRR の模式図

(Freddy Boutrot and Cyril Zipfel, Annu. Rev. Phytopathol. 2017 から引用)

MAMP/PAMP、DAMP、Effector という微生物由来のパターンの認識による防御応答には、多様な PRRs が関わることを示されている。

当研究室が着目する真菌の MAMP であるキチンの認識・応答系も、そのシグナル伝達系の理解が進んでいる。キチンは、*N*-アセチルグルコサミンが β 1-4 結合した多糖で、7,8 量体のキチンオリゴ糖が植物に防御応答を誘導することがわかっている (52, 53)。シロイヌナズナでは、細胞外に LysM (Lysin Motif) 構造を持ち、細胞内にキナーゼ構造を持つ LysM-RLK の CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1) が、キチンオリゴ糖の認識・応答に必須であることがわかっている (Fig. 4) (54-58)。X 線結晶構造解析および生化学的解析から、CERK1 が 2 分子で 1 分子のキチンオリゴ糖を受容することが示唆され、CERK1 はキチンオリゴ糖の受容体であるとされている (59)。最近では、CERK1 ホモログである LYK4/5 (LysM Domain Receptor-Like Kinase 4/5) が、CERK1 と比較して高いキチンオリゴ糖結合活性を有することや、その変異体を用いた解析から、キチン応答に関わることを報告され、新規のキチンオリゴ糖の受容体である

可能性が示された (60, 61)。しかしながら、当研究室を含む複数の研究グループの *lyk4*, *lyk5* 変異体を用いた生物学的解析では、キチン応答への影響が確認されず、その関与については今後さらに検討が必要であると考えられる (62)。

イネのキチンオリゴ糖の認識・応答系では、細胞外に LysM 構造を持つ GPI (Glicosylphosphatidylinositol) アンカー型タンパク質の CEBiP (Chitin Elicitor Binding Protein) がキチンオリゴ糖を受容することがわかっている (19, 63)。CEBiP は細胞内ドメインを持たないため、単独でシグナル伝達系を起動することができず、CERK1 ホモログである OsCERK1 (*Oryza sativa* Chitin Elicitor Receptor Kinase 1) と協調して、キチンオリゴ糖の認識・応答系を起動することがわかっている (64)。また、OsCERK1 はキチンオリゴ糖に対する結合能を持たないことが示されており、キチンオリゴ糖を受容した CEBiP と複合体を形成してシグナル伝達系を起動すると考えられている (56)。近年、2 分子の CEBiP が 1 分子のキチンオリゴ糖をサンドイッチ状に挟み込んで 2 量体を形成すること、また、この 2 量体形成が防御応答の起動に関わることが示され、キチンオリゴ糖を介した CEBiP のダイマー化で OsCERK1 が活性化するモデルが考えられている (65)。

シロイヌナズナにおいても CERK1 のホモダイマー化で防御応答が起動することが示されており、シロイヌナズナ、イネの場合も CERK1 の 2 量体形成が細胞内ドメインの活性化に関わると考えられる (59, 66)。また、シロイヌナズナにキチンオリゴ糖を処理すると、その直後に CERK1 細胞内ドメインのリン酸化が観察されることから (58)、CERK1 がキチンオリゴ糖の受容を介してホモダイマー化し、その細胞内ドメインを自己リン酸化後、シグナル伝達系を起動すると考えられている。

CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子も同定され、*flg22* 認識・応答系で機能する BIK1 とは異なる遺伝子であるが、類似した構造を持つ受容体様細胞質キナーゼの PBL27 (PBS1-Like Kinase 27) が、CERK1 を介したシグナル伝達系で機能することが明らかになっている (67)。PBL27 はキチンオリゴ糖誘導性の活性酸素生成には関わらないが、MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) カスケードの最上流分子である MAPKKK5 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 5) と相互作用することがわかっている (68)。また、CERK1 によってリン酸化された PBL27 は、MAPKKK5 をリン酸化して活性化することが示されており、キチンオリゴ糖の受容から MAPK カスケードの活性化までの一連の流れが明らかにされた。最近では E3 ユビキチンリガーゼである PUB4 (Plant U-box Type E3 Ubiquitin Ligase 4) も、CERK1

と直接相互作用するシグナル伝達因子であることがわかっており、活性酸素生成等の一部の防御応答系を正に制御することが示されている (Desaki et al., *in prep*)。イネ OsCERK1 の直下では、PBL27 のホモログである OsRLCK185 (*Oryza sativa* Receptor-Like Cytoplasmic Kinase 185) やそのホモログが同定され、それらが活性酸素生成および MAPK カスケードを制御することが示されている (69-72)。

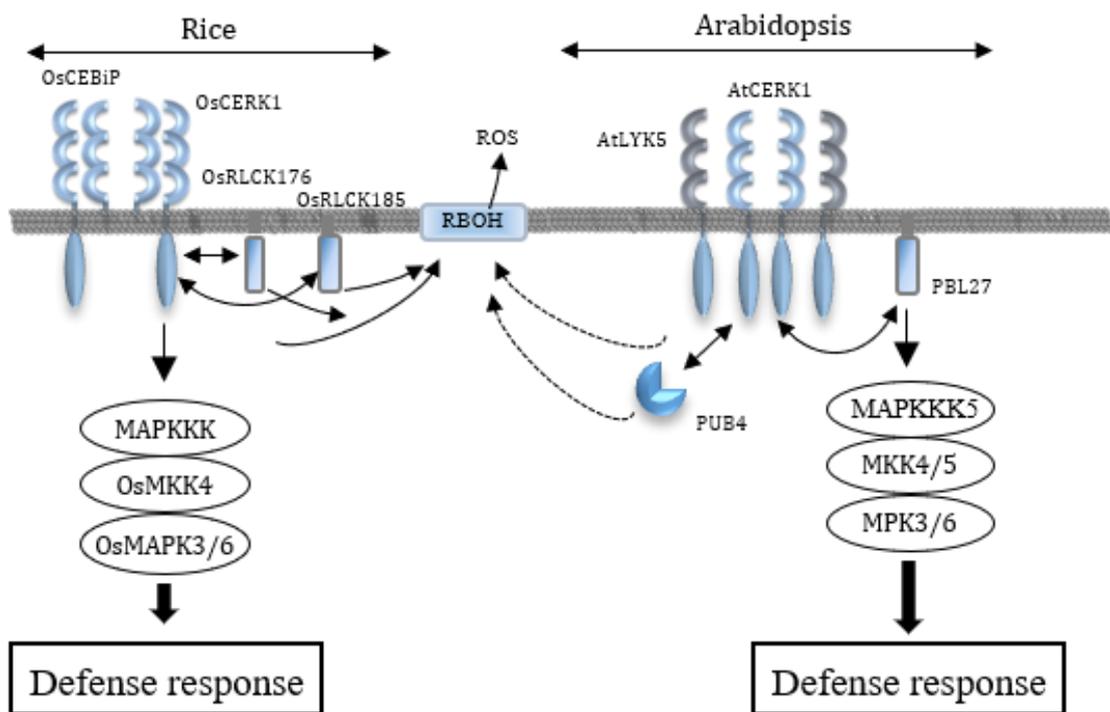


Fig. 4 キチン認識・応答系の模式図

イネ、シロイヌナズナでは、キチン認識・応答系に関わるシグナル伝達分子が明らかにされつつある。

またこうした RLK と直接相互作用するシグナル伝達因子の解析から、PBL27 が flg22 認識・応答系に関与しないことも明らかにされ (67)、MAMP 認識・応答系によって受容体直下のシグナル伝達系が異なることが示されている。BAK1 は PBL27 よりも BIK1 を選択的にリン酸化することが明らかになり (67)、RLK のキナーゼの基質特異性が、その直下のシグナル伝達系の制御に関わることもわかってきた。そのため、それぞれの MAMP 認識・応答系の制御機構を明らかにするには、RLK がどのように自身を活性化し、シグナル伝達因子をリン酸化できるようになるかを理解することも必要であること

が示されてきた。前述のように、RLK は細胞内ドメインを自己リン酸化し、シグナル伝達を起動することから、FLS2、BAK1 では、自己リン酸化部位が同定・解析されている (73, 74)。その結果、一部の自己リン酸化部位がシグナル伝達の起動に関わることや、RLK 自身のキナーゼの活性化に関わることが明らかにされ、自己リン酸化によるシグナル伝達起動機構が示されつつある。また、BAK1 については細胞内ドメインの立体構造解析も行われ、自己リン酸化を通じてキナーゼが制御される仕組みも明らかになってきている (75)。一方で、当研究室が着目するキチン認識・応答系に必須の CERK1 ではそうした解析は進んでおらず、CERK1 がどのようにしてキチン認識・応答系を起動・制御するかはわかっていないことが多い。

マメ科植物の根粒菌共生の起動に関わる Nod factor 認識・応答系においては、マメ科植物であるミヤコグサの細胞膜上の NFR1 (Nod factor Receptor 1) と NFR5 (Nod factor Receptor 5) が Nod factor を受容するとされる (37, 38, 76)。NFR1 および NFR5 は RLK であるが、NFR1 が細胞内にキナーゼ活性を有する一方、NFR5 はキナーゼ活性を持たないことが示されており、NFR1 が共生応答を起動する主体的な分子であることがわかっている (76)。また、NFR1 の細胞内ドメインは自己リン酸化能を持つことが示され、Nod factor を介して NFR1 が自己リン酸化し、シグナル伝達を起動するとされる (77)。NFR1 と NFR5 は、SYMRK (Symbiosis Receptor-Like Kinase) と呼ばれる細胞膜上の RLK と協調して根粒菌共生を制御することもわかっており、Nod factor 認識・応答系の最上流が明らかになってきている (78-80)。

NFR1 と NFR5 は CERK1 と同じ LysM-RLK で、特に NFR1 は CERK1 と高い構造的相同性をもつことがわかっている (39)。また Nod factor はキチン骨格を有しており、キチン認識系と Nod factor 認識系で誘導する応答は異なるものの、シグナル分子とその受容体分子は類似することがわかっている (39)。また、ミヤコグサに Nod factor を処理すると、防御応答関連遺伝子が一過的に誘導されることも明らかにされ、防御応答のシグナル伝達系と類似性することも指摘されている (39)。ミヤコグサの *nfr1* 変異体に、NFR1 の細胞外領域と、CERK1 の細胞内領域を融合した *NFR1-CERK1* キメラ遺伝子を導入した形質転換体では、根粒菌を接種しても根粒菌共生は起こらないが、NFR1 細胞内ドメインの特徴的な 3 アミノ酸配列 (YAQ) を CERK1 の細胞内ドメインに導入した *NFR1-CERK1(YAQ)* キメラ遺伝子を *nfr1* 変異体に導入した形質転換体では、根粒菌を接種すると、根粒が形成されることが明らかになっている (39)。こ

のことから、**CERK1** と **NFR1** の細胞内ドメインのわずかな違いで相反する防御と共生応答が制御されることが示された。しかし、**CERK1** の細胞内ドメインのわずかな違いでどのように応答が制御されるかは明らかになっていない。イネ **OsCERK1** は **NFR1** の **YAQ** 配列に対応する位置に類似した **YAR** 配列を持っていることもわかっている。上記と同様に **NFR1-OsCERK1** キメラ遺伝子を *nfr1* 変異体に導入した形質転換体では、根粒が形成されることも確認され、**OsCERK1** の細胞内ドメインは防御と共生の2つの相反する応答を誘導する能力を持つことが示された (81, 82)。また最近では、イネ *oscerk1* 変異体でキチン応答のみならず、菌根菌共生能も消失することから、**OsCERK1** が相反する2つの応答 (防御応答と共生応答) を制御することも明らかになった。しかし **OsCERK1** がどのように相反する生物応答を制御することができるのかもわかっていない。

そこで本研究では、**CERK1** によるキチン認識・応答系の起動メカニズムの理解および **CERK1** 型分子の細胞内ドメインの構造と機能の関連を明らかにすることを目指して解析を行った。特に、**CERK1** は自己リン酸化を伴ってシグナル伝達系を起動することから、自己リン酸化を介した **CERK1** 自身のシグナル伝達系の活性化機構の解析を進めた。第一章では、**CERK1** の *in vitro*、*in vivo* 自己リン酸化部位の同定とリン酸化部位の生物学的機能解析を行い、**CERK1** のシグナル伝達に関わる自己リン酸化部位の同定を行った。第二章では、キチン応答に関わることが示された5か所の自己リン酸化部位が、どのように **CERK1** のシグナル伝達系の制御に関わるのかについて生化学的解析を行った。第三章では、**CERK1** 細胞内ドメインの X 線結晶構造解析を行うためのタンパク質試料の大量調製法の確立および結晶化条件の検討を行った。第四章では、**CERK1** 型分子の細胞内ドメインの構造の違いと機能に着目して解析を行った。

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 1 節 緒論

植物は、微生物に保存された固有の分子パターン (Microbe/Pathogen-Associated Molecular Pattern ; MAMP/PAMP) や、傷害応答時に植物組織から生じる DAMP (Damage-associated Molucular Pattern) 、植物免疫を阻害する目的で病原菌から分泌された Effector などの様々な分子を、細胞膜上の PRR (Pattern Recognition Receptor) で認識し、防御応答を誘導する能力を持っている(33)。本認識・応答系は PTI (PRR-triggered immunity) と呼ばれ、植物免疫系の基盤であることがわかっている。近年、本免疫系の移植や人為的制御で植物の病害抵抗性の増強が可能であることが示され、その利用の観点からも防御応答系の制御機構の理解が期待されている (16, 49, 83) 。

これまでに多数のシグナル分子とその PRR が同定され、それぞれのシグナル伝達系の解析が行われてきた (84) 。PRR は受容体様タンパク質と受容体様キナーゼ (Receptor-Like Kinase、RLK) に分けられ、細胞内にキナーゼ構造を有する RLK が下流のシグナル伝達因子を直接制御することがわかっている (85) 。そのため、RLK が応答の特異性を決める分子であると言え、応答系がどのように起動されるかを理解するためには、それぞれの RLK のシグナル伝達起動メカニズムを理解する必要がある。RLK は細胞内ドメインのリン酸化に伴ってシグナル伝達を起動することから、RLK 自身のリン酸化がシグナル伝達の起動・制御に関わると考えられ、そのリン酸化部位の機能解析は盛んに行われている (73, 74, 86-92) 。

シロイヌナズナでは、細胞外に LysM (Lysin Motif) 構造を持つ RLK の CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase) が、真菌の MAMP であるキチンオリゴ糖の認識・応答系を起動することがわかっている (54, 55) 。X 線結晶構造解析および生化学的解析から、CERK1 は 2 分子で 1 分子のキチンオリゴ糖を受容することが示唆されており、キチンオリゴ糖の受容体であるとされている (59, 66) 。また、CERK1 はホモダイマー化で防御応答を誘導することや、シロイヌナズナにキチンオリゴ糖を処理すると、CERK1 のキナーゼ活性に依存して細胞内ドメインがリン酸化すること、そのリン酸化と防御応答の誘導が相関することがわかっており、CERK1 は 1 分子のキチンオリゴ糖を介してホモダイマー化し、それをきっかけに細胞内ドメインを自己リン酸化して、シグナル伝達系を活性化すると考えられている (58) 。しかしながら、こうしたイベント

を通じて CERK1 がどのようにシグナル伝達系を起動するかはいまだ明らかになっていない。

そこで本章では CERK1 自身の活性化に伴うシグナル伝達起動機構の解明を目指し、CERK1 の細胞内ドメインの自己リン酸化部位の同定と機能解析を行った。解析にあたり、まず、大腸菌発現系を利用して調製した CERK1 タンパク質を用いて、CERK1 の自己リン酸化モードを解析することで、2 量体形成に伴ってどのようにして自己リン酸化が起こるのかを解析した。また、CERK1 の自己リン酸化部位の機能解析のため、大腸菌発現系を利用して調製した CERK1 細胞内ドメインタンパク質およびベンサミアナタバコ一過的発現系を利用して調製した CERK1 タンパク質を用いて、LC-MS/MS 解析を行い、CERK1 の *in vitro*/*in vivo* 自己リン酸化部位を同定した。その後、自己リン酸化部位をそれぞれアミノ酸残基置換した CERK1 を *cerk1* 変異体に形質転換し、キチンオリゴ糖処理時の防御応答を評価することで、それぞれの自己リン酸化部位が CERK1 を介したシグナル伝達に関わるかを明らかにした。

第2節 実験方法

1. コンストラクトの作製

解析で用いたすべてのコンストラクトは Gateway technology (Life technologies) に基づいて作製した。コンストラクトの作製はエントリークローンの作製とデスティネーションクローンの作製の2つのステップからなり、以下にその作製方法を示した。

1). GST-CERK1cyt、GST-NFR1cyt コンストラクトの作製

CERK1cyt は、研究室で構築済みであった CERK1 cDNA が導入された pENTR/D-TOPO (Life technologies) エントリークローンを鋳型に、下記のプライマーセットおよび PrimeSTAR GXL DNA polymerase (TAKARA) を用いて PCR を行い、増幅した。増幅された CERK1cyt DNA 断片は TOPO 反応で pENTR/D-TOPO に挿入した。TOPO 反応は、PCR 産物 2 μ l、Salt solution 1 μ l、D-TOPO ベクター 0.5 μ l、H₂O 2.5 μ l を混合し、25°C、60 分間静置して行った。その後、反応溶液と 100 μ l の DH5 α 株の大腸菌のコンピテントセルを混合し、氷上に 30 分静置後、42°C で 40 秒加熱し、2 分氷上に静置した。そこに、SOC 培地を 200 μ l 加え、37°C、750 rpm で、1 時間振とう培養した。その後、50 μ g/ml のカナマイシンを含む LB プレートに塗布し、37°C で一晩培養、抗生物質選抜を行った。得られたコロニーに対し、コロニー PCR を行い、目的のプラスミドを有する大腸菌を選抜した。大腸菌は 50 μ g/ml のカナマイシンを含む液体 LB 培地で 37°C、12 時間振とう培養した。培養後、遠心分離によって集菌、HiYield Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience) を使用してプラスミドを抽出した。このプラスミドに対して BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンスを行った。増幅した産物は製品添付の方法に従い精製し、乾燥させた。その後、Hi-Di ホルムアミドを 12 μ l 加え、95°C で、2 分間熱処理した後、3130x/Genetic Analyzer を用いてシーケンス解析を行うことで、挿入された目的の DNA 配列を確認した。同様の方法で、NFR1cyt が入ったエントリーベクターを作製した。PCR による NFR1cyt の増幅のためのテンプレートとした NFR1 cDNA は名古屋大学 特任助教の中川知己博士から分与して頂いた。

約 150 ng のエントリークローンと等量の pDEST15 (Life technologies) 、N 末 GST タグ)および 1 μ l の LR Clonase を混合し、H₂O で 5 μ l に調製、25°C、1 時間反応させた。その反応液をエントリークローン作製時と同様の操作で形質転換し、シーケンスの確認までを行った。ただし、大腸菌培養における抗生物質は終濃度 100 μ g/ml のアンピシリンを用いた。

TOPO 反応前の DNA 断片増幅の PCR 条件、SOC 培地組成、LB 培地組成、サイクルシーケンス条件を下記に示す。

<DNA 断片増幅の PCR 条件>

Template (エントリークローン)	0.5 μ l
5×GXL Buffer	5 μ l
dNTP Mix	2 μ l
Primer Forward	0.5 μ l
Primer Reverse	0.5 μ l
PrimeSTAR GXL	0.5 μ l
H ₂ O	16 μ l
<hr/>	
	25 μ l

98°C	98°C	55°C	68°C	68°C	4°C
3 分	10 秒	15 秒	1 分	3 分	∞
	30cycle				

	Fwd	プライマー 名	プライマー配列
	Rev		
CERK1cyt	Fwd	CERK1-C F	CACCTATGCTTACCGGAAGAATAAGTCGAA
	Rev	CERK1 R3	CTACCGGCCGGACATAAGACTG
NFR1cyt	Fwd	NFR1-C F	CACCAGATACCAGAAGAAGGAAGAAG
	Rev	NFR1 R	TTATCTCACAGACAGTAAATTTATGAG

<SOC 培地組成 (100 ml) >

Bacto Tryptone	2 g
Bacto Yeast Extract	0.5 g
NaCl	50 mg
250mM KCl	1 ml

up to 100 ml

オートクレーブ滅菌後、別にオートクレーブした 2 M MgCl₂、0.22 μm フィルター (Millipore) でろ過滅菌した 1 M グルコースをそれぞれ 0.5 ml、2 ml 加えた。

<LB 液体培地組成 (1000 ml) >

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g

up to 1000 ml

オートクレーブにて滅菌し、培養に用いた。プレート培地の場合は上記組成に Bacto Agar 15 g を加えた後にオートクレーブし、シャーレに分注した。抗生物質はいずれもオートクレーブ後に添加した。

<サイクルシーケンス条件>

Template vector (150~300 ng)	X μ l
5 \times buffer	3.5 μ l
BigDye Terminator Ready Reaction Mix	1 μ l
Primer	3.2 μ l
up to 20 μ l	

96°C	96°C	50°C	60°C	60°C	4°C
3分	10秒	5秒	4分	4分	∞
30cycle					

2). GST-CERK1(D441V)cyt、GST-NFR1(T481A)cyt コンストラクトの作製

CERK1(D441V)cyt のエントリークローンおよび NFR1(T481A)cyt のエントリークローンは、CERK1cyt のエントリークローンおよび NFR1cyt のエントリークローンを鋳型に下記プライマーセットおよび PrimeSTAR MAX DNA polymerase (TAKARA) を用いてインバース PCR により作製した。PCR 増幅後の操作は、前述の方法に従い、デスティネーションクローンを作製した。

<PCR 条件>

Template (CERK1cyt あるいは NFR1cyt エントリークローン)	1 μ l
Primer Forward	1 μ l
Primer Reverse	1 μ l
PrimeSTAR MAX	12.5 μ l
H ₂ O	9.5 μ l
25 μ l	

98°C	98°C	55°C	72°C	72°C	4°C
1分	10秒	15秒	1分	10分	∞
35cycle					

	Fwd	プライマー名	プライマー配列
	Rev		
CERK1	Fwd	CERK1 DV F	CATAGGGTCATTAATCTGCCAATATT
D441V	Rev	CERK1 DV R	TTTAATGACCCTATGGACATAAACTGG
NFR1	Fwd	NFR1 T481A F	TATATCCATCGCGTTGTGAAATC
T481A	Rev	NFR1 T481A R	AGATTTTCAACGCGATGGATATA

3). Strep-CERK1(D441V)cyt、Strep-NFR1(T481A)cyt コンストラクトの作製

CERK1(D441V)cyt のエントリークローンおよび NFR1 (T481A)cyt のエントリークローンに対して、下記プライマーおよび PrimeSTAR GXL DNA polymerase で PCR を行った。この時、各遺伝子の 5'側のプライマーには Strep タグとなる配列を付加した。DNA 断片を増幅後は前に示した方法にてエントリークローンおよびデスティネーションクローンを作成した。ただし、デスティネーションベクターには pDEST14 (Life technologies、N 末 Strep タグ) を用いた。

	Fwd	プライマー名	プライマー配列 (タグ配列を小文字で示す)
	Rev		
CERK1 D441V	Fwd	Strep-CERK1 F	caccatgtggagccaccgcagttcgaaaaagcaagcctt gttccaegtggttctgtcTATGCTTACCGGAAG AATAAGTCGAA
	Rev	CERK1 R3	CTACCGGCCGGACATAAGACTG
NFR1 T481A	Fwd	Strep-NFR1 F	caccatgtggagccaccgcagttcgaaaaagcaagcctt gttccaegtggttctgtcAGATACCAGAAGAAG GAAGAAG
	Rev	NFR1 R	TTATCTCACAGACAGTAAATTTATGAG

4). CERK1-3HA, CERK1(D441V)-3HA コンストラクトの作製

CERK1 のエントリークローンおよび CERK1(D441V)のエントリークローンを鋳型に、終始コドンを含まない下記のプライマーセットおよび PrimeSTAR GXL DNA polymerase (TAKARA) で PCR を行い、増幅された断片を pENTR/D-TOPO にクローニングした。以下の操作は前述の方法に従った。ただし、デスチネーションベクターには植物過剰発現用 pGWB14 (35S プロモーター、C 末 3HA タグ) を用い、形質転換した大腸菌は 50 µg/ml のカナマイシンおよびハイグロマイシンを含む LB 培地によって培養、選抜を行った (93)。

	Fwd	プライマー名	プライマー配列
	Rev		
CERK1	Fwd	CERK1 F3	CACCATGAAGCTAAAGATTTCTC
	Rev	CERK1 R -stop	CCGGCCGGACATAAGACTG

5). 一アミノ酸残基置換 CERK1 形質転換体の作出に用いたコンストラクトの作製

一アミノ酸残基置換 CERK1 形質転換体作出に用いたコンストラクトはインバース以下の 2 つの方法で作製した。

<インバース PCR 法によるコンストラクトの作成>

S270A, S274A, S281A, S284A, S296A, T471A, T479A, T487A, S493A, S556A, T573A, S582A, Y255F, Y390F, Y428F, Y437F, Y482F, Y489F, Y499F, Y557F, Y563F の置換を持つコンストラクトはインバース PCR にて作製した。

CERK1 が挿入されたエントリークローンを鋳型に、下記プライマーセットおよび PrimeSTAR MAX DNA polymerase を用いてインバース PCR を行った。増幅されたベクターは前述の方法に従い、エントリークローンとした。得られたエントリークローンは過剰発現用ベクター pMDC32 (35S プロモーター、タグなし) と LR 反応させた (94)。形質転換した大腸菌は 50 µg/ml のカナマイシンおよびハイグロマイシンを含む LB 培地によって培養、選抜を行った。

	Fwd	プライマー名	プライマー配列 (変異部を小文字で示す)
	Rev		
S270A	Fwd	S270A FP	TCTTCTgCTATTCCGTTGTCTACTAAG
	Rev	S270A RP	CCACTAAGCAAAGAAGAcGATAAGGC
S274A	Fwd	S274A FP	CCGTTGgCTACTAAGGCTGATCATGCT
	Rev	S274A RP	AGAAGAAGATAAGGCAACcGATGATTC
S281A	Fwd	S281A FP	CATGCTgCTTCTACTAGTCTCCAAAGT
	Rev	S281A RP	AGTAGAAGcAGCATGATCAGCCTTAGT
S284A	Fwd	S284A FP	TCTACTgcTCTCCAAAGTGGAGGTTTG
	Rev	S284A RP	TTGGAGAgcAGTAGAAGAAGCATGATC
S296A	Fwd	S296A FP	GGAGTGgctCCTGGCATTGCTGCCATA
	Rev	S296A RP	GCCAGGagcCACTCCGGCACCACCCAA
T471A	Fwd	T471A FP	GGAGGTgcaGCAACTCGGGGTGCAATG
	Rev	T471A RP	AGTTGcTgcACCTCCAACCTTCTGTCAG
T479A	Fwd	T479A FP	AATGGGTgCATTTGGTTACATGGCAC
	Rev	T479A RP	TGAGCCCCACGTTACCCAcGTAAACC
T487A	Fwd	T487A FP	ACCAGAGgCTGTTTATGGAGAAGTGT
	Rev	T487A RP	CCAATGTACCGTGGTCTCcGACAAAT
S493A	Fwd	S493A FP	GAAGTGgCTGCAAAAGTAGATGTATAT
	Rev	S493A RP	TTTTGCAGcCACTTCTCCATAAACAGT
S556A	Fwd	S556A FP	GGTGATgcTTACCCGTTTGATTCCGGT
	Rev	S556A RP	TCTGGGCTCCGAGCCACTAcgAATGG
T573A	Fwd	T573A FP	GCATGTgcaCAAGAGAATGCGCAGCTA
	Rev	T573A RP	CTCTTGtgcACATGCTTTCCCTAATTC

S582A	Fwd	S582A FP	CGTCCGgcTATGAGATACATTGTGGTT
	Rev	S582A RP	TCTCATAgcCGGACGTAGCTGCGCATT
Y255F	Fwd	Y255F FP	GTATATTtTGCTTACCGGAAGAATAAG
	Rev	Y255F RP	GTAAGCAaAATATACGATAAACAAGAT
Y390F	Fwd	Y390F FP	TTGGTGTtTGAATATGTTGAGAATGGT
	Rev	Y390F RP	ATATTCAaACACCAAGAAAAGTGATCC
Y428F	Fwd	Y428F FP	TTAGAATtTATCCACGAGCACACGGTT
	Rev	Y428F RP	GTGGATAaATTCTAAACCTCTAGCTGA
Y437F	Fwd	Y437F FP	CCAGTTTtTGTCCATAGGGACATTAAA
	Rev	Y437F RP	ATGGACAaAAACTGGAACCGTGTGCTC
Y482F	Fwd	Y482F FP	ACTGTTTtTGGAGAAGTGTCTGCAAAA
	Rev	Y482F RP	TTCTCCAaAAACAGTCTCTGGTGCCAT
Y489F	Fwd	Y489F FP	ACTGTTTtTGGAGAAGTGTCTGCAAAA
	Rev	Y489F RP	TTCTCCAaAAACAGTCTCTGGTGCCAT
Y499F	Fwd	Y499F FP	GATGTATtTGCATTTGGAGTTGTCCTT
	Rev	Y499F RP	AAATGCAaATACATCTACTTTTGCAGA
Y557F	Fwd	Y557F FP	GATAGTTtCCCGTTTGATTTCGGTATAC
	Rev	Y557F RP	AAACGGGgAACTATCACCGAGCCTCGG
Y563F	Fwd	Y563F FP	TCGGTATtCAAGATGGCGGAATTAGGG
	Rev	Y563F RP	CATCTTGaATACCGAATCAAACGGGTA

<2 ステップの PCR によるコンストラクトの作製>

S266A、S268A、T433A、S444A、T463A、T473A、T519A の一アミノ酸残基置換を持つコンストラクトは 2 ステップの PCR によって作製した。

CERK1 が挿入されたエントリークローンを鋳型に、開始コドンから変異部分周辺までを CERK1 F3 プライマーと各変異を導入したリバースプライマーで、変異部分周辺から終始コドンまでを各変異を導入したフォワードプライマーと CERK1 の終始コドンまでのプライマー (CERK1 R3) を用いてそれぞれ増幅した。これら 2 つの PCR 産物を混合したものを鋳型として、再度 CERK1 F3 プライマーと CERK1 R3 プライマーで PCR を行うことで塩基置換を持つ CERK1 断片を増幅した。得られた断片は、上記に示した方法でエントリークローンとし、pMDC32 に挿入してデスティネーションクローンを得た(94)。

	Fwd Rev	プライマー名	プライマー配列 (変異部を小文字で示す)
S266A	Fwd	CERK1 S266A-upper(F)	CGAAGGGTGATgCGTTTTCTTC
	Rev	CERK1 S266A-lower(R)	GAAGAAAACGcATCACCTTCG
S268A	Fwd	CERK1 S268A-upper(F)	AGGGTGATTTCGTTTgCTTCTTCTA
	Rev	CERK1 S268A-lower(R)	TAGAAGAAGcAAACGAATCACCT
T433A	Fwd	CERK1 T433A-upper(F)	AGCACgCGGTTCCAGTTTAT
	Rev	CERK1 T433A-lower(R)	ATAAACTGGAACCGcGTGCT
S444A	Fwd	CERK1 S444A-upper(F)	GACATTAAAgCTGCCAATATTTT
	Rev	CERK1 S444A-lower(R)	AAAATATTGGCAGcTTTAATGTC
T463A	Fwd	CERK1 T463A-upper(F)	GATTTTCGGGTTAgCAAACTGAC
	Rev	CERK1 T463A-lower(R)	GTCAGTTTTGcTAACCCGAAATC
T473A	Fwd	CERK1 T473A-upper(F)	GGTTCAGCAgCTCGGGGTGCA
	Rev	CERK1 T473A-lower(R)	TGCACCCCGAGcTGCTGAACC
T519A	Fwd	CERK1 T519A-upper(F)	GTTGTCAAATGgCAGAAGCC
	Rev	CERK1 T519A-lower(R)	GGCTTCTGcCATTTTGACAAC

CERK1	Fwd	CERK1 F3	CACCATGAAGCTAAAGATTTCTC
	Rev	CERK1 R3	CTACCGGCCGGACATAAGACTG

2. 大腸菌発現タンパク質の調製

目的のデスティネーションクロンが形質転換された BL21-AI 株の大腸菌を、2 ml の LB 培地 (100 µg/ml のアンピシリン含有) で、37°C、12 時間振とう培養した。その培養液から 100 µl を分けとり、100 ml の新しい LB 培地に植菌し、37°C で 10 時間振とう培養した。さらに、この 100 ml の培養液から、新しい LB 培地 250 ml に対して 5 ml 植菌し、OD₆₀₀ が 0.4 になるまで 37°C で振とう培養した。そこに最終濃度が 0.2 % になるようにアラビノースを添加し、15°C、16 時間振とう培養した。培養後、7000×g、25°C で 10 分間遠心し、沈殿した大腸菌をグルタチオンバッファー (20 mM リン酸二水素ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、2 mM DTT、5 mM EDTA・2Na、pH 7.0) もしくは Strep バッファー (100 mM Tris、150 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA・2Na、pH 8.0) で懸濁した。懸濁の際には 1.5 g の大腸菌が 40ml のバッファーに懸濁されるように調整し、これを 40 ml ずつ超音波破砕機で溶菌した。溶菌後、20000×g、4°C で 40 分間遠心し、不溶性画分と可溶性画分を分離した。可溶性画分は 0.45 µm のシリンジフィルターでろ過した。GST タグ融合タンパク質の場合は、1 ml の GSTrap FF カラム(GE)を用いて精製した。サンプルを添加後の GSTrap カラムは、カラム体積の 10 倍以上のグルタチオンバッファーで洗い作業を行った。その後、5 ml の溶出バッファー (50 mM Tris、10 mM 還元型グルタチオン、pH 7.0) で溶出した。Strep タグ融合タンパク質の場合は、1ml の StrepTrap HP カラム (GE) で精製した。サンプル添加後の StrepTrap カラムは、カラムボリュームの 10 倍以上の Strep バッファーで洗い作業を行った。その後、5 ml の溶出バッファー (100 mM Tris、150 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA・2Na、5 mM D-Desthiobiotin、pH 8.0) で溶出した。溶出したサンプルは、Amicon Ultra-4 10K (Millipore) を用いて、7500×g、4°C の条件下で遠心し、濃縮した。濃縮中は、後述するリン酸化反応のバッファーを適宜添加することでバッファーの置換を行った。

3. *in vitro* キナーゼアッセイ

40 µl の反応系の中に、5 µg のキナーゼ、1 µg の基質タンパク質および終濃度 50 mM HEPES (pH 7.0)、150 mM NaCl₂、10 mM MnCl₂、1 mM DTT、10 µM ATP となる様に調製し、25°C、1 時間静置して反応させた。

4. フォスファターゼ処理

反応には λ -phosphatase (Sigma) を用いた。反応条件は添付されたプロトコルに従い、40 μ l の反応系の中に、4 μ l の 10 \times Buffer (500 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA、50 mM DTT、0.1 % Brij 35)、4 μ l の 10 \times MnCl₂ (20 mM MnCl₂)、1 μ l の λ -phosphatase 溶液およびリン酸化反応液 31 μ l を加えて、30 $^{\circ}$ C、1 時間反応させた。

5. ベンサミアナタバコの育成

浅鉢 5 号に 6 割ほどのくみあいニッピ園芸培土 1 号を入れ、スパチュラ 2~3 杯分の種を播種し、鉢にラップをかけた。鉢は水を薄く引いたバットの上に置き、底面から灌水させ発芽させた (22 $^{\circ}$ C、暗期 10 時間、20 $^{\circ}$ C、明期 14 時間、ファイトロン (エスペックミック))。3 日後にラップを取り、さらに 7 日ほど経過したところで、園芸用黒ポッドに植え替え 3 週間ほど同一条件で育成させた。

6. ベンサミアナタバコでのタンパク質の一過的発現法

目的のコンストラクトを形質転換したアグロバクテリウム (C58C1) を 2 ml の YEP 培地 (50 μ g/ml カナマイシン、50 μ g/ml ハイグロマイシン、20 μ g/ml リファンピシン含有) で 28 $^{\circ}$ C、2 日間振とう培養した。その培養液から 100 μ l 分けとり、20 ml の YEP 培地に植菌し、28 $^{\circ}$ C、16 時間振とう培養した。その後、2000 \times g、28 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心し、集菌した。上清を捨てたのち、MMA バッファー (10 mM MgCl₂、0.2% MES-KOH pH 5.6、1 mM アセトシリンゴン) に懸濁し、OD₆₀₀ が 0.6 になるように調整した。調整した後は 2 時間、28 $^{\circ}$ C で静置し、1 ml のシリンジでベンサミアナタバコの葉の裏側からアグロバクテリウムをインフィルトレーションした。CERK1-3HA 発現体は接種後 1 日で回収し、CERK1(KD)-3HA 発現体は接種後 3 日で回収した。

<YEP 液体培地組成(1000 ml)>

Bacto pepton	10 g
Bacto Yeast Extract	10 g
NaCl	5 g

up to 1000 ml

pH 7.2 に調製した後に、オートクレーブにて滅菌した。

7. ベンサミアナタバコで発現させた CERK1-3HA の調製

アグロバクテリウムを感染させたベンサミアナタバコの葉を回収し、速やかに液体窒素で凍結させた。凍結した葉を溶解せずに葉さじで粉碎した。葉と等量のホモジナイズバッファー (0.3 M スクロース、50 mM Mes-Tris pH 7.6、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM PMSF) を加え、ヒスコトロンを用いて 30 秒、4 回で破碎した。その後、10,000×g、4°C で 10 分遠心し上清を回収した。その上清を、100000×g、4°C で 40 分間超遠心し、膜画分を回収した。得られた膜画分は可溶化バッファー (50 mM リン酸化二水素ナトリウム、150 mM NaCl pH 7.0、1 mM PMSF、0.5 % Triton-X100) で溶解後、2 時間、回転攪拌させることで可溶化した。100000×g、4°C で 40 分間超遠心し、上清を回収した。その上清に対してして、20 µl の HA アガロース (Sigma) を添加し、一晚、回転攪拌した。PrepSpin Column (Sigma) に溶液を添加し、8000×g、4°C で 10 秒遠心することで、HA アガロースを回収した。その後、Wash バッファー (0.05 % Triton-X100、50 mM リン酸二水素ナトリウム、150 mM NaCl pH 7.0) を加え、遠心を繰り返すことで洗い作業を行った。その後、50 µl の SDS バッファー (400 mM Tris-HCl pH 6.8、4% SDS、10 % グリセロール、0.01 % BPB、2 %メルカプトエタノール) を添加し、95°C、10 分間加熱し、15000×g、25°C で 2 分間遠心することで溶出した。

8. CERK1 タンパク質発現評価に用いたシロイヌナズナの膜画分の調製

2 ml マイクロチューブに 600 粒の種子を取り、70 %エタノールを 1 ml 加えて 1 分間激しく攪拌した。エタノールを捨て、滅菌水 800 µl、次亜塩素酸 200 µl、Tween20 を 5 µl 加えて、3 分間激しく攪拌し、クリーンベンチ内で溶液を除去した後、5 回以上、滅菌水を替えてよく洗浄することで種子の表面殺菌を行った。30 ml のオートクレ

ーブで滅菌した 2%スクロース溶液 (0.2% Agarose S を含む) と、30 ml のオートクレーブ後に 0.22 μm のフィルターでろ過した MS 液体培地を混ぜ、シャーレ 3 枚に約 20 ml ずつ分注し、そこへ表面殺菌した種子を 3 枚に均等になるように播種した。シャーレの周囲をパラフィルムで巻き、4 日間の低温処理の後、22°C、明期 16 時間、暗期 8 時間の温室に移し、9 日間育成した。育成した実生約 600 個体の水分をハンドタオルでよく切り、50 ml チューブに回収し液体窒素で速やかに凍結させた。その後は、ベンサミアナタバコから膜画分を抽出した方法と同様の操作を行った。MS 液体培地の組成を下記に示す。

<MS 液体培地 (1000 ml) >

MS salt	1 袋
H ₂ O	1000 ml

オートクレーブにて滅菌して用いた。

9. タンパク質サンプルの電気泳動と検出

300 ml ほどの 1×SDS-PAGE Running buffer を作製し、泳動槽に 200 ml ほど泡が立たないように注意しながら注いだ。その後、作製したゲルをセットし、傾けながらゲル板の間に気泡が入らないように泳動槽 (ATTO) へ入れた。泳動槽の上部には残りの Running buffer を適量加えた。サンプルをロード後、泳動を行うゲルが 1 枚の場合は、20 mA で、2 枚の場合は 40 mA 電流を流した。電気泳動の終わったゲルを CBB 染色で検出する場合は、染色液に 1 時間ほどゲルを浸透させたのち、脱色液で脱色させた。電気泳動後にウエスタンブロッティングを行う場合は下記の方法で操作した。ブロッティングに使うメンブレンを 100%メタノールに 30 秒ほど浸した後、Towbin 転写バッファーに浸した。フィルターペーパー2枚も Towbin 転写バッファーに浸した。ゲル板からゲルを剥し Towbin 転写バッファーに 30 秒ほど浸すことで平衡化した。その後、ウエスタンブロッティング装置 (Bio-rad) にフィルターペーパーを 1 枚のせ、メンブレンを重ねた。この際、メンブレンが乾かないように表面に Towbin 転写バッファーを加えた。ゲルをメンブレンの上のせ、もう 1 枚のフィルターペーパーを重ねた。さらに乾燥を防ぐために、全体に Towbin 転写バッファーをかけた。最後に、フィルターペーパーの表面で試験管等を転がすことによって中の気泡を抜いた。その後、カバーをは

め、15 V、40 分間、ブロッキングを行った。転写操作後、適当なサイズのタッパーに 5%スキムミルクをメンブレンが浸る程度に用意し、そこへメンブレンを浸し、30 分間振とうさせることでブロッキングをした。ブロッキング終了後 1 次抗体を加えておいた 3%スキムミルクにメンブレンを移し、1 次抗体処理を 30 分から一晩の範囲で行った。抗体処理時間を長くした場合は、4°Cで抗体処理を行った。反応後、メンブレンを PBS-T の入ったタッパーに移し、5 分間振とうし、洗い作業とした。その後、PBS-T を捨てメンブレンに直接かからないように PBS を加え、5 分間振とうし、2 回目の洗い操作とした。更に同様の操作をもう一度行い計 3 回の洗い操作を行った。2 次抗体処理では、1 次抗体処理と同様に 2 次抗体の入った 3%スキムミルク溶液を用意しておき、メンブレンを浸し、30 分振とうすることで抗体処理とした。その後の洗い操作は、1 次抗体処理後の操作と同様であるが、PBS-T で 1 度洗った後、PBS で 3 回洗った。検出液 (Millipore) に 5 分間浸し、LAS4000 (GE) で検出を行った。作製したゲル、SDS-PAGE Running buffer、CBB 染色液、脱色液、Towbin 転写バッファー、PBS、PBS-T の組成、および使用した抗体は下記に示す。ただし、抗ホスホセリン/ホスホチロシン抗体で検出を行う場合は、スキムミルク溶液を BSA 溶液に置き換えて実験を行った。

<使用したゲルの組成 (2 枚分) >

大腸菌発現タンパク質の電気泳動は、10 %の分離ゲルを使用した。

ベンサミアナタバコから抽出した膜タンパク質の電気泳動は 7.5 %の分離ゲルを使用した。

使用したゲルの組成 (2 枚分)

	分離ゲル (7.5%)	分離ゲル (10%)	濃縮ゲル (4.5%)
A 液	4.5 ml	6 ml	0.9 ml
B 液	4.5 ml	4.5 ml	—
C 液	—	—	1.5 ml
D 液	0.08 ml	0.08 ml	0.02 ml
TEMED	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
水	4.5 ml	7.5 ml	3.6 ml

*Phos-tag (和光純薬) ゲルを作製する場合は、分離ゲルに最終濃度 10 μ M になるように調製した Phos-tag 溶液と 20 μ M の $MnCl_2$ を添加した。

A 溶液 (100 ml)

アクリルアミド 29.2 g

NN-メチレンビスアクリルアミド 0.8 g

B 溶液 (100 ml)

Tris 18.2 g

SDS 0.4 g

塩酸で pH 8.8 に調製

C 溶液 (100 ml)

Tris 6.1 g

SDS 0.4 g

塩酸で pH 6.8 に調製

D 溶液 (1 ml)

過硫酸アンモニウム 0.1 g

< 5×SDS-PAGE Running Buffer (1000 ml) >

Tris 15 g

SDS 5 g

Glycine 72 g

*使用時は H₂O で 5 倍に希釈し使用した。

< CBB 染色液 (1000 ml) >

クマシーブリリアントブルー 248 mg

メタノール 50 ml

酢酸 100 ml

H₂O 850 ml

< CBB 脱色液 (1000 ml) >

メタノール 300 ml

酢酸 100 ml

H₂O 600 ml

< Towbin 転写バッファー (1000ml) >

Tris 3.03 g

Glycine 14.4 g

メタノール 200 ml

Up to 1000 ml

<PBS および PBS-T (2000 ml) >

リン酸二水素ナトリウム 4.8 g

NaCl 17.53 g

Up to 2000 ml

10 N NaOH で pH 7.0 に調製し用いた。

PBS-T は PBS に 0.1 %の Tween20 を加えて調製した。

10. シロイヌナズナの形質転換

膜画分の調製に記述したのと同様の方法で表面殺菌を行った種子を MS 寒天培地に播種した。4 日間低温処理をしたのち、数週間、22℃、恒明条件で生育させた。寒天を洗い流した幼生をオアシスに移植し、MGRL 培地と蒸留水を交互に与えながら 1 か月ほど成育させた。途中、抽苔した頂芽を切断し、側芽の成長を促した。目的のコンストラクトを形質転換したアグロバクテリウム (C58C1) を 2 ml の YEP 培地 (50 µg/ml カナマイシン、50 µg/ml ハイグロマイシン、20 µg/ml リファンピシン含有) で 28℃、2 日間振とう培養した。その培養液から 100 µl 分けとり、250 ml の YEP 培地に植菌し、28℃、16 時間振とう培養した。培養したアグロバクテリウム培養液を、2000×g、28℃で 10 分間遠心した。上清を捨て浸潤培地を加えて懸濁し、OD₆₀₀ が 0.8 以上になるように調整した。均一に拡散したアグロバクテリウム菌液を、タッパーなどの適当な容器へ移し、植物体全体を浸潤培地に 5 分間浸した。その後、白いビニール袋に植物体を入れ、袋の口を縛った。22℃、連続光のもとで、2 日間育成させた。2 日間置いたのち、袋から出し育成させた。MS 寒天培地、MGRL 培地と浸潤培地の組成は下記に示した。

<MS 寒天培地 (1000 ml) >

MS salt 1 袋

Sucrose 25 g

pH 6.0 に調製後にメスアップした。

ゲランガムを 2.4 g 加えてオートクレーブした。

固まる前に 1 ml の 1000×Vitamin を加えてシャーレに分注した。

<1000×Vitamin (100ml) >

Thiamine hydrochloride (Vitamin B1)	300 mg
Nicotinic acid	500 mg
Pyridoxine hydrochloride (Vitamin B6)	50 mg

<MGRL medium (1000ml) >

MGRL Amix	0.71 g	NaH ₂ PO ₄ (無水)	18.1 g
		Na ₂ HPO ₄ (無水)	3.7 g
		MgSO ₄ (無水)	18.1 g
		KNO ₃	30.4 g
		Fe(III) EDTA	0.5 g
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.47 g		
1000×MGRL 溶液	1 mL	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.3 g
		H ₃ BO ₃	1.85 g
		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.29 g
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.24 g
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.03 g
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.03 g

pH 5.8

1Lにメスアップした。

<浸潤培地 (1000 ml) >

MS salt	1 袋
1000×Vitamine	1 ml
Sucrose	50 g
MES	0.5 g

1 N KOH で pH を 5.7 に調製し、1Lにメスアップした。その後、1 mg/ml ベンジルア
デニン (DMSO 溶解) を 10 μ l、 20% Tween20 を 1 ml 加えた。

11. 形質転換体の選抜

アグロバクテリウムを感染させた植物体から、種子を収穫した。種子を前述の方法と同様に表面殺菌した後、25 $\mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシンと 160 $\mu\text{g/ml}$ のクラフォランを含んだ MS 寒天培地に播種した。4°C で 4 日間低温処理した後、22°C、恒明条件下で育成した。10 日以上経過したら、抗生物質耐性個体を選び、再び抗生物質の入っている MS 寒天培地に移植した。寒天培地で 7~10 日間育成した後、オアシスに移植して MGRL を与えながら 1 ヶ月程育成した。その過程で、形質転換植物体から本葉を 1 枚取り、100 μl のバッファー A (100 mM Tris-HCl pH 9.5、1 M KCl、10 mM EDTA) 中で葉をすりつぶした後、95°C、10 分間加熱。この植物破砕液をテンプレートに KOD FX Neo (TOYOBO) を用いて PCR を行い、形質転換を確認した。プライマー、PCR 条件は下記に示す。

<PCR 条件>

葉の破砕液	0.5 μl
2×PCR Buffer	7.5 μl
dNTPs	3 μl
Primer Forward	0.45 μl
Primer Reverse	0.45 μl
KOD FX Neo	0.15 μl
	15 μl

94°C	98°C	60°C	68°C	68°C	4°C
2 分	10 秒	30 秒	1 分	10 分	∞
	35cycle				

	Fwd	プライマー名	プライマー配列
	Rev		
	Fwd	CERK1 F8	CGCCTGATTGGATATTGTGTTG
	Rev	attB2	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

12. 形質転換した *CERK1* 遺伝子配列のシーケンス解析

前項同様に、下に示すプライマーを用いて、変異導入部分を含む PCR 産物を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動を行い、目的バンドを切り出した。HiYieldGel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience) を用いてゲル抽出を行うことで目的産物を回収した。この PCR 産物に対して、Ex Taq polymerase (TAKARA) を用いて 5'末端に A 付加した (70°C、30 分間反応)。2 µg 相当の A 付加した PCR 産物を pCR8 (Life technologies) に導入した。その後は DH5α 株の大腸菌に形質転換、プラスミド抽出を行った。このプラスミドに対して、シーケンス解析を行い形質転換された *CERK1* 配列が正しいことを確認した。プライマー、PCR 条件と A 付加条件、TOPO 反応条件を下に記す。

<PCR 条件>

葉の破碎液	0.5 µl
2×PCR Buffer	7.5 µl
dNTPs	3 µl
Primer Forward	0.45 µl
Primer Reverse	0.45 µl
KOD FX Neo	0.15 µl
<hr/>	
Total	15 µl

94°C	98°C	60°C	72°C	72°C	4°C
5 分	30 秒	30 秒	4 分	4 分	∞
	30cycle				

	Fwd	プライマー名	プライマー配列
	Rev		
	Fwd	attB1	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC
	Rev	CERK1 R3	CTACCGGCCGGACATAAGACTG

<A 付加反応溶液組成>

ゲル抽出した PCR 産物	5 μ l
10×Buffer	1 μ l
dATPs (2 mM)	1 μ l
Ex Taq	1 μ l
H ₂ O	2 μ l
<hr/>	
	10 μ l

<TOPO 反応>

A 付加した PCR 産物	2 μ l
Salt solution	0.5 μ l
pCR8	0.5 μ l
<hr/>	
	3 μ l

13. 活性酸素応答解析

MF 画分の調製で記述したのと同様の方法で種子（各系統 400 粒）の表面殺菌を行った。オートクレーブで滅菌した 2%スクロース、0.2% Agarose 溶液 40 ml に対してクリーンベンチ内でろ過滅菌した MGRL 培地 40 ml を加え、20 ml ずつシャーレに分注した。そこへ表面殺菌した種子を等量ずつ播種した。シャーレの周囲をパラフィルムで巻き、4 日間の低温処理の後、22°C、明期 16 時間、暗期 8 時間の温室で 9 日間、成育した。オートクレーブで滅菌した 2% スクロース溶液とクリーンベンチ内でろ過滅菌した MGRL 培地を等量混合した培地を調整した。培地を 48 穴プレートに最終液量が 600 μ l となるように分注し、9 日目の実生を調整した培地で洗った後に 1 穴あたり 3 個体ずつ入れた（一処理区 3 反復）。サーモミキサーにより、25°C、300 rpm で 2 時間プレインキュベートした。プレインキュベートが終わったら、最終濃度が 20 μ M になるようにキチン 7 量体を添加した。実生が浮かんだ培地 10 μ l を経時的（0 分、30 分、60 分、120 分、180 分）にサンプリングし、1.1 mM ルミノール 50 μ l 及び 14 mM フェリシアン化カリウム 100 μ l をすぐに加え、ルミノメーターにより活性酸素量を化学発光量として測定した。

14. 防御応答関連遺伝子の発現誘導解析

活性酸素測定と同条件で表面殺菌、育成した実生を用いた。さらに活性酸素測定に用いたのと同じ 1/2 MGRL (1% スクロースを含む) を調整し、24 穴プレート 1 穴あたりに最終量が 700 μ l となる様に分注した。1 穴あたり 15 個体の実生を入れ、1 処理区 3 反復となる様に準備した。サーモミキサーにより、25°C、300 rpm で 2 時間プレインキュベートした。プレインキュベートが終わったら、最終濃度が 10 μ g/ml となるようにキチン 7 量体を添加した。キチン 7 量体を処理後 30 分の実生を回収し、ろ紙の上で余分な培地を除いたのち、液体窒素により凍結した。凍結状態の実生をビーズ破砕機で破砕し、FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (300 preps) (FAVORGEN) を用いて RNA の抽出を行った。キットに付属の説明書に従って抽出した後、NanoDrop により濃度と純度を測定した。Total RNA 500 ng から QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて逆転写反応を行った。キットに付属の説明書に従って操作した。ただし、反応は半量で行った。得られた cDNA 溶液は 10 倍に希釈してリアルタイム PCR のテンプレートとした。合成した cDNA をテンプレートとし、ABI7500Fast (applied biosystems) システムを用いて SYBR Green 法によるリアルタイム PCR を行った。解析により得られた各遺伝子の Ct 値を、ハウスキーピング遺伝子である *Actin* の Ct 値を基にして $\Delta\Delta$ Ct 法によって解析した。各系統の水処理時の値を 1 とした際の発現量を計算してグラフ化した。

<SYBR Green 法>

Template	2 μ l
Primer Mix	0.8 μ l
H ₂ O	0.2 μ l
Fast SYBR Green PCR Master Mix(ABI)	4 μ l
<hr/>	
Total	8 μ l

Primer Mix は事前に Forward Primer、Reverse Primer が 2 μ M となるように混合した。

PCR 反応は Fast モードで行った。使用したプライマーは下記に示した。

	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Actin</i>	CTTGCACCAAGCAGCATGAA	CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT
<i>CERK1</i> lower	AGATGGCGGAATTAGGGAAAG	GGATAAAGCAACCACAATGTATCTC
<i>AtWRKY53</i>	CAGACGGGGATGCTACGG	GGCGAGGCTAATGGTGGTG
<i>AtMYB51</i>	ACAAATGGTCTGCTATAGCT	CTTGTGTGTA ACTGGATCAA

第3節 実験結果

1. 大腸菌発現系で調製した CERK1 細胞内ドメインタンパク質のリン酸化能の評価

受容体様キナーゼ (RLK) の活性化機構の解析では、大腸菌発現系で調製した細胞内ドメインタンパク質を用いて実験することが一般的である。そこで本研究でも、大腸菌発現系で調製した CERK1 細胞内ドメインタンパク質を用いて、CERK1 の自己リン酸化を介したシグナル伝達制御機構を解析した。

まずは、大腸菌発現系で調製した CERK1 細胞内ドメインタンパク質 (CERK1_{cyt}) が、自己リン酸化能を有するかについて確認した。CERK1_{cyt} は精製を容易にするために、N 末端側に GST (Glutathione S-transferase) タグを付加した GST-CERK1_{cyt} を調製した。また、キナーゼに保存され、キナーゼの活性制御に関わることが知られる CERK1 の 441 番目のアスパラギン酸残基 (D) をバリン残基 (V) に置換することで、キナーゼ活性を失った GST-CERK1(D441V)_{cyt} も調製し、キナーゼ活性評価の指標に用いた。それらタンパク質は大腸菌で発現させたのち、その大腸菌を破碎することで溶菌させ、GSTrap FF カラム (GE) で精製することで調製した。それぞれのタンパク質の自己リン酸化能は SDS-PAGE 後のリン酸化によるバンドシフトから評価した。ゲルは CBB 染色、またはウエスタンブロッティング後、抗 GST 抗体 (α -GST)、抗ホスホセリン抗体 (α -pS)、抗ホスホチロシン抗体 (α -pY) で検出した。

その結果、予測質量と一致する 68 kDa 付近に GST-CERK_{cyt} および GST-CERK1(D441V)_{cyt} のバンドが確認された (Fig. 1-1)。GST-CERK_{cyt} はブロードなバンドとして検出され、フォスファターゼを処理したサンプルでは、バンド位置が GST-CERK1(D441V)_{cyt} と同位置に収束した。そのため、GST-CERK_{cyt} は大腸菌内でリン酸化していたことがわかった。また、GST-CERK1(D441V)_{cyt} に対し、フォスファターゼ処理をしてもバンド位置の変化は見られないことから、GST-CERK1(D441V)_{cyt} は大腸菌内でリン酸化しないことがわかった。

以上のことから、大腸菌発現系で調製した GST-CERK1_{cyt} は自己リン酸化能を持つことが示された。抗ホスホセリン抗体、抗ホスホチロシン抗体を用いたところ、GST-CERK_{cyt} のバンドが確認されたことから CERK1 は、セリン残基およびチロシン残基を自己リン酸化することも明らかになった。

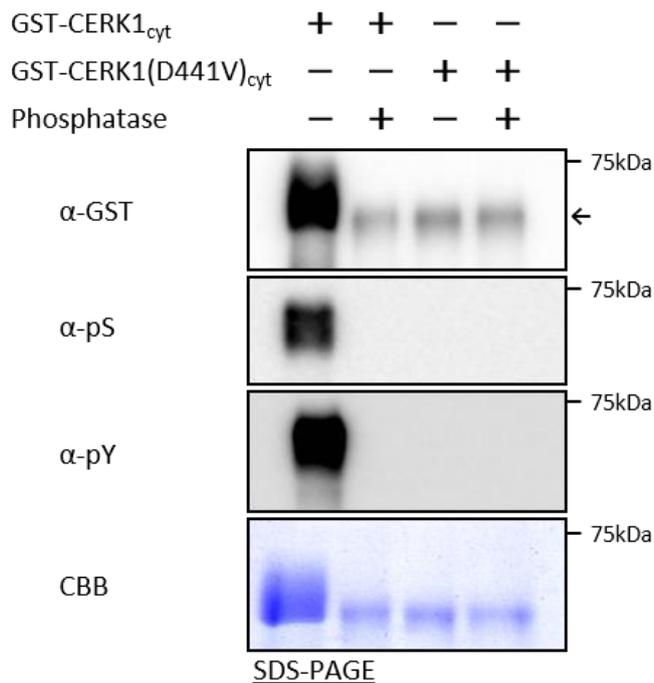


Fig. 1-1 大腸菌発現系で発現した GST-CERK1_{cyt} の自己リン酸化能の評価

大腸菌にて発現、精製して得られた GST-CERK1_{cyt}、GST-CERK1(D441V)_{cyt} をフォスファターゼ (Phosphatase) 処理および非処理のサンプルを電気泳動後、CBB 染色および抗 GST 抗体 (α-GST)、抗ホスホセリン抗体 (α-pS)、抗ホスホチロシン抗体 (α-pY) で検出した。矢印は非リン酸化状態の GST-CERK1_{cyt} および GST-CERK1(D441V)_{cyt} の位置を示す。

2. CERK1 自己リン酸化モードの解析

CERK1 はホモダイマー化でシグナル伝達を起動することがわかっている (59, 66)。また、CERK1 細胞内ドメインの自己リン酸化がシグナル伝達に関わると考えられている(54, 58)。そのため、CERK1 はホモダイマーに伴って細胞内ドメインを自己リン酸化することが想定された。そこで、CERK1cyt がキナーゼ活性を持たない CERK1(D441V)cyt をリン酸化する能力を持つかを評価することで、CERK1 が 2 分子でリン酸化 (分子間リン酸化) するのか、1 分子でリン酸化 (分子内リン酸化) するのかを評価することにした。

この実験では、CERK1cyt の N 末端側に GST タグを融合した GST-CERK1cyt タンパク質と、CERK(D441V)cyt の N 末端に Strep タグを融合した Strep-CERK1(D441V)cyt タンパク質を大腸菌発現系から調製して用いた。また、本実験ではすでに分子間の自己リン酸化を行うことが立証されているミヤコグサの NFR1 をコントロールに用いた (77)。NFR1 由来のタンパク質は、NFR1 の細胞内ドメインタンパク質 (NFR1cyt) の N 末端側に GST タグを融合した GST-NFR1cyt と、NFR1 の 481 番目のスレオニン残基 (T) をアラニン残基 (A) に置換することでキナーゼ活性を欠損させた NFR1(T481A)の細胞内ドメインの N 末端側に Strep タグを融合した Strep-NFR1(T481A)cyt を、大腸菌発現系で調製した。

それぞれの 2 種類のタンパク質は、第 2 節の方法に示したバッファー中でリン酸化反応を行った。CERK1 のリン酸化は、SDS-PAGE・ウエスタンブロッティング後、抗 Strep 抗体 (α -Strep) で検出し、評価した。また基質の SDS-PAGE では、そのリン酸化をより容易に観察するため、リン酸化タンパク質が特異的にトラップされることで、リン酸化によるバンドシフトが見やすくなる Phos-tag ゲルを用いた。

その結果、GST-NFR1cyt と Strep-NFR1(T481A)cyt 共存下で ATP を添加したサンプルでは Strep-NFR1(T481A)cyt のブロードなバンドが確認された (Fig. 1-2)。このサンプルにフォスファターゼを処理すると、ブロードなバンドが Strep-NFR1(T481A)cyt のみのサンプルのバンド位置に収束することから、前述のブロードなバンドがリン酸化によるものであることが明らかになった。また、Strep-NFR1(T481A)cyt に ATP を添加しても、バンドシフトが観察されないことから、Strep-NFR1(T481A)cyt のリン酸化は、GST-NFR1cyt によるものあると確認された。これらの実験結果から、NFR1 は分子間でリン酸化することが本実験系においても確認され

た。また本実験系が CERK1 のキナーゼでの自己リン酸化様式の解析に利用可能であることが示された。

そこで、同様の実験を CERK1 についても行った結果、GST-CERK1cyt と Strep-CERK1(D441V)cyt 共存下で ATP を添加したサンプルにおいて、Strep-CERK1(D441V)cyt のブロードなバンドが確認された。また、フォスファターゼを処理したサンプルで、Strep-CERK1(D441V)cyt のバンドが消失した。Strep-CERK1(D441V)cyt のみに ATP を加えてもバンドシフトしないことから、Strep-CERK1(D441V)cyt で確認されたバンドシフトは GST-CERK1cyt によってもたらされたものであることが示された。以上の結果から、CERK1 は NFR1 と同様に分子間で自己リン酸化することが示唆され、CERK1 は 2 量体を形成し、リン酸化し合うことで自己リン酸化する可能性が示された。



Fig. 1-2 CERK1 分子間の自己リン酸化モード解析

大腸菌発現系を用いて調製したそれぞれのタンパク質を用いて、GST-CERK1_{cyt} がキナーゼ活性を持たない Strep-CERK1(D441V)_{cyt} をリン酸化するかについて評価した。NFR1 は本実験のコントロールとして用いた。

3. CERK1 の *in vitro* 自己リン酸化部位同定のための試料の評価

CERK1 の自己リン酸化部位の機能解析にあたり、そのリン酸化部位を LC-MS/MS 解析で同定することにした。まずは大腸菌発現系で調製した GST-CERK1cyt を用いて、CERK1 の *in vitro* 自己リン酸化部位の同定を進めた。

GST-CERK1cyt は大腸菌内で自己リン酸化することがわかっている (Fig. 1-1) 。しかし、大腸菌由来のキナーゼによって、リン酸化されたリン酸化部位が含まれる可能性も考えられる。そこで、GST-CERK1(D441V)cyt でも LC-MS/MS 解析を行い、双方で得られたリン酸化部位の結果を比較することで、GST-CERK1cyt で自己リン酸化された部位のみを抽出できると考えた。

LC-MS/MS 解析に用いる GST-CERK1cyt は、自己リン酸化率を高めるため、ATP 存在下でさらにリン酸化させた。本実験では LC-MS/MS 解析に用いる各タンパク質試料の一部とり、SDS-PAGE・ウエスタンブロッティング後、抗 GST 抗体で検出することで、GST-CERK1cyt の自己リン酸化をバンドシフトの程度から評価した。

その結果、ATP 存在下で GST-CERK1cyt のリン酸化を促したサンプルでは、ATP を加えていない GST-CERK1cyt のタンパク質バンドに比較して、高質量側にバンドシフトした (Fig. 1-3) 。よって、GST-CERK1cyt のキナーゼ活性により自己リン酸化が亢進したことがわかった。一方、GST-CERK1(D441V)cyt では ATP の存在下、非存在下にかかわらず、バンドシフトは確認されず、同じ位置にバンドが確認された。そのため、GST-CERK1(D441V)cyt は ATP 存在下で反応させてもリン酸化はしないことが示された。ATP を添加したそれぞれのサンプルを用いて、LC-MS/MS 解析を行った。

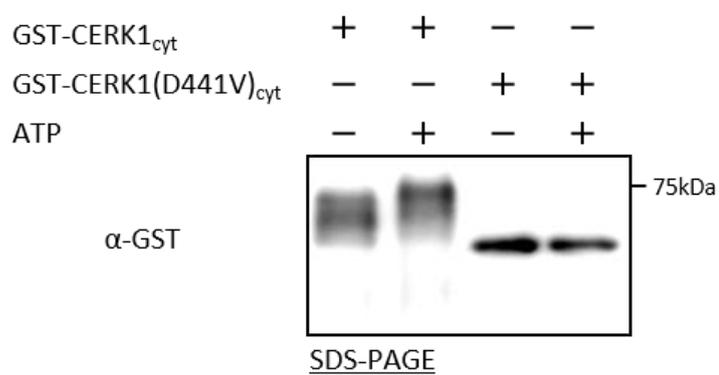


Fig. 1-3 GST-CERK1_{cyt} の自己リン酸化の評価

大腸菌発現系を用いて調製した GST-CERK_{cyt}、GST-CERK1(D441V)_{cyt} に対して ATP 存在/非存在下でリン酸化反応を促した際の自己リン酸化状態について解析を行った。

4. CERK1 の *in vivo* 自己リン酸化部位同定のための試料の評価

上記では、大腸菌発現系で調製した GST-CERK1cyt を用いて、*in vitro* 自己リン酸化部位の同定を進めたが (Fig. 1-3)、植物生体内でリン酸化された CERK1 でも LC-MS/MS 解析を行い、CERK1 の *in vivo* 自己リン酸化部位も同定することにした。本来はキチンオリゴ糖を処理したシロイヌナズナから CERK1 を単離し、それ用いて LC-MS/MS 解析を行い、CERK1 の *in vivo* 自己リン酸化部位を同定するのが直接的なアプローチである。一方、アグロバクテリウム法を用いて、ベンサミアナタバコの葉に CERK1 を一過的に発現系させると、CERK1 のキナーゼ活性に依存的にリン酸化すること、また、防御応答様の細胞死が誘導されることが示されており、シロイヌナズナにキチンオリゴ糖を処理したときと同じ状況をタバコの系でも擬似的に再現できることがわかっている (67, 95)。また、ベンサミアナタバコ発現系を用いることで大量のリン酸化 CERK1 を簡便に調製できることもわかっていた。そこで、本系を用いて、CERK1 の *in vivo* 自己リン酸化部位同定のための試料を調製することにした。

分析に用いた CERK1-3HA は、CERK1 全長の C 末端側に 3HA タグを付加したコンストラクトを持つアグロバクテリウムを、ベンサミアナタバコの葉にインフィルトし、強制的に感染させることで一過的に発現させた。その葉から膜画分を抽出・可溶化後、抗 HA 抗体が付加されたアガロースビーズで免疫沈降を行うことで、リン酸化した CERK1-3HA を調製した。また、CERK1 のキナーゼ活性依存的な自己リン酸化部位を同定するにあたり、CERK1(D441V)-3HA も同様の方法で調製した。

本実験では、調製したサンプルの一部を、Phos-tag ゲルを用いて SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロッティング後、転写膜を抗 HA 抗体 (α -HA) で検出することで、バンドシフトからリン酸化の有無を評価した。その結果、CERK1-3HA で検出されたタンパク質バンドは、CERK1(D441V)-3HA のものと比較して、明らかに高質量側にシフトしていることが確認された (Fig. 1-4)。また、同様な試料にフォスファターゼを処理したサンプルでは、そのバンドが CERK1(D441V)-3HA と同じ位置に低下した。よって、ベンサミアナタバコ一過的発現系を用いて調製した CERK1-3HA はリン酸化していることが確認され、CERK1 の *in vivo* 自己リン酸化部位の同定解析に適したサンプルであることが示された。

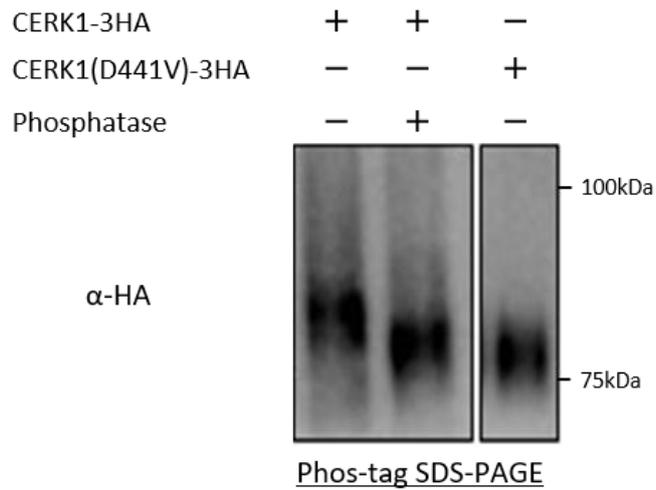


Fig. 1-4 CERK1-3HA の自己リン酸化の評価

ベンサミアナタバコ過発現系にて発現、HA アガロースによって調製した CERK1-3HA および CERK1(D441V)-3HA のリン酸化状態を抗 HA 抗体で評価した。電気泳動には phos-tag ゲルを用いた。

5. CERK1 の *in vivo/in vitro* 自己リン酸化部位の同定

CERK1 の自己リン酸化部位を同定するため、前述のように調製した試料を用いて (Fig.1-3, 4)、トリプシン分解処理後、LC-MS/MS 解析を行った。LC-MS/MS 解析は、明治大学 紀藤圭治 准教授に行っていた。

下記の図 (Fig. 1-5) には、GST-CERK1cyt および CERK1-3HA で自身のキナーゼ活性依存的に検出された自己リン酸化部位を示した。GST-CERK1cyt の *in vitro* の自己リン酸化部位は、セリン残基で 21 か所、スレオニン残基で 10 か所、チロシン残基で 10 か所の合計 41 か所のアミノ酸残基で確認された (Fig. 1-5)。また、GST-CERK1(D441V)cyt では、リン酸化部位が検出されず、GST-CERK1cyt で検出されたリン酸化部位は CERK1 の自己リン酸化によるものであることが示唆された。一方、CERK1-3HA の *in vivo* の自己リン酸化部位は、セリン残基で 11 か所、スレオニン残基で 4 か所の合計 15 か所のアミノ酸残基で確認された。*In vivo* リン酸化部位の中には、*in vitro* でリン酸化されていないリン酸化部位が 1 か所検出されたため、*in vivo/in vitro* リン酸化部位をまとめると、CERK1 の自己リン酸化部位を 42 か所同定することができた。LC-MS/MS 解析の結果は、170 頁に示した。

		260	270	280	290	300
In vitro	----	YAYRKN	KSKGDS SFSSS	IPL ST KADHA	SST SLQ S GGL	GGAGV S PGIA
In vivo	----	YAYRKN	KSKGDS SFSSS	IPL ST KADHA	SSTSLQ S GGL	GGAGV S PGIA
		310	320	330	340	350
In vitro		AISVDK S VEF	SLEELAKATD	NFNL S FKIGQ	GGFGAVYYAE	LRGEKAAIKK
In vivo		AISVDK S VEF	SLEELAKATD	NFNL S FKIGQ	GGFGAVYYAE	LRGEKAAIKK
		360	370	380	390	400
In vitro		MDMEA S KQFL	AELKVLTRVH	HVNLVRLIGY	CVEGSLFLV Y	E Y VENGNLGQ
In vivo		MDMEA S KQFL	AELKVLTRVH	HVNLVRLIGY	CVEGSLFLV Y	E Y VENGNLGQ
		410	420	430	440	450
In vitro		HLHGSGREPL	PWTKRVQIAL	D S ARGLE Y IH	E H TVPV V VHR	DIK S ANILID
In vivo		HLHGSGREPL	PWTKRVQIAL	D S ARGLE Y IH	E H TVPV V VHR	DIK S ANILID
		460	470	480	490	500
In vitro		QKFRQKVADE	GL T KL T EVGG	S ATRGAM G T F	G YMAPET V Y G	E V S A KVDV Y A
In vivo		QKFRQKVADE	GL T KL T EVGG	S ATRGAM G T F	G YMAPET V Y G	E V S A KVDV Y A
		510	520	530	540	550
In vitro		FGVVLYELIS	AKGAVVK M T E	AVGEFRGLVG	V F E S FKETD	KEEALRKIID
In vivo		FGVVLYELIS	AKGAVVK M T E	AVGEFRGLVG	V F E S FKETD	KEEALRKIID
		560	570	580	590	600
In vitro		PRLGD S Y P FD	S V Y KMAELGK	ACT Q ENAQLR	P SMRYIVVAL	STLFSSTGNW
In vivo		PRLGD S Y P FD	S V Y KMAELGK	ACT Q ENAQLR	P SMRYIVVAL	STLFSST T GNW
		610	617			
In vitro		DVGNFQNE D L	VSLM S GR			
In vivo		DVGNFQNE D L	VSLM S GR			

Fig. 1-5 *in vivo/in vitro* 解析による CERK1 キナーゼ自己リン酸化部位の同定

大腸菌発現 GST-CERK1cyt (In vitro) およびベンサミアナタバコ発現 CERK1-3HA (In vivo) を用いて質量分析を行い、キナーゼ領域中の自己リン酸化部位を同定した。自己リン酸化部位は赤文字で示した。

6. CERK1 の *in vivo* チロシンリン酸化の評価

質量分析の結果、*in vitro* タンパク質試料からはチロシン残基のリン酸化が同定されたが、*in vivo* リン酸化部位中にはチロシンリン酸化部位が検出されなかった (Fig. 1-5)。そこで、*in vivo* においてもチロシン残基がリン酸化されるかを明らかにするため、ベンサミアナタバコに一過的に発現させた CERK1-3HA が、抗チロシン抗体 (α -pY) で検出できるかを確認することにした。そこで、LC-MS/MS 解析に用いた同様のサンプルを、SDS-PAGE・ウエスタンブロッティング後、転写膜を抗チロシン抗体 (α -pY) で検出した。抗 HA 抗体 (α -HA) で検出したデータは CERK1-3HA のコントロールとして用いた。

その結果、CERK1-3HA のサンプルで CERK1-3HA と同じ質量の位置に、抗チロシン抗体でバンドが確認された (Fig. 1-6)。一方、CERK1(D441V)-3HA では、そのバンドが確認されなかった。そのため、CERK1-3HA は生体内で、チロシン残基をリン酸化することが、抗体を用いた評価から確認された。

7. シロイヌナズナ相補実験系を用いた自己リン酸化部位の機能解析

大腸菌発現系を用いて調製した GST-CERK1_{cyt} およびベンサミアナタバコー過的発現系を用いて調製した CERK1-3HA で LC-MS/MS 解析を行ったところ、CERK1 の自己リン酸化部位を 42 か所同定した (Fig. 1-5)。しかしこれらのアミノ酸残基のリン酸化が、キチンオリゴ糖誘導性の防御応答の起動に関与するのか不明である。そこで *in vitro/in vivo* の CERK1 自己リン酸化部位について、セリン残基 (S) 及びスレオニン残基 (T) はアラニン残基 (A) に、チロシン残基 (Y) はフェニルアラニン残基 (F) に、一アミノ酸残基置換した CERK1 を *cerk1-2* 変異体に形質転換し、それぞれの形質転換体に対してキチンオリゴ糖を処理した時の活性酸素生成および防御応答遺伝子の発現誘導を評価することで、一アミノ酸残基置換したリン酸化部位が CERK1 のシグナル伝達に関わるかを明らかにすることにした。

解析にあたり、*cerk1-2* 変異体に野生型の CERK1 を形質転換した、独立した 3 ラインの相補体 (CERK1/*cerk1-2*) で、野生型のシロイヌナズナ (Col-0) と同程度のキチン応答を示すかを、活性酸素生成を指標に評価した。その結果、独立した 3 ラインの相補体で、野生型と同程度のキチンオリゴ糖誘導性の活性酸素生成が確認された (Fig. 1-7)。このことから、上記の *cerk1-2* 変異体を用いた自己リン酸化部位の評価が可能であることを示された。また野生型シロイヌナズナ (Col-0)、*cerk1-2* および CERK1/*cerk1-2* 形質転換体の 1 ライン (35S::CERK1-1) において、それぞれの膜画分を調製し、SDS-PAGE・ウエスタンブロッティング後、得られた転写膜を抗 CERK1 抗体 (α-CERK1) で検出を行ったところ、Col-0 および 35S::CERK1-1/*cerk1-2* 形質転換体で CERK1 タンパク質の発現が確認された (Fig. 1-8)。このことから、相補体の活性酸素生成の復帰は、CERK1 タンパク質の発現に依存することが確認された。

そこで、上述した方法で作製した一アミノ酸残基置換 CERK1/*cerk1-2* 形質転換体に対して、キチンオリゴ糖を処理し、活性酸素生成と複数の防御応答関連遺伝子 (*AtMYB51*, *AtWARY53*) の発現誘導を評価することにした。形質転換体の得られた 28 か所の一アミノ酸残基を置換した個体で、防御応答評価を行った。その結果、一アミノ酸残基置換によって防御応答の復帰の消失またはわずかな復帰著を示したリン酸化部位が 5 か所 (T479, Y428, T473, T573, S493) を見出された。一アミノ酸残基置換によって影響がみられた形質転換体の結果は Fig. 1-9、10、12~14 に記載し、一アミノ酸残基置換で影響がみられなかった形質転換体はアミノ酸番号順に Fig. 1-15 に記載した。

479 番目のスレオニン残基 (T) をアラニン残基 (A) に置換した *CERK1(T479A)/cerk1-2* 形質転換体と 428 番目のチロシン残基 (Y) をフェニルアラニン残基 (F) 置換した *CERK1(Y428F)/cerk1-2* 形質転換体では、独立した 3 ラインで、キチンオリゴ糖誘導性の活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導の復帰の消失が観察された (Fig. 1-9, 10)。またそれぞれの形質転換体ラインで、*CERK1* の RNA レベルの発現量に幅はあるものの、全てのラインで Col-0 より高い発現が確認された。その形質転換体ラインの中でも一番 *CERK1* の発現量が高いライン (T479A-3、Y428F-1) で、膜画分を調製し、*CERK1* タンパク質の発現を確認したところ、野生型の Col-0 よりも高いタンパク質発現を示していることが確認された (Fig. 1-11)。以上から、T479 および Y428 の一アミノ酸残基置換でキチンオリゴ糖誘導性の防御応答の復帰が消失したことが確認され、T479、Y428 が *CERK1* を介したシグナル伝達系の起動に関わるリン酸化部位である可能性が示された。

573 番目のスレオニン残基をアラニン残基置換した *CERK1(T573A)/cerk1-2* 形質転換体の独立した 3 ラインでは、野生型と比較して、活性酸素応答の極めてわずかな復帰および防御応答関連遺伝子の発現誘導のわずかな復帰が観察された (Fig. 1-12)。それぞれの形質転換体ラインで *CERK1* の RNA レベルの発現量に差があるものの、すべてのラインで Col-0 よりも高い発現を示した。また、*CERK1* の RNA レベルの発現量が一番高いライン (T573A-3) で膜画分を調製し、*CERK1* タンパク質の発現を確認したところ、野生型の Col-0 よりもタンパク質発現量は低いが、*CERK1* が発現していることが確認された (Fig. 1-11)。以上から、T573 が *CERK1* を介したシグナル伝達系の起動に関わるリン酸化部位である可能性が示された。

473 番目のスレオニン残基 (T) をアラニン残基 (A) 置換した *CERK1(T473A)/cerk1-2* 形質転換体と 493 番目のセリン残基 (A) をアラニン残基 (A) 置換した *CERK1(S493A)/cerk1-2* 形質転換体のそれぞれ独立した 3 ラインでは、キチンオリゴ糖誘導性の活性酸素生成が共にわずかに復帰することが観察された (Fig. 1-13, 14)。*CERK1(S493A)/cerk1-2* 形質転換体ではキチンオリゴ糖誘導性の防御応答誘導遺伝子の発現誘導もわずかに復帰したものの、*CERK1(T473A)/cerk1-2* 形質転換体ではキチンオリゴ糖誘導性の防御応答誘導遺伝子の発現誘導が復帰していないか、もしくはその復帰がわずかであることが観察された。またそれぞれの形質転換体ラインで、*CERK1* の RNA レベルの発現量に幅はあるものの、すべてのラインで Col-0 と比較し

て高い発現を示していた。以上から、T473 および S493 が CERK1 を介したシグナル伝達系の起動に関わるリン酸化部位である可能性が示された。

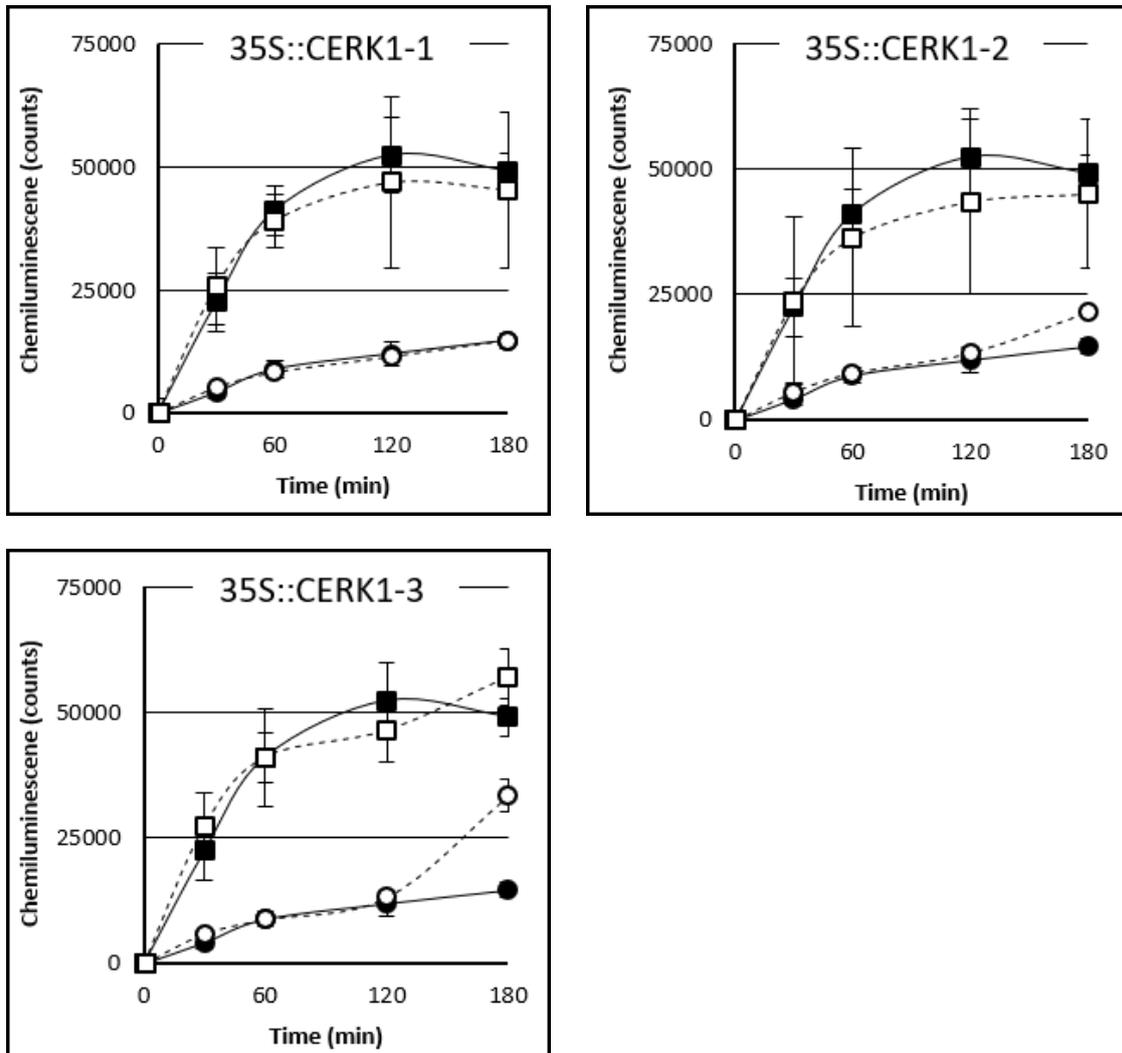


Fig. 1-7 CERK1/*cerk1-2*相補体の活性酸素生成量の評価

cerk1-2 変異体に CERK1 を過剰発現させたライン (*35S::CERK1*) で CERK1 依存的なキチンオリゴ糖誘導性の活性酸素生成の有無について評価した。実線は野生型 (Col-0) の結果を、破線は各相補体を示す。黒丸および白丸は水処理コントロール、黒四角および白四角はキチン 7 量体 (GN7) 処理を示す。各処理区 3 反復の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

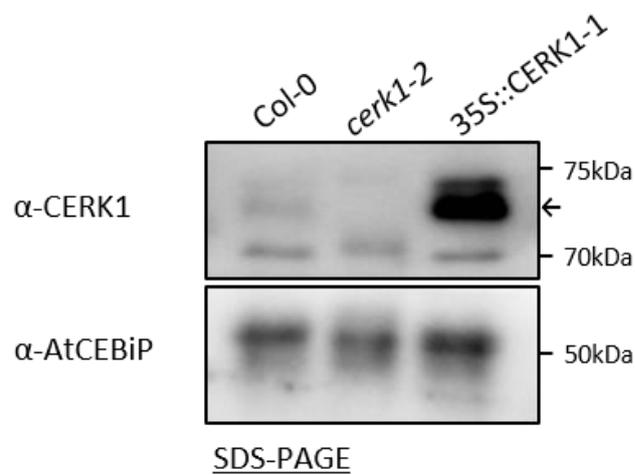


Fig. 1-8 *CERK1/cerk1-2*相補体における CERK1 タンパク質の発現確認

野生型 (Col-0)、*cerk1-2*変異体および *CERK1/cerk1-2*相補体 (*35S::CERK1-1*) から膜画分を抽出し、可溶化、電気泳動した。その後、ウエスタンブロッティングを行い、抗 CERK1 抗体および抗 AtCEBiP 抗体で検出した。抗 AtCEBiP 抗体で検出したデータはローディングコントロール。矢印は CERK1 の位置を示す。

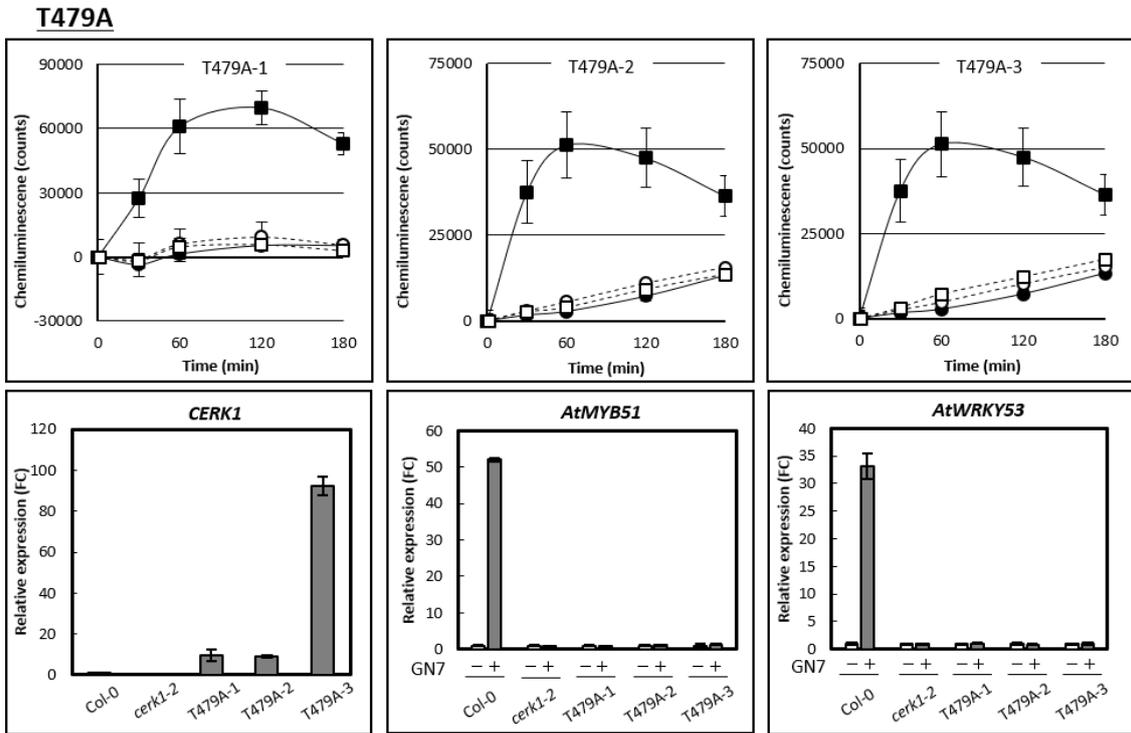


Fig. 1-9 T479 置換体の防御応答解析と *CERK1* の RNA レベルの発現確認

cerk1-2 変異体に一アミノ酸残基置換 *CERK1(T479A)* を形質転換し、得られた形質転換体 3 ラインに対してキチン 7 量体 (GN7) を処理した時の活性酸素応答 (上段 3 つ) および防御応答関連遺伝子の発現誘導量 (下段中央および右) を評価した。解析に用いた形質転換体の *CERK1* mRNA の発現レベルを左下に示した。活性酸素応答における実線は野生型 (Col-0) の結果、破線は作出した形質転換体の結果を示す。黒丸および白丸は水処理コントロール、黒四角および白四角はキチンオリゴ糖処理を示した。防御応答関連遺伝子発現誘導解析では、水処理コントロールは白色のバー、キチンオリゴ糖処理は灰色のバーで示した。すべての図におけるエラーバーは標準偏差を示す。

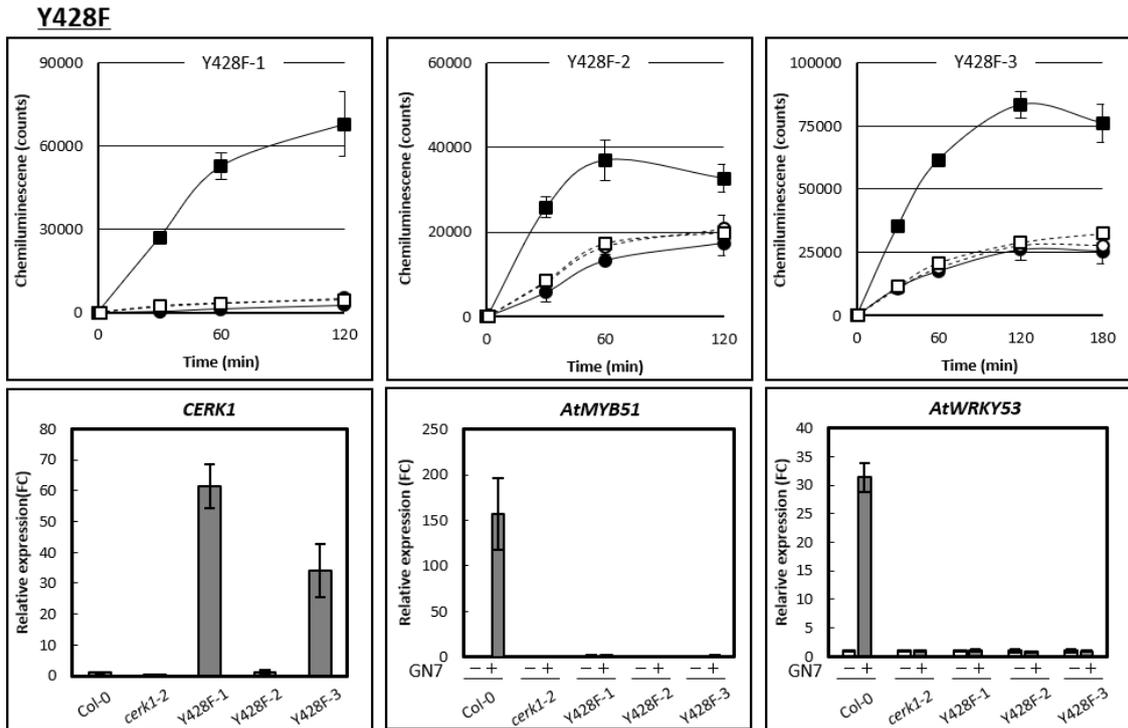


Fig. 1-10 Y428 置換体の防御応答解析と *CERK1* の RNA レベルの発現確認

cerk1-2 変異体に一アミノ酸残基置換 *CERK1(Y428F)* を形質転換し、得られた形質転換体 3 ラインに対してキチン 7 量体 (GN7) を処理した時の活性酸素応答 (上段 3 つ) および防御応答 関連遺伝子の発現誘導量 (下段中央および右) を評価した。解析に用いた形質転換体の *CERK1* mRNA の発現レベルを左下に示した。活性酸素応答における実線は野生型 (Col-0) の結果、破線は作出した形質転換体の結果を示す。黒丸および白丸は水処理コントロール、黒四角および白四角はキチンオリゴ糖処理を示した。防御応答関連遺伝子発現誘導解析では、水処理コントロールは白色のバー、キチンオリゴ糖処理は灰色のバーで示した。すべての図におけるエラーバーは標準偏差を示す。

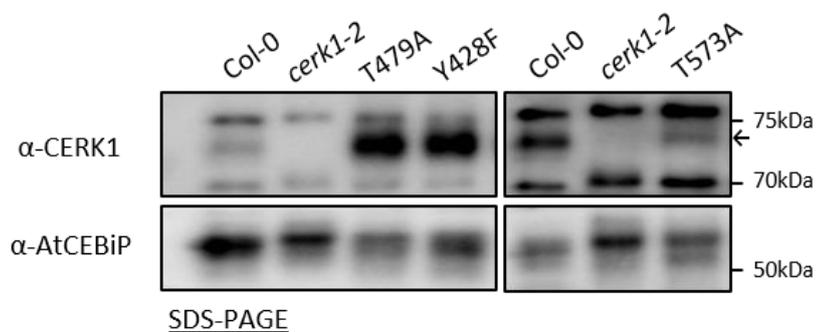


Fig. 1-11 CERK1(T479A), CERK1(Y428F), CERK1(T573A)タンパク質の発現確認

野生型 (Col-0) 、*cerk1-2*変異体、各形質転換体から膜画分を抽出し、可溶化したサンプルを電気泳動した。その後、ウエスタブロットティングを行い、抗 CERK1 抗体および抗 AtCEBiP 抗体で検出した。抗 AtCEBiP 抗体で検出したデータはコントロール。矢印は、CERK1 タンパク質を示している。

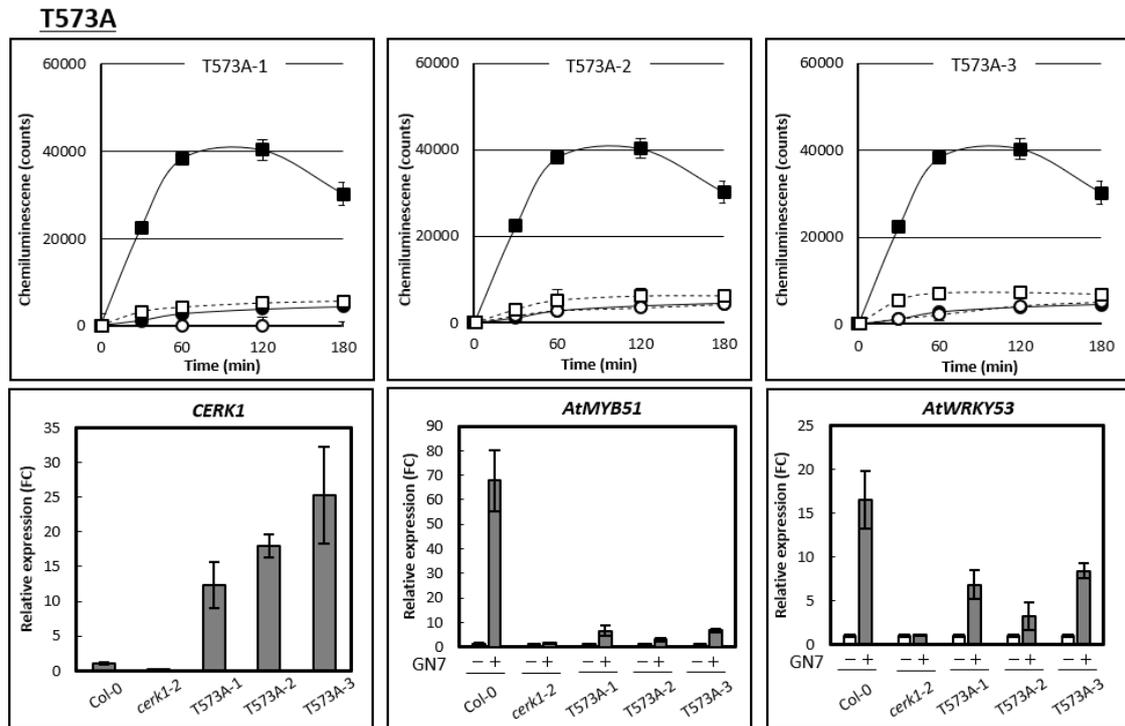


Fig. 1-12 T573A 置換体の防御応答解析と *CERK1* の RNA レベルの発現確認

cerk1-2 変異体に一アミノ酸残基置換 *CERK1(T573A)*を形質転換し、得られた形質転換体 3 ラインに対してキチン 7 量体 (GN7) を処理した時の活性酸素応答 (上段 3 つ) および防御応答 関連遺伝子の発現誘導量 (下段中央および右) を評価した。解析に用いた形質転換体の *CERK1* mRNA の発現レベルを左下に示した。活性酸素応答における実線は野生型 (Col-0) の結果、破線は作出した形質転換体の結果を示す。黒丸および白丸は水処理コントロール、黒四角および白四角はキチンオリゴ糖処理を示した。防御応答関連遺伝子発現誘導解析では、水処理コントロールは白色のバー、キチンオリゴ糖処理は灰色のバーで示した。すべての図におけるエラーバーは標準偏差を示す。

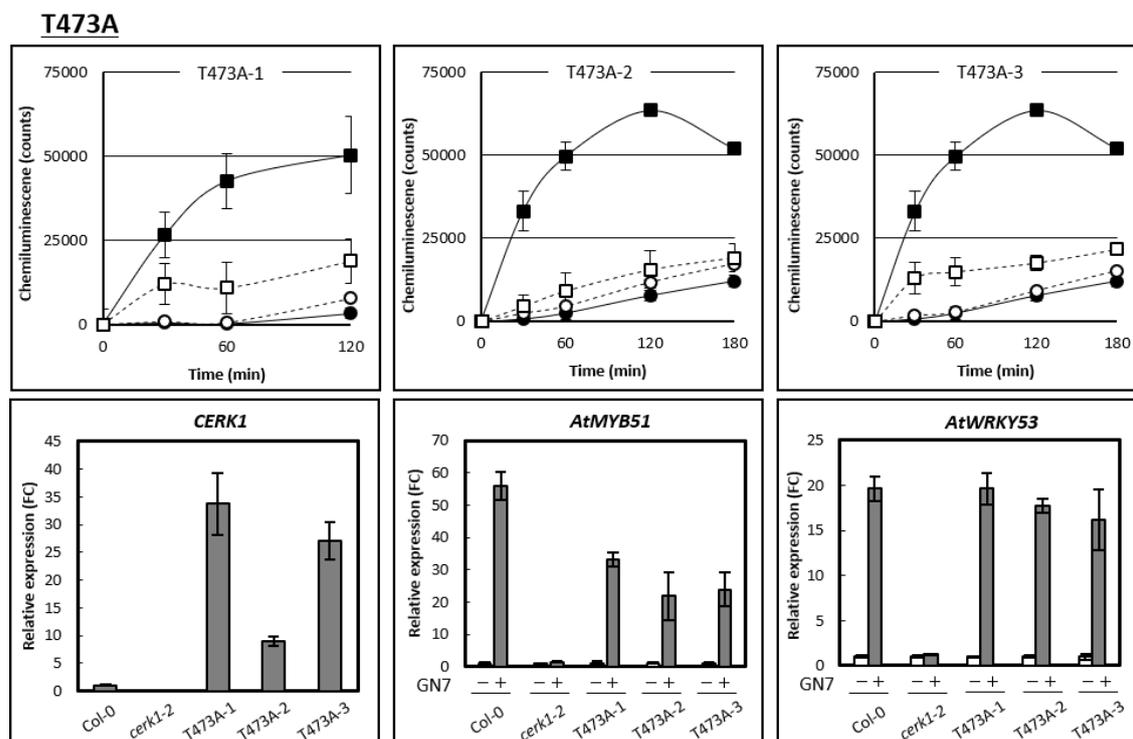


Fig. 1-13 T473A 置換体の防御応答解析と *CERK1* の RNA レベルの発現確認

cerk1-2 変異体に一アミノ酸残基置換 *CERK1(T473A)* を形質転換し、得られた形質転換体 3 ラインに対してキチン 7 量体 (GN7) を処理した時の活性酸素応答 (上段 3 つ) および防御応答関連遺伝子の発現誘導量 (下段中央および右) を評価した。解析に用いた形質転換体の *CERK1* mRNA の発現レベルを左下に示した。活性酸素応答における実線は野生型 (Col-0) の結果、破線は作出した形質転換体の結果を示す。黒丸および白丸は水処理コントロール、黒四角および白四角はキチンオリゴ糖処理を示した。防御応答関連遺伝子発現誘導解析では、水処理コントロールは白色のバー、キチンオリゴ糖処理は灰色のバーで示した。すべての図におけるエラーバーは標準偏差を示す。

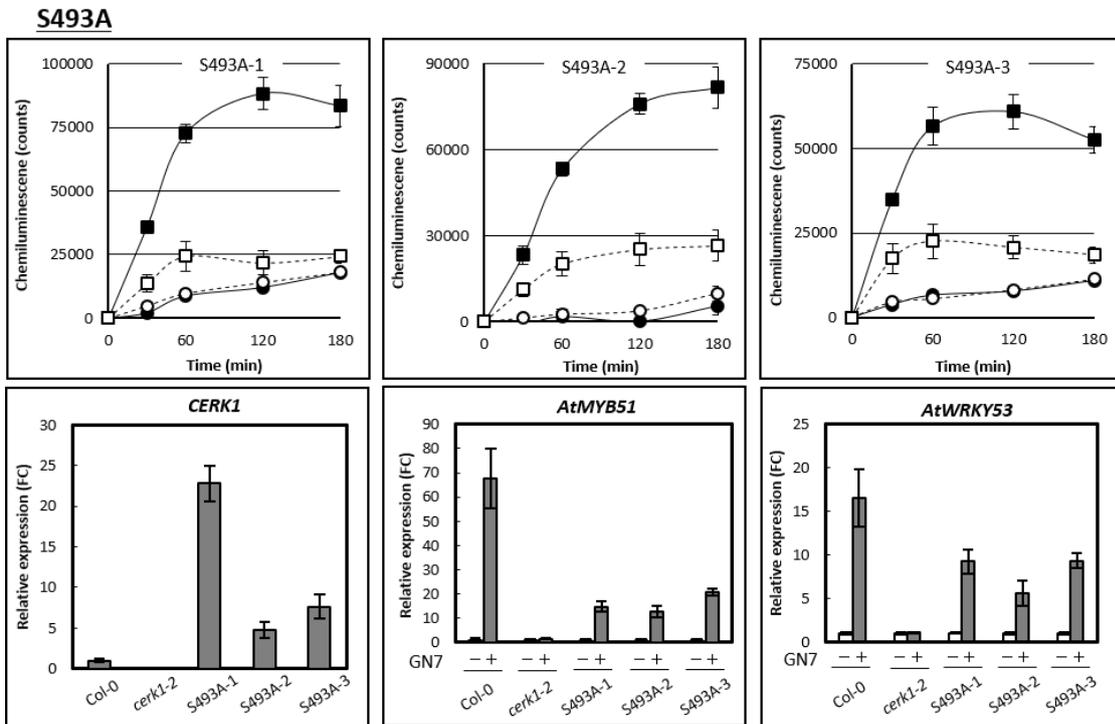
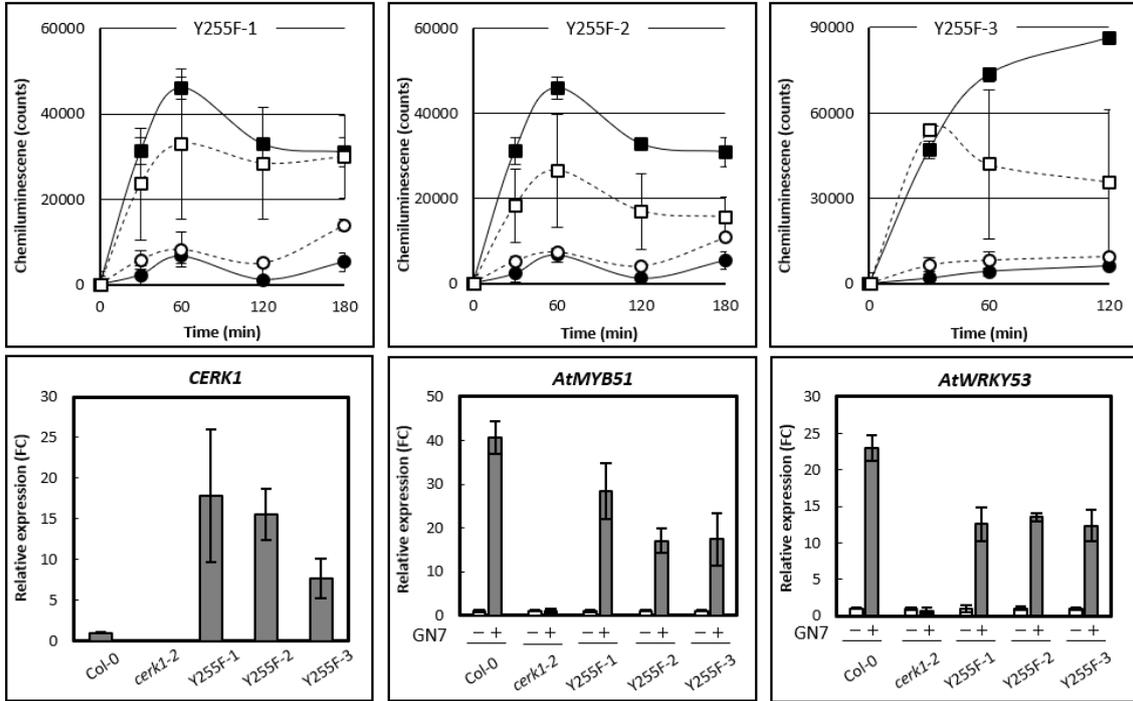


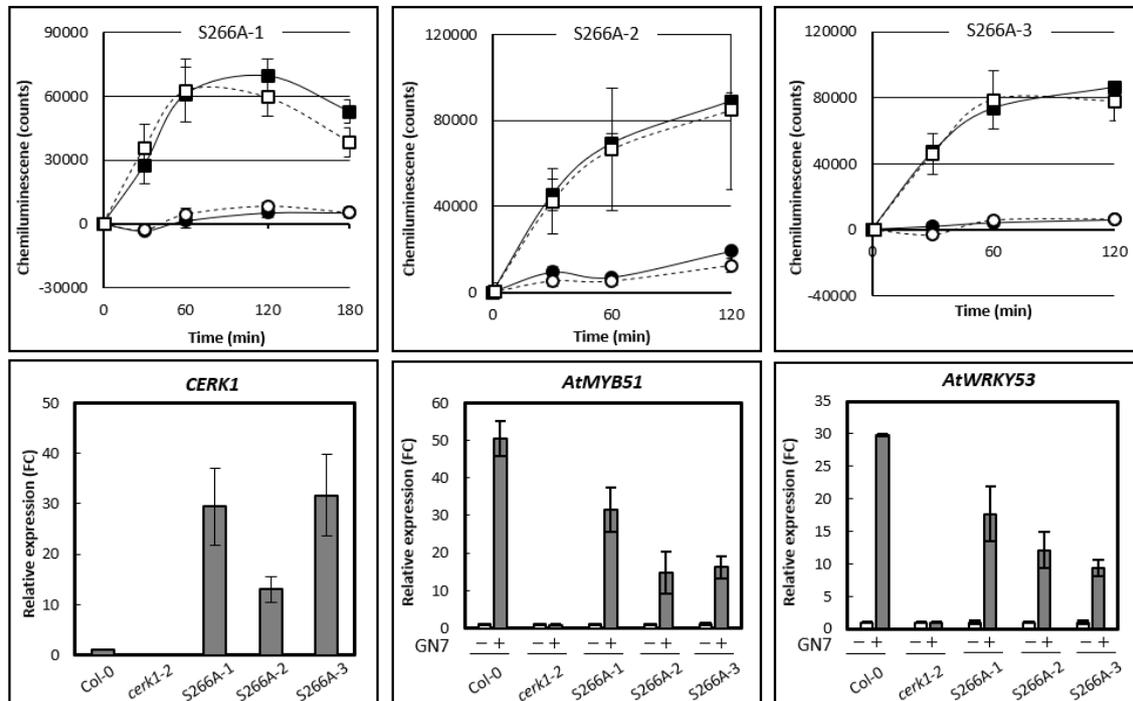
Fig. 1-14 S493A 置換体の防御応答解析と *CERK1* の RNA レベルの発現確認

cerk1-2 変異体に一アミノ酸残基置換 *CERK1(S493A)* を形質転換し、得られた形質転換体 3 ラインに対してキチン 7 量体 (GN7) を処理した時の活性酸素応答 (上段 3 つ) および防御応答関連遺伝子の発現誘導量 (下段中央および右) を評価した。解析に用いた形質転換体の *CERK1* mRNA の発現レベルを左下に示した。活性酸素応答における実線は野生型 (Col-0) の結果、破線は作出した形質転換体の結果を示す。黒丸および白丸は水処理コントロール、黒四角および白四角はキチンオリゴ糖処理を示した。防御応答関連遺伝子発現誘導解析では、水処理コントロールは白色のバー、キチンオリゴ糖処理は灰色のバーで示した。すべての図におけるエラーバーは標準偏差を示す。

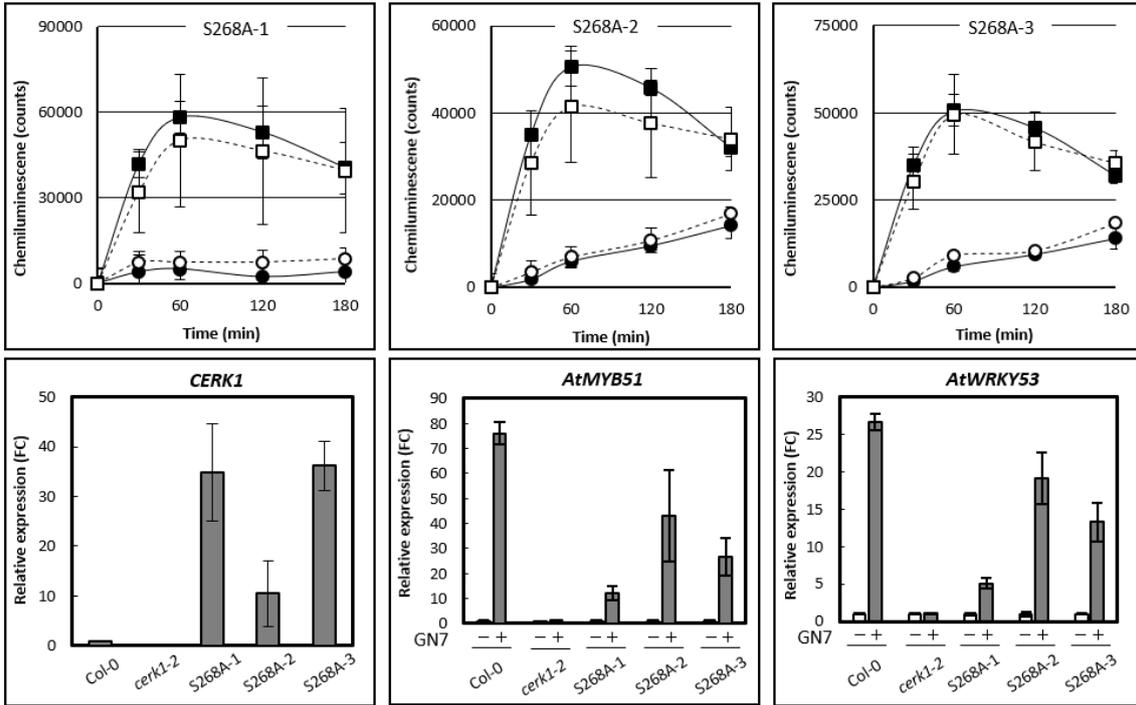
Y255F



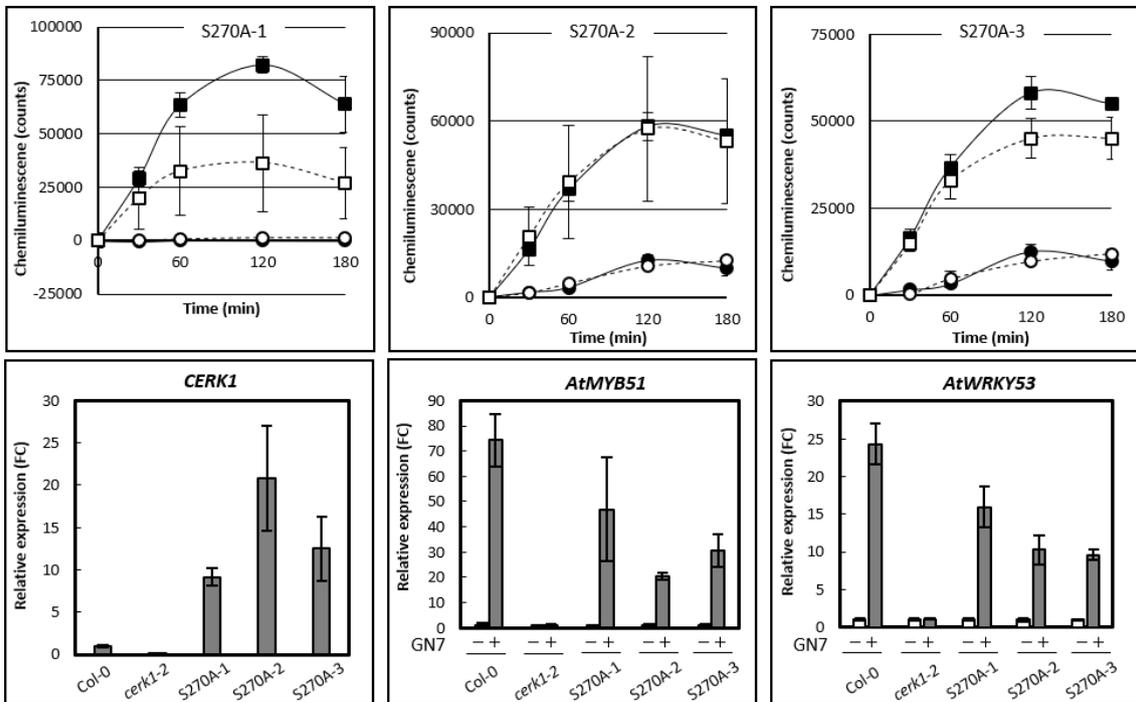
S266A



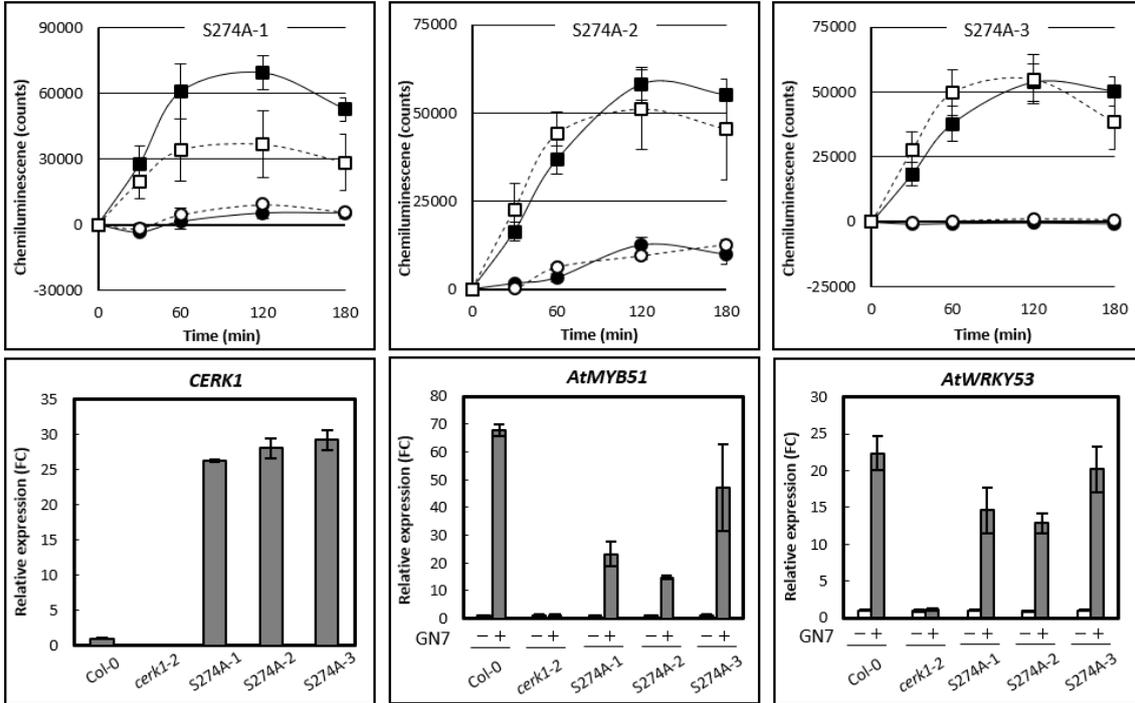
S268A



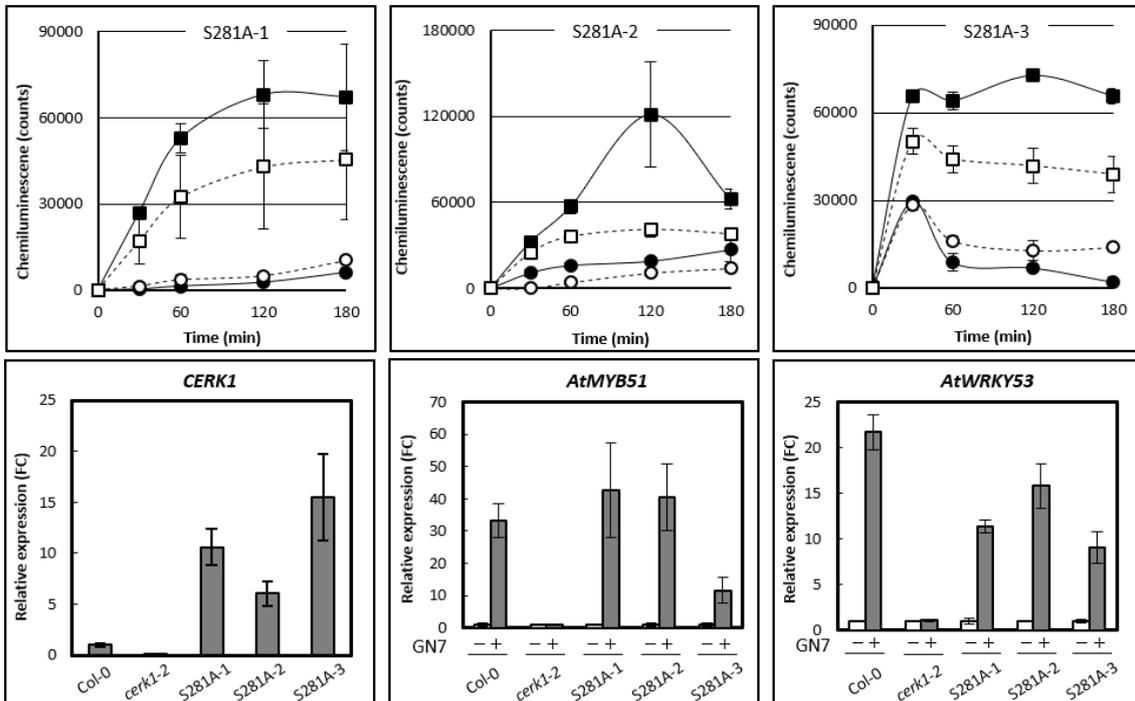
S270A



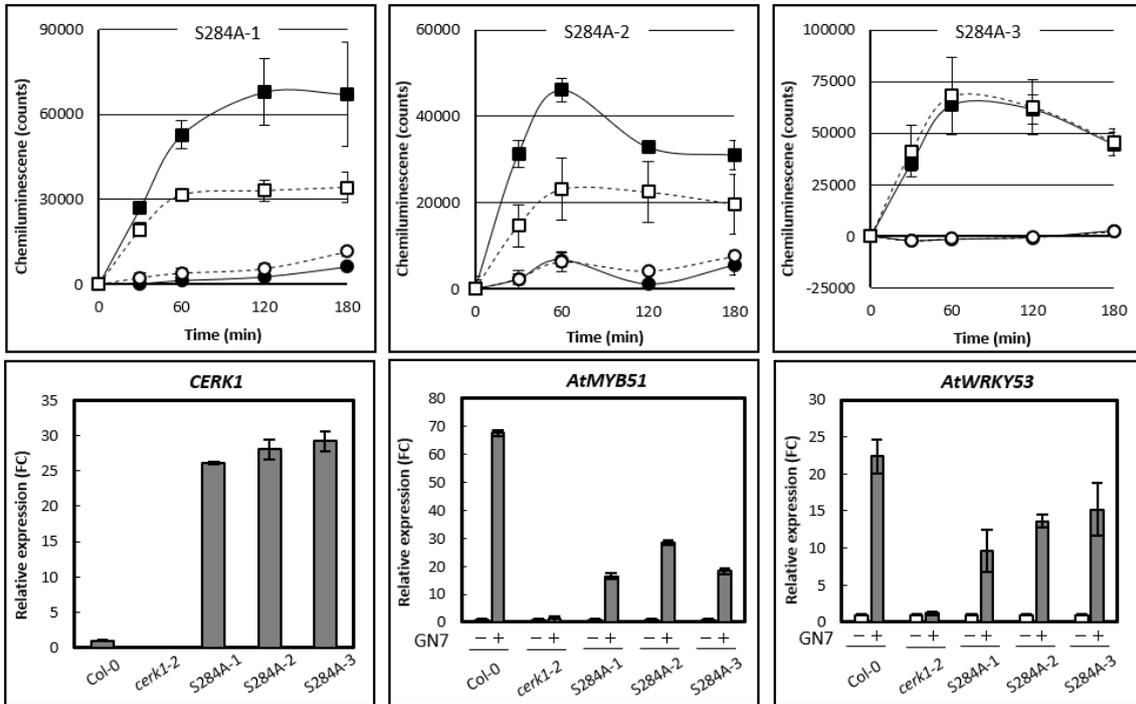
S274A



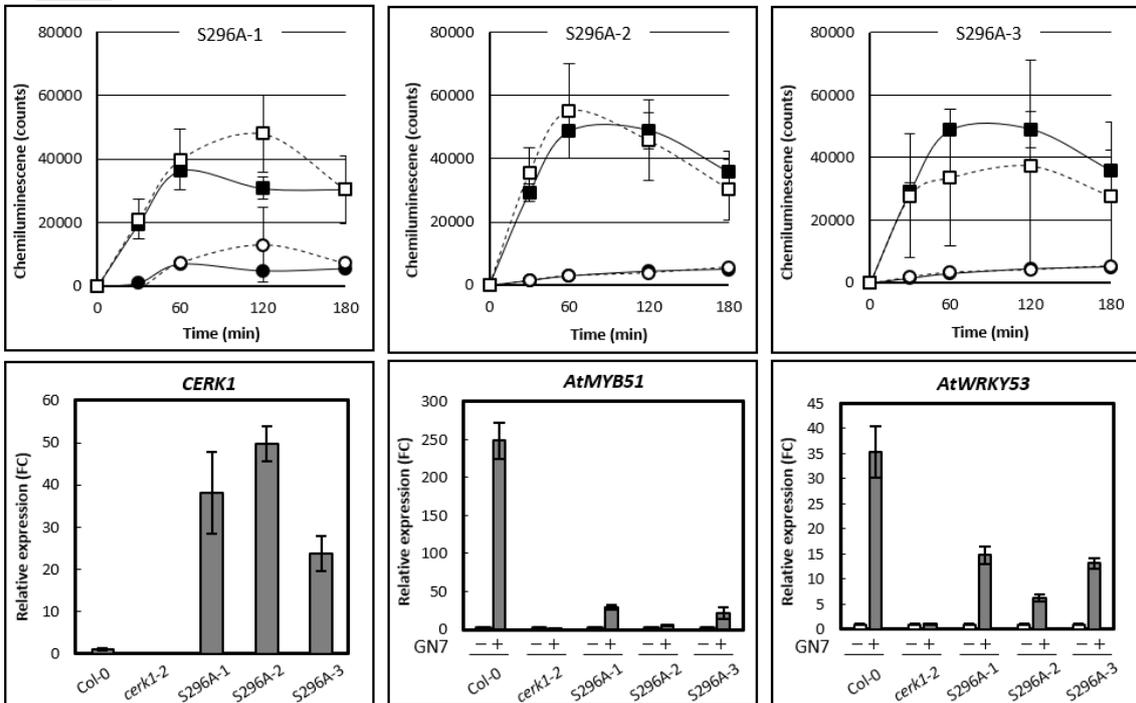
S281A



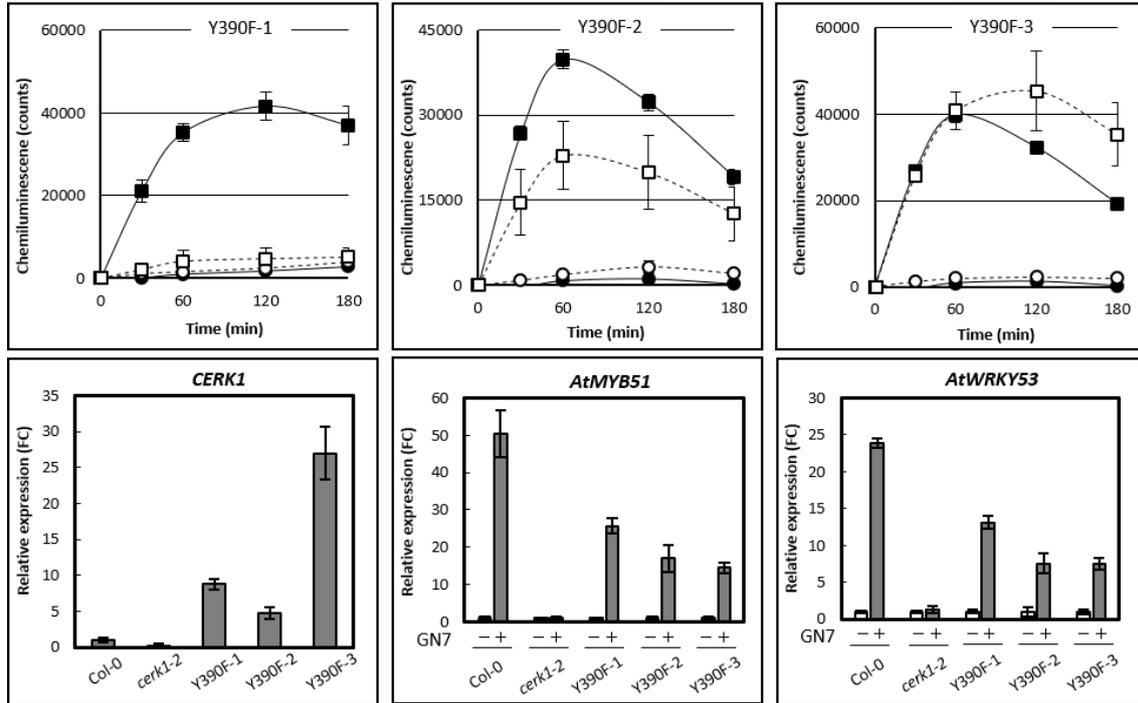
S284A



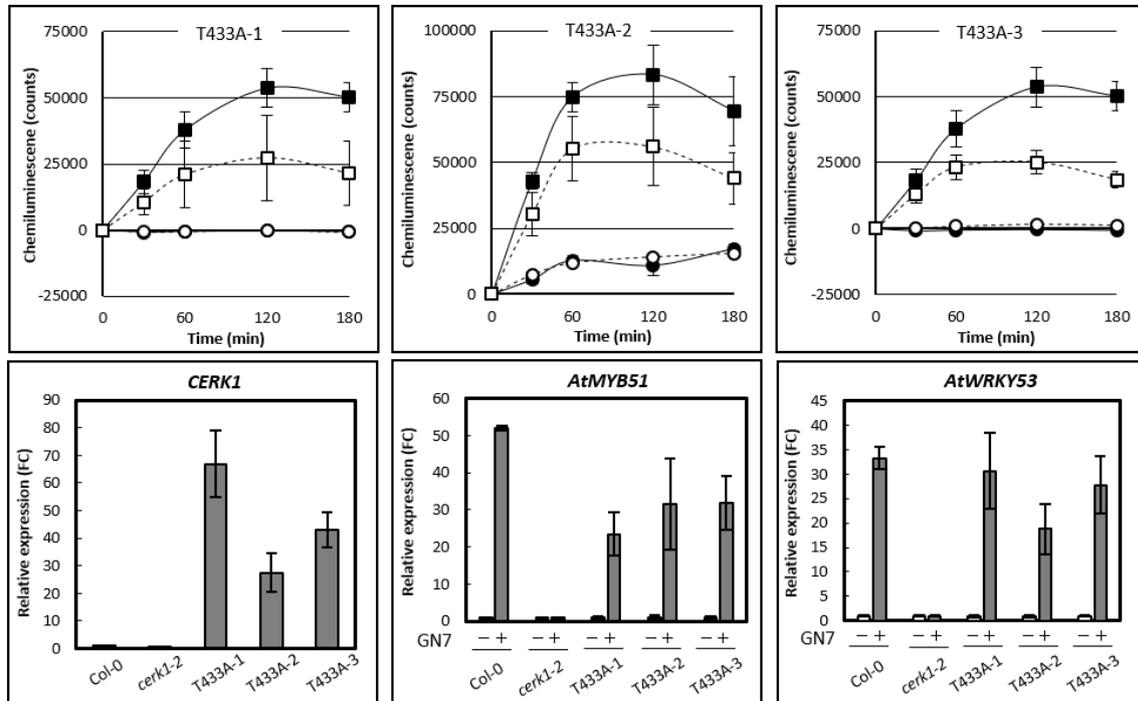
S296A



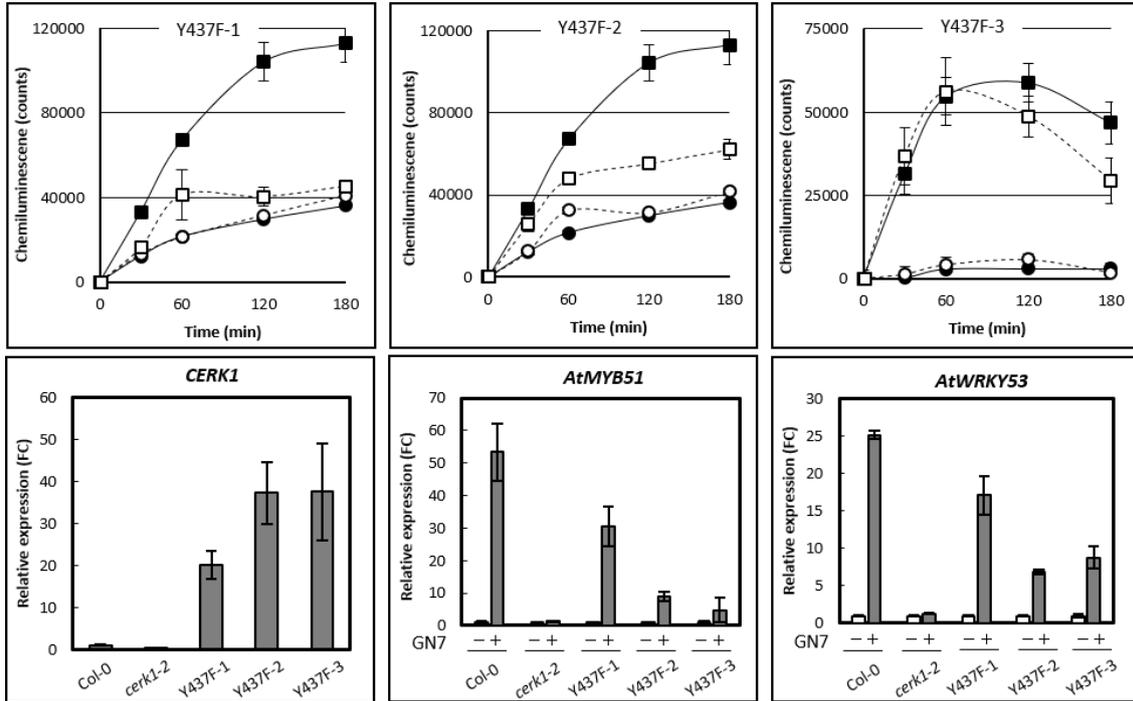
Y390F



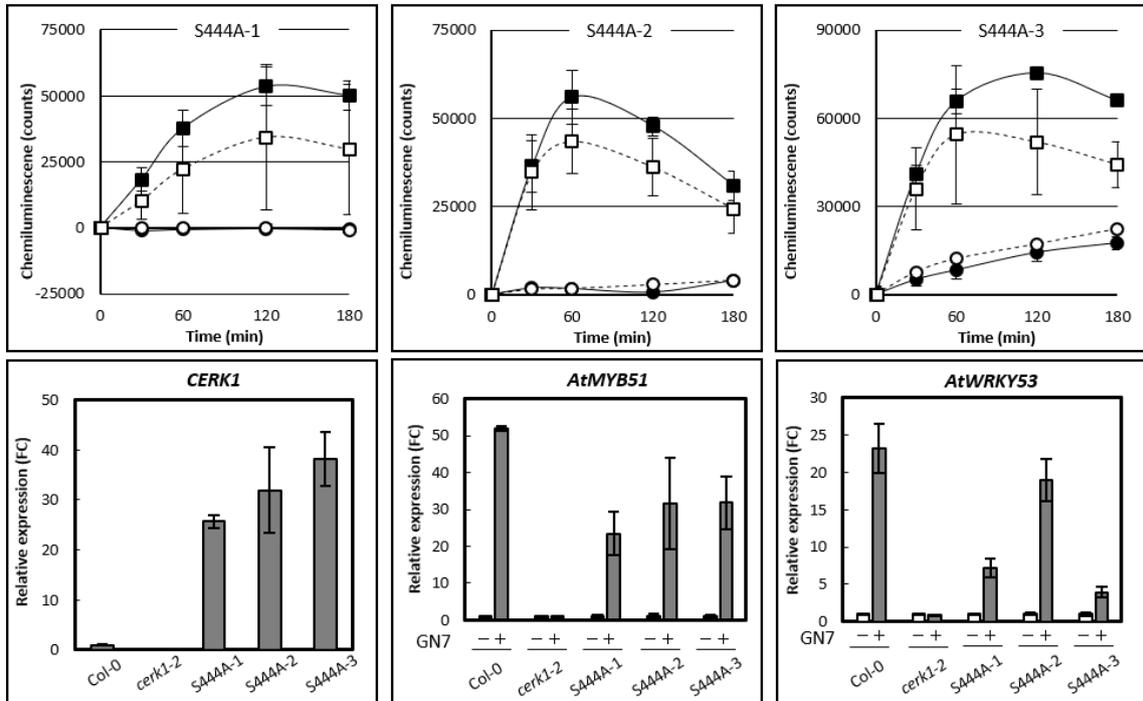
T433A



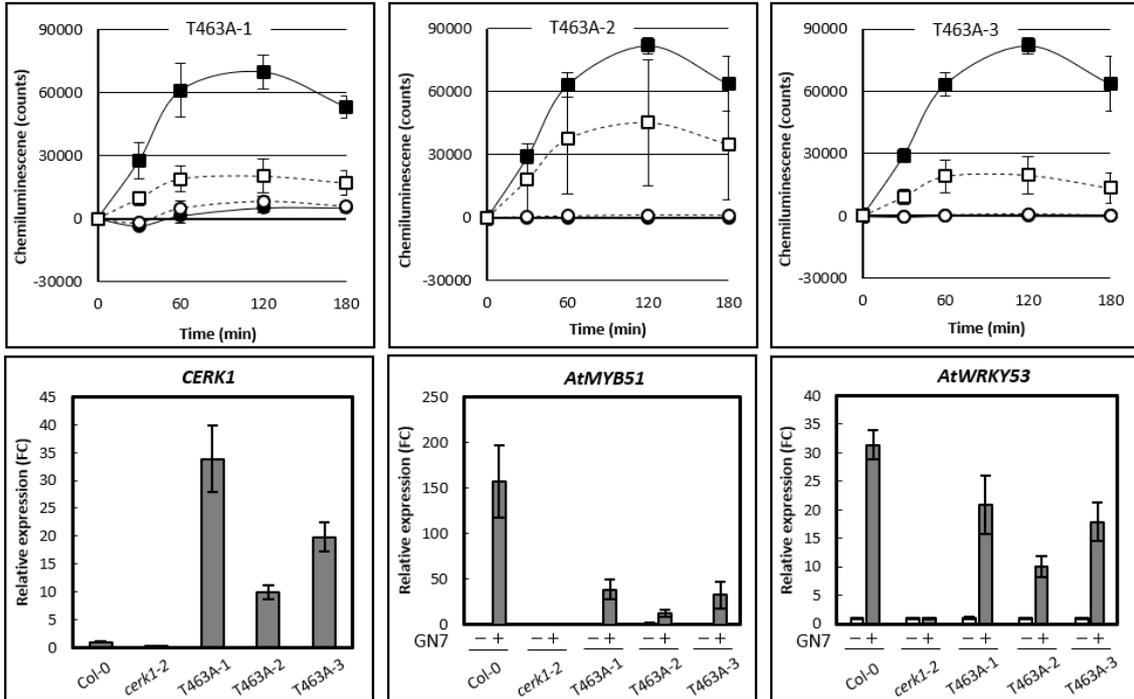
Y437F



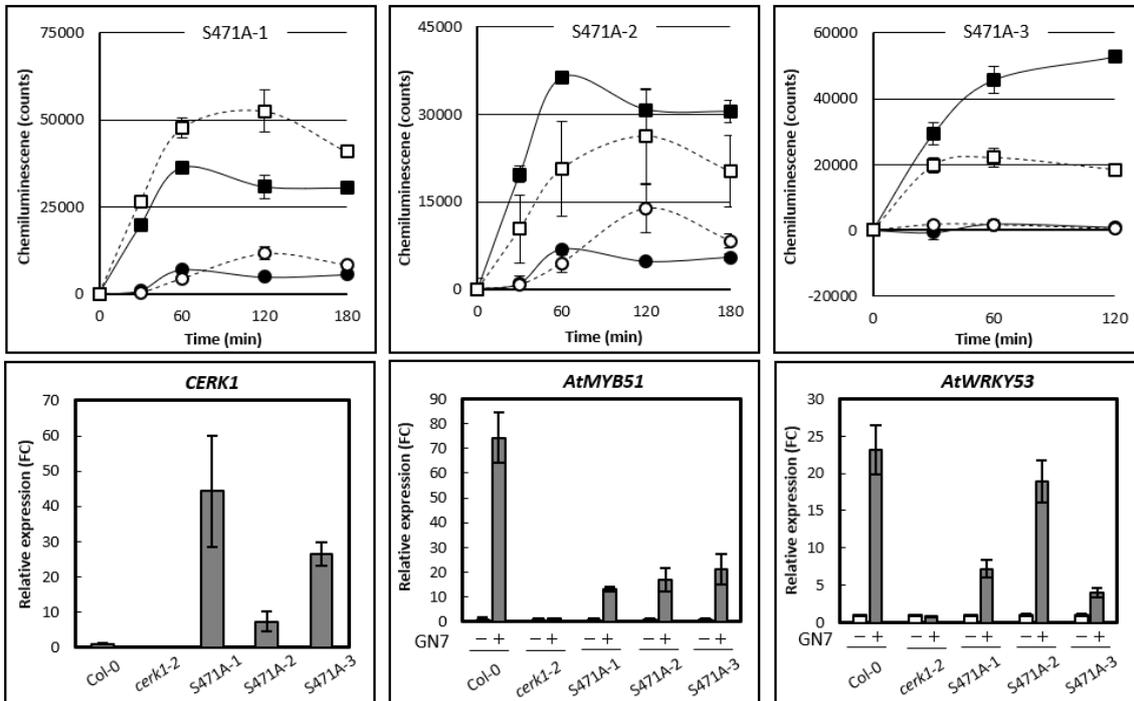
S444A



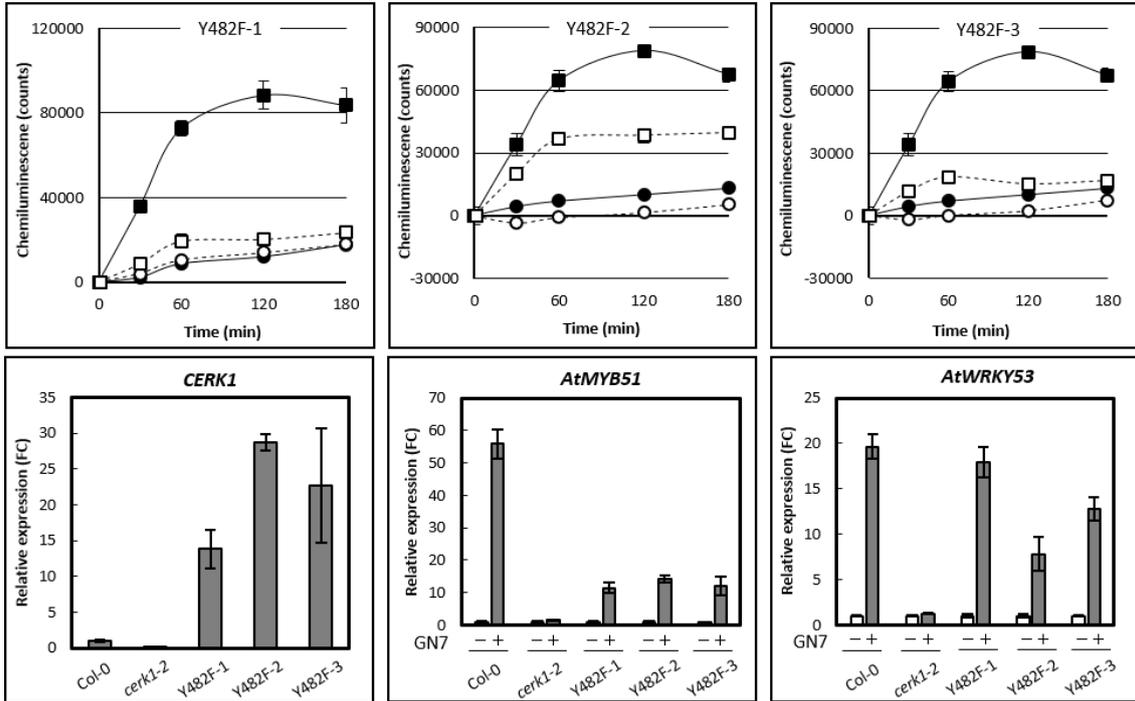
T463A



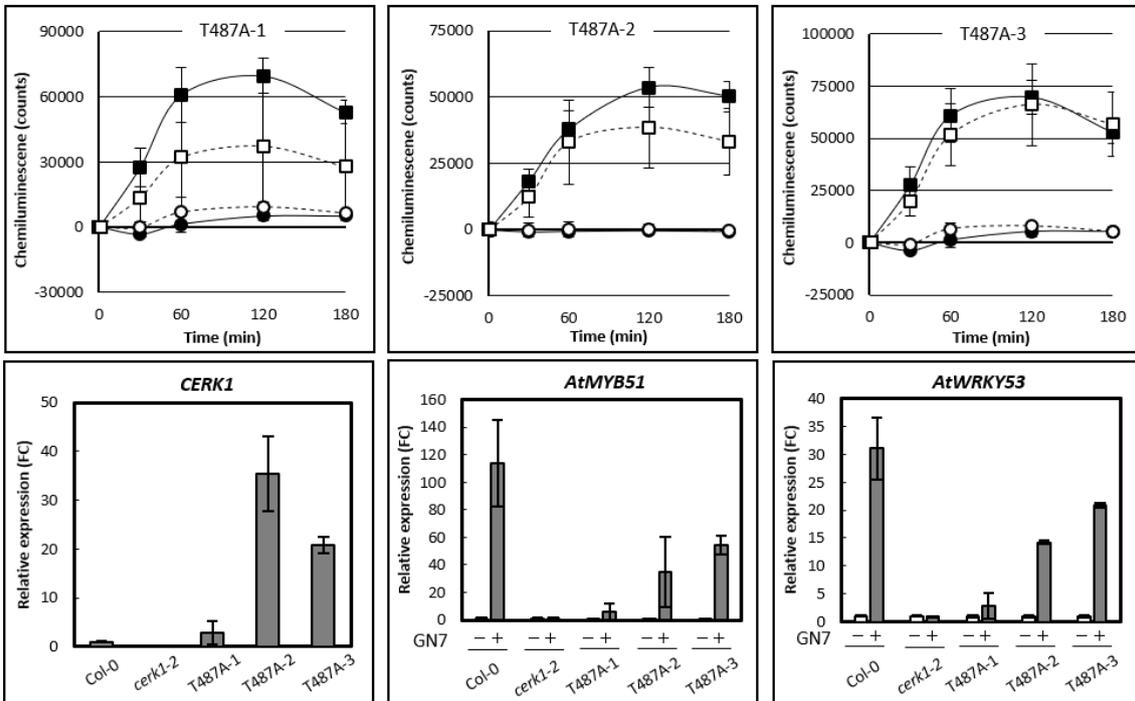
S471A



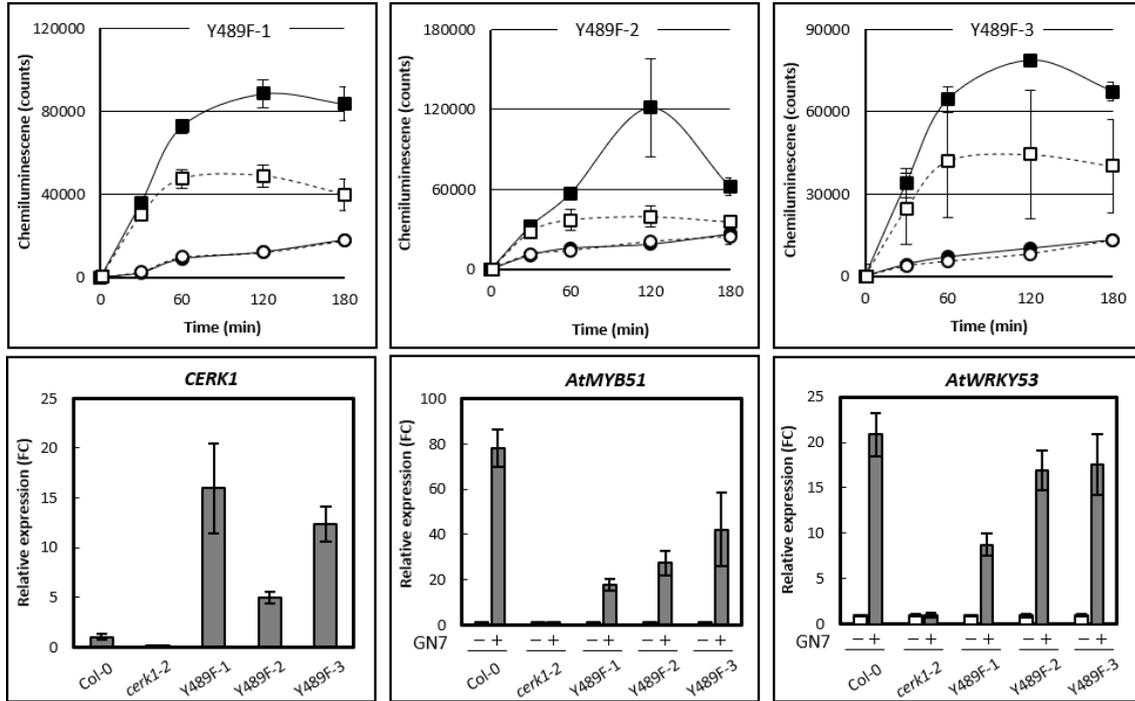
Y482F



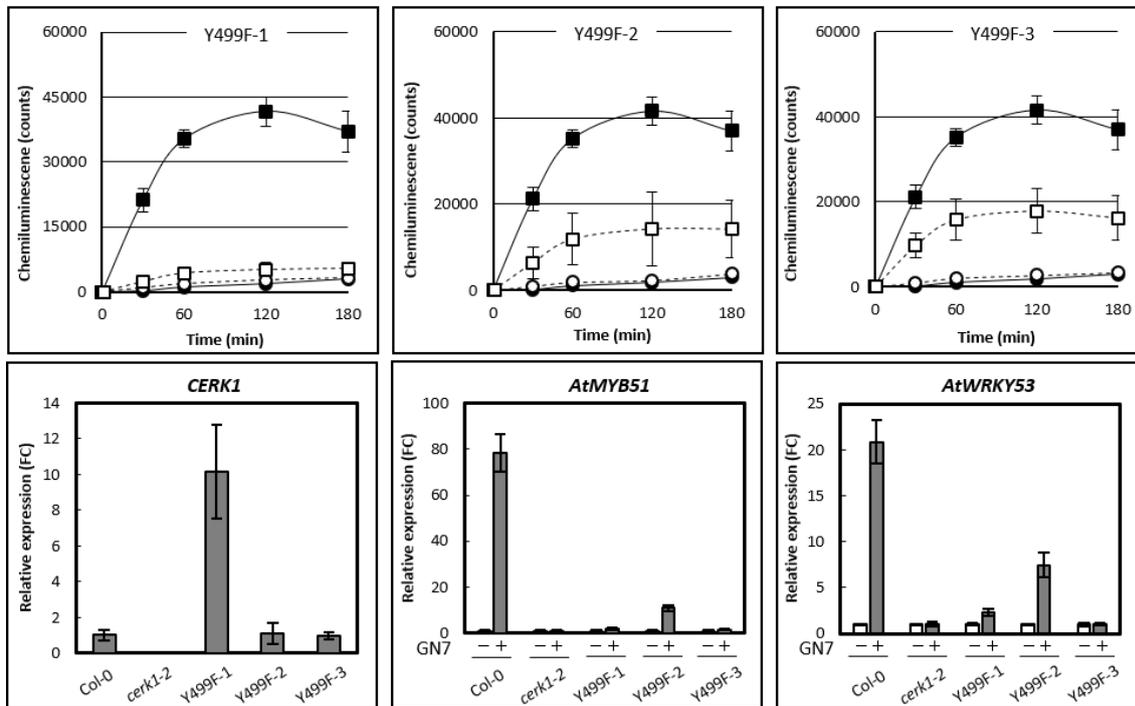
T487A



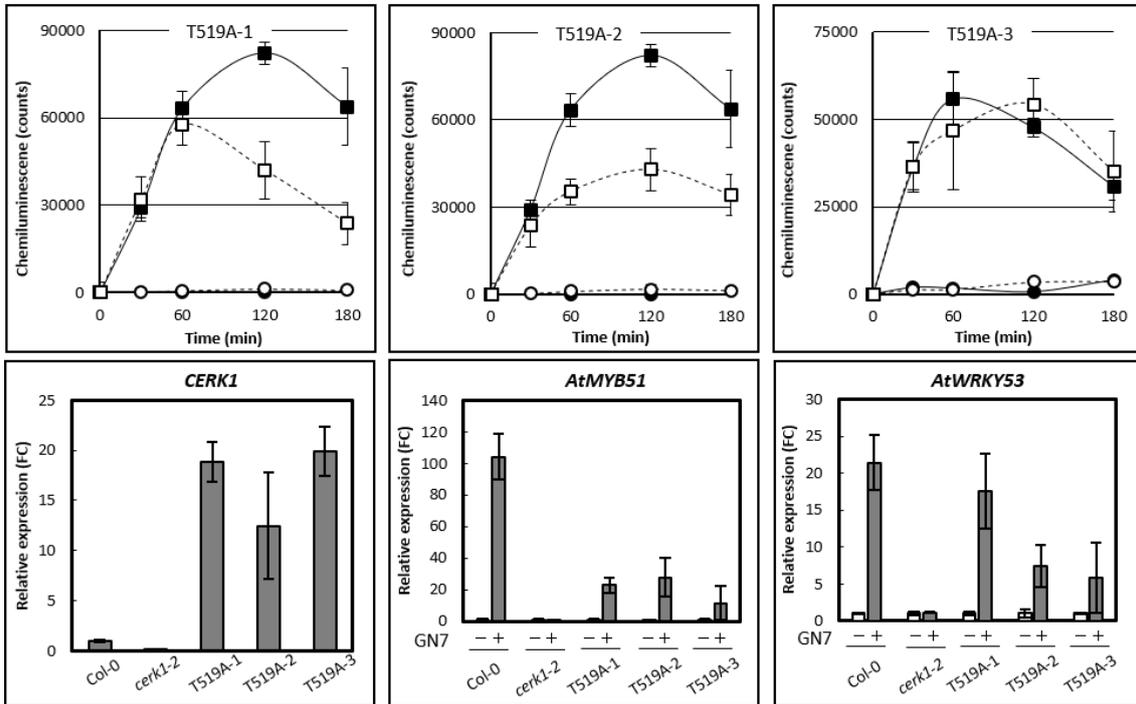
Y489F



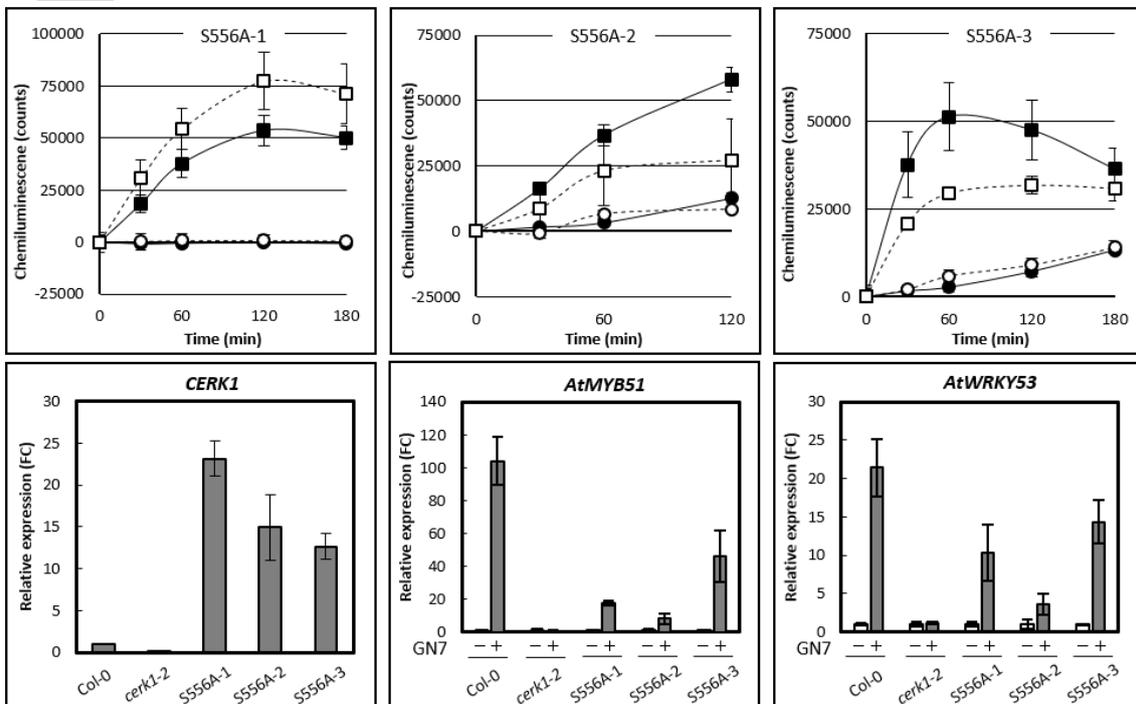
Y499F



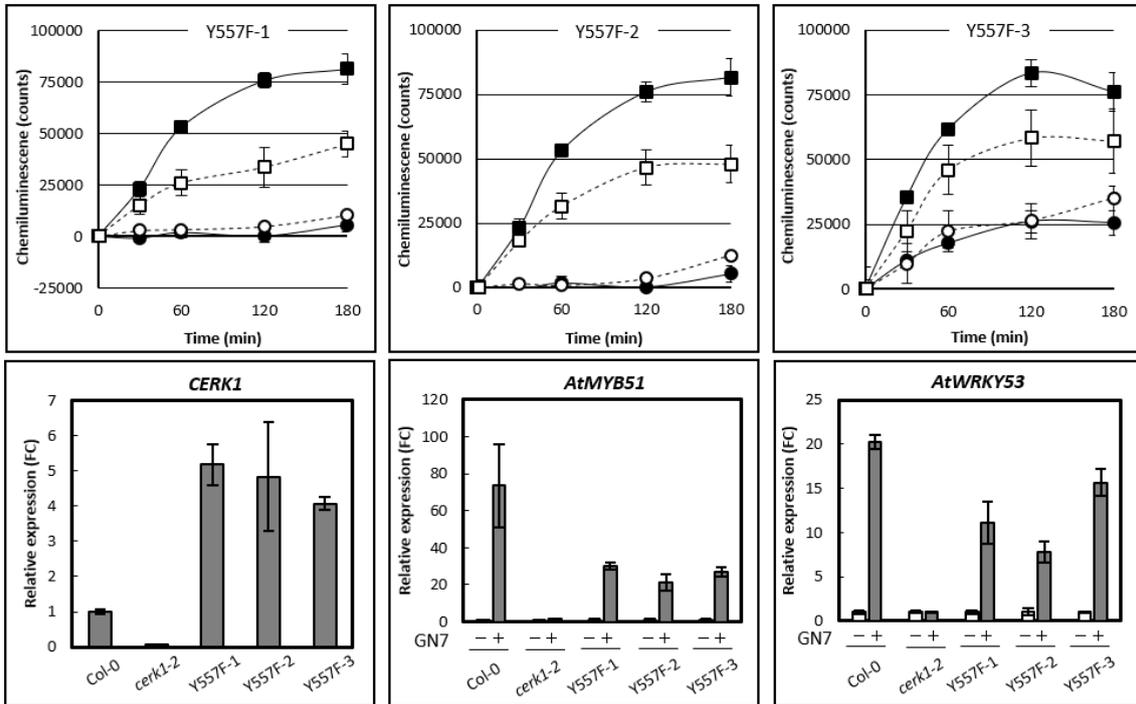
T519A



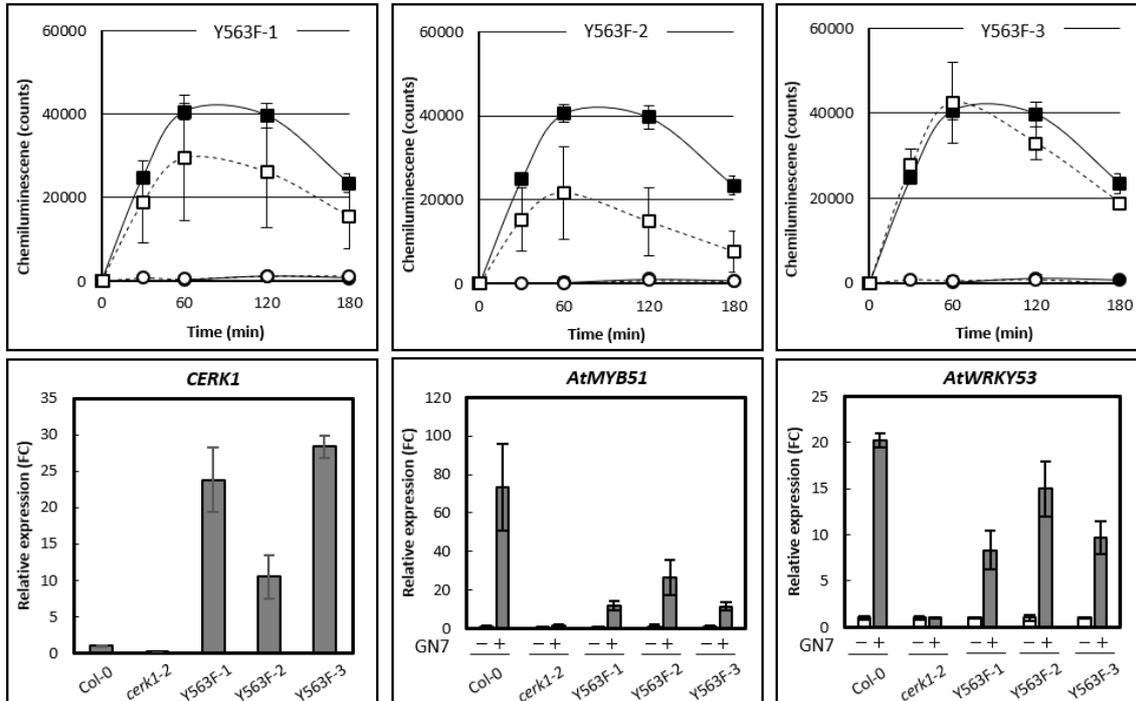
S556A



Y557F



Y563F



S582A

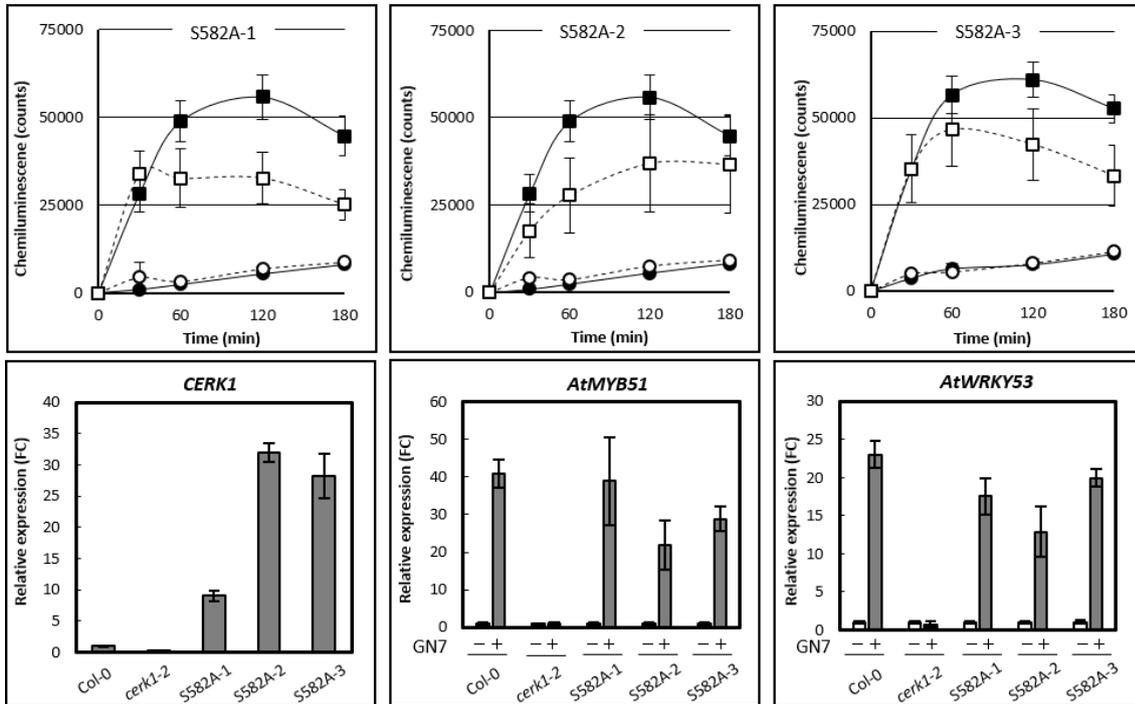


Fig. 1-15 キチン応答への影響がみられなかった一アミノ酸残基置換体の防御応答解析と *CERK1* の RNA レベルの発現確認

cerk1-2 変異体にそれぞれの一アミノ酸残基置換 *CERK1* を形質転換し、得られた形質転換体 3 ラインに対してキチン 7 量体 (GN7) を処理した時の活性酸素応答 (上段 3 つ) および防御応答関連遺伝子の発現誘導量 (下段中央および右) を評価した。解析に用いた形質転換体の *CERK1* mRNA の発現レベルを左下に示した。活性酸素応答における実線は野生型 (Col-0) の結果、破線は作出した形質転換体の結果を示す。黒丸および白丸は水処理コントロール、黒四角および白四角はキチンオリゴ糖処理を示した。防御応答関連遺伝子発現誘導解析では、水処理コントロールは白色のバー、キチンオリゴ糖処理は灰色のバーで示した。すべての図におけるエラーバーは標準偏差を示す。

第4節 考察

CERK1 を介した防御応答の起動には、CERK1 のホモダイマー形成が関わること、また、シロイヌナズナにキチンオリゴ糖を処理すると、CERK1 のキナーゼ活性に依存して CERK1 がリン酸化すること、そのリン酸化と防御応答の誘導が相関することが示されていた (58, 59, 66)。そのため、CERK1 のホモダイマー形成に伴って CERK1 の細胞内ドメインが自己リン酸化し、シグナル伝達系を起動すると考えられた。しかし、CERK1 のホモダイマー形成でどのようにして自己リン酸化が誘導されるかについては明らかにされていなかった。

動物の上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) などの受容体キナーゼでは、受容体のホモ 2 量体形成で細胞内ドメイン同士が、お互いにリン酸化しあうこと (トランス自己リン酸化) によって、シグナル伝達を起動することがわかっている (96-98)。そこで、CERK1 についてもホモダイマー形成をきっかけに、分子間でトランス型の自己リン酸化を行う可能性を考えた。その可能性を検討するために、CERK1 が他の CERK1 分子をリン酸化する能力をもつかを明らかにすることにした。大腸菌発現系を利用して調製した GST-CERK1_{cyt} とキナーゼ活性を持たない Strep-CERK1(D441V)_{cyt} を用いて *in vitro* のキナーゼアッセイを行ったところ、GST-CERK1_{cyt} が Strep-CERK1(D441V)_{cyt} をリン酸化したことから、CERK1 が分子間で自己リン酸化することが示された (Fig. 1-2)。よって、CERK1 のホモダイマー化を介して CERK1 が分子間で自己リン酸化する可能性が示された。

大腸菌発現系でキナーゼ活性を持つ GST-CERK1_{cyt} を発現させると、CERK1 が自己リン酸化することがわかっているが (Fig. 1-1)、これは大腸菌内で GST-CERK1_{cyt} が過剰に発現したことで、GST-CERK1_{cyt} の 2 量体形成が促され、分子間で自己リン酸化が誘発したためではないかと推測される。また、ベンサミアナタバコ一過的発現系で活性型の CERK1 を発現させると、CERK1 がリン酸化することもわかっているが、これも細胞膜上で CERK1 が過剰に蓄積したことによって CERK1 のホモダイマー形成が促され、自己リン酸化が誘発されたためではないかと考えている (67)。ベンサミアナタバコ一過的発現系では、CERK1 の一過性発現・自己リン酸化に伴って防御応答様の細胞死も観察されるが、これはリン酸化した CERK1 によってシグナル伝達系が過剰に活性化されたことで、誘導された応答であると考えられる (67, 95)。

大腸菌発現系を利用して調製した CERK1 細胞内ドメインタンパク質と、ベンサミアナタバコ過剰発現系を利用して調製した CERK1 の両者を用いて、トリプシン分解と LC-MS/MS 解析を行ったところ、*in vitro* 自己リン酸化部位を 41 か所 (Ser; 21, Thr; 10, Tyr; 10)、*in vivo* リン酸化部位を 15 か所 (Ser; 11, Thr; 4)、合計で 42 か所のリン酸化部位を同定することができた (Fig.1-5)。*in vivo* 自己リン酸化部位の数が、*in vitro* 自己リン酸化部位よりも少なかった理由の一つとしては、ベンサミアナタバコ過剰発現系を利用して調製したリン酸化 CERK1 の量が足りず質量分析の検出感度に届かなかったことがあると考えられる。事実、ベンサミアナタバコから調製した CERK1 の LC-MS/MS 分析では *in vivo* チロシンリン酸化部位が同定されなかったが、そのサンプルを SDS-PAGE 後ウエスタンブロッティングを行い、抗ホスホチロシン抗体で検出したところ、チロシン残基のリン酸化が確認されており (Fig. 1-6)、上記の推論が支持される。一方、CERK1 は、自己リン酸化を介してシグナル伝達系を起動した後、プロテアソーム系や液胞への輸送を介して分解されることで、下流のシグナル伝達系を過剰に活性化しないように制御されることが示唆されている (99)。そのため、ベンサミアナタバコで過剰に発現された CERK1 が完全にリン酸化したとしてもこうした分子種の分解がとくに進行するため、結果として不完全なリン酸化の CERK1 が主として調製され、*in vivo* リン酸化部位が少なかった可能性も考えられる。また、キナーゼドメインのみでの *in vitro* リン酸化と、全長で膜に固定された CERK1 の自己リン酸化に本質的な違いがあるという可能性も否定できないため、*in vitro* と *in vivo* の実験で得られた差異の原因については慎重な検討が必要と考えられる。

自己リン酸化部位の生物学的機能解析では、*in vivo* で同定された CERK1 の自己リン酸化部位だけでなく、*in vitro* で調製した CERK1 細胞内ドメインタンパク質のみで同定された自己リン酸化部位についても解析を行った。その理由は、今回の実験で *in vivo* リン酸化部位として同定されたものの多くが、*in vitro* リン酸化実験でも同定されており (Fig. 1-5)、また、上記で述べた理由から *in vitro* リン酸化部位の中には、今後 *in vivo* でのリン酸化が確認される可能性があるものが多く存在すると考えられたためである。実際に、生物学的機能解析の結果からシグナル伝達に関わることが示唆された Y428、T479、S493、T573 はこれまでの実験では *in vivo* 自己リン酸化部位として同定されていない (Fig. 1-5)。この点に関しては、今後、これら 4 か所の自己リン酸化部位に特異的な抗体を作製し、ウエスタンブロッティング等を行うことで、*in vivo* のリン酸化部位として検出できるのではないかと期待している。

35S プロモーター (過剰発現プロモーター) 制御下で野生型 CERK1 を *cerk1-2* 変異体に発現させた *CERK1/cerk1-2* 相補体に対してキチンオリゴ糖を処理したところ、活性酸素応答が野生型 (Col-0) とほぼ同程度に回復していた (Fig. 1-7)。一方、*CERK1/cerk1-2* 相補体と野生型 Col-0 で CERK1 タンパク質の発現量を比較すると、*CERK1/cerk1-2* 相補体の方で CERK1 タンパク質発現量が高かった (Fig. 1-8)。そのため、この実験条件下では Col-0 よりも高い CERK1 タンパク質の発現量を示しても、防御応答が過剰に誘導されることはないと考えられた。

同定した自己リン酸化部位のうち 28 か所の自己リン酸化部位に関して、アラニン残基 (A) 置換 (セリンあるいはスレオニンリン酸化部位) あるいはフェニルアラニン残基 (F) 置換 (チロシンリン酸化部位) した CERK1 を *cerk1-2* 変異体に導入し形質転換体を作成した。それら形質転換体に対して、キチンオリゴ糖を処理した時の防御応答を評価したところ、T479、T473、Y428、S493、T573 を一アミノ酸残基置換した CERK1 を持つ形質転換体では、活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導の復帰が消失もしくはその復帰がわずかであることが確認された (Fig. 1-9, 10, 12~14)。このことから、これら 5 か所の CERK1 自己リン酸化部位がシグナル伝達に関与する可能性が示された。ほかの自己リン酸化部位をアラニン残基置換もしくはフェニルアラニン残基置換した形質転換体でも、キチンオリゴ糖で誘導される防御応答がわずかに復帰するラインがみられたが、実験に使用した独立した 3 ラインの結果が一致しないことや、指標にした防御応答の結果の誤差範囲 (エラーバー) が大きくかけ離れていることなどから (Fig. 1-15)、野生型 (Col-0) のキチン応答と差がみられた上記の 5 か所のアミノ酸残基が CERK1 のシグナル伝達に関わる有力なリン酸化部位であると考えた。一方、これらのアミノ酸残基の置換自身が立体構造に影響を及ぼし、CERK1 の機能が阻害されたことでみられた表現型である可能性は理論的には否定できないが、セリン・スレオニン残基とアラニン残基およびチロシン残基とフェニルアラニン残基の構造的な違いがごくわずかであることを考えると、こうした可能性はそれほど高くないと考えられる。

CERK1(T479A)/cerk1-2 形質転換体、*CERK1(Y428F)/cerk1-2* 形質転換体、*CERK1(T573A)/cerk1-2* 形質転換体では、膜画分を調製し CERK1 タンパク質の発現量を確認している (Fig. 1-11)。その結果、*CERK1(T479A)/cerk1-2* 形質転換体、*CERK1(T479A)/cerk1-2* 形質転換体では、Col-0 よりも高い変異型 CERK1 タンパク質の発現が確認された。変異型 CERK1 タンパク質が十分あるにもかかわらず、キチン応答の復帰が消失することから、T479、Y428 の置換による CERK1 の質的な変化によっ

てキチン応答に影響がみられたと考えられる。一方、*CERK1(T573A)/cerk1-2*形質転換体では Col-0 と比較して、*CERK1* のタンパク質発現量自身が大幅に低下していることが示された。そのため、*CERK1(T573A)/cerk1-2*形質転換体で確認されたキチン応答のわずかな復帰が、タンパク質量の低下に依存した結果である可能性を否定できない。なぜ、*CERK1(T573A)/cerk1-2* 形質転換体で *CERK1* タンパク質の発現量が低下したかは不明であるが、T573 のアラニン残基置換で *CERK1* タンパク質の構造が不安定化し、細胞内のタンパク質品質管理機構によって分解されやすくなり、*CERK1(T573A)*タンパク質の発現が低下した可能性も考えられる。

今回の実験で明らかになった *CERK1* の *in vivo/in vitro* リン酸化部位を合計すると、42 か所の自己リン酸化部位が同定されたが、実際に形質転換体を用いた解析を終了したのは 28 か所であった。残りのリン酸化部位に関して解析が行えなかった理由の一つに、これらの形質転換体に導入された変異 *CERK1* の配列を確認したところ、意図した変異導入部位とは異なるアミノ酸残基に変異が起こっていることが確認されたためである。形質転換体は、アグロバクテリウム法を用いて一アミノ酸置換 *CERK1* を *cerk1-2* 変異体に形質転換して作出しており、アグロバクテリウムの培養中に *CERK1* コンストラクトに意図しない変異が入ったのではないかと考えている。今回、キチン応答に影響がみられた一アミノ酸残基置換 *CERK1/cerk1-2* 形質転換体では、植物体から導入された *CERK1* を増幅してシーケンス解析を行っており、正しい一アミノ酸残基置換 *CERK1* コンストラクトが導入されていることを確認している。

残りのリン酸化部位で解析が行えなかったもう一つの理由は、*CERK1* の cDNA に PCR で変異を導入することができなかったためである。目的とする塩基置換が導入できなかった理由の詳細はわからないが、PCR 後の産物を電気泳動すると、目的の *CERK1* の DNA 断片は増幅されていたため、ポリメラーゼの性質上、設計したような DNA 配列を PCR で増幅することが困難だったのかもしれない。

本研究では、*CERK1* を介したシグナル伝達に関わる自己リン酸化部位を 5 か所同定したが、それぞれの自己リン酸化部位が、どのようにシグナル伝達に関与しているのかを解明することが次の目標である。これら 5 か所のリン酸化部位の機能に関して、これまでに報告されている受容体様キナーゼ (RLK) のリン酸化部位と比較して下記で考察した。

CERK1(T479A)/cerk1-2 形質転換体では、キチンオリゴ糖で誘導される活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導の復帰がいずれも消失したことから (Fig. 1-

9)、CERK1の479番目のスレオニン残基がCERK1のシグナル伝達に不可欠な役割を果たすことが示唆された。T479はキナーゼの活性制御に関わるActivation Segment上に位置し、そのスレオニン残基はRLKで広く保存されていることがわかっている(Fig. 1-16)。BAK1および根粒菌共生応答に関わるミヤコグサのNFR1では、CERK1のT479に対応するスレオニン残基がリン酸化部位として同定されている(73, 77)。また、BAK1およびNFR1でT479に対応するスレオニン残基をアラニン残基に置換したBAK1およびNFR1を、それぞれの欠損変異体に形質転換した植物体では、BAK1、NFR1を介した防御・共生応答の復帰が消失することがわかっている(73, 77)。また、大腸菌発現タンパク質を用いた解析からそのスレオニン残基をアラニン残基置換したBAK1およびNFR1で、キナーゼの活性自身も消失することがわかっており、これらのスレオニン残基が、RLKに共通してキナーゼ活性の制御に関わることが示唆されている(73, 77)。そのため、CERK1のT479についても同様にキナーゼの活性制御に関わる可能性が考えられる。

CERK1(T473A)/cerk1-2 形質転換体は、キチンオリゴ糖で誘導される活性酸素応答には顕著な影響がみられたものの、防御応答関連遺伝子の1つである*AtWRKY53*の発現誘導には大きな影響は見られなかった(Fig. 1-13)。CERK1の下流のシグナル伝達系は、活性酸素生成に関わる経路とMAPKカスケードの活性化に関わる経路に大別される(49, 50, 67)。今回、防御応答関連遺伝子として用いた*AtMYB51*と*AtWRKY53*は、MAPKカスケードの下流にあることがわかっている遺伝子である(100, 101)。そのため、T473は活性酸素応答の制御には関わるものの、MAPKカスケードを介したシグナル伝達系には関わらない可能性がある。ただし、*AtMYB51* 遺伝子の発現誘導には影響がみられているため、なぜ二つの遺伝子間でT473変異の影響が異なるか、その詳細は不明である。今後、CERK1下流のシグナル伝達系とこれら遺伝子の発現制御機構に関する理解が進むことで、上記のような違いの理由が明らかになるかもしれない。一方、T473はキナーゼの活性制御に関わるActivation Segment中の保存性の低い領域にあり(Fig. 1-16)、そのスレオニン残基の保存性を他のRLKと比較することは難しいが、BAK1およびNFR1のホモログであるタルウマゴヤシのLYK3では、T473と類似する位置のスレオニン残基をアラニン残基置換するとキナーゼ活性が低下することから(73, 102)、T473もキナーゼの活性制御に関わる可能性が考えられる。

CERK1(Y428F)/cerk1-2 形質転換体では、キチンオリゴ糖で誘導される活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導の復帰が消失したことから(Fig. 1-10)、

CERK1 の 428 番目のチロシン残基が CERK1 のシグナル伝達に不可欠な役割を果たすことが示唆された。CERK1 の Y428 と対応するチロシン残基は RLK で広く保存されることがわかっており (Fig. 1-16)、バクテリアの翻訳伸長因子である EF-Tu の受容体である EFR では、そのチロシン残基 (Y836) が *in vivo* リン酸化部位として同定されていることもわかっている (91)。EFR のこのチロシン残基を置換した EFR(Y836F) 変異体では、EFR を介したシグナル伝達の機能が完全に消失することが示されているものの、キナーゼの活性には変化が見られないこともわかっているため、Y836 はキナーゼの活性化に関与しないことが示唆されている (91)。そのため、CERK1 の Y428 もキナーゼの活性制御とは別の面でシグナル伝達に関わっている可能性が考えられた。一方、CERK1 の細胞内ドメインの分子モデル上で Y428 の位置を確認すると、Y428 はキナーゼの活性制御に関わる α C ヘリックスの近傍に位置していることが確認でき、Y428 のリン酸化で α C ヘリックスと相互作用するなど、キナーゼの活性制御に関与する可能性も考えられた (Fig. 1-17) (103)。そこで、第 2 章の CERK1 の Y428 の生化学的機能解析では、Y428 が CERK1 のキナーゼの活性制御に関わる可能性を考慮して解析を行った。

CERK1(S493A)/cerk1-2 形質転換体および *CERK1(T573A)/cerk1-2* 形質転換体では、キチンオリゴ糖で誘導される活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導がわずかに復帰したことから (Fig. 1-12, 14)、CERK1 の 493 番目のセリン残基および 573 番目のスレオニン残基は CERK1 のシグナル伝達に関わることが示唆された。CERK1 の S493 および T573 は、代表的な多くの RLK において高い割合で保存されているアミノ酸残基であるが、これまでにリン酸化部位として同定されたことはなく、既往の情報からは機能が想定できないアミノ酸残基である (Fig. 1-16)。そのため、CERK1 に特徴的なリン酸化部位の可能性があり、CERK1 を介したシグナル伝達系の制御の特異性を決める重要なリン酸化部位の可能性があるのでないかと期待している。

また、*in vivo* リン酸化部位として同定されたものの、*in vitro* リン酸化部位として同定されていない T597 については、いまだ解析を行っていない。このリン酸化部位については今後同様の解析を行う予定である。

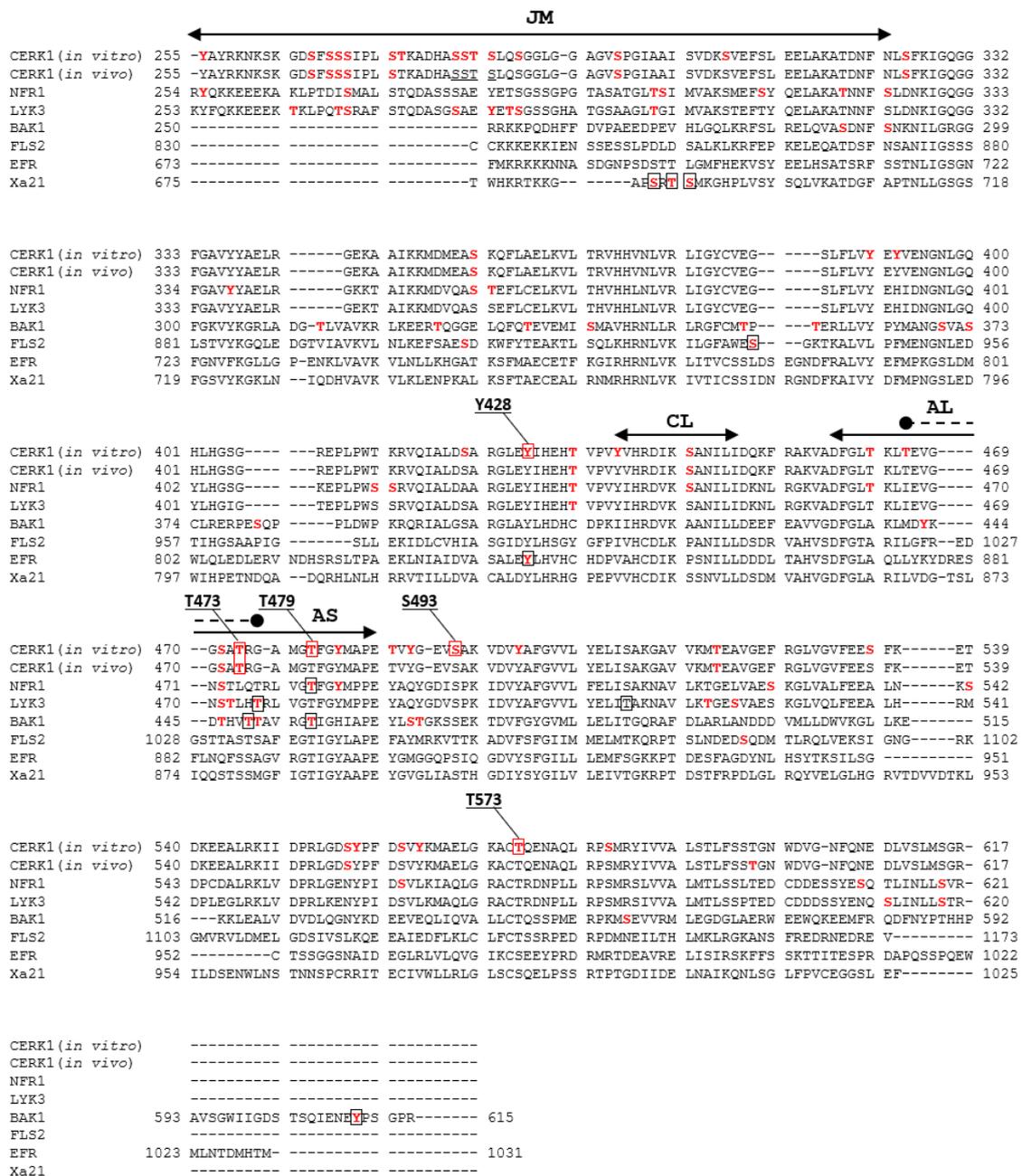


Fig. 1-16 RLK 細胞内ドメインのアラインメント比較

ClustalW を用いてアラインメントを比較した。赤文字はリン酸化部位を示し、四角で囲ったアミノ酸残基は、アミノ酸残基置換によってシグナル伝達に影響がみられた部位である。JM : Jaxamembrane, CL : Catalytic loop, AS : Activation Segment, AL : Activation Loop

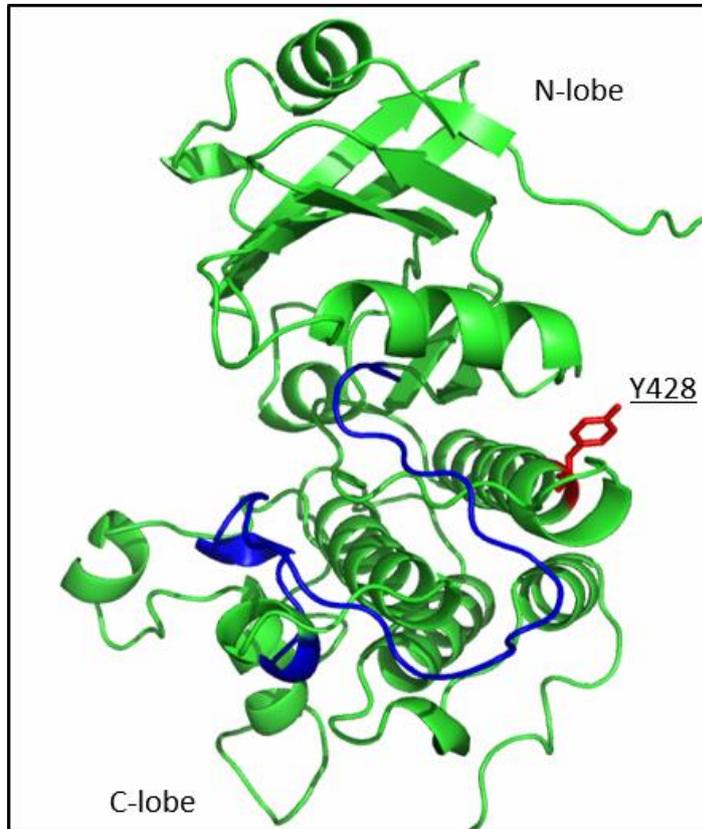


Fig. 1-17 CERK1 細胞内ドメインの分子モデル

ヒトのキナーゼである IRAK-4 と BAK1 の細胞内ドメインの立体構造に基づいて、MODELLER 9v12 で CERK1 の細胞内ドメインのモデリングをおこなった。赤色部分は、Y428 残基、青色は Activation Segment を示している。

第2章 CERK1 自己リン酸化部位の生化学的機能評価

第1節 緒論

真菌の MAMP であるキチンオリゴ糖によって誘導されるシグナル伝達は、CERK1 細胞内ドメインの自己リン酸化に伴って起動されることがわかっていた。しかし、CERK1 の自己リン酸化がどのようにシグナル伝達系の起動に関わるかについては明らかになっていなかった。

そこで第1章では、CERK1 のシグナル伝達の起動に関わる自己リン酸化部位を明らかにすることを旨とし、*in vivo/in vitro* で同定した CERK1 の自己リン酸化部位を一アミノ酸残基置換した CERK1 を *cerk1-2* 変異体に形質転換し、キチンオリゴ糖誘導性の防御応答を評価した。その結果、リン酸化部位を置換した 5 つの形質転換体において、防御応答の復帰の消失またはわずかな復帰が見出され、この 5 か所の自己リン酸化部位が CERK1 のシグナル伝達に関わることが示唆された (92)。しかし、これらのアミノ酸残基の自己リン酸化がどのように CERK1 およびそのシグナル伝達系を活性化するかはいまだ明らかになっていなかった。

動物の受容体キナーゼでは、アミノ酸残基の段階的なリン酸化で、キナーゼが活性化され、直下のシグナル伝達因子をリン酸化できるようになることが示されており (103)、植物の RLK でもリン酸化を通じて同様の制御を行うことが考えられる。

そこで本章では、CERK1 のシグナル伝達に関わることが示唆された 5 か所の自己リン酸化部位が、CERK1 あるいはシグナル伝達活性化のどの段階に関わるのかを、大腸菌発現系およびベンサミアナタバコ一過的発現系で調製した CERK1 タンパク質を用いて生化学的に解析した。

第2節 実験方法

1. コンストラクトの作製

1). 大腸菌発現用各種 GST-CERK1_{cyt} 発現コンストラクトの作製

CERK1 細胞内ドメインが挿入されたエントリークローンに対して、第1章で用いたプライマーで PCR を行い、エントリークローンを作製後、LR 反応で pDEST15 (Life Technologies) に導入することで作製した。S493D 置換に用いたプライマーは下記に示す。詳細な方法、条件は第1章を参照されたい。

	Fwd	プライマー名	プライマー配列 (変異部を小文字で示す)
	Rev		
S493D	Fwd	S493D FP	GAAGTGgATGCAAAAGTAGATGTATATG
	Rev	S493D RP	TTTTGCATcCACTTCTCCATAAAC

2). ベンサミアナタバコ発現用各種 CERK1-3HA 発現コンストラクトの作製

終止コドンを含まない CERK1 の cDNA が挿入されたエントリークローンに対して、第1章で用いたプライマーで PCR を行い、エントリークローンを作製後、LR 反応で pGWB14 に導入することで作製した (93)。Y428D,E 置換に用いたプライマーは下記に示す。詳細な方法、条件は第1章を参照されたい。

	Fwd	プライマー名	プライマー配列 (変異部を小文字で示す)
	Rev		
Y428D	Fwd	Y428D FP	TTTAGAAGAtATCCACGAGCACACGG
	Rev	Y428D RP	TGGATaTCTTCTAAACCTCTAGCTGAGTCTAGT
Y428E	Fwd	Y428E FP	TTTAGAAGAaATCCACGAGCACACGG
	Rev	Y428E RP	GTGGATtTCTTCTAAACCTCTAGCTGAGTCTAG

3). 大腸菌発現用 Strep-PBL27(K112E)発現コンストラクトの作製

PBL27 が挿入されたエントリークローンに対して、下記プライマーで PCR を行い、PBL27(K112E)のエントリークローンを作製後、下記プライマーで PCR を行い、Strep タグ配列を融合した PBL27(K112E)の DNA 断片を増幅し、TOPO 反応で pENTR/SD/D-TOPO (Life Technologies) に DNA 断片を導入し、Strep-PBL27(K112E)のエントリークローンを作製した。そのエントリークローンと pDEST14 で LR 反応を行い、pDEST14 (Life Technologies) に Strep-PBL27(K112E)の配列を導入した。詳細な方法、条件は第 1 章を参照されたい。

	Fwd	プライマー名	プライマー配列 (タグ配列および置換部位を小文字で示す。)
	Rev		
PBL27 (K112E)	Fwd	PBL27 KE F	TAGTAGCTGTTgAACAGCTTGATC
	Rev	PBL27 KE R	TCGATCAAGCTGTTcAACAGCTAC
Strep- PBL27 (K112E)	Fwd	Strep-PBL27 F	caccatgtggagccaccgcagttcgaaaaagcaagccttgttcca cgtgGTTCTGTCAGTGGGTGTTTGCCTTGTTT TGGATC
	Rev	PBL27 R	TCAGTCATTTGTACTATCAAAGCTG

4). 大腸菌発現用 PUB4-Strep 発現コンストラクトの作製

PUB4 が挿入されたエントリークローンに対して、下記プライマーで PCR を行い、Strep タグ配列を融合した PUB4 の DNA 断片を増幅し、TOPO 反応で pENTR/SD/D-TOPO に DNA 断片を導入し、PUB4-Strep のエントリークローンを作製した。そのエントリークローンと pDEST14 で LR 反応を行い、pDEST14 に PUB4-Strep の配列を導入した。詳細な方法、条件は第 1 章を参照されたい。

	Fwd	プライマー名	プライマー配列 (タグ配列および置換部位を小文字で示す。)
	Rev		
PUB4- Strep	Fwd	PUB4 Strep F	CACCATGGTGGAAATGGAAGTTCT
	Rev	PUB4 Strep R	TCATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGACAG AACcactggaacaaggcttgcgccacgccagcgttt

5). 大腸菌発現用 6His-CERK1(D441V)cyt 発現コンストラクトの作製

CERK1(D441V)cyt エントリークローンを LR 反応で pDEST17 (Life Technologies) に導入した。本実験で使用したプライマーは下記に示す。また、詳細な方法、条件は第 1 章を参照されたい。

2. ベンサミアナタバコ一過的発現系を利用した細胞死評価

目的のコンストラクトを形質転換したアグロバクテリウム (*C58C1*) を培養、集菌後、MMA バッファー (10 mM MgCl₂、0.2 % MES-KOH pH 5.6、1 mM アセトシリンゴン) に懸濁し、OD₆₀₀ が 0.6 になるように調整した。調整した後は 2 時間、28°C で静置し、注射針を付けていない 1 ml のシリンジでベンサミアナタバコの葉の裏側からインフィルトレーションした。接種後 4 日で細胞死を観察した。エタノールと酢酸を 3 対 1 の割合で混合した溶液に葉を 2 日間浸すことで脱色した。

3. ベンサミアナタバコで発現させた CERK1-3HA の調製

アグロバクテリウムを感染させたベンサミアナタバコの葉を回収し、速やかに液体窒素で凍結させた。凍結した葉を溶解せずに葉さじで粉碎した。葉と等量のホモジナイズバッファー (0.3M スクロース、50 mM Mes-Tris pH 7.6、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM PMSF) を加え、ヒスコトロンを用いて 30 秒、4 回で破碎した。その後、10,000×g、4°C で 10 分遠心し上清を回収した。その上清を、100,000×g、4°C で 40 分間超遠心し、膜面分を回収した。得られた膜面分は MF バッファー (0.25 M スクロース、10 mM リン酸二水素ナトリウム pH 7.8) に懸濁した。

4. 6×His タグ融合タンパク質の精製法

6His-CERK1(D441V)cyt のデスティネーションクロンが形質転換された BL21-AI 株の大腸菌を培養し、最終濃度が 0.2% になるようにアラビノースを添加し、15°C、16 時間で発現を誘導した。超音波破碎、遠心による不溶性画分の分離後、1ml の Histrap カラム HP (GE) で精製した。洗い作業は 6His バッファー (20 mM リン酸二水素ナトリウム、500 mM 塩化ナトリウム、30 mM イミダゾール pH 7.0) で行った。溶出は 5 ml の溶出バッファー (20 mM リン酸二水素ナトリウム、500 mM 塩化ナトリウム、500 mM イミダゾール pH 7.0) で行った。また、詳細な方法、条件は第 1 章を参照されたい。

第3節 結果

1. *in vitro* キナーゼアッセイ系を用いた CERK1 の T479 の機能解析

受容体様キナーゼ (RLK) は、段階的にそれぞれのアミノ酸残基を自己リン酸化することでキナーゼ活性を亢進し、直接相互作用するシグナル伝達因子をリン酸化できるようになるとする (104)。

CERK1 の 479 番目のスレオニン残基 (T479) は CERK1 の自己リン酸化部位として同定された (Fig. 1-5)。T479 をアラニン残基 (A) に置換した *CERK1(T479A)/cerk1-2* 形質転換体では、キチンオリゴ糖誘導性の活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導の復帰が消失することから (Fig. 1-9)、T479 は CERK1 のシグナル伝達に不可欠な役割を果たすリン酸化部位であると示唆された。しかし、T479 のリン酸化が、CERK1 および CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子の活性化のどこの段階に関与するかはわかっていない。

そこで、CERK1 細胞内ドメインタンパク質 (CERK1cyt) の N 末端側に GST を融合した GST-CERK1cyt およびキナーゼ活性をもたない GST-CERK1(D441V)cyt (92) をコントロールにして、GST-CERK1(T479A)cyt の、CERK1 自身のリン酸化能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することで、T479 のリン酸化が、CERK1 を介したシグナル伝達の、どの段階の制御に関わるかを明らかにすることにした。それぞれのタンパク質は、第1章で述べたように、それぞれの発現コンストラクトをもつ大腸菌を培養し、アラビノースを処理することで発現させ、大腸菌を破碎後、遠心分離で得られた可溶性画分を GSTrap カラム (GE) で精製した。また、それぞれのタンパク質のリン酸化は、SDS-PAGE 後のタンパク質バンドのシフトから評価した。また、GST-CERK1cyt の自己リン酸化は、SDS-PAGE・ウエスタンブロッティング後、抗 GST 抗体 (α -GST) でバンドシフトを評価することに加え、抗ホスホセリン抗体 (α -pS)、抗ホスホチロシン抗体 (α -pY) で検出することで、それらリン酸化強度からも評価した。MBP のリン酸化は、抗 MBP 抗体 (α -MBP) で検出することで確認した。MBP のリン酸化評価では、リン酸化によるバンドシフトを見やすくするため、第1章と同様に Phos-tag ゲルを用いた。

Fig. 2-1 に示すように、自己リン酸化能を解析した抗 GST 抗体の結果から、GST-CERK1(D441V)cyt は、ATP を添加しても予測質量の 68 kDa にバンドが確認される

ため、リン酸化しないことが確認された。また、GST-CERK1cyt は ATP の非存在下でもバンドシフトが確認され、ATP 存在下で反応させたものでは、さらに高質量側にバンドがシフトした。そのサンプルにフォスファターゼを処理したものでは、GST-CERK1(D441V)cyt と同位置のところにバンドが収束したことから、リン酸化状態の GST-CERK1cyt は ATP の存在下で、さらに自己リン酸化したことが確認された。これらの結果は、第 1 章の結果と一致した。一方、ATP 非存在下で反応させた GST-CERK1(T479A)cyt は GST-CERK1(D441V)cyt と同じ位置にバンドがみられ、ATP の存在下で反応させたものでは、GST-CERK1(D441V)cyt と比較してわずかなバンドシフトが見られた。そのサンプルにフォスファターゼを処理したものでは、そのシフトが消失したことから、GST-CERK1(T479A)cyt はわずかに自己リン酸化能を持つが、その活性は GST-CERK1cyt と比較して、極めて弱いことが確認された。また、抗ホスホセリン抗体および抗ホスホチロシン抗体で検出したところ、抗 GST 抗体で検出したデータと同様に、GST-CERK1(T479A)cyt は GST-CERK1cyt と比較してリン酸化能が低下した結果が得られた。そのため、T479 のリン酸化が CERK1 自身のリン酸化に関与することが示唆された。

MBP に対するリン酸化能を評価した抗 MBP 抗体の結果では、GST-CERK1cyt と MBP を混合しただけのサンプルでは、MBP のバンドシフトが確認されないが、そこに ATP を加えて反応させたサンプルでは、MBP のバンドシフトが確認された。そのサンプルにフォスファターゼを処理したサンプルでは、MBP のバンドシフトが消失した。従って、GST-CERK1cyt は MBP に対するリン酸化能をもつことが確認された。一方、GST-CERK1(D441V)cyt では、ATP 存在下でも MBP のリン酸化が確認されず、自己リン酸化できない CERK1(D441V)cyt は MBP をリン酸化できないことが観察された。GST-CERK1(T479A)cyt では、ATP の存在下、非存在下に関わらず、MBP のリン酸化バンドは確認されなかった。また、フォスファターゼ処理したものでも MBP のバンド位置に変化はなかった。そのため、GST-CERK1(T479A)cyt は MBP に対するリン酸化能が消失していることがわかった。

以上から、CERK1 のシグナル伝達の起動に必須な T479 は、そのリン酸化で CERK1 のキナーゼ活性を活性化することが示唆された。

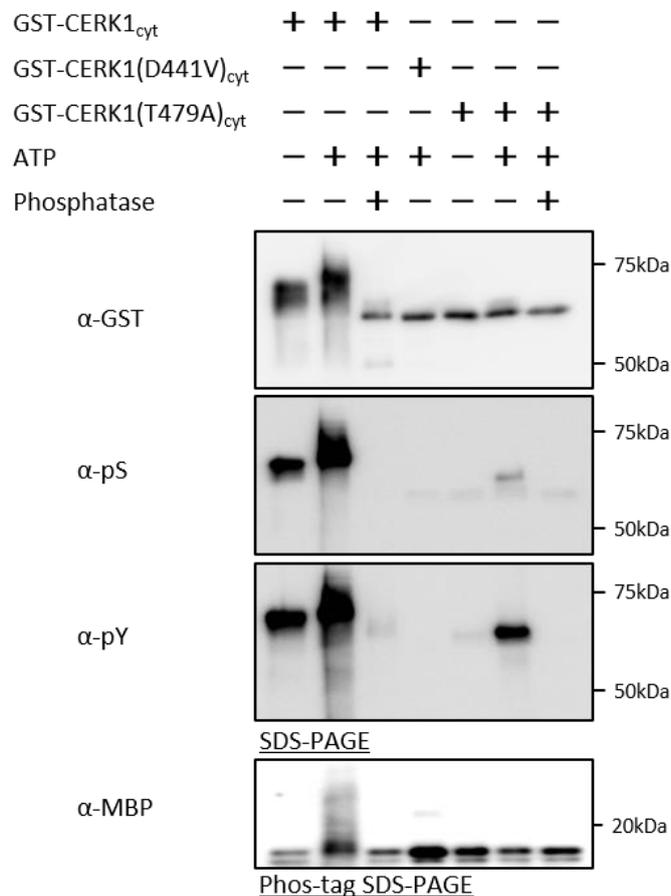


Fig. 2-1 *in vitro* キナーゼアッセイによる T479 の機能評価

大腸菌発現系を利用して発現、精製した GST-CERK1_{cyt}、GST-CERK1(D441V)_{cyt}、GST-CERK1(T479A)_{cyt} に対して ATP 存在/非存在下でリン酸化反応を行った試料および ATP 存在下でリン酸化反応後にフォスファターゼ処理した試料を SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング後、抗 GST 抗体 (α-GST)、抗ホスホセリン抗体 (α-pS)、抗ホスホチロシン抗体 (α-pY) で検出した。また、全ての反応はミエリンベースックプロテイン (MBP) を含んでおり、CERK1 から MBP へのトランスリン酸化の程度について、各試料を phos-tag ゲルで電気泳動、ウエスタンブロッティング、抗 MBP 抗体によって検出することで評価した。GST-CERK1(D441V)_{cyt} は非リン酸化状態のバンド位置を示すコントロールとして用いた。

2. *in vitro* キナーゼアッセイ系を用いた CERK1 の T573 の機能解析

CERK1 の 573 番目のスレオニン残基 (T573) は、自己リン酸化部位として同定されている (Fig. 1-5)。T573 をアラニン残基 (A) に置換した *CERK1(T573A)/cerk1-2* 形質転換体では、キチンオリゴ糖誘導性の活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導が極めてわずかに復帰することが明らかになった (Fig. 1-12)。これらのことから、T573 は CERK1 を介したシグナル伝達に関わるリン酸化部位であることが示唆されたが、T573 のリン酸化が CERK1 および下流のシグナル伝達の活性化にどのように関与するかは明らかになっていない。そこで、上記の T479 の機能解析と同様な方法で、T573 についても解析を行い、その結果を Fig. 2-2 に示した。

自己リン酸化能を解析した抗 GST 抗体の結果から、ATP 非存在下で反応させた GST-CERK1(T573A)cyt で、GST-CERK1(D441V)cyt と比較してその上方に 1 本のバンドのシフトが観察された (矢印の位置)。ATP 存在下で反応させた GST-CERK1(T573A)cyt では、バンドシフトの大まかな特徴は ATP 非存在下で反応させたサンプルと同じであった。ATP 存在下で反応させた GST-CERK1(T573A)cyt サンプルに対してフォスファターゼを処理したところ、そのバンドは GST-CERK1(D441V)cyt のバンドと同位置に確認された。したがって、GST-CERK1(T573A)cyt でみられたバンドシフトは自己リン酸化によるものであることが示された。このことから GST-CERK1(T573A)cyt は自己リン酸化能を持つが、その活性は GST-CERK1cyt と比較して弱いことが見いだされた。また抗ホスホセリン抗体および抗ホスホチロシン抗体で検出した結果は、抗 GST 抗体で検出した結果と同様に、GST-CERK1(T573A)cyt のリン酸化能が GST-CERK1cyt と比較して低下するという結果が得られた。

一方、MBP に対するリン酸化活性についての評価を抗 MBP 抗体で行った結果では、GST-CERK1(T573A)cyt を ATP 非存在下で MBP と反応させたサンプルでは、MBP のバンドシフトが確認されなかったが、ATP 存在下で反応させたものでは、MBP のバンドシフトが確認された。しかし、ATP 存在下で GST-CERKcyt と反応させたものと比較して、そのバンドの移動度はわずかであった。また、これらのサンプルをフォスファターゼで処理したサンプルは、高質量側にみられた MBP のバンドシフトが消失した。これらの解析により GST-CERK1(T573A)cyt は MBP に対するリン酸化活性を持つが、GST-CERK1cyt が持つリン酸化活性と比較して弱いことが示された。

以上から、CERK1 のシグナル伝達に関わる T573 は、そのリン酸化を通じて自己リ

ン酸化の亢進およびキナーゼ活性の亢進に関わることが示唆された。

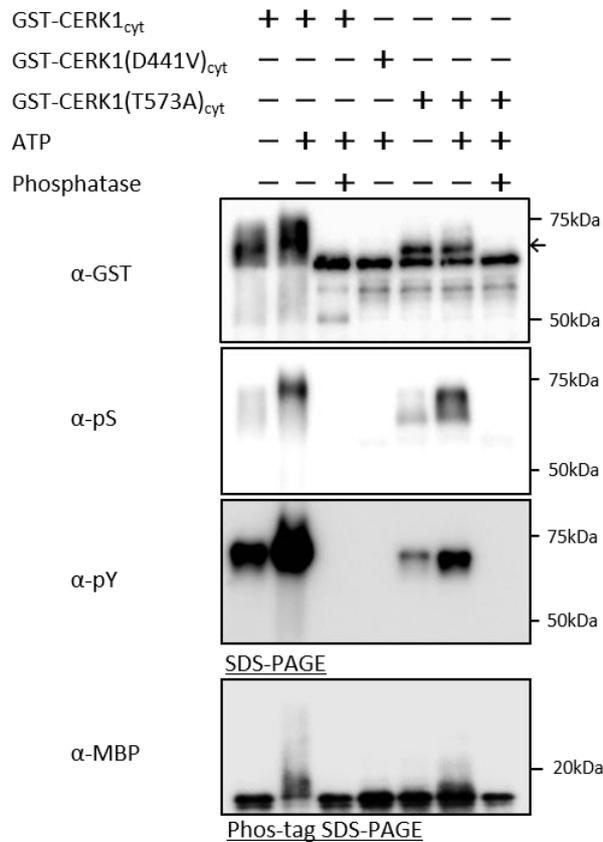


Fig. 2-2 *in vitro* キナーゼアッセイによる T573 の機能評価

大腸菌発現系を利用して発現、精製した GST-CERK1_{cyt}、GST-CERK1(D441V)_{cyt}、GST-CERK1(T573A)_{cyt} に対して ATP 存在/非存在下でリン酸化反応を行った試料および ATP 存在下でリン酸化反応後にフォスファターゼ処理した試料を SDS-PAGE、ウエスタンブロットティング後、抗 GST 抗体 (α-GST)、抗ホスホセリン抗体 (α-pS)、抗ホスホチロシン抗体 (α-pY) で検出した。また、全ての反応はミエリンベシクプロテイン (MBP) を含んでおり、CERK1 から MBP へのトランスリン酸化の程度について、各試料を phos-tag ゲルで電気泳動、ウエスタンブロットティング、抗 MBP 抗体によって検出することで評価した。GST-CERK1(D441V)_{cyt} は非リン酸化状態のバンド位置を示すコントロールとして用いた。矢印は、GST-CERK1(T573A)_{cyt} のシフトしたバンド位置を示した。

3. *in vitro* キナーゼアッセイ系を用いた CERK1 の T473 の機能解析

第1章に述べたように、CERK1の473番目のスレオニン残基(T473)は自己リン酸化部位として同定された(Fig. 1-5)。T473をアラニン残基(A)に置換した *CERK1(T473A)/cerk1-2* 形質転換体では、キチンオリゴ糖誘導性の活性酸素生成が *cerk1* 変異体と比較してわずかに復帰した(Fig. 1-13)。これらのことから、T473がキチンシグナル伝達に関わることを示唆されたが、T473のリン酸化がCERK1および下流のシグナル伝達の活性化にどのように関与するかは明らかになっていない。そこで、上記のT479の機能解析と同様な方法で、T473についても解析を行い、その結果をFig. 2-3に示した。

抗GST抗体による検出の結果では、ATP非存在下で反応させた GST-CERK1(T473A)cyt バンド位置は、同条件で反応させた GST-CERK1cyt のバンド位置と比較して低いが、GST-CERK1(D441V)cyt で確認されたバンドよりも高い位置にみられた。一方、ATP存在下で反応させた GST-CERK1(T473A)cyt のバンドは、GST-CERK1cyt と同位置までにシフトしたが、このサンプルをフォスファターゼで処理した GST-CERK1(T473A)cyt のバンドは、GST-CERK1(D441V)cyt と同位置に収束した。このことから、GST-CERK1(T473A)cyt でみられたバンドのシフトは自己リン酸化によるものであることが示された。また、ATP添加した条件で反応させた GST-CERK1cyt および GST-CERK1(T473A)cyt のリン酸化によるバンドのシフト位置に差がないことから、T473のリン酸化はCERK1の自己リン酸化に関与しないことが示唆された。また抗ホスホセリン抗体および抗ホスホチロシン抗体で検出した結果は、抗GST抗体で検出した結果と同様に、GST-CERK1(T473A)cyt のリン酸化能の低下が観察された。

MBPに対するリン酸化活性を評価した抗MBP抗体の結果から、GST-CERK1(T473A)cyt をATP非存在下でMBPと混ぜただけのサンプルでは、MBPのバンドシフトが確認されなかったが、ATP存在下で反応させた同サンプルでは、MBPのバンドシフトが確認され、そのシフトは同条件のGST-CERK1cytの結果と同程度であった。これらのサンプルにフォスファターゼを処理した結果では、高質量側に見られたMBPバンドのシフトが消失した。従ってGST-CERK1(T473A)cyt はGST-CERK1cytのMBPに対するリン酸化能と同程度のリン酸化能を持つことが示された。

以上から、CERK1のシグナル伝達に関わるT473は、CERK1自身のキナーゼ活性の制御には関与しないことが示唆された。

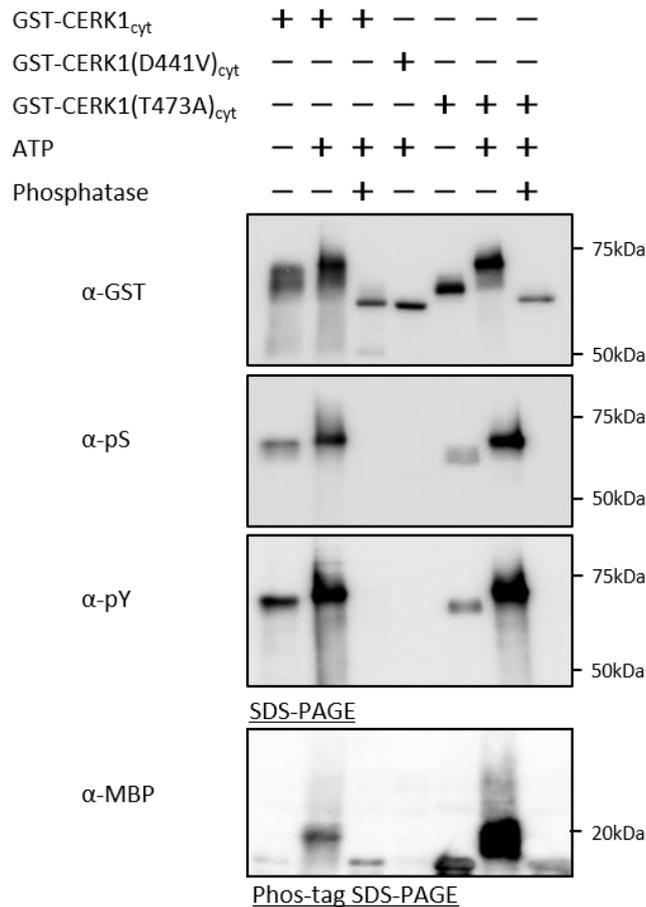


Fig. 2-3 *in vitro* キナーゼアッセイによる T473 の機能評価

大腸菌発現系を利用して発現、精製した GST-CERK1_{cyt}、GST-CERK1(D441V)_{cyt}、GST-CERK1(T473A)_{cyt} に対して ATP 存在/非存在下でリン酸化反応を行った試料および ATP 存在下でリン酸化反応後にフォスファターゼ処理した試料を SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング後、抗 GST 抗体 (α-GST)、抗ホスホセリン抗体 (α-pS)、抗ホスホチロシン抗体 (α-pY) で検出した。また、全ての反応はミエリンベースックプロテイン (MBP) を含んでおり、CERK1 から MBP へのトランスリン酸化の程度について、各試料を phos-tag ゲルで電気泳動、ウエスタンブロッティング、抗 MBP 抗体によって検出することで評価した。GST-CERK1(D441V)_{cyt} は非リン酸化状態のバンド位置を示すコントロールとして用いた。

4. *in vitro* キナーゼアッセイ系を用いた CERK1 の Y428 の機能解析

CERK1 の 428 番目のチロシン残基 (Y428) についても、第 1 章で述べたようにリン酸化部位として同定された (Fig. 1-5)。また *CERK1(Y428F)/cerk1-2* 形質転換体では、キチンオリゴ糖誘導性の活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導の復帰が消失することから (Fig. 1-10)、Y428 は CERK1 のシグナル伝達に不可欠な役割を果たすリン酸化部位であると示唆された。しかし、Y428 のリン酸化が CERK1 の活性化のどの段階に関与するかは明らかになっていない。そこで、上記の T479 の機能解析と同様な方法で、Y428 についても解析を行い、その結果を Fig. 2-4 に示した。

自己リン酸化能を解析した抗 GST 抗体の結果から、ATP 非存在下で反応させた GST-CERK1(Y428F)cyt のバンド位置は、同条件の GST-CERK1cyt のものと比較して低いが、GST-CERK1(D441V)cyt よりも高いことが観察された。また ATP 存在下で反応させた GST-CERK1(Y428F)cyt のバンドは、GST-CERK1cyt のバンドと同等の位置までシフトした。このサンプルにフォスファターゼを処理した結果、GST-CERK1(D441V)cyt と同じ位置にタンパク質バンドが収束した。このことから、GST-CERK1(Y428F)cyt でみられたバンドシフトは自己リン酸化によるものであることが示された。また、ATP を添加し、同条件で反応させた GST-CERK1cyt と GST-CERK1(Y428F)cyt のリン酸化によるバンドのシフトの位置には差がないことから、Y428 のリン酸化は CERK1 自身のリン酸化に関与しないことが示唆された。また抗ホスホセリン抗体および抗ホスホチロシン抗体で検出したこれらのサンプルの結果においても、GST-CERK1(Y428F)cyt のリン酸化量は GST-CERK1cyt と同程度であった。

MBP に対するリン酸化活性を評価した抗 MBP 抗体による検出の結果では、GST-CERK1(Y428F)cyt を ATP 非存在下で MBP と混ぜて反応させたサンプルでは、MBP のバンドシフトが確認されなかったが、ATP 存在下同条件で反応させたものでは、MBP のバンドシフトが確認され、同条件で処理した GST-CERK1cyt のものと同程度であった。また、このサンプルをフォスファターゼ処理した結果では、MBP バンドのシフトが消失した。従って GST-CERK1(Y428F)cyt は GST-CERK1cyt と同程度の MBP に対するリン酸化能を持つことが示された。

以上から、CERK1 のシグナル伝達の起動に関わる Y428 は、CERK1 自身のキナーゼ活性の制御には関与しないことが示唆された。

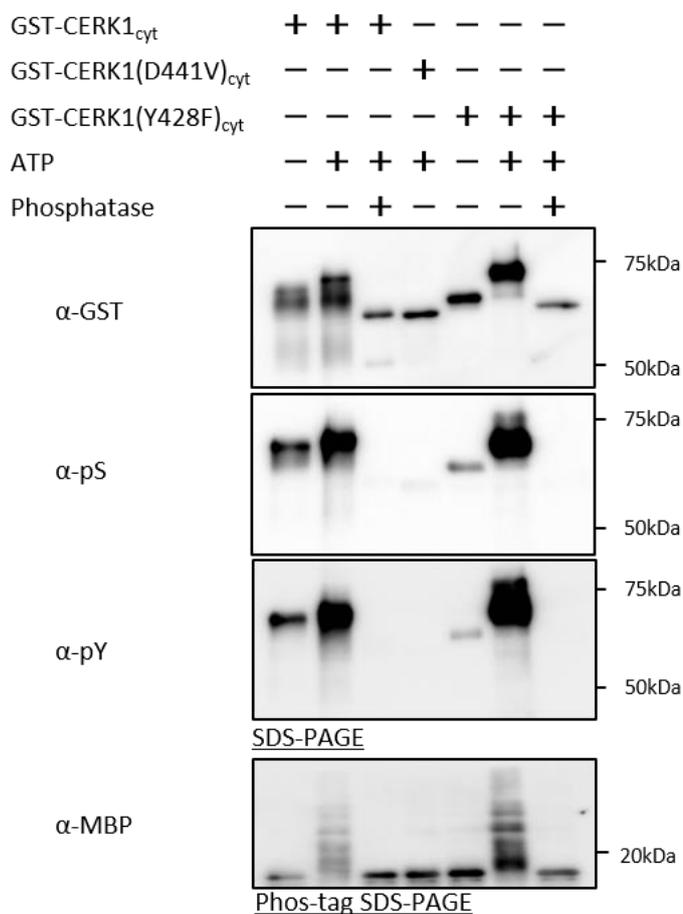


Fig. 2-4 *in vitro* キナーゼアッセイによる Y428 の機能評価

大腸菌発現系を利用して発現、精製した GST-CERK1_{cyt}、GST-CERK1(D441V)_{cyt}、GST-CERK1(Y428F)_{cyt} に対して ATP 存在/非存在下でリン酸化反応を行った試料および ATP 存在下でリン酸化反応後にフォスファターゼ処理した試料を SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング後、抗 GST 抗体 (α-GST)、抗ホスホセリン抗体 (α-pS)、抗ホスホチロシン抗体 (α-pY) で検出した。また、全ての反応はミエリンベースックプロテイン (MBP) を含んでおり、CERK1 から MBP へのトランスリン酸化の程度について、各試料を phos-tag ゲルで電気泳動、ウエスタンブロッティング、抗 MBP 抗体によって検出することで評価した。GST-CERK1(D441V)_{cyt} は非リン酸化状態のバンド位置を示すコントロールとして用いた。

5. 細胞死を指標にした CERK1 の Y428 の機能解析

In vitro の CERK1 の細胞内ドメインを用いた解析から、Y428 のリン酸化が CERK1 自身のキナーゼ活性の制御に関与しないことが示された (Fig. 2-4)。しかし第 1 章の考察で述べたように、Y428 はキナーゼの活性制御に関わるとされる α C ヘリックスと相互作用し得るような位置に存在していたため、Y428 は、キナーゼの活性制御に関わる可能性も示唆されていた (Fig.1-17)。そこで、*in vivo* において CERK1 全長を用いた解析を行うことで、Y428 が CERK1 のキナーゼの活性制御に関与するかを明らかにすることにした。

これまでにベンサミアナタバコの葉に CERK1 を一過的に発現させると、CERK1 のキナーゼ活性依存的にリン酸化および、防御応答様の細胞死が誘導されることがわかっている (67, 95)。このため、シロイヌナズナのキチンオリゴ糖処理時に観察される CERK1 のリン酸化とそれに伴う応答が、ベンサミアナタバコ一過的発現系を用いて擬似的に再現できると考えられる。

そこで、本発現系を用いて CERK1(Y428F) を発現させた時の自己リン酸化を評価することで、Y428 が *in vivo* においても CERK1 のキナーゼ活性の制御に関与しないかが評価可能であると考えた。また、シロイヌナズナの *CERK1(Y428F)/cerk1-2* 形質転換体では、キチン誘導性の防御応答の復帰が完全に消失していたことから (Fig. 1-10)、CERK1(Y428F) をベンサミアナタバコの葉に一過的に発現させても、細胞死が誘導されないと考え、この想定と一致するかについて確かめることにした。さらに、Y428 をアスパラギン酸残基 (D)、グルタミン酸残基 (E) に置換することで Y428 を擬似リン酸化した CERK1(Y428D) および CERK1(Y428E) においても、細胞死を観察することにより、Y428 の機能が相補されるかについて、確認することにした。この評価のコントロールとして、CERK1 および CERK1(D441V) も同様な方法で発現させた。また、それぞれの CERK1 は、C 末端側に 3HA タグを付加し、35S プロモーターで発現が制御される CERK1-3HA 発現コンストラクトを構築し、それらが形質転換されたアグロバクテリウムを、ベンサミアナタバコの葉に強制的に感染させることで発現させた。細胞死は、アグロバクテリウム接種後、4 日目に観察した。

結果、CERK1-3HA を発現させた場所では、細胞死が観察された (Fig. 2-5)。また CERK1(D441V)-3HA では、細胞死が誘導されなかった。この結果は、これまでの報告されている結果と一致し、再現性が確認された。一方、CERK1(Y428F)-3HA を発現さ

せた場所では、細胞死が誘導されなかったことから、*CERK1(Y428F)/cerk1-2*形質転換体を用いた生物機能応答解析の結果とベンサミアナタバコを用いた細胞死応答の結果が一致することが示された。*CERK1(Y428D)3-HA* および *CERK1(Y428E)3-HA* を発現させた場所では、細胞死が誘導されなかったため、Y428 を擬似リン酸化状態にしても *CERK1* の機能は相補されないことがわかった。

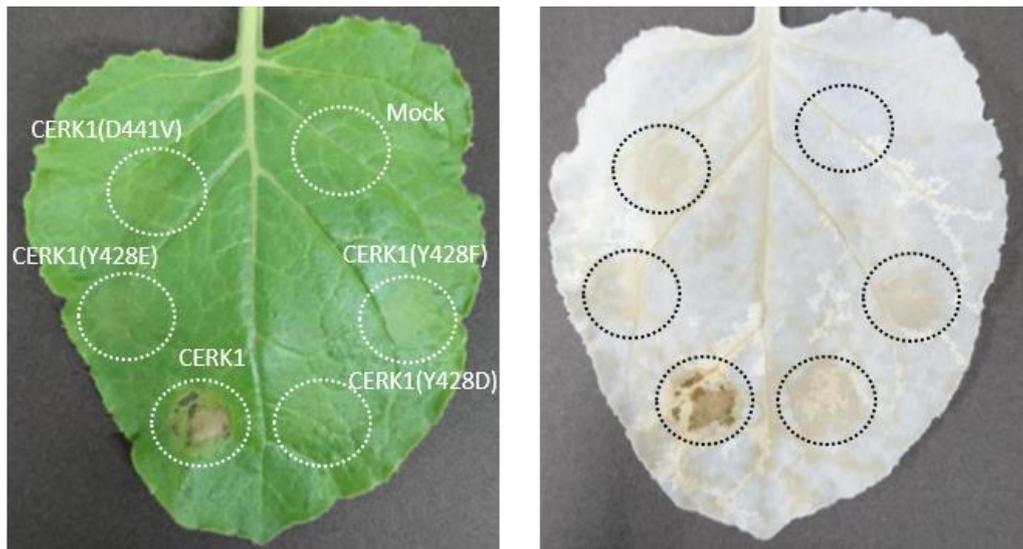


Fig. 2-5 ベンサミアナタバコ一過的発現系を用いた細胞死の観察

アグロインフィルトレーション法を用いて、ベンサミアナタバコの葉に CERK1-3HA、CERK1(D441V)-3HA、CERK1(Y428F)-3HA、CERK1(Y428D)-3HA、CERK1(Y428E)-3HA を一過的に発現させ、細胞死を評価した結果を示した。右はエタノールと酢酸を 3 対 1 の割合で混ぜた溶液で脱色した結果である。図中の点線で示す領域は各コンストラクトを持つアグロバクテリウムを感染させた範囲を示す。

6. *in vivo* 発現タンパク質を用いた CERK1 の Y428 の機能解析

CERK1(Y428F)-3HA 発現コンストラクトを持つアグロバクテリウムをベンサミアナタバコの葉に接種したところ、細胞死が誘導されなかった (Fig. 2-5)。このことから、細胞死を指標とした結果と *CERK1(Y428F)/cerk1-2* 形質転換体を用いたキチンオリゴ糖誘導性の防御応答を評価した結果が相関することが示された。

そこで、ベンサミアナタバコに一過的に発現させた CERK1(Y428F)-3HA のリン酸化状態を調べることで、Y428 が *in vivo* における CERK1 自身のキナーゼ活性の制御に関与するかについて評価した。また、擬似リン酸化置換した CERK1(Y428D)-3HA および CERK1(Y428E)-3HA についても同様の評価を行った。本解析のリン酸化は、これまでと同様に、SDS-PAGE 後のバンドのシフトから評価した。本実験に用いた目的タンパク質は、細胞死の評価で行った操作と同様の方法でベンサミアナタバコの葉に発現させ、アグロバクテリウム接種後 1 日で回収した葉から調製した。目的タンパク質は、発現させたベンサミアナタバコ葉を破碎、超遠心後、膜画分を調製し、SDS-PAGE・ウェスタンブロットングを行い、抗 HA 抗体 (α -HA) で検出した。CERK1-3HA については、予測質量が 73 kDa 程度であるが、これまでの解析で約 75 kDa 付近に検出されることがわかっている。

CERK1-3HA は、75 kDa 付近から高質量側にブロードなバンドとして確認された (Fig. 2-6)。CERK1(D441V)-3HA の膜画分では、75 kDa 付近に単一のバンドが確認された。第 1 章で述べたようにベンサミアナタバコに発現させた CERK1-3HA にみられるブロードなバンドは、CERK1 の自己リン酸化によるものであることがすでにわかっているが、本実験においても CERK1 の自己リン酸化によるバンドシフトが確認された。一方、CERK1(Y428F)-3HA の結果では、CERK1(D441V)-3HA と同位置にバンドが観察され、CERK1-3HA で見られたバンドシフトは観察されなかった。したがって、CERK1(Y428F)-3HA では CERK1 自身のキナーゼ活性が著しく低下もしくは消失していることが明らかになり、*in vivo* の解析では Y428 が CERK1 自身のキナーゼの活性制御に関わることが示唆された。

一方、Y428 を擬似リン酸化置換した CERK1(Y428D)-3HA および CERK1(Y428E)-3HA では、CERK1(D441V)-3HA や CERK1(Y428F)-3HA に比較して、わずかに高質量側にバンドがシフトしており、Y428 の擬似的リン酸化によって CERK1 のキナーゼ活性が部分的に復帰することが示唆され、Y428 のリン酸化がキナーゼの活性制御に関

わる可能性が示された。しかし、CERK1(Y428D)-3HA および CERK1(Y428E)-3HA のバンドシフトは野生型 CERK1-3HA に比較して低いため、CERK1 のキナーゼ活性は完全に相補されておらず、Y428 のリン酸化がキナーゼの活性制御に関わるかは確認できなかった。これらの結果により、*in vitro* の実験結果とは異なり、Y428 のリン酸化はキナーゼの活性制御に関わる可能性が高いことが *in vivo* の解析から示された。

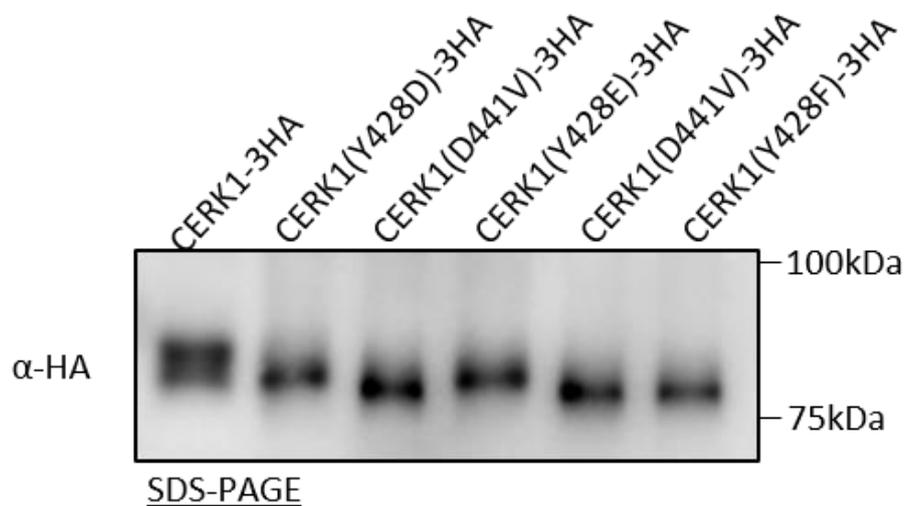


Fig. 2-6 ベンサミアナタバコ一過的発現系を用いた Y428 の機能解析

アグロインフィルトレーションによって、ベンサミアナタバコの葉に CERK1-3HA、CERK1(D441V)-3HA、CERK1(Y428F)-3HA、CERK1(Y428D)-3HA、CERK1(Y428E)-3HA を一過的に発現させ、抽出した膜画分を SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングに用いた。転写膜を抗 HA 抗体 (α -HA) で検出した結果である。

7. *in vitro* キナーゼアッセイ系を用いた CERK1 の S493 の機能解析

すでに述べているように、CERK1 の 493 番目のセリン残基 (S493) はリン酸化部位として同定された。*CERK1(S493A)/cerk1-2* 形質転換体では、キチンオリゴ糖誘導性の活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導がわずかに復帰した (Fig. 1-14)。これらのことから、S493 は CERK1 を介したシグナル伝達に関わることが示唆された。しかし、S493 のリン酸化がどのようにして CERK1 のシグナル伝達に関与するかは明らかになっていない。そこで、上記の T479 の機能解析と同様な方法で、S493 についても解析を行い、その結果を Fig. 2-7 に示した。

自己リン酸化能を解析したところ、ATP 存在/非存在条件下で反応させた GST-CERK1(S493A)cyt では、同条件の GST-CERK1cyt のものと同程度のバンドシフトが観察された (Fig. 2-7)。またそのサンプルにフォスファターゼを処理したところ、GST-CERK1(D441V)cyt と同位置にバンドが収束した。このことから、GST-CERK1(S493A)cyt でみられたバンドシフトは自己リン酸化によるものであることが示された。このことから、GST-CERK1(S493A)cyt は、GST-CERK1cyt と同程度の自己リン酸化活性をもつことが示された。また抗ホスホセリン抗体、抗ホスホチロシン抗体で検出したデータでも、抗 GST 抗体で検出したデータと同様の結果が得られた。従って S493 は CERK1 の自己リン酸化に関与しないことが *in vitro* の解析から示された。

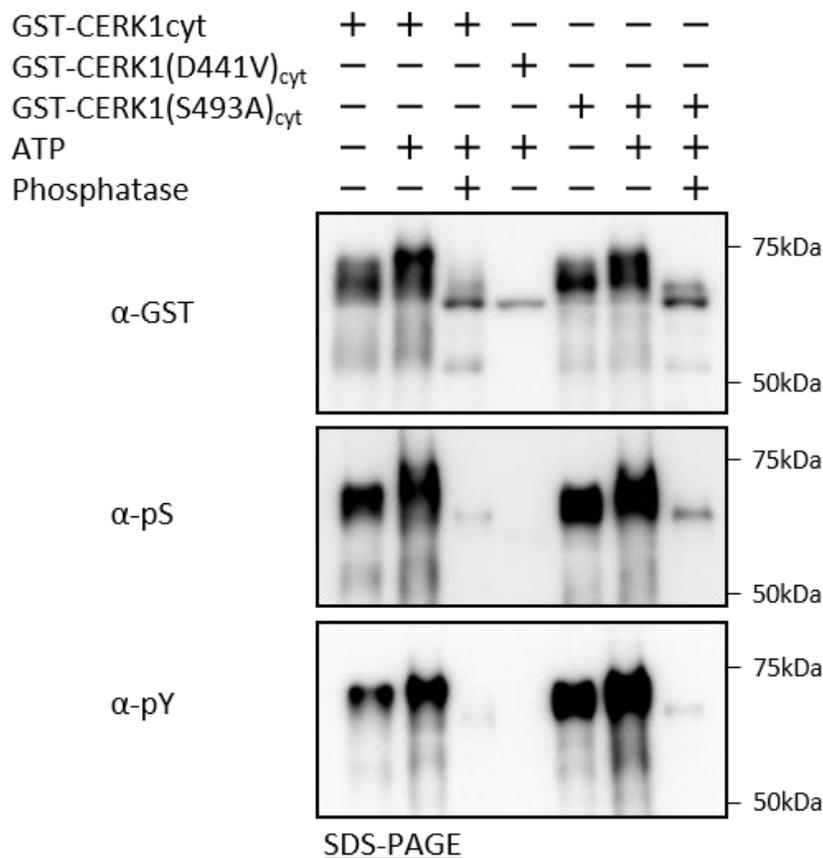


Fig. 2-7 *in vitro* キナーゼアッセイによる S493 の機能評価

大腸菌発現系を利用して発現、調製した GST-CERK1_{cyt}、GST-CERK1(D441V)_{cyt}、GST-CERK1(S493A)_{cyt} に対してリン酸化反応およびフォスファターゼ処理を行った。SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング後の転写膜を、抗 GST 抗体 (α-GST)、抗ホスホセリン抗体 (α-pS)、抗ホスホチロシン抗体 (α-pY) で処理し、各 CERK1 タンパク質および特定のアミノ酸残基のリン酸化状態を検出した。

8. *in vivo* 発現タンパク質を用いた CERK1 の S493 の機能解析

大腸菌発現タンパク質を用いた *in vitro* のキナーゼアッセイから、S493 のリン酸化が *in vivo* においても CERK1 の自己リン酸化能に関与しないのかどうかを明らかにするため、上記で行った Y428 の *in vivo* 解析と同様に実験を S493 についても行った。

その結果、CERK1-3HA 及び CERK1(S493A)-3HA の両サンプルは、ともに同位置に同程度のバンドシフトが確認された (Fig. 2-8)。一方、キナーゼ活性をもたない CERK1(D441V)-3HA ではバンドのシフトが観察されなかった。これらのことから、CERK1(S493A)-3HA と CERK1-3HA で同程の自己リン酸化が確認され、*in vivo* においても S493 のリン酸化が CERK1 の自己リン酸化に関わらないことが示された。

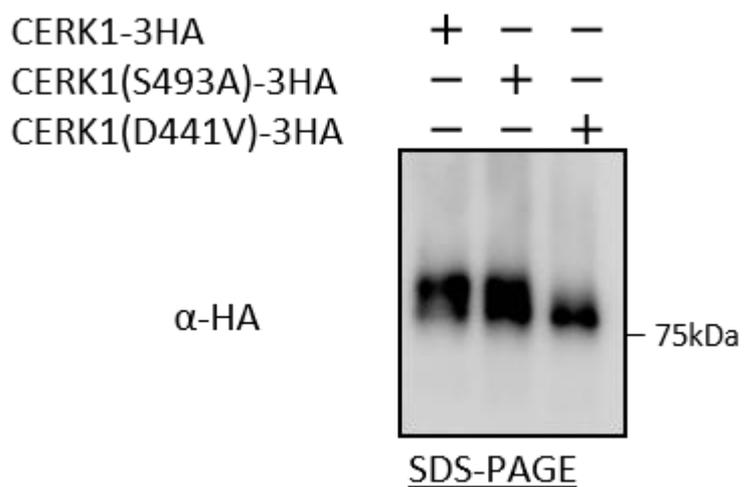


Fig. 2-8 ベンサミアナタバコ一過的発現系を用いた S493 の機能解析

アグロインフィルトレーションによって、ベンサミアナタバコの葉に CERK1-3HA、CERK1(D441V)-3HA、CERK1(S493A)3-HA を一過的に発現させ、膜画分中の CERK1 の自己リン酸化を評価した。抽出した膜画分は SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングを行い転写膜にタンパク質を移し、抗 HA 抗体 (α-HA) で検出した。

9. CERK1 による直下のシグナル伝達因子のリン酸化評価系の構築

前述の解析から、S493 のリン酸化が CERK1 の自己リン酸化能に関与しないことが示唆された。そこで、S493 のリン酸化が CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化に関わる可能性が考えられた。その可能性を評価するため、*in vitro* キナーゼアッセイ系を用いて、GST-CERK1(S493A)cyt による CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化を解析することとした。

その解析にあたり、まずは GST-CERK1cyt が CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子をリン酸化するかについて検討した。解析に用いた CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子である PBL27 (67) および PUB4 (Desaki et al., *in prep*) は、大腸菌発現系を利用して PBL27 の N 末端側に Strep タグを融合した Strep-PBL27 と、PUB4 の C 末端側に Strep タグを融合させた PUB4-Strep を調製した。GST-CERK1cyt によるこれらの因子のリン酸化は、反応後のサンプルを、Phos-tag ゲルを用いて SDS-PAGE で分離し、抗 Strep 抗体で目的タンパク質を検出したときのバンドシフトから評価した。また、それぞれのローディングコントロールとして GST-CERK1cyt を抗 GST 抗体で検出した。PBL27 はキナーゼ活性をもつため、反応中に自己リン酸化しないように、112 番目のリジン (K) 残基をグルタミン (E) 酸残基に改変した。また、解析に用いる Strep-PBL27(K112E) および PUB4-Strep は、あらかじめ予測質量である 55 kDa および 100 kDa 付近に検出されることがわかっている。

ATP 非存在下で GST-CERK1cyt と Strep-PBL27(K112E) とを反応させたところ、Strep-PBL27(K112E) のバンドシフトが見られなかったが、ATP 存在下で反応させたサンプルでは、Strep-PBL27(K112E) が高質量側にバンドシフトすることが観察された (Fig. 2-9)。また、このサンプルをフォスファターゼで処理すると、Strep-PBL27(K112E) は、ATP 非存在下で GST-CERK1cyt と反応させた Strep-PBL27(K112E) と同程度の位置にバンドが確認された。このことから、Strep-PBL27(K112E) は GST-CERK1cyt によってリン酸化され、バンドシフトしたことが示された。一方、ATP 存在下でキナーゼ活性を持たない GST-CERK(D441V)cyt と Strep-PBL27(K112E) とを反応させても、Strep-PBL27(K112E) のバンドのシフトが確認されなかった。これらの結果から、GST-CERK1cyt が Strep-PBL27(K112E) をリン酸化する能力を持つことが示された。これと同様な実験を PUB4-Strep に対しても行った結果、GST-CERK1cyt が PUB4-Strep を ATP 依存的にリン酸化することが確認された。

したがって、この方法で、GST-CERK1_{cyt} によるシグナル伝達因子のリン酸化を評価
できることが示された。

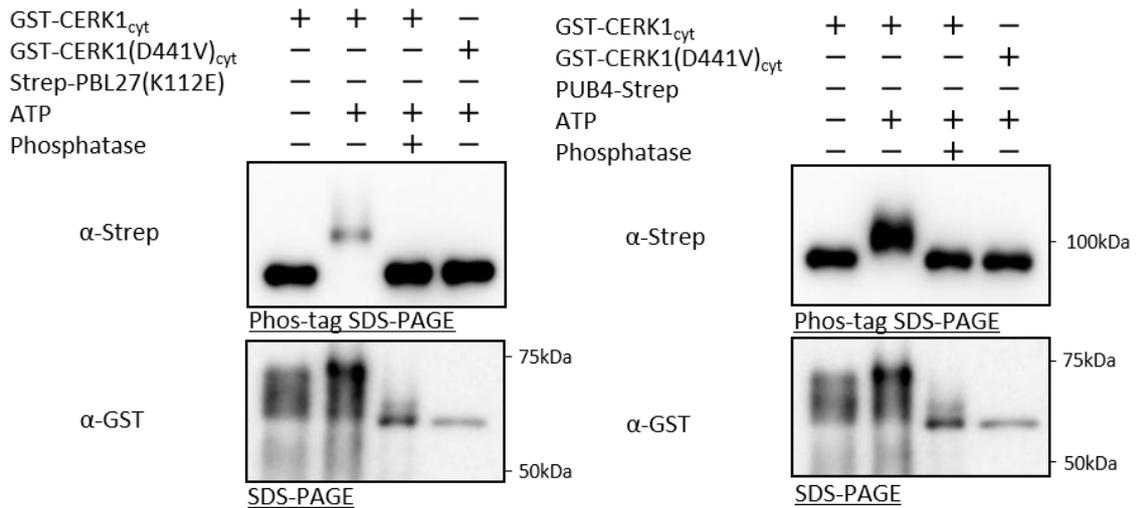


Fig. 2-9 *in vitro* キナーゼアッセイ系を用いた CERK1 によるシグナル伝達因子のリン酸化評価系の構築

大腸菌発現系を利用して調製した GST-CERK1_{cyt}、GST-CERK1(D441V)_{cyt}、Strep-PBL27(K112E)、PUB4-Strep を用いて、CERK1 による PBL27 および PUB4 のリン酸化を評価した。リン酸化反応およびフォスファターゼ処理を行い、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング後の転写膜を抗 Strep 抗体 (α-Strep)、抗 GST 抗体 (α-GST) で検出した。基質の検出では、Phos-tag ゲルを用いた。

10. シグナル伝達因子のリン酸化を指標にした CERK1 の S493 の機能解析

前述の実験系を用いて、GST-CERK1cyt の S493 をアラニン残基置換した GST-CERK1(S493A)cyt による 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することにした。さらに、S493 をアスパラギン酸残基に置換し、擬似リン酸化させた GST-CERK1(S493D)cyt についても、同様の解析を行うことにした。

ATP 非存在下で GST-CERK1cyt と Strep-PBL27(K112E)を反応させた結果、Strep-PBL27(K112E)のタンパク質のバンドシフトは確認されないが、ATP 存在下で両タンパク質を反応させると、Strep-PBL27(K112E)のリン酸化によるバンドのシフトが確認された (Fig. 2-10)。一方、ATP 存在下で GST-CERK1(S493A)cyt と Strep-PBL27(K112E)とを反応させたサンプルでは、Strep-PBL27(K112E)のバンドシフトが GST-CERK1cyt と反応させたものと比較して低下していた。このことから、CERK1 の S493 をリン酸化できない GST-CERK1cyt では、Strep-PBL27 のリン酸化能が低下することが示され、S493 が PBL27 のリン酸化に関わることを示唆された。また、CERK1 の S493 をアスパラギン酸残基に置換した GST-CERK1(S493D)cyt による Strep-PBL27(K112E)のリン酸化評価では、Strep-PBL27(K112E)のバンドシフトが、GST-CERK1cyt と反応させたものと同程度であった。したがって、S493 の擬似的リン酸化で CERK1 の S493 の機能が相補されることが示された。PUB4-Strep に対しても同様の解析を行ったところ、PBL27 に対するリン酸化評価の結果と一致する結果が得られ、CERK1 の S493 のリン酸化が CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化に関わることを示された。

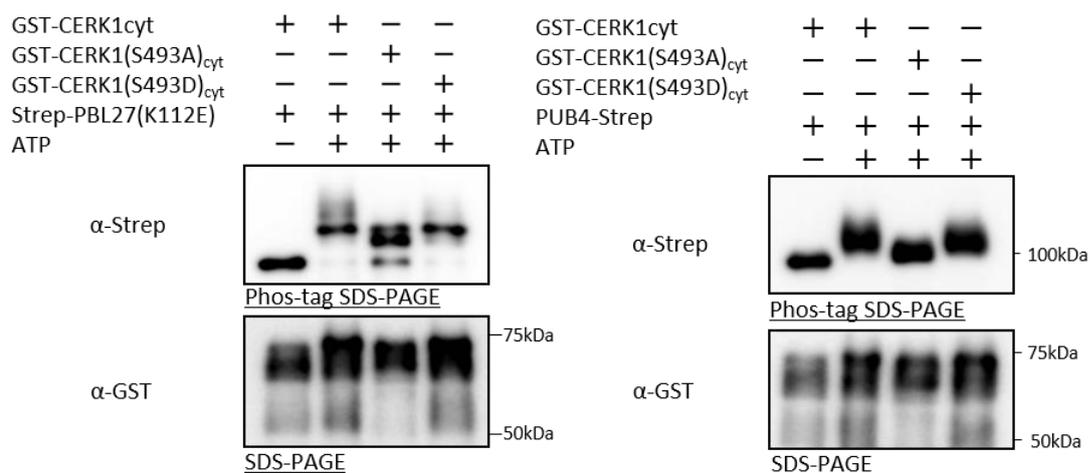


Fig. 2-10 *in vitro* キナーゼアッセイ系を用いた S493 が CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化に与える影響の評価

大腸菌発現系を利用して発現、調製した GST-CERK1_{cyt}、GST-CERK1(S493A)_{cyt}、GST-CERK1(S493D)_{cyt}、Strep-PBL27(K112E)および PUB4-Strep を用いて、CERK1 による PBL27 および PUB4 のリン酸化を評価した。リン酸化反応およびフォスファターゼ処理を行い、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティング後の転写膜を抗 Strep 抗体 (α-Strep)、抗 GST 抗体 (α-GST) で検出した。基質の検出には Phos-tag ゲルを用いた。

11. CERK1 の S493 が自己リン酸化モードに与える影響の評価

in vivo/in vitro の解析から、S493 をアラニン残基置換した CERK1 では自己リン酸化能に影響が見られないことから、S493 は CERK1 の自己リン酸化に関与しないことが示唆された (Fig. 2-7, 8)。一方、CERK1 は分子間でリン酸化し合うことで、自己リン酸化することがわかっているため、S493 をアラニン残基置換した CERK1 では、他の CERK1 分子のトランスリン酸化に影響を与えないことが想定される。そこで、大腸菌発現系を利用して調製した GST-CERK(S493A)cyt と CERK(D441V)cyt の N 末端側に 6×His タグを融合した 6His-CERK1(D441V)cyt を用いて、自己リン酸化モードについて解析を行うことにした。また、S493 をアスパラギン酸残基 (D) に置換した GST-CERK(S493D)cyt でも同様の解析を行った。6His-CERK1(D441V)cyt のリン酸化は、反応試料を Phos-tag ゲルを用いて SDS-PAGE・ウエスタンブロットティングし、抗 6×His タグ抗体で検出することで、そのバンドのシフトを観察し評価した。バンドシフトの比較として、GST-CERK1cyt と 6His-CERK1(D441V)cyt も用いている。それぞれの GST-CERKcyt タンパク質量は、抗 GST 抗体で確認した。

その結果、ATP 非存在下で GST-CERK1cyt と 6His-CERK1(D441V)cyt とを反応させた場合では、6His-CERK1(D441V)cyt のタンパク質バンドのシフトは確認されないが、ATP 存在下で両タンパク質を反応させた場合では、6His-CERK1(D441V)cyt の高質量側へのバンドシフトが確認された (Fig. 2-11)。GST-CERK(S493A)cyt と 6His-CERK1(D441V)cyt を ATP 存在下で反応させたサンプルでは、6His-CERK1(D441V)cyt のバンドシフトが、GST-CERK1cyt と反応させたものと比較して低下していた。このことから、S493 が CERK1 間のトランスリン酸化に関わることを示唆された。GST-CERK1(S493D)cyt と 6His-CERK1(D441V)cyt を共存下でリン酸化反応させたサンプルでは、6His-CERK1(D441V)cyt のバンドシフトが、GST-CERK1cyt でリン酸化させたものと同程度であった。したがって CERK1 の S493 を疑似リン酸化置換した CERK1 では、CERK1 間のトランスリン酸化能が復帰することが観察された。以上の結果から、S493 のリン酸化が CERK1 間のトランスリン酸化能に関わることを示された。

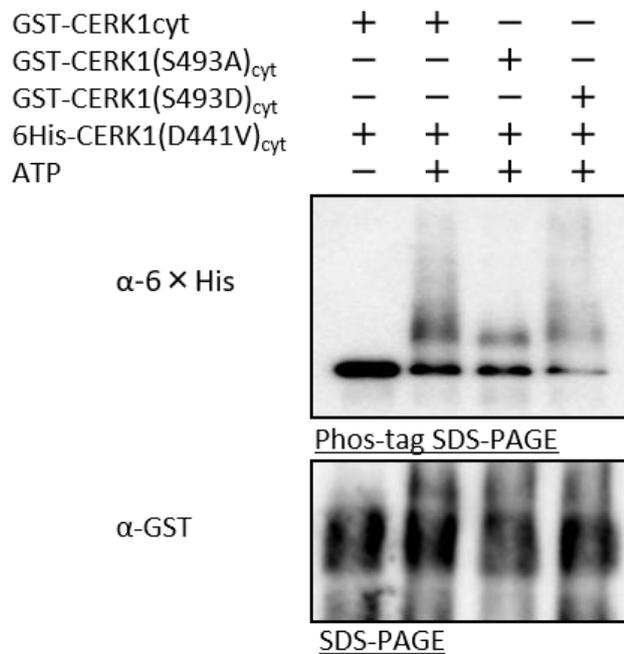


Fig. 2-11 *in vitro* キナーゼアッセイ系による S493 が自己リン酸化モードに与える影響の評価
 大腸菌発現系を用いて発現、調製した GST-CERK1_{cyt}、GST-CERK1(S493A)_{cyt}、GST-CERK1(S493D)_{cyt} および 6His-CERK1(D441V)_{cyt} を用いて、CERK1 による基質 CERK1(D441V)のリン酸化を評価した。リン酸化反応およびフォスファターゼ処理を行い、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング後の転写膜を抗 6×His 抗体 (α-6×His) 、抗 GST 抗体 (α-GST) で検出した。基質の検出では、Phos-tag ゲルを用いた。

第4節 考察

本章では第一章の生物学的機能解析でキチン応答に関わることが示されたリン酸化部位について、その生化学的機能を大腸菌発現系で調製した CERK1 細胞内ドメインあるいは全長 CERK1 を用いて解析した。

第一章で示したように、シロイヌナズナの *CERK1(T479A)/cerk1-2* 形質転換体に対してキチンオリゴ糖を処理したところ、活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導の復帰が消失したことから (Fig. 1-9, 2-12)、CERK1 の 479 番目のスレオニン残基が CERK1 のシグナル伝達の起動に不可欠なことが示唆された。また、T479 はキナーゼの活性制御に関わる Activation Segment 上のスレオニン残基で、RLK において高度に保存されることがわかっている (77, 105)。BAK1 および NFR1 では、T479 と対応するスレオニン残基がキナーゼの活性制御に関わることが示されており、CERK1 の T479 もキナーゼの活性制御に関与することが想定された (Fig. 2-1) (73, 77)。

大腸菌発現系を利用して GST-CERK1(T479A)cyt を調製し ATP 存在下で自己リン酸化および MBP のリン酸化を評価したところ、野生型の GST-CERK1cyt と比較して自己リン酸化のバンドシフトが著しく低下し、MBP に対するリン酸化能は消失した (Fig. 2-1)。このことから、T479 がリン酸化できない CERK1 ではキナーゼ活性の著しい低下が確認され、T479 がキナーゼの活性化に関わるリン酸化部位であることが明らかになった。BAK1 細胞内ドメインの立体構造解析では、T479 に対応するスレオニン残基が ATP の結合に関わるアミノ酸側鎖と相互作用することで、キナーゼ活性を制御することが示されており (75)、CERK1 の T479 においても ATP の結合に関わるアミノ酸側鎖と相互作用することで、キナーゼの活性を制御すると考えられる。

シロイヌナズナの *CERK1(T573A)/cerk1-2* 形質転換体に対して、キチンオリゴ糖を処理したところ活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導が極めてわずかに復帰した (Fig. 1-13, 2-12)。このことから、T573 は CERK1 を介したシグナル伝達に関わることが明らかになった。T573 は代表的な RLK に保存されるものの、CERK1 以外ではリン酸化部位として検出されていないスレオニン残基である (Fig. 1-16)。

大腸菌発現系を利用して調製した GST-CERK1(T573A)cyt を用いて ATP 存在下で自己リン酸化および MBP のリン酸化を評価したところ、野生型の GST-CERK1cyt と比

較して自己リン酸化によるバンドシフトが低下していた。また、MBP に対するリン酸化では、GST-CERK1(T573A)*cyt* による MBP のリン酸化の程度は GST-CERK1*cyt* のものと比較して低下することが観察された (Fig. 2-2)。これらのことから、T573 はキナーゼの活性化に関わる自己リン酸化部位であることが明らかになった。特に GST-CERK1(T573A)*cyt* の自己リン酸化によるバンドシフトに着目すると、GST-CERK1(T573A)*cyt* のリン酸化バンドの大半がある程度リン酸化されたバンドのところで止まってしまっており、T573 をアラニン残基置換した CERK1 では部分的に自己リン酸化が進むものの、それ以上のリン酸化はできないことが示唆された。そのため、CERK1 は、本来 T573 をリン酸化することで自己リン酸化を亢進させ、キナーゼを完全に活性化すると考えられた。

CERK1 細胞内ドメインの分子モデリングで T573 の位置を確認すると、T573 はキナーゼの活性制御に関わる Activation Segment とは離れているため (Fig.2-13)、この領域との相互作用でキナーゼの活性制御に関わると考えるのは困難である。一方、BAK1 では、細胞内ドメインの C 末端側がキナーゼの活性制御に関わることが示されており (106)、T573 も CERK1 の C 末端側に位置しているため、CERK1 においても C 末端側が何らかの機構でキナーゼ活性を制御し、そこに T573 が関わる可能性が考えられる。今後、CERK1 細胞内ドメインの立体構造が明らかにされることによって、T573 がどのようにしてキナーゼ活性を制御するかをより深く考察することが可能になるものと期待される。

一方、第 1 章で述べたように、*CERK1(T573A)/cerk1-2* 形質転換体の CERK1 タンパク質発現量を調べたところ、野生型の Col-0 よりも CERK1 の発現量が低いことが確認されている (Fig. 1-11)。そのため、T573 のアラニン残基置換による立体構造の不安定化により細胞内の品質管理機構によって分解され、タンパク質量が減った可能性も考えられた。しかし、本解析を通じて、大腸菌で発現させた GST-CERK1(T573A)*cyt* が他の GST-CERK1*cyt* と比べ可溶画分に回収されるタンパク質量が少ないということはなく、また、上記のように T573 がキナーゼの活性化に部分的に関わることが示されたことから、*CERK1(T573A)/cerk1-2* 形質転換体でみられたキチン応答のわずかな復帰は、タンパク質の発現量の問題よりも、キナーゼ活性制御のようなより本質的な問題によるものと考えられた。

CERK1 の Y428 は RLK に広く保存されたチロシン残基で、バクテリアの翻訳伸長因子である EF-Tu の受容体である EFR では Y428 に対応するチロシン残基 (Y836) が *in vivo* リン酸化部位として同定されている (91)。また、そのチロシン残基をフェニルアラニン残基置換した *EFR(Y836F)/efr* 形質転換体では、EFR を介した応答が完全に消失することが観察されている。大腸菌発現系を利用して調製した EFR(Y836F)の *in vitro* のキナーゼアッセイでは、野生型の EFR と同程度のキナーゼ活性を示しており、Y836 はキナーゼの活性に影響を与えないことが示されていた (91)。一方、植物体から抽出した EFR(Y836F)の *in vivo* キナーゼアッセイでは、野生型と比較してキナーゼの活性が低下しているようではあったがその差はわずかで、このデータを記載した論文ではキナーゼ活性制御との関わりについては議論されていなかった (91)。

シロイヌナズナの *CERK1(Y428F)/cerk1-2* 形質転換体に対して、キチンオリゴ糖を処理したところ活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導の復帰が消失したことから、Y428 がキチン応答に重要な役割を果たしていることが示唆された (Fig. 1-10, 2-12)。また、大腸菌発現系を利用して調製した GST-CERK1(Y428F)*cyt* を用いて ATP 存在下で自己リン酸化および MBP のリン酸化を評価したところ、GST-CERK1(Y428F)*cyt* の自己リン酸化によるバンドシフトおよび GST-CERK1(Y428F)*cyt* による MBP のリン酸化は野生型の GST-CERK1*cyt* のものと同程度で、Y428 は CERK1 のキナーゼの活性化に関与しないことが示唆された (Fig. 2-4)。一方、ベンサミアナタバコ過剰発現系を利用して調製した CERK1(Y428F)-3HA の *in vivo* リン酸化の解析では、自己リン酸化によるバンドシフトが消失した (Fig. 2-6)。そのため、この *in vivo* の結果からは Y428 がキナーゼの活性制御に関わることを示された。この結果は、EFR に対応するチロシン残基 (Y836) の役割を解析した結果と極めて類似しており (91)、CERK1 の Y428 と EFR の Y836 はいずれも *in vivo* でのキナーゼ活性制御に関わる可能性が考えられる。

EFR は、キナーゼの活性化に関わるアルギニンがなく、比較的キナーゼ活性が弱いとされる non-RD kinase に分類される一方 (18)、CERK1 は non-RD kinase と比較して高いキナーゼ活性を有する RD kinase に属することがわかってい (18, 103, 107)。そのため、CERK1 と EFR では異なるキナーゼの活性制御が行われていると考えられているが、Y428 の *in vivo* での解析結果から共通したチロシン残基のリン酸化を介してキナーゼ活性が制御される可能性が示された。現段階ではどのようにして Y428 がキナーゼ活性を制御するかは不明であるが、今後、CERK1 の細胞内ドメインタンパク質

の立体構造が明らかになることで、Y428 がどのようにしてキナーゼの活性化に関与するかをより深く考察することが可能になると期待される。

また、Y428 を擬似リン酸化状態にした CERK1(Y428D)-3HA、CERK1(Y428E)-3HA では、CERK1(Y428F)-3HA と比較してわずかに高質量側にバンドシフトしたことから、疑似リン酸化で Y428 の機能が一部相補されたことが示された (Fig. 2-6)。しかし、野生型の CERK1 と同程度のバンドシフトは確認されなかった。その理由としては、チロシン残基とアスパラギン酸残基、グルタミン酸残基の構造が大きく異なり、チロシン残基の疑似リン酸化として十分に機能しなかったためではないかと考えられる。BAK1 でキナーゼ活性に寄与することが知られる自己リン酸化部位の T455 をアスパラギン酸残基に置換しても、キナーゼ活性の亢進がみられないことが観察されており (73)、RLK の疑似リン酸化は必ずしもキナーゼの活性化につながらない場合があることも示唆されている。

Y428 の解析から *in vivo* のキナーゼアッセイの結果と *in vitro* のキナーゼアッセイの結果が異なることもあることが示された (Fig. 2-4, 6)。そのため、CERK1 の細胞内ドメインのみを用いた *in vitro* の評価だけでは、リン酸化部位の機能を正しく理解することが難しいことも示された。CERK1 細胞内ドメインタンパク質を用いた *in vitro* のキナーゼアッセイは、溶液中に分散した CERK1 細胞内ドメインタンパク質で反応が進む一方、*in vivo* の細胞膜に固定化された CERK1 では CERK1 間の自己リン酸化・活性化機構がこうした *in vitro* の実験とは異なる可能性があるため、こうした結果の違いが生じたのではないかと考えられる。

CERK1(T473A)/cerk1-2 形質転換体を用いた生物学的解析では、キチンオリゴ糖による活性酸素生成が *cerk1* 変異体と比較してわずかに復帰したものの、防御応答関連遺伝子の 1 つである *AtWRKY53* の発現誘導には影響がみられないことが確認されている (Fig. 1-13, 2-12)。T473 は Activation Segment に位置しているが、キナーゼ間で保存性の低い領域に存在しており、実際に他の RLK と比較しても保存性が低いことがわかっている (Fig. 1-16)。しかし、BAK1 および NFR1 のホモログであるタルウマゴヤシの LYK3 では T473 と類似する位置のスレオニン残基が、キナーゼ活性の制御に部分的に関与することが示されているため、T473 もキナーゼ活性制御に関与する可能性が考えられた (73, 102)。大腸菌発現系を利用して調製した GST-CERK1(T473A)cyt を用いて ATP 存在下で自己リン酸化および MBP (Myelin Basic Protein) のリン酸化を評

価したところ、GST-CERK1(T473A)cyt の自己リン酸化によるバンドシフトおよび MBP に対するリン酸化は野生型の GST-CERK1cyt と比較して同程度であった (Fig. 2-3)。そのため T473 は CERK1 のキナーゼの活性制御には関わらないと考えられ、BAK1、LYK3 の T473 に対応するスレオニン残基とは異なる機能を有している可能性が考えられた。しかし、BAK1、LYK3 のリン酸化部位の解析ではキナーゼ活性の測定に放射性同位体を用いており、バンドシフトを指標にした本解析よりも高感度にリン酸化を評価できる (73, 102)。こうした実験系の違いによって GST-CERK1(T473A)cyt でキナーゼの活性制御に影響がみられなかった可能性も否定できない。RLK のリン酸化部位の機能解析では、Activation Segment 上のシグナル伝達に関わるアミノ酸残基はすべてキナーゼの活性制御に関わることが報告されており (73, 77, 102)、そうした点から考えると T473 もキナーゼの活性制御に関わる可能性があるものと推測される。

CERK1(S493A)/cerk1-2 形質転換体を用いた生物学的解析では、野生型と比較してキチンオリゴ糖処理時の活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導の復帰がわずかであった (Fig. 1-14, 2-12)。S493 は代表的な RLK で高い割合で保存されるアミノ酸残基であるが、他の RLK でリン酸化部位として同定された例はなく、アラインメント比較では機能が推定できないリン酸化部位である (Fig. 1-16)。大腸菌発現系を利用して調製した GST-CERK1(S493A)cyt の *in vitro* のキナーゼアッセイおよび、ベンサミアナタバコ一過的発現系を利用して調製した CERK1(S493A)-3HA の *in vivo* のキナーゼアッセイでは、S493 のアラニン残基置換体で、野生型の CERK1 と同程度の自己リン酸化のバンドシフトが示され、S493 はキナーゼの活性制御には関わらないことが示唆された (Fig. 2-7, 8)。そこで、このリン酸化部位の置換が CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子である PBL27 および PUB4 のリン酸化に影響するかを、GST-CERK1(S493A)cyt を用いた *in vitro* キナーゼアッセイで評価した。その結果、GST-CERK1(S493A)cyt は、野生型の GST-CERK1cyt と比較して、これらのシグナル伝達因子のリン酸化が低下した (Fig. 2-10)。また、S493 を疑似リン酸化状態にした GST-CERK1(S493D)cyt では、PBL27、PUB4 のリン酸化が野生型と同程度まで復帰した。これらの結果から、S493 のリン酸化は、CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化に関わることが示唆された。

また、S493 をアラニン残基に置換した CERK1(S493A)を用いた解析から、CERK1 のキナーゼの活性制御に影響が見られないことから、CERK1(S493A)は CERK1 同士

の分子間リン酸化にも影響を与えないことが考えられた。そこで、大腸菌発現系を利用して調製した GST-CERK1(S493A)cyt とキナーゼ活性を持たない Strep-CERK1(D441V)cyt を用いてリン酸化モードの解析を行ったところ、予想に反して GST-CERK1(S493A)cyt による Strep-CERK1(D441V)cyt のリン酸化は、GST-CERK1cyt によるものよりも低下した (Fig. 2-11)。そのため、S493 は CERK1 の分子間リン酸化に関わるリン酸化部位である可能性も示唆された。このことから、分子間リン酸化能が低下する CERK1(S493A)で、なぜ野生型の CERK1 と同程度の自己リン酸化を示したかという疑問が提起された。その考察の一つとして、CERK1 の自己リン酸化モードの変化を考えている。動物のキナーゼの中には、2 量体化に伴い、分子内で自己リン酸化したのち、分子間で自己リン酸化することで活性化する分子も知られている(108)。そこで、CERK1 も本来は、分子内でリン酸化したのち、分子間で自己リン酸化する分子で、S493 がリン酸化できない CERK1(S493A)でも、分子内自己リン酸化によって大部分をリン酸化できたため、野生型の CERK1 と同程度の自己リン酸化を示したのではないかと考えている。CERK1(S493A)では、分子間リン酸化ができないことの間接的な影響として、CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化の低下につながったのではないかと考えている。S493 についての上記の結果やその考察、また、立体構造解析や更なる生化学的解析を通じて、S493 の機能が明らかになると期待している。更なる解析として、まずは、S493 をアラニン残基置換した CERK1(S493A)を用いた CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化の低下が、そのシグナル伝達因子の活性化に関わるかを明らかにすることを計画している。また、このリン酸化部位がタンパク質間相互作用に関わる可能性を考えて、CERK1 とその直下のシグナル伝達因子との相互作用を解析することを計画している。

	T479A	T573A	T473A	Y428F	S493A
キチン応答	復帰なし	わずかに復帰	わずかに復帰	復帰なし	わずかに復帰
キナーゼ活性 (in vitro)	消失	低下	野生型と同程度	野生型と同程度	野生型と同程度
キナーゼ活性 (in vivo)	-	-	-	消失	野生型と同程度

Fig. 2-12 それぞれのリン酸化部位置換体を用いた表現型

それぞれのリン酸化部位を置換した CERK1 でみられた表現型をまとめたものを示している。

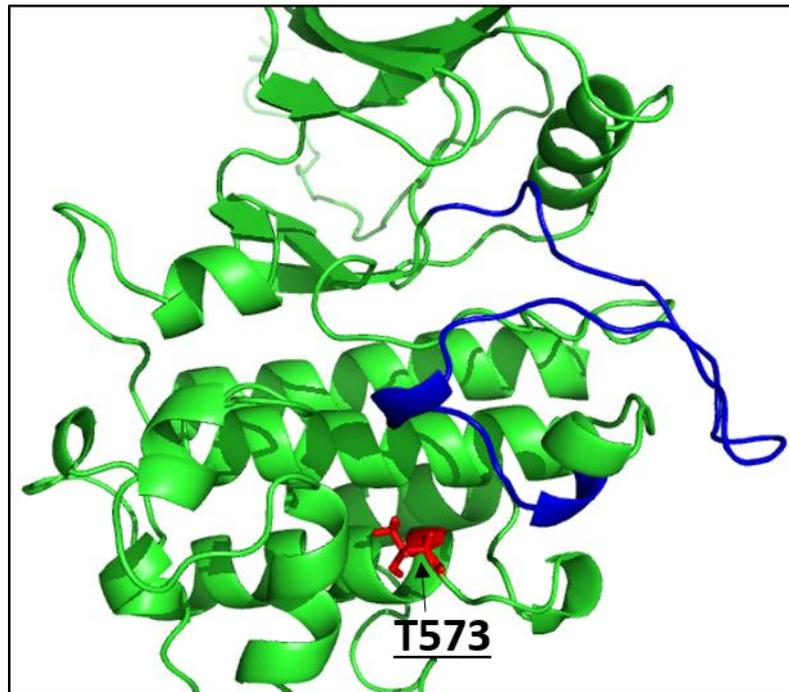


Fig. 2-13 CERK1 細胞内ドメインの分子モデル

ヒトのキナーゼである IRAK-4 と BAK1 の細胞内ドメインの立体構造に基づいて、MODELLER 9v12 で CERK1 の細胞内ドメインのモデリングをおこなった。赤色部分は、T573 残基、青色は Activation Segment を示している。

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 1 節 緒論

第 1 章および第 2 章では、CERK1 細胞内ドメインの自己リン酸化に着目して、CERK1 のシグナル伝達起動メカニズム理解を目指し解析を行った。その結果、CERK1 細胞内ドメインの 5 つのアミノ酸残基が自己リン酸化されることで CERK1 が活性化し、CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子をリン酸化できるようになることが示された (92)。しかし、どのようにしてそれぞれの自己リン酸化で CERK1 のキナーゼ活性が制御されるのか、また、CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化・活性化が可能になるかについてはわかっていない。

キナーゼは自己リン酸化とそれに伴う構造変化で相乗的に活性化し、シグナル伝達を制御することが一般的に知られている (103, 109)。また、キナーゼの立体構造が、キナーゼに直接相互作用するシグナル伝達因子との相互作用や、キナーゼの基質特異性に関わることも知られている。そのため CERK1 についても、それぞれのアミノ酸残基の自己リン酸化で、構造変化を誘導し、キナーゼの活性化と並行して CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子をリン酸化できるようになると考えられる。

タンパク質の X 線結晶構造解析では、タンパク質の立体構造とタンパク質を構成するアミノ酸側鎖間の相互作用を明らかにすることができる。そのため、CERK1 の細胞内ドメインの X 線結晶構造解析を行うことで、シグナル伝達に関わる自己リン酸化部位がどのアミノ酸側鎖と相互作用し、立体構造を変化させキナーゼの活性化を導くのか、また、どのようにシグナル伝達因子のリン酸化やリクルートに関わる領域が形成されるかを明らかにすることができるだろうと考えた。

そこで、本章では X 線結晶構造解析に用いるための CERK1 細胞内ドメインタンパク質の結晶サンプルを得るため、大腸菌発現系とアフィニティークロマトグラフィー精製を用いて高純度な CERK1 細胞内ドメインタンパク質の調製系の確立を目指した。

第2節 実験方法

1. コンストラクトの作製

1). GST-CERK1(D441V)cyt-6His 発現コンストラクトの作製

GST-CERK1(D441V)cyt-6His 発現コンストラクトは、終止コドンを含まない CERK1(D441V)cyt が導入されたエンタリークローンを LR 反応で pET60 (Novagen) に導入して作製した。

2). MBP-CERK1(D441V)cyt-6His 発現コンストラクトの作製

pMAL-p2 (NEB) ベクターを鋳型にして、下記プライマー (MBP タグ) で PCR を行い、MBP タグの DNA 断片を増幅した。また、pDEST15 (Life technologies) ベクターを鋳型にして、下記プライマー (pDEST15) でインバース PCR を行った。それら、DNA 断片を用いて in-fusion (TAKARA) 反応を行い、MBP タグが挿入された pDEST15(MBP)ベクターを構築した。一方、CERK1(D441V)cyt が挿入されたエンタリークローンを LR 反応で pDEST42 (Life technologies) に導入した。そのデスティネーションクローンに対して下記プライマー (CERK1cyt-6His) で PCR を行い、CERK1(D441V)cyt-6His の DNA 断片を増幅し、TOPO 反応で、pENTR/D-TOPO に導入した。そのエンタリークローンと pDEST15(MBP)で LR 反応を行い、デスティネーションクローンを構築した。方法の詳細は 1 章を参照されたい。

	Fwd	プライマー名	プライマー配列
	Rev		
MBP タグ	Fwd	MBP F	GAAGGAGATATACATATGAAAATCGAAGAA GGTAAACT
	Rev	MBP R	TTGATTCGACCATGGCCTTCCCTCGATCCC GAG
pDEST15	Fwd	pDEST15 F	CCATGGTCGAATCAAACAAGT
	Rev	pDEST15 R	ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAA
CERK1cyt -6His	Fwd	CERK1-C F	CACCTATGCTTACCGGAAGAATAAGTCGAA
	Rev	6His R	TCAATGGTGATGGTGATGATGA

2. MBP タグ融合タンパク質の精製

MBP-CERK1(D441V)cyt-6His のデスティネーションクロンが形質転換された BL21-AI 株の大腸菌を培養し、最終濃度が 0.2%になるようにアラビノースを添加し、15℃、16 時間で発現を誘導した。超音波破碎、遠心による不溶性画分の分離後、4 ml の Dextrin Sepharose High Performance カラム (GE) で精製した。洗い作業は MBP バッファー (20 mM Tris、200 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、1 mM DTT pH 7.4) で行った。溶出は 20ml の溶出バッファー (20 mM Tris、200 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、1 mM DTT、10 mM マルトース pH 7.4) で行った。

3. Thrombin 処理による MBP タグの切断条件

大腸菌発現系を利用して調製した 100 μ g の目的タンパク質に対して、Thrombin を 4 units 添加し 25℃で、12 時間反応した。反応液は最終濃度が 140 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM リン酸ナトリウム、1.8 mM リン酸二水素カリウム、pH 7.3 になるように調製した。その後、20000 \times g、4℃で 10 分間遠心を行い、凝集画分と可溶性画分を分離した。

4. 精製タンパク質の結晶化条件の検討法

Hampton Research 社の Index HT および、EmeraldBiosystems 社の Cryo 1 & 2 - 96 Well、Wizard Classic 1 & 2 - 96 Well を用いて、添付プロトコルに従い操作した。ただし、添加した CERK1(D441V)cyt-6His は約 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。20°C で 2 カ月間静置した。

第 3 節 実験結果

CERK1 の細胞内ドメイン (CERK1_{cyt}) の自己リン酸化による制御機構および CERK1 タンパク質の構造の特徴を構造生物学的に明らかにすることを目指し、CERK1_{cyt} の X 線結晶構造解析を行うことにした。この解析においては、CERK1_{cyt} の結晶用試料を作る必要があり、そのためには高純度かつ大量の均一な CERK1_{cyt} タンパク質を調製しなければならない。そこで、第 1 章および第 2 章で大腸菌発現系を用いてタンパク質を調製した経験から、その系を用いて試料の調製を行うことにした。第 1 章および第 2 章の結果からもわかるように、大腸菌内でキナーゼ活性を有する CERK1_{cyt} を発現させると、CERK1 は不均一な自己リン酸化をしてしまうため、CERK1_{cyt} を均一なタンパク質として得ることができないことが明らかである。そこで、自己リン酸化が起きないキナーゼ不活性型の CERK1(D441V)_{cyt} を結晶化試料として用い、均一な目的タンパク質の作製を試みることにした。また高純度な発現タンパク質を得るために、種々のアフィニティータグを付加した試料の作製とその精製方法もあわせて検討した。

1. GST-CERK1(D441V)cyt-6His タンパク質の精製と評価

タンパク質の純度の高い CERK1(D441V)cyt の調製を目指し、2 段階のアフィニティークロマトグラフィーによる精製を行うことを考え、CERK1cyt の N 末端側に GST (Glutathione S-transferase) タグを、C 末端側に 6×His タグを付加した GST-CERK1(D441V)cyt-6His を大腸菌発現系で調製することにした。

本実験では、GST-CERK1(D441V)cyt-6His 発現用コンストラクトを導入した大腸菌の培養液に、タンパク質発現誘導剤であるアラビノース（最終濃度が 0.2%）に添加し、15℃、16 時間培養した。大腸菌を集菌し、超音波で破碎後、遠心分離により得られた上清画分は、GSTrap カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。GSTrap カラムから溶出したサンプルは、種々のタンパク質濃度で SDS-PAGE し、CBB 染色によりタンパク質を検出、または抗 GST 抗体 (α -GST) で検出することで、その精製度と回収量を評価した。

GST-CERK1(D441V)cyt-6His は、予測質量 69 kDa の付近にタンパク質バンドが確認されると期待された (Fig. 3-1)。しかし CBB 染色後の結果から、目的タンパク質の近傍の質量に複数のタンパク質バンドが観察された。また、それ以外にも多くの夾雑タンパク質の存在が確認された。そこで、目的タンパク質を特定するため、CBB 染色および抗 GST 抗体で検出した結果を突き合せたところ、矢印で示したバンドが GST-CERK1(D441V)cyt-6His であることを確認した。また、37 kDa 以下の質量のタンパク質バンドが、抗 GST 抗体で検出されることから GST-CERK1(D441V)cyt-6His の分解産物である可能性が考えられた。CBB 染色の結果で見られた目的タンパク質の直下にあるタンパク質は、大腸菌由来の夾雑タンパク質であると考えられた。また、BSA (ウシ血清アルブミン) を用いたタンパク質量のキャリブレーションから、1000 mL の LB 培地当たり GST-CERK1(D441V)cyt-6His が約 200 μ g 回収できたことがわかった。しかし、本 CBB 染色の結果で見られるように、上記の方法で調製したサンプルでは、夾雑タンパク質が多く検出されたため、この方法で十分な純度の GST-CERK1(D441V)cyt-6His を調製できないと考え、異なるベクターの構築を検討した。

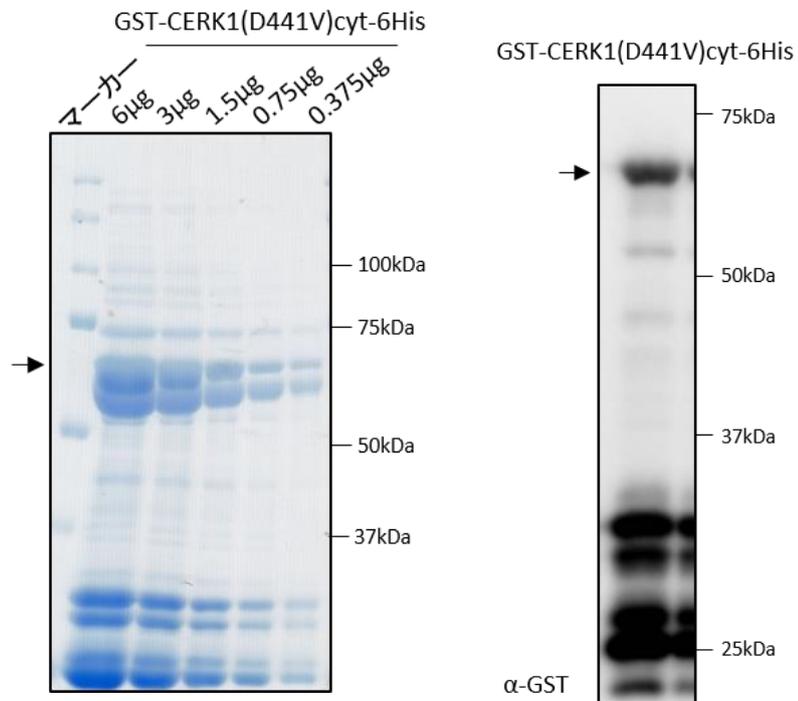


Fig. 3-1 GST-CERK1(D441V)cyt-6His の精製度の評価

大腸菌で発現、GST カラムで精製した GST-CERK1(D441V)cyt-6His を電気泳動後、CBB 染色および抗 GST 抗体 (α -GST) で検出した。矢印は、GST-CERK1(D441V)cyt-6His を示した。

2. MBP-CERK1(D441V)cyt-6His タンパク質の精製と評価

新たな発現ベクターを構築するにあたり、2016 年度修士課程修了生である小泉春樹が、大腸菌発現系で MBP (maltose binding protein) タグを付加したタンパク質を発現させ、MBPtrap (GE) カラムで調製したところ、高純度かつ大量のタンパク質が回収できることを見出した。そこで、GST タグの代わりに MBP タグを付加した MBP-CERK1(D441V)cyt-6His タンパク質を大腸菌発現系で発現させたのち、上記と同様な方法で集菌した大腸菌を破碎し、遠心分離により得られた可溶性画分を MBPtrap カラムによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。精製タンパク質は SDS-PAGE で分離した後、CBB 染色により、目的タンパク質の回収量と純度を評価した。

その結果、Fig. 3-2 に示すように、MBP-CERK1(D441V)cyt-6His の予測された質量 86 kDa 付近にタンパク質バンドを確認した。また、BSA のキャリブレーションを用いて算出した結果、1000 mL の LB 培地あたりに約 1~1.5 mg の MBP-CERK1(D441V)cyt-6His タンパク質を調製することができた。精製した MBP-CERK1(D441V)cyt-6His は純度が高く、さらに高収量であるため、本タンパク質を結晶化試料として用いることとした。

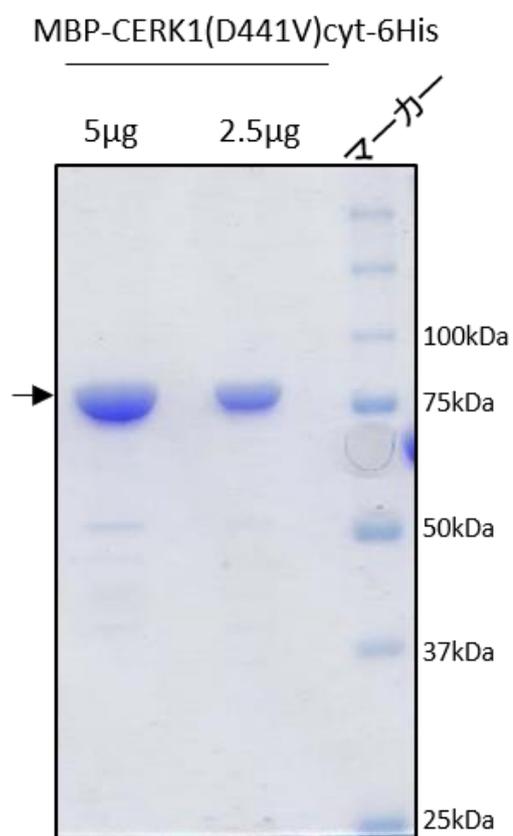


Fig. 3-2 MBP-CERK1(D441V)cyt-6His の精製度の評価

大腸菌で発現、MBP カラムで精製した MBP-CERK1(D441V)cyt-6His を電気泳動後、CBB 染色で検出した。矢印は、MBP-CERK1(D441V)cyt-6His を示す。

3. Thrombin プロテアーゼによる MBP タグの切断とその影響

タンパク質の結晶化において、質量の大きなタグは、目的タンパク質の結晶化の妨げになる可能性がある。MBP-CERK1(D441V)cyt-6His では CERK1(D441V)cyt が質量 41 kDa であるのに対し、MBP タグは目的タンパク質と非常に近い質量である 43 kDa であり、また 6×His タグは 1 kDa である。このため、MBP タグは、CERK1(D441V)cyt-6His の結晶化を行うには取り除く必要があると考えられる。

そこで本実験では、MBP-CERK1(D441V)-6His の MBP と CERK1cyt との間に Thrombin プロテアーゼ (以下、Thrombin) 切断サイトを挿入したベクターを構築し大腸菌に導入した。大腸菌で発現させ精製した目的タンパク質が Thrombin で切断されるかどうかについて検討した。Thrombin による MBP タグの切断は、市販酵素に添付されたプロトコルを参考に、100 µg の MBP-CERK1(D441V)cyt-6His に Thrombin (4 units) を添加し、25°C で、12 時間反応させた。その結果、Thrombin を添加したサンプルは、白濁した沈殿が確認されたため、Thrombin 処理後のサンプルを遠心分離し、上清画分と沈殿画分に分けた。それらサンプルは SDS-PAGE・ウエスタンブロッティング後、目的タンパク質は抗 6×His 抗体で検出した。一方、MBP-CERK1(D441V)cyt-6His の Thrombin 非処理の試料も同様に調製し、これをコントロールとして用いた。

その結果、MBP-CERK1(D441V)cyt-6His を Thrombin 処理した後の可溶性試料において予測される CERK1(D441V)cyt-6His の質量 42 kDa 付近にバンドが確認された。一方、Thrombin 処理後の不溶性画分では、可溶性画分の CERK1(D441V)cyt-6His に比較して、より多量の CERK1(D441V)cyt-6His が観察された (Fig. 3-3)。このことから MBP-CERK1(D441V)cyt-6His から MBP タグを切断することにより、CERK1(D441V)-6His の大部分が凝集により不溶化することが示された。

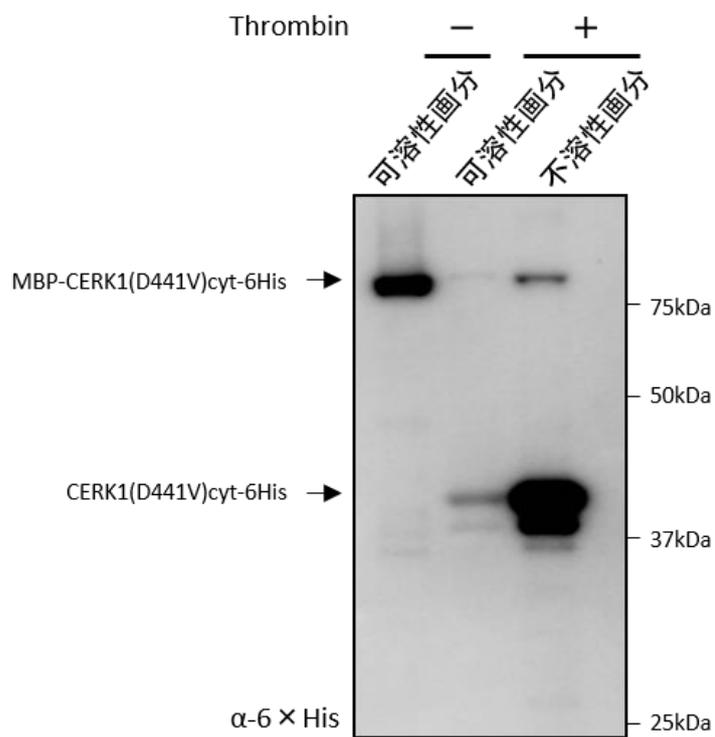


Fig. 3-3 Thrombin 処理後の可溶化 CERK1(D441V)cyt-6His の評価

精製した MBP-CERK1(D441V)cyt-6His に対して、Thrombin を処理し、遠心で可溶性タンパク質と不溶性タンパク質を分離し、電気泳動後、抗 6×His 抗体 (α -6×His) で検出した。

4. 界面活性剤の添加による可溶性 CERK1(D441V)-6His の保持条件の検討

MBP タグ切断後の CERK1(D441V)-6His の凝集による不溶化の問題点を打開するために、Thrombin 処理時に界面活性剤を添加することで、目的タンパク質の凝集を防げるのではないかと考えた。そこで、最適な界面活性剤の検討を行うために、Fig. 3-4 に示した種々の界面活性剤を最終濃度 1 %になるように添加したバッファー中で、MBP-CERK1(D441V)cyt-6His に対して前述と同じ条件で Thrombin 処理を行った。しかし本実験においても Thrombin 処理後の反応溶液には、白濁した不溶物が確認されたため、遠心分離により上清画分と沈殿画分に分けた。可溶性画分である上清分のみを SDS-PAGE・ウエスタンブロッティング後、抗 6×His 抗体を用いて検出した。

その結果は、Fig. 3-4 に示したように、1 %のドデシルマルトシドおよび、IGEPAL、Triton X-100 を添加したサンプルは、ほかの界面活性剤を使用したサンプルと比較して、より多量の CERK1(D441V)-6His が検出された。特に、1 %のドデシルマルトシドを添加したサンプルでは、目的タンパク質が顕著に得られたために、CERK1(D441V)-6His の可溶性の維持に適している界面活性剤であることが示された。

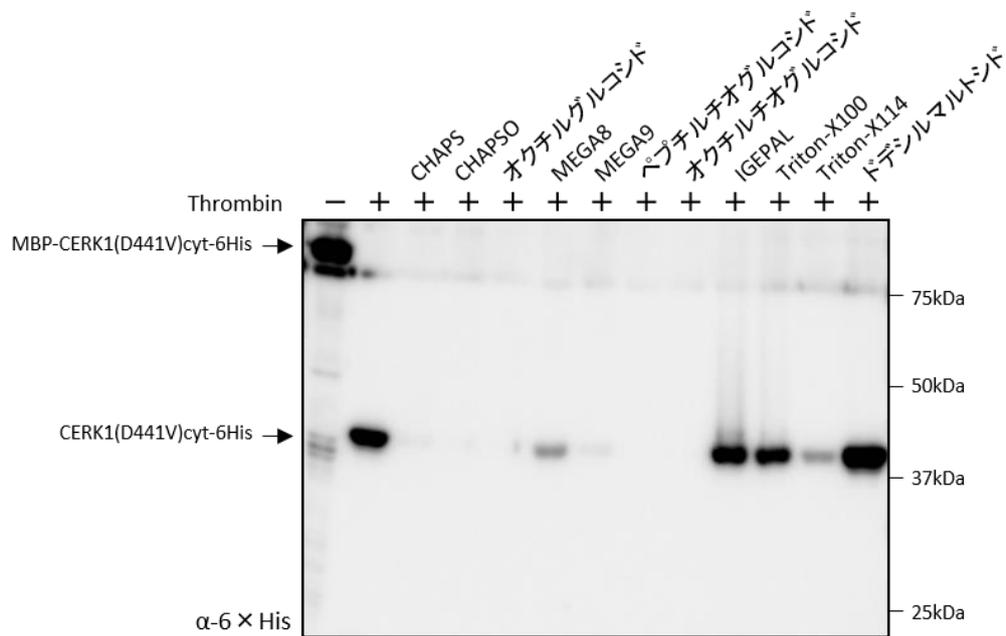


Fig. 3-4 種々の界面活性剤の存在下における Thrombin 処理によるタンパク質の可溶性評価

精製した MBP-CERK1(D441V)cyt-6His に対して、Thrombin を処理する際に、各種界面活性剤を添加し、可溶性に得られる CERK1(D441V)cyt-6His の量を比較した。Thrombin 処理後のサンプルは電気泳動・ウエスタンブロッティング後、目的タンパク質は抗 6xHis 抗体 (α -6xHis) にて検出を行った。

5. アルギニン添加による CERK1(D441V)-6His タンパク質の凝集阻害の条件検討

前述のように、界面活性剤ドデシルマルトシドを含むバッファー中で、MBP-CERK1(D441V)-6His から MBP タグの切断を行うと、より多くの可溶性の CERK1(D441V)-6His タンパク質を調製できることが示唆された。一方で、凝集阻害剤としてアルギニンもよく知られている。そこでアルギニンが、CERK1(D441V)-6His の凝集阻害に効果的であるかどうかについて評価を行うことにした。さらに、アルギニンとドデシルマルトシドを共添加することによる、さらなる凝集阻害への可能性についても検討した。アルギニンを 200 mM 以上の濃度で添加することが、タンパク質の凝集阻害に効果的であるとされていたため、本実験においても最終濃度が 200 mM になるようにアルギニンを加え、MBP-CERK1(D441V)-6His から MBP タグの切断実験を行った。これまでと同様に Thrombin 処理後のサンプルは、遠心分離により可溶性画分と不溶性画分に分けた。それぞれのサンプルは SDS-PAGE・ウエスタンブロッティング後、抗 6×His 抗体で検出した。

その結果、アルギニンを添加したサンプルで、凝集阻害剤無添加のサンプルと比較して、可溶性状態の CERK1(D441V)-6His のバンドが顕著に観察された (Fig. 3-5)。このことから、アルギニン添加が、タンパク質の凝集緩和に有効であることが示された。さらに、アルギニンを単独で添加したサンプルは、ドデシルマルトシド単独、またアルギニン及びドデシルマルトシドの両方を添加したサンプルと比較して、可溶性画分で検出される目的タンパク質量が多いことが分かった。これらの結果から、CERK1(D441V)-6His の凝集阻害には、アルギニンのみを添加することが適していることが示された。

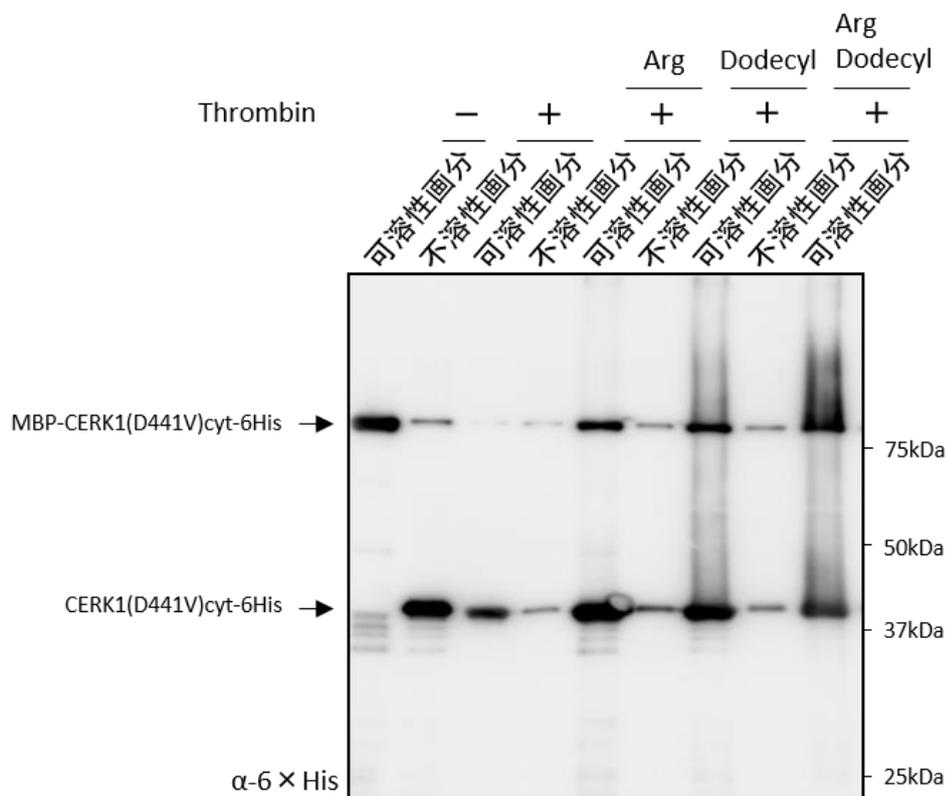


Fig. 3-5 アルギニン及びドデシルマルトシドの存在下での Thrombin 処理後の可溶性画分に含まれる目的タンパク質の評価

精製した MBP-CERK1(D441V)cyt-6His に対して、Thrombin を処理する際に、アルギニンを添加し、遠心後の可溶性画分に含まれる CERK1(D441V)cyt-6His の量を比較した。サンプルは電気泳動後、抗 6×His 抗体 (α -6×His) で検出した。Arg はアルギニン、Dodecyl はドデシルマルトシドを示している。

6. アルギニン濃度と可溶性 CERK1(D441V)-6His 量の評価

アルギニンが有効な添加剤であることが明らかになったが、アルギニン添加濃度を増すことで、より多くの可溶性 CERK1(D441V)-6His タンパク質量を回収できることが可能であるのかについて評価した。この検討では、アルギニンの最終濃度を 200 mM および 500 mM とした。それぞれのサンプルは、前述の条件に基づいてアルギニン濃度のみを変化させて調製し、Thrombin との反応を行った。反応後のサンプルは、遠心分離で、不溶性画分と可溶性画分を分けたのち、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング後、得られた転写膜を抗 6×His 抗体で検出した。

その結果、200 mM のアルギニンを添加したサンプルの可溶性画分にある CERK1(D441V)-6His は、500 mM のアルギニンを添加した場合に比較して、より多くの可溶性 CERK1(D441V)-6His 量を検出した (Fig. 3-6)。そこで、これ以降の実験においては、200 mM のアルギニン存在下で Thrombin 処理を行うことにした。

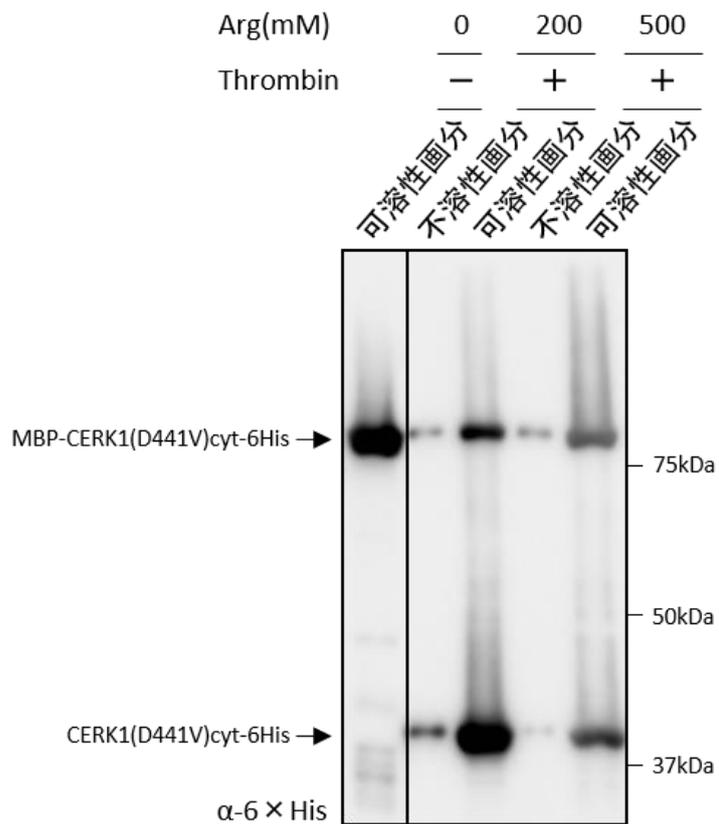


Fig. 3-6 Thrombin 処理時のアルギニンの濃度の評価

精製した MBP-CERK1(D441V)cyt-6His に対して、Thrombin を処理する際に、終濃度 200 mM もしくは 500 mM のアルギニン (Arg) を添加し、可溶性画分中の CERK1(D441V)cyt-6His の量を比較した。サンプルは電気泳動後、抗 6×His 抗体 (α-6×His) で検出した。

7. Thrombin 処理条件と可溶性 CERK1(D441V)-6His 量の評価

これまでの Thrombin 処理条件の検討から、200 mM のアルギニンを含むバッファー中に 100 μ g の MBP-CERK1(D441V)-6His、4 units の Thrombin を添加し、25°C で、12 時間反応させることで、効率よく可溶性の CERK1(D441V)-6His を回収できることを確認した。一方、本条件では、MBP タグが切断されていない MBP-CERK1(D441V)-6His も検出されている。そこで MBP-CERK1(D441V)-6His の MBP タグを完全に切断できる条件を検討するため、Thrombin の濃度や反応時間について検討した。また、酵素反応温度を下げることによりタンパク質の凝集による不溶化を緩和できることを期待し、温度条件についても検討した。そこで、反応サンプルには、Thrombin を 4 units および 8 units 添加したもの、さらに反応時間は 12 と 18 時間で反応させたもの、温度については 20°C と 25°C で反応させたものそれぞれ条件を設定し、可溶性 CERK1(D441V)-6His 量を効率よく回収できる系の構築を目指した。酵素反応後それぞれの反応溶液は遠心分離で、不溶性画分と可溶性画分に分けた。本実験は、それぞれの可溶性画分のサンプルのみを SDS-PAGE・ウエスタンブロッティング後、目的タンパク質を抗 6 \times His 抗体で検出した。

その結果、Thrombin 量をこれまでの 2 倍にした、25°C、12 時間、Thrombin を 8 units で反応させたサンプルでは、MBP-CERK1(D441V)-6His が完全な MBP タグの切断が観察された。一方、上記と同温度および処理時間を用いて Thrombin を 4units 加えたサンプルでは、MBP タグが切断されていない MBP-CERK1(D441V)-6His のバンドが検出された (Fig. 3-7)。しかし、上記の条件で反応時間だけをさらに 6 時間伸ばした 18 時間 (25°C、Thrombin : 4 units) のサンプルでは、MBP-CERK1(D441V)-6His のバンドが確認されず、酵素反応の時間を延ばすことにより切断効率が高まることが示唆された。また、反応温度においては、25°C (18 時間、Thrombin : 8 units) で処理したサンプルと同じ条件で温度 20°C のみを変えたサンプルでは、20°C の方が CERK1(D441V)-6His のバンドが濃いことが観察された。このことにより温度を下げたことによって、より多くの可溶化した目的タンパク質が得られることが示唆された。以上の実験の結果から、100 μ g の MBP-CERK1(D441V)-6His に対して、Thrombin を 8 units 処理し、20°C、18 時間反応させることで、可溶性の CERK1(D441V)-6His をより効率よく回収できることが明らかになった。

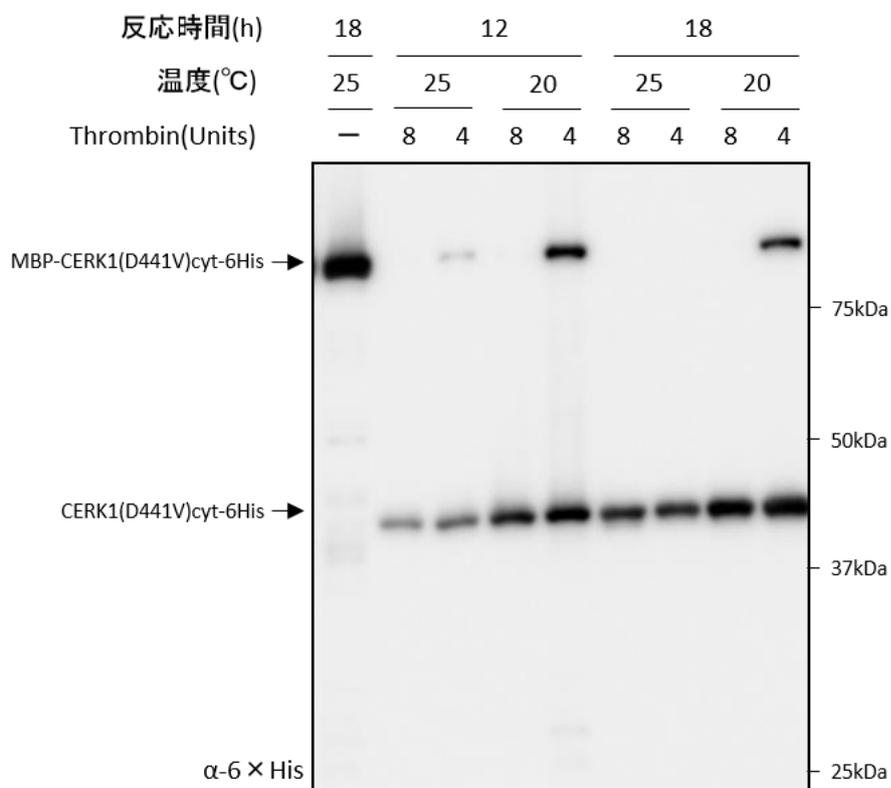


Fig. 3-7 Thrombin 処理時条件の評価

精製した MBP-CERK1(D441V)cyt-6His に対して、Thrombin を処理するときの温度、反応時間、Thrombin 量を変えて、切断効率および可溶性画分に含まれるタンパク質の量を評価した。サンプルは電気泳動後、抗 6×His 抗体 (α-6×His) で検出した。

8. CERK1(D441V)cyt-6His の調製と評価

上記の構築した Thrombin 処理条件をもとに、3 mg の MBP-CERK1(D441V)-6His に対して MBP タグの切断を行った。反応後のサンプルは、Histrap カラムで精製後、洗浄したのち 500 mM イミダゾールで目的タンパク質を溶出したのち、限外ろ過膜 (Amicon Ultra-4 10K、Millipore) で濃縮した。濃縮サンプルの一部は、SDS-PAGE を行い、CBB 染色およびウエスタンブロッティング後、目的タンパク質を抗 MBP 抗体および抗 6×His 抗体で検出し、タンパク質の精製度を評価した。

CBB 染色の結果から、CERK1(D441V)-6His 以外のタンパク質は確認されず、高純度な CERK1(D441V)-6His を調製できたことが示された (Fig. 3-8)。また、BSA を用いたタンパク質量のキャリブレーションから、約 300 µg の CERK1(D441V)-6His を回収できたこともわかった。抗 6×His 抗体で検出した結果では、MBP-CERK1(D441V)-6His が検出されたが、その量はわずかであった。抗 MBP 抗体で検出した結果でも、MBP-CERK1(D441V)-6His および遊離の MBP タグが検出されたが、MBP タグの量は、MBP-CERK1(D441V)-6His の比率から考えて、かなり少ないものであることが示唆された。共同研究者である農研機構の藤本瑞博士により、CERK1(D441V)-6His の結晶化には十分な精製純度であることが確認された。

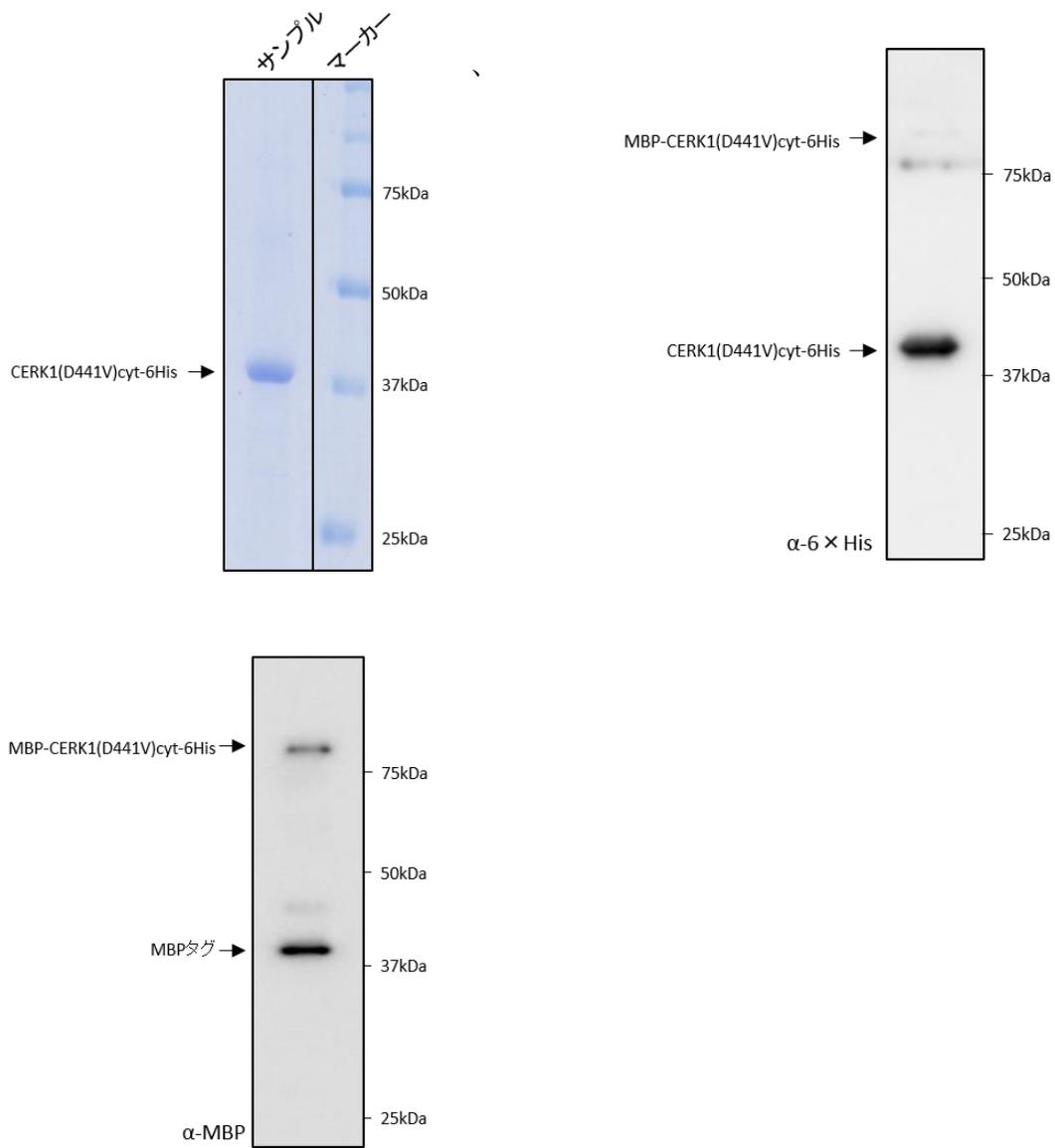


Fig. 3-8 CERK1(D441V)cyt-6His の精製度の評価

Thrombin 処理によって MBP タグを切断した後の試料を Histrap カラムで CERK1(D441V)cyt-6His を精製した。電気泳動後、CBB 染色および抗 6×His 抗体 (α-6×His) 、抗 MBP 抗体 (α-MBP) で検出した。

9. CERK1(D441V)cyt-6His の結晶化条件の検討

上記で精製した CERK1(D441V)-6His の結晶化条件を検索するために、結晶化条件検討キット (Hampton Research 社の Index HT、Emerald Biosystems 社の Cryo 1 & 2 - 96 Well および Wizard Classic 1 & 2 - 96 Well) を用いて行った。

試料に約 300 条件の結晶化溶液に加えたサンプルは、20℃で、2 カ月間静置したのち観察した。その結果、2 つの緩衝液条件において CERK1(D441V)-6His 様結晶が確認された (Fig. 3-9)。下記の左図が、30 % PEG2000MME、150 mM KBr 中でみられた結晶で、右図が、40 % PEG400、100 mM Tris pH 8.5、200 mM Li₂SO₄ 中でみられた結晶である。CERK1cyt-6His 様の結晶が確認されたが、X 線回折実験には十分な大きさではないため、現在は、mg 単位の CERK1(D441V)-6His を同条件中に添加し、解析可能な結晶にすることを目指している。

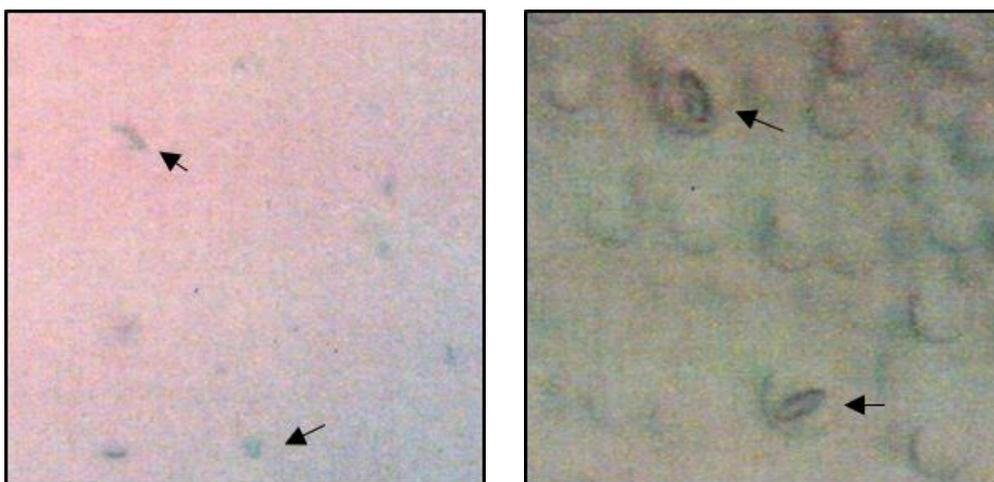


Fig. 3-9 CERK1(D441V)cyt-6His の結晶化条件の検討

Histrap カラムで精製した CERK1(D441V)cyt-6His をバッファーに添加し、2 か月後の結晶を観察した。矢印が結晶を示している。

第4節 考察

本章では、CERK1(D441V)-6His の X 線結晶構造解析を行うためのサンプル調製方法の検討を進めてきた。最初に CERK1(D441V)cyt の N 末端側に GST タグおよび C 末端側に 6×His タグを付加した GST-CERK1(D441V)-6His で結晶化用試料の調製を試みていたが、GSTrap カラム精製後のサンプル中に、多くの夾雑タンパク質と GST-CERK1(D441V)-6His が分解したと思われるタンパク質が確認された (Fig. 3-1)。これまでに大腸菌発現系を利用して 6×His タグを導入していない GST-CERK1(D441V)cyt を GSTrap カラムで調製したときは、GST-CERK1(D441V)cyt と GST-CERK1(D441V)cyt の分解産物と考えられるタンパク質は確認されたものの、それ以外の夾雑タンパク質は確認されなかった。これらの点から考えると、精製後の GST-CERK1(D441V)-6His サンプルで見られた多くの夾雑タンパク質は、GST-CERK1(D441V)cyt の C 末端側に 6×His タグを付加したことで相互作用しやすくなり、精製操作時に一緒に溶出されてしまったものではないかと考えられる。6×His タグは正の電荷をもつため、イオンの相互作用によって夾雑タンパク質との相互作用に影響を与えた可能性が考えられる。

GST-CERK1(D441V)cyt 発現コンストラクトをもつ大腸菌を 1000 ml の LB 培地で培養し、アラビノースの添加で GST-CERK1(D441V)cyt の発現を促したのち、破碎・GSTrap カラムで精製すると、GST-CERK1(D441V)cyt が約 1 mg 回収できる。一方、GST-CERK1(D441V)cyt-6His 発現コンストラクトを持つ大腸菌を 1000 ml の LB 培地で培養し、同様の方法で GST-CERK1(D441V)cyt-6His を発現・精製しても、約 200 μg ほどのタンパク質しか回収できなかった (Fig. 3-1)。そこで、大腸菌内の GST-CERK1(D441V)cyt と GST-CERK1(D441V)cyt-6His のタンパク質発現量を比較したところ、GST-CERK1(D441V)cyt-6His の発現量の方が低かったことから、C 末端側に 6×His タグが付加されたことで、GST-CERK1(D441V)cyt-6His タンパク質自身が大腸菌に何らかの悪影響を与えてしまい、GST-CERK1(D441V)cyt-6His の発現量が低下したのではないかと考えられる。

一方、CERK1(D441V)cyt-6His の N 末端側に MBP を付加した MBP-CERK1(D441V)cyt-6His 発現コンストラクトを有する大腸菌を培養し MBP-CERK1(D441V)cyt-6His を発現させ、破碎・MBPtrap カラム精製を行ったところ、極めて高純度で大量の MBP-CERK1(D441V)cyt-6His を回収することができた (Fig. 3-

2)。大腸菌内で発現させた MBP-CERK1(D441V)cyt-6His と大腸菌内で発現させた GST-CERK1(D441V)cyt-6His のタンパク質量を比較していないため、なぜ MBP-CERK1(D441V)cyt-6His の方で大量にタンパク質が調製できたかは不明であるが、6×His タグを付加したことでタンパク質発現量が低下したことを考えると、MBP タグを付加させたことでこうした悪影響が何らかの形で相殺され、結果として大腸菌のタンパク質発現量が向上した可能性がある。また、当研究室で大腸菌発現系を用いて MBP タグが融合された他のタンパク質を発現させ、MBPtrap カラムで精製したところ、高純度で大量のタンパク質を回収することができたことから、大腸菌発現系では MBP タグを融合することによって、大量にタンパク質を回収することが可能になるのかもしれない。

一方当研究室では、大腸菌発現系を利用して MBP-CERK1cyt を発現させ、MBPtrap カラムで調製後、*in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、MBP-CERK1cyt のキナーゼ活性は GST-CERK1cyt のものよりも弱いことが確認されたため、MBP タグを融合したタンパク質が必ずしも解析に適しているわけではないことも示されている。

MBP-CERK1cyt で GST-CERK1cyt よりもキナーゼ活性が弱いことから、MBP タグと融合した CERK1 細胞内ドメインの立体構造・生化学的機能が MBP の存在によって影響を受けている可能性が考えられた。今後、大腸菌発現系を利用して調製した MBP-CERK1cyt を Thrombin 処理して MBP タグの切断を行い、得られた CERK1cyt がキナーゼ活性を有しているかを評価することで、MBP タグ切断後の CERK1cyt が適切な立体構造を保持しているかを確認する予定である。

Thrombin による MBP タグ切断後の CERK1(D441V)cyt-6His の凝集は、アルギニンを追加することで緩和できることが示された (Fig. 3-5)。どのようにしてアルギニンがタンパク質の凝集を防ぐかについての詳細は明らかになっていないが、アルギニン表面の疎水性部分がタンパク質の芳香環と疎水性相互作用することで、可溶化の維持につながることを示唆されており、そうした作用で CERK1(D441V)cyt-6His の凝集を防ぐことができたと考えている。

3 mg の MBP-CERK1(D441V)cyt-6His に対して Thrombin 処理を行い、Histrap カラムで精製したところ、300 µg の CERK1(D441V)cyt-6His が回収できた (Fig. 3-8)。MBP タグが 43 kDa であるのに対して、CERK1(D441V)cyt-6His は 42 kDa であるため、理論上は約 1.5 mg の CERK1(D441V)cyt-6His が回収できるはずである。これまでの経験から、MBP-CERK1(D441V)cyt-6His に対して Thrombin 処理を行った後、

Histrap カラム精製を行うと、カラム内でタンパク質様の沈殿が確認されたことから、精製中に CERK1(D441V)cyt-6His が凝集してしまう可能性が示されている。その理由として、カラム内では、CERK1(D441V)cyt-6His が高濃度に濃縮されるため、凝集が促進されやすい環境になっているためではないかと考えている。今後は CERK1(D441V)cyt-6His の Histrap 精製時だけ、アルギニンの濃度を高めることで凝集を防ぐことができないかを検討するつもりである。

これまでに得られた CERK1(D441V)cyt-6His 試料を用いた結晶化条件の検討から、2つの条件でタンパク質様の結晶が確認された (Fig. 3-9)。これが CERK1(D441V)cyt-6His の結晶であるか判別するためにはさらに大きな結晶を得る必要があり、現在も CERK1(D441V)cyt-6His の調製を行っている。CERK1(D441V)cyt-6His の結晶であることを確認でき次第、X 線結晶構造解析を行い、CERK1(D441V)cyt-6His の立体構造を明らかにする予定である。

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

第1節 緒論

植物は、微生物に対して防御応答を誘導する能力を持ち、非自己を侵入させない仕組みを備えている(4)。一方マメ科植物は、根粒菌を積極的に組織内に進入させ共生することがわかっており、植物は微生物を識別し、相反する応答(防御応答と共生応答)を厳密に制御することが示されている(13, 110)。その微生物認識に基づく応答系は、細胞膜上の受容体を介して微生物由来の分子を認識することで制御され、微生物固有の分子パターン(MAMP)の認識では防御応答が誘導され、根粒菌が分泌するNod factorの認識では共生応答が誘導される(15)。

CERK1は、真菌のMAMPであるキチンオリゴ糖の認識・応答に関わるLysM型受容体様キナーゼで、植物に高度に保存されていることがわかっている(54, 111, 112)。しかし、ミヤコグサのCERK1ホモログは、Nod factorの認識・応答に関わるNFR1であることが示されており、類似した細胞膜受容体が真逆の応答を制御することがわかっている(37, 38)。これら分子が、どのように相反する応答を制御するかについてはわかっていなかったが、近年、NFR1とCERK1のキメラ分子を用いた解析から、その答えが示されつつある(39)。ミヤコグサの*nfr1*変異体にNFR1を形質転換した植物体では、根粒菌共生が相補される。しかし、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、根粒菌共生が誘導されないことがわかっている。一方、NFR1のキナーゼドメインに特徴的な3つのアミノ酸配列(YAQ)をCERK1細胞内ドメインに導入したNFR1-CERK1(YAQ)をもつ形質転換体では、根粒菌共生が相補されることが示されている。このことから、CERK1型分子の細胞内ドメインのわずかな違いが防御応答と共生応答の切り替えに関わることが示された。しかし、CERK1型分子の細胞内ドメインの違いが、応答の違いをどのように制御するか全くわかっていない。

そこで、本章では、CERK1型分子の細胞内ドメインの違いが、自身の活性化機構に影響を与える可能性を考えて、CERK1細胞内ドメインタンパク質とCERK1(YAQ)細胞内ドメインタンパク質の自己リン酸化部位の比較を行った。また、CERK1型分子の細胞内ドメインの構造が共役受容体との相互作用に影響を与える可能性を考えて、共免疫沈降法を用いて相互作用を評価した。

第2節 実験方法

1. コンストラクトの作製

GST-CERK1(YAQ)*cyt* のデスティネーションクローンは、名古屋大学 特任助教の中川知己 博士から分与頂いた NFR1-CERK1(YAQ)が導入されたエントリークローンを鋳型に、PCR を行い、DNA 断片を増幅、TOPO 反応でエントリークローンを作製し、pDEST15 に導入することで構築した。ベンサミアナタバコ過発現系を利用したタンパク質の発現に用いたコンストラクトも、中川知己 博士から分与頂いたエントリークローンを用いた。ベンサミアナタバコ過発現に際して、3HA タグ付加には pGWB14 を 4myc タグ付加には pGWB17 を用いた。これら pGWB ベクターは島根大学の中川強 教授より分与いただいた (93)。

2. ベンサミアナタバコの膜画分を用いた共免疫沈降法

アグロバクテリウムを感染させたベンサミアナタバコの葉を回収し、速やかに液体窒素で凍結させた。凍結した葉を溶解せずに葉さじで粉碎した。葉と等量のホモジナイズバッファー (0.3 M スクロース、50 mM Mes-Tris pH 7.6、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM PMSF) を加え、ヒスコトロンを用いて 30 秒、4 回で破碎した。その後、10,000×g、4°C で 10 分遠心し上清を回収した。その上清を、100,000×g、4°C で 40 分間超遠心し、膜画分を回収した。得られた膜画分は可溶化バッファー (50 mM リン酸化二水素ナトリウム、150 mM NaCl、pH 7.0、1 mM PMSF、0.5 % Triton-X100) で溶解後、2 時間、回転攪拌させることで可溶化した。100000×g、4°C で 40 分間超遠心し、上清を回収した。その上清に対してして、20 µl の HA アガロース (Sigma) を添加し、一晩、回転攪拌した。PrepSpin Column (Sigma) に溶液を添加し、8000×g、4°C で 10 秒遠心することで、HA アガロースを回収した。その後、Wash バッファー (0.05 % Triton-X100、50 mM リン酸二水素ナトリウム、150 mM NaCl、pH 7.0) を加え、遠心を繰り返すことで洗い作業を行った。その後、50 µl の SDS バッファー (400 mM Tris-HCl pH 6.8、4 % SDS、10 % グリセロール、0.01 % BPB、2%メルカプトエタノール) を添加し、95°C、10 分間加熱し、15000×g、25°C で 2 分間遠心することで溶出した。

第3節 実験結果

1. CERK1(YAQ)の *in vitro* 自己リン酸化部位同定のための試料の評価

NFR1 の細胞外ドメインと CERK1 細胞内ドメインを融合した NFR1-CERK1 決め分子を *nfr1* 変異体に導入した形質転換体では、根粒菌共生が確認されなかったが、NFR1 の細胞内ドメインにある特徴的な YAQ 配列を導入された NFR1-CERK1(YAQ) キメラ分子を導入した形質転換体では、根粒菌共生が確認された (39)。そのことから、細胞内ドメインのわずかな違いが応答の切り替えに関わることが示唆された。しかし、細胞内ドメインがどのようにして応答を切り替えるかはわかっていない。

そこで NFR1-CERK1(YAQ)の共生応答誘導能の獲得は、細胞内ドメインの活性化機構の変化によるものではないかと考え、CERK1 細胞内ドメイン (CERK1_{cyt}) と CERK1(YAQ)細胞内ドメイン (CERK1(YAQ)_{cyt}) の自己リン酸化部位を比較することにした。CERK1 細胞内ドメインの自己リン酸化部位はすでに同定しているため、CERK1(YAQ)_{cyt} の自己リン酸化部位を明らかにすることにした。そこで、CERK1 細胞内ドメインの自己リン酸化部位同定法と同条件で、CERK1(YAQ)_{cyt} のリン酸化部位を同定するため、CERK1(YAQ)_{cyt} の N 末端側に GST タグを融合した GST-CERK1(YAQ)_{cyt} を大腸菌発現系で調製し、ATP 存在下で自己リン酸化を促したのち、LC-MS/MS 解析で、自己リン酸化部位を同定することにした。

本実験では、LC-MS/MS 解析に用いた GST-CERK1(YAQ)_{cyt} の一部を、同条件で操作した GST-CERK1_{cyt} および、キナーゼ活性を持たない GST-CERK1(D441V)_{cyt} と、SDS-PAGE し、CBB 染色で検出後、バンドシフトを指標に、それぞれのタンパク質の自己リン酸化の程度を比較した。

その結果、GST-CERK1_{cyt} および GST-CERK1(YAQ)_{cyt} で高質量側のバンドシフトが確認された (Fig. 4-1)。これまでの知見も踏まえ、GST-CERK1(D441V)_{cyt} がバンドシフトしていないことから、GST-CERK1_{cyt} および GST-CERK1(YAQ)_{cyt} でみられたバンドシフトは、自己リン酸化によるものであることが示された。また、バンドシフト幅から GST-CERK1(YAQ)_{cyt} が GST-CERK1_{cyt} と同程度の自己リン酸化を行うことが明らかになった。この GST-CERK1(YAQ)_{cyt} サンプルを用いて、LC-MS/MS 解析を行い、自己リン酸化部位を同定した。

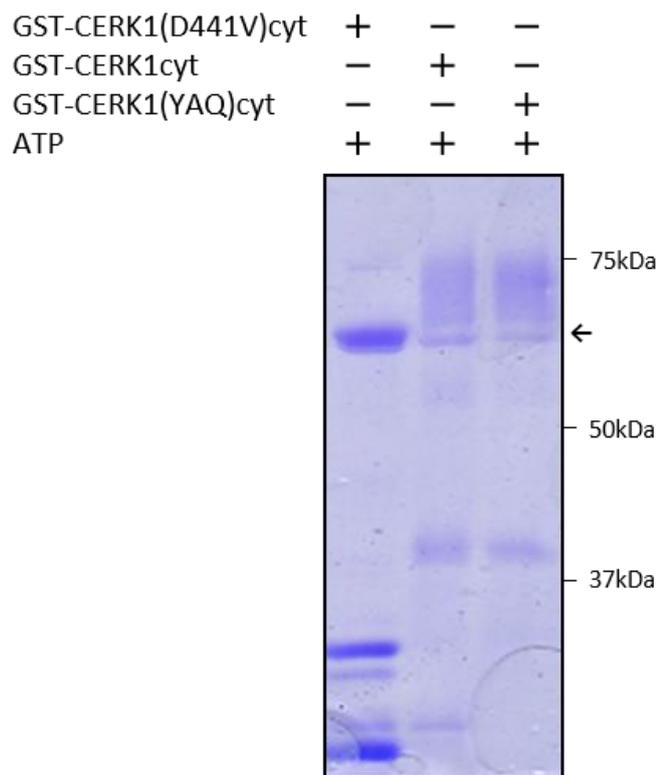


Fig. 4-1 質量分析用 GST-CERK1(YAQ)cyt の試料調製

大腸菌発現系を利用して調製した GST-CERK1cyt、GST-CERK1(YAQ)cyt、GST-CERK1(D441V)cyt を用いてリン酸化反応を行った。SDS-PAGE 後、CBB 染色で検出した。矢印が、目的タンパク質を示す。

2. CERK1(YAQ)の *in vitro* 自己リン酸化部位の同定

CERK1(YAQ)細胞内ドメインタンパク質の自己リン酸化部位を同定するため、前述で調製した GST-CERK1(YAQ)cyt を用いて、LC-MS/MS 解析を行った。LC-MS/MS 解析は、明治大学 紀藤圭治 准教授により行っていただいた。またその解析は、異なるロットの GST-CERK1(YAQ)cyt に対して独立した解析を二回行った。

その結果、GST-CERK1(YAQ)cyt の自己リン酸化部位として、セリン残基で 12 か所、スレオニン残基で 5 か所、チロシン残基で 1 か所が確認された (Fig. 4-2)。GST-CERK1cyt で同定されたリン酸化部位が 41 か所であったのに対して (Fig. 1-5)、GST-CERK1(YAQ)cyt で同定されたリン酸化部位は 18 か所と少なかった。その理由としては、GST-CERK1cyt の自己リン酸化部位の同定では、独立した試料を用いて LC-MS/MS 解析を合計 4 回行ったのに対して、GST-CERK1(YAQ)cyt では、LC-MS/MS 解析が 2 回だったことが関係する可能性がある。GST-CERK1(YAQ)cyt のリン酸化部位と GST-CERK1cyt で同定されたリン酸化部位を比較した結果、GST-CERK1cyt だけでリン酸化されたアミノ酸残基の数が多く、GST-CERK1(YAQ)cyt で特異的にリン酸化されたアミノ酸残基は確認されなかった。また、GST-CERK1(YAQ)cyt で同定されたリン酸化部位は、GST-CERK1cyt で同定された部位と一致したため、それらタンパク質の自己リン酸化部位の違いはそれほど多くはないと考えられた。

	260	270	280	290	300
CERK1	---- Y AYRKN	KSKGDS FSSS	IPL ST KADHA	SSTS LQ SGGL	GGAGV S PGIA
CERK1 (YAQ)	----YAYRKN	KSKGDS FSSS	IPLSTKADHA	SSTSLSQSGGL	GGAGVSPGIA
	310	320	330	340	350
CERK1	AISVDK S VEF	SLEELAKATD	NFNLS F KIGQ	GGFGAVYYAE	LRGEKAAIKK
CERK1 (YAQ)	AISVDK S VEF	SLEELAKATD	NFNLS F KIGQ	GGFGAVYYAE	LRGEKAAIKK
	360	370	380	390	400
CERK1	MDMEAS K QFL	AELKVLTRVH	HVNLVRLIGY	CVEGSLFLV Y	EY VENGNLGQ
CERK1 (YAQ)	MDMEAS K QFL	AELKVLTRVH	HVNLVRLIGY	CVEGSLFLVY	EYVENGNLGQ
	410	420	430	440	450
CERK1	HLHGSGREPL	PWTKRVQIAL	D S ARGLE Y IH	EHT V VPV Y VHR	DIK S ANILID
CERK1 (YAQ)	HLHGSGREPL	PWTKRVQIAL	D S ARGLEYIH	EHT V VPV Y VHR	DIK S ANILID
	460	470	480	490	499
CERK1	QKFRAKVADF	GL TKL TEVGG	S ATRGAM GTF	G YMAPE- TVY	GEV S AKVDV Y
CERK1 (YAQ)	QKFRAKVADF	GL TKL TEVGG	S ATRGAM GTF	GYMAPE YAQY	GEV S AKVDVY
	509	519	529	539	549
CERK1	AFGVVLYELI	SAKGAVV KMT	EAVGEFRGLV	GVFEES F KET	DKEEALRKII
CERK1 (YAQ)	AFGVVLYELI	SAKGAVV KMT	EAVGEFRGLV	GVFEES F KET	DKEEALRKII
	559	569	579	589	599
CERK1	DPRLGD S YPF	D S VYKMAELG	KACT Q ENAQL	RP S MRYIVVA	LSTLF S STGN
CERK1 (YAQ)	DPRLGDSYPF	D S VYKMAELG	KACTQENAQL	RP S MRYIVVA	LSTLFSSTGN
	609	617			
CERK1	WDVGNFQ N ED	LVSLM S GR			
CERK1 (YAQ)	WDVGNFQ N ED	LVSLM S GR			

Fig. 4-2 GST-CERK1(YAQ)_{cyt} の自己リン酸化部位の同定と GST-CERK1_{cyt} の自己リン酸化部位の比較

自己リン酸化反応を行った GST-CERK1(YAQ)_{cyt} の試料を用いて LC-MS/MS 解析を行い、CERK1 細胞内の自己リン酸化部位を同定した。自己リン酸化部位は赤文字で示した。YAQ は緑色の網掛けで示した。

3. CERK1 と NFR1 の細胞内ドメインの違いが共生受容体複合体に与える影響の評価

本解析では、NFR1-CERK1 と NFR1-CERK1(YAQ)では共役受容体あるいは受容体と直接相互作用するシグナル伝達因子との相互作用に差があり、その影響で機能に違いがみられたのではないかと考えて、実験を行った。ミヤコグサと根粒菌の共生では、NFR1 と NFR5 の 2 つの CERK1 型分子が複合体を形成して、Nod factor を受容し、その応答を誘導するとされている (35, 37, 77)。そこで、NFR1-CERK1 と NFR1-CERK1(YAQ)で NFR5 との相互作用に差があるのではないかと期待した。まずは、NFR1 および NFR1-CERK1 キメラ分子と NFR5 との相互作用に差があるかについて評価することにした。この相互作用解析は、ベンサミアナタバコの葉に、それぞれの組み合わせのタンパク質を一過的に共発現させ、共免疫沈降法を用いて評価した。

ベンサミアナタバコに CERK1 を発現させると、自己リン酸化することがわかっている (67, 92)。まずは、一アミノ酸残基置換によって自己リン酸化しなくなった NFR1(D442V)および同様の方法で自己リン酸化しなくなった NFR1-CERK1(D439V)を用いて、NFR5 との相互作用を評価することにした。その解析にあたり、NFR1(D442V)および NFR1-CERK1(D439V)の C 末端側には 4×Myc タグを付加し、NFR5 の C 末端側には 3×HA タグを付加させたものを用いることにした。それらタンパク質は、アグロバクテリウム法でベンサミアナタバコの葉に共発現させ、その葉から膜画分を抽出し、抗 HA 抗体で NFR5-3HA の免疫沈降を行った後、そのサンプルを SDS-PAGE・ウエスタンブロッティング後、抗 HA 抗体及び、抗 Myc 抗体 (α-Myc) でそれぞれのタンパク質を検出し相互作用を評価した。また、免疫沈降反応を行う前の膜画分を Input とし、免疫沈降後の溶出サンプル画分を Eluate とした。

NFR1(D442V)-4Myc と NFR5-3HA を共発現させたサンプルおよび、NFR1-CERK1(D439V)-4Myc と NFR5-3HA を共発現させたサンプルの input では、抗 HA 抗体および抗 Myc 抗体で、バンドが確認できることから、それぞれのタンパク質がベンサミアナタバコの葉で発現していることが確認された (Fig. 4-3)。それぞれの Eluate 画分を抗 HA 抗体で検出したところ、NFR5-3HA のバンドが確認されたことから、免疫沈降が成功していることが示された。また、Eluate 画分に対して抗 Myc 抗体で検出したところ、NFR1(D442V)-4Myc および NFR1-CERK1(D439V)-4Myc のバンドが同程度確認されたことから、NFR5-3HA と相互作用する NFR1(D442V)-4Myc と NFR1-

CERK1(D439V)-4Myc の量に差がないことが示された。これらの結果は自己リン酸化能状態でない NFR1 および NFR1-CERK1 キメラ分子は、NFR5 と同程度に相互作用することが観察された。

次に、自己リン酸化した NFR1-CERK1 および NFR1 と NFR5 の相互作用を、上記と同様の方法で評価することにした。NFR1-4Myc と NFR5-3HA を共発現させたサンプルおよび NFR1-CERK1-4Myc と NFR5-3HA を共発現させたサンプルの input を、抗 HA 抗体で検出したところ、NFR5-3HA のバンドが同程度であったため、NFR5-3HA の発現量が揃っていることが確認できた (Fig. 4-4)。一方、input を抗 Myc 抗体で検出したところ、NFR1-CERK1-4Myc のバンドが、NFR1-4Myc のバンドよりも薄いため、NFR1-CERK1-4Myc の発現量が低かったことが確認された。

また、Eluate 画分に対して抗 HA 抗体で検出したところ、NFR1-CERK1-4Myc と共発現させた NFR5-3HA のバンドは、NFR1-4Myc と共発現させた NFR5-3HA のバンドよりも濃いため、NFR1-CERK1-4Myc と NFR5-3HA と共発現させたサンプルの方で、より多くの NFR5-3HA が免疫沈降されたことが観察された。一方、Eluate 画分を抗 Myc 抗体で検出したところ、NFR1-4Myc のバンドは、NFR1-CERK1-4Myc のバンドと比較して濃いことがわかった。これらの結果から、NFR5-3HA の免疫沈降で得られた NFR1-CERK1-4Myc および NFR1-4Myc のタンパク質は、NFR1-4Myc の方が多いことが示された。そのため、NFR5-3HA と NFR1-4Myc および NFR1-CERK1-4Myc の相互作用を比較すると、NFR5-3HA と NFR1-4Myc の相互作用の方が強いことが示された。したがって、NFR1-CERK1 は NFR5 との相互作用しないか、あるいは極めてその相互作用が弱いことが考えられ、細胞内領域を CERK1 型に入れ替えた NFR1 である NFR1-CERK1-4Myc では、NFR5 との相互用に影響を与えることが示された。

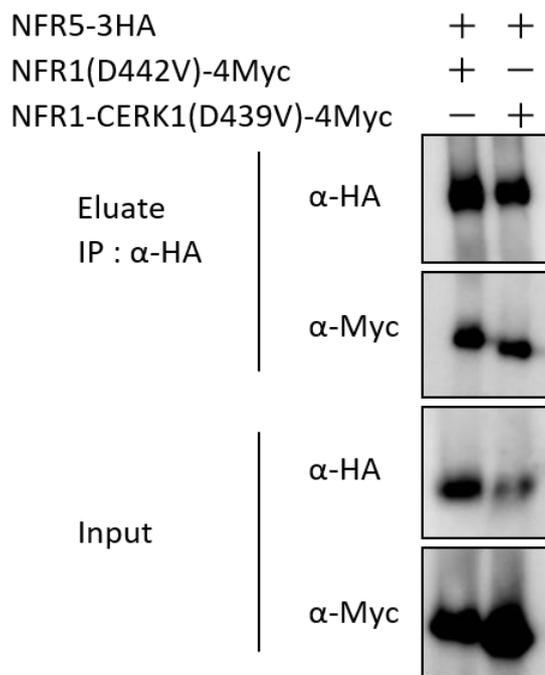


Fig. 4-3 NFR1(D442V)-4Myc および NFR1-CERK1(D439V)-4Myc の NFR5-3HA との相互作用解析

ベンサミアナタバコー過的発現系で NFR1(D442V)-4Myc、NFR1-CERK1(D439V)-4Myc を NFR5-3HA と共発現させ、抽出した膜画分を用い、抗 HA 抗体 (α -HA) アガロースビーズによる免疫沈降を行うことでタンパク質間の相互作用を評価した。SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング後、転写膜を抗 Myc 抗体 (α -Myc)、抗 HA 抗体 (α -HA) で検出した。Eluate は免疫沈降後のサンプルを示し、Input は免疫沈降実験に使用した膜タンパク質サンプルを示している。

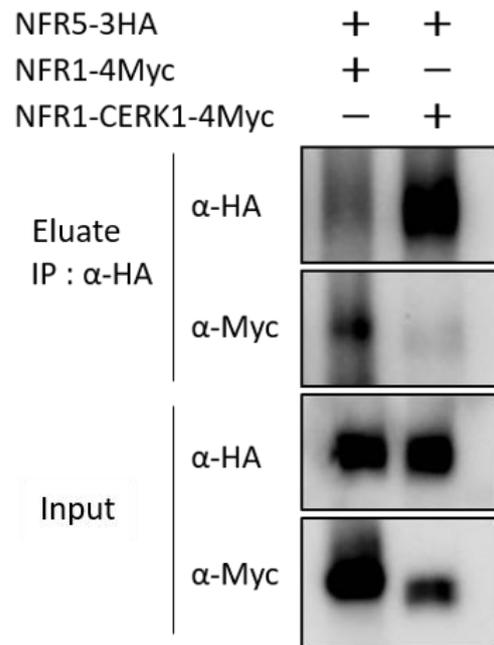


Fig. 4-4 NFR1-4Myc および NFR1-CERK1-4Myc の NFR5-3HA との相互作用解析

ベンサミアナタバコ過剰的発現系によって NFR1-4Myc あるいは NFR1-CERK1-4Myc を NFR5-3HA と共発現させ免疫沈降法で評価した。抗 HA 抗体 (α -HA) アガロースを用いて、NFR5-3HA を免疫沈降した。SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング後、転写膜を抗 Myc 抗体 (α -Myc)、抗 HA 抗体 (α -HA) で検出した。Eluate は免疫沈降後のサンプルを示し、Input は免疫沈降前のタンパク質サンプルを示した。

第4章 考察

キチン認識・応答系の起動に関わる CERK1 は、根粒菌共生に関わる NFR1 と高い構造的相同性を持つことが示されている (39)。*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、NFR1 の細胞内ドメインに特徴的な YAQ 配列を CERK1 の細胞内ドメインに挿入した NFR1-CERK1(YAQ) キメラ分子をもつ形質転換体では、根粒菌共生が確認された (39)。そのため、NFR1 細胞内ドメインと CERK1 細胞内ドメインでは誘導する応答が異なるが、その応答はわずかな違いで制御されることが示唆された。しかし、細胞内ドメインのわずかな違いが、どのようにして応答を切り替えるかについてはわかっていなかった。

そこでまずは、NFR1-CERK1 と NFR1-CERK1(YAQ) の細胞内ドメインの活性化メカニズムが異なることで、誘導する応答が異なるのではないかと考え、解析を行うことにした。CERK1 と NFR1 は細胞内ドメインの自己リン酸化でシグナル伝達系を起動するため (77, 92)、CERK1 細胞内ドメインと CERK1(YAQ) 細胞内ドメインの自己リン酸化部位に違いがあるのではないかと仮説を立てた。CERK1 細胞内ドメインの自己リン酸化部位は第 1 章ですでに同定していたため (Fig. 1-5)、同様の方法で、CERK1(YAQ) 細胞内ドメインの自己リン酸化部位を同定することにした。GST-CERK1(YAQ)_{cyt} の自己リン酸化部位を同定するにあたり、調製したタンパク質を SDS-PAGE 後、リン酸化によるバンドシフトを評価したところ、GST-CERK1_{cyt} と GST-CERK1(YAQ)_{cyt} で同程度の自己リン酸化によるバンドシフトが確認され、GST-CERK1_{cyt} と GST-CERK1(YAQ)_{cyt} の自己リン酸化の程度に目立った差がないことが示唆された (Fig. 4-1)。そのため GST-CERK1_{cyt} で同定された自己リン酸化部位 (41 か所) と同数程度のリン酸化部位が GST-CERK1(YAQ)_{cyt} で同定されると期待された。しかし、GST-CERK1(YAQ)_{cyt} の同定された自己リン酸化部位は、セリン残基で 12 か所、スレオニン残基で 5 か所、チロシン残基で 1 か所、合計 18 か所であった (Fig. 4-2)。GST-CERK1(YAQ)_{cyt} で同定されたリン酸化部位が少なかった理由としては、GST-CERK1_{cyt} の自己リン酸化部位の同定では LC-MS/MS 解析を 4 回行っているのに対して、GST-CERK1(YAQ)_{cyt} の自己リン酸化部位の同定では、LC-MS/MS 解析が 2 回だけだったことが関係するかもしれない。そのため、今回確認されたリン酸化部位の違いが、タンパク質の本質的な違いによるものであるかは現時点では断定できない。

GST-CERK1_{cyt} と GST-CERK1(YAQ)_{cyt} の自己リン酸化部位の比較から、YAQ 配列の有無で自己リン酸化部位に何らかの違いがみられることを期待したが、上述のように GST-CERK1(YAQ)_{cyt} で検出されたリン酸化部位そのものの数がまだ少なく、結果として GST-CERK1_{cyt} で検出されたリン酸化部位の中に、GST-CERK1(YAQ)_{cyt} で検出されないものが見出されたため、現状ではリン酸化部位の比較から YAQ 配列の有無で自己リン酸化の特異的な変化を評価することは困難であると考えられる。GST-CERK1(YAQ)_{cyt} で GST-CERK1_{cyt} とは異なるリン酸化部位が同定されれば、そのアミノ酸残基が共生応答の制御に関わる可能性も考えられるが、これまでのところ、GST-CERK1(YAQ)_{cyt} で特異的なリン酸化部位は検出されていない。そのため、GST-CERK1(YAQ)_{cyt} を用いてさらに LC-MS/MS 解析を行うことで、自己リン酸化の違いがあるかが明らかになると考えている。

ベンサミアナタバコー過的発現系を利用した NFR1 および NFR1-CERK1 キメラ分子の NFR5 との相互作用解析では、非リン酸化状態の NFR1 および NFR1-CERK1 は NFR5 と相互作用することが示された (Fig. 4-3)。一方、リン酸化状態の NFR1 は NFR5 と相互作用できるものの、リン酸化状態の NFR1-CERK1 は、NFR5 と相互作用できなくなる、もしくはその相互作用が同条件の NFR1 と NFR5 の相互作用と比較すると、弱いことが示された (Fig. 4-4)。以上から、細胞内ドメインの構造の差異が NFR1 と NFR5 の相互作用に大きな影響を与えることが示された。ミヤコグサの *nfr1* 変異体を用いた NFR1-CERK1 キメラ分子の根粒菌共生能の評価から、NFR1-CERK1 は根粒菌共生誘導能を持たないことが示されているが、上記の結果から考えると、この共生能の欠如は NFR1-CERK1 の細胞内ドメインと NFR5 の細胞内ドメインが相互作用できなくなったことによる可能性が考えられる。NFR5 の細胞内ドメインはシュードキナーゼでキナーゼ活性を持たないことがわかっているが、NFR5 の細胞内ドメインを欠損させると、ミヤコグサの根粒菌共生が失われることから、NFR5 の細胞内ドメインが根粒菌共生に関わることが示されている (113)。この結果は、本研究で示した NFR1 と NFR5 の細胞内ドメインの相互作用が共生応答の起動に関わるとする推定を支持するものと考えられる。

NFR1 と NFR5 は根粒菌が分泌する Nod factor を受容することで根粒菌共生を起動するが (37, 38)、細胞膜に局在する SYMRK もまた根粒菌共生に関わることがわかっている (78)。SYMRK は NFR1 および NFR5 と相互作用することがわかっており (79,

80, 114)、ミヤコグサの根粒菌共生は **NFR1-NFR5-SYMRK** の 3 つの複合体で起動されることが示唆されている。また、**SYMRK** は、**NFR1** よりも **NFR5** との相互作用の方が強いことがわかっており、**NFR1** は **NFR5** を介して **SYMRK** と複合体を形成すると考えられる。遺伝学的解析では、**NFR1**、**NFR5**、**SYMRK** の順で根粒菌共生応答のシグナルが伝達されることも示唆されている (80)。そのため、**NFR1** と **NFR5** が **Nod factor** を受容することで、キナーゼ活性を持つ **NFR1** の細胞内ドメインが自己リン酸化・活性化され、その後 **SYMRK** をリン酸化・活性化することで、根粒菌共生応答が起動すると考えられる (Fig. 4-5)。本章の結果から、**NFR1-CERK1/nfr1** 形質転換体では、**NFR1-CERK1** と **NFR5** が **Nod factor** を受容し、**NFR1-CERK1** の細胞内ドメインを自己リン酸化・活性化できたとしても、**NFR1-CERK1** が **NFR5** と解離してしまうため、**SYMRK** を活性化できず根粒菌共生系が起動しなかったと考えられる。

これまでの解析では、**NFR1** による **SYMRK** のリン酸化がシグナル伝達の制御に関わるかは明らかになっていないため、想定したモデルで根粒菌共生が制御されるかについては不明であるが、**NFR1** のリン酸化が **SYMRK** の活性化に関わるかを評価することでその真偽が明らかになると考えられる。また、本結果から、**NFR1-CERK1(YAQ)** と **NFR5** の相互作用は、**NFR1-CERK1** と **NFR5** の相互作用よりも強いことが想定される。そこで、**NFR1-CERK1(YAQ)** と **NFR5** を用いて、同様の解析を行うことで、想定したモデルが成り立つのかを評価するつもりである。

Lotus japonicus

Nod Factor

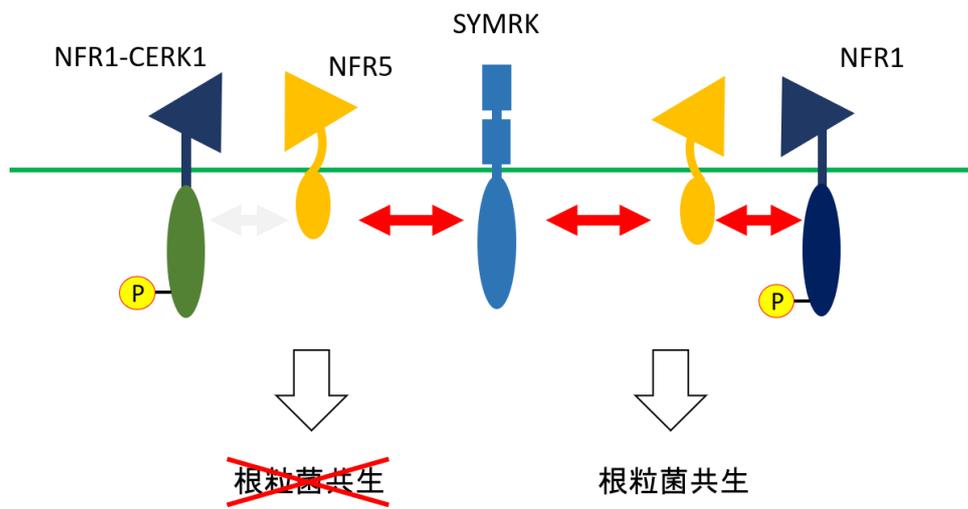


Fig. 4-5 マメ科植物の Nod factor 認識・応答系の起動モデルの模式図

NFR1 は NFR5 を介して SYMRK と相互作用できるが、NFR1-CERK1 キメラは NFR5 と相互作用できず、その結果 SYMRK とも相互作用できないと考えられる。

総合考察

近年、植物の MAMP 認識・応答系の移植や人為的制御で、植物の病害抵抗性の増強が可能であることが示され、その利用の観点からも本系の制御機構の理解が期待されている。

真菌の MAMP であるキチンオリゴ糖の認識に基づく防御応答系は、最初の陸上植物であるコケでもその存在が明らかにされ、進化的に古い植物免疫系であることがわかってきた (115)。また、コケの系においても CERK1 分子がその応答の起動に必須であることが示され、CERK1 は植物間で高度に保存された分子であると考えられる。シロイヌナズナの CERK1 は、真菌のみならずバクテリアに対する抵抗性の誘導にも関与し、バクテリアの MAMP であるペプチドグリカンの認識・応答系の起動に関わることがわかっている (54, 116)。イネでは、CERK1 のホモログである OsCERK1 が、キチン認識・応答系に関与することに加えて、バクテリアの MAMP であるリポ多糖の認識・応答系にも関わることがわかっている (62, 64)。以上の点から、CERK1 のシグナル伝達制御機構の理解は、複数の MAMP 認識・応答系の制御機構を理解するための基盤と考えられる。また、CERK1 のシグナル伝達起動の人為的制御が可能になれば、広範な微生物に対する病害抵抗性の付与につながると期待され、また、多様な植物でその利用が可能になると考えられる。

本論文では、CERK1 のシグナル伝達制御機構の理解を目指し、CERK1 細胞内ドメインの自己リン酸化による CERK1 自身およびその下流のシグナル伝達活性化機構について解析を進めた。

CERK1 は細胞外領域に LysM 構造を持ち、細胞内領域にキナーゼ活性を有する LysM 型の受容体様キナーゼ (RLK) である (54, 55)。CERK1 はホモダイマー化を介して防御応答を誘導すること、また、シロイヌナズナにキチンオリゴ糖を処理すると CERK1 の細胞内ドメインがリン酸化すること、そのリン酸化は CERK1 自身のキナーゼ活性に依存すること、リン酸化した CERK1 は直接相互作用するシグナル伝達因子をリン酸化できるようになることがわかっている (58, 59, 66, 67, 92)。以上のことから、CERK1 はホモダイマー化を通じて、細胞内ドメインを自己リン酸化し活性化することで、シグナル伝達因子のリン酸化が可能になり、防御応答系を起動すると考えられる。しかし、CERK1 のホモダイマー形成でどのようにして自己リン酸化が起こるのか、また、自己

リン酸化による CERK1 の活性化とそれに伴う下流のシグナル伝達因子のリン酸化がどのように制御されるかといった CERK1 自身による一連の制御機構はわかっていない。

そこでまず、CERK1 のホモダイマー化による自己リン酸化モードを調べることにした。大腸菌発現系で調製した CERK1 細胞内ドメインタンパク質 (CERK1cyt) の N 末端側に GST タグが付加された GST-CERK1cyt と、キナーゼ活性を持たない CERK1(D441V)の N 末端側に Strep タグを付加した Strep-CERK1(D441V)cyt を用いて、GST-CERK1cyt が Strep-CERK1(D441V)cyt をリン酸化するかを評価し、CERK1 が他の分子の CERK1 をリン酸化する能力を持つかを明らかにすることで、CERK1 が分子内で自己リン酸化するか、分子間で自己リン酸化するかを評価することにした。その結果、GST-CERK1cyt による Strep-CERK1(D441V)cyt のリン酸化が確認され、CERK1 は分子間で自己リン酸化する能力を持つことが示された (Fig. 1-2)。そのことから、CERK1 はホモダイマーを形成することで、分子間で自己リン酸化を行い、シグナル伝達を開始する可能性が示された。

さらに自己リン酸化で CERK1 がどのようにシグナル伝達系を起動するかを明らかにするため、まず CERK1 の自己リン酸化部位を同定した。大腸菌発現系を用いて調製した CERK1 細胞内ドメインタンパク質およびベンサミアナタバコ一過的発現系で調製した CERK1 タンパク質を用いて LC-MS/MS 解析を行った結果、*in vitro* 自己リン酸化部位を 41 か所、*in vivo* 自己リン酸化部位を 15 か所同定した (Fig. 1-5)。

これら自己リン酸化部位のうち、どの部位が CERK1 のシグナル伝達の起動に関わるかを明らかにするため、それぞれの自己リン酸化部位を一アミノ酸残基置換した CERK1 を *cerk1-2* 変異体に形質転換し、キチンオリゴ糖処理時の、防御応答の復帰の程度を評価した。28 か所におよぶ自己リン酸化部位について解析したところ、5 か所 (T473、T479、S493、T573、Y428) の一アミノ酸残基置換で、キチンオリゴ糖誘導性の活性酸素生成および防御応答関連遺伝子の発現誘導の復帰が消失、またはわずかな復帰が観察された (Fig. 1-9~15)。そのため、この 5 か所が CERK1 を介したシグナル伝達の起動に関わる自己リン酸化部位であることが示唆された。

RLK は、それぞれのアミノ酸残基を段階的に自己リン酸化することで、RLK 自身のキナーゼを活性化して、下流のシグナル伝達因子をリン酸化できるようになるとされている (104)。そこで、シグナル伝達に関わるが見出された 5 か所のリン酸化部位が、CERK1 およびシグナル伝達の活性化のどの段階に関わるかを解析することにした。

まず大腸菌発現系で、それぞれのリン酸化部位を一アミノ酸残基置換した GST-CERK1_{cyt} を調製し、その自己リン酸化能および汎用性の基質である MBP (Myelin Basic Protein) に対するリン酸化能を評価した。その結果、GST-CERK1(T479A)_{cyt} で、自己リン酸化の消失およびMBPに対するリン酸化の消失が確認され (Fig. 2-1)、T479のリン酸化が CERK1 自身のリン酸化の起動に関わることが示唆された。また、GST-CERK1(T573A)_{cyt} では、自己リン酸化の低下、また MBP に対するリン酸化の低下が確認され (Fig. 2-2)、T573のリン酸化も 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、GST-CERK1(Y428F)_{cyt}、GST-CERK1(T473A)_{cyt}、GST-CERK1(S493A)_{cyt} では、自己リン酸化能に影響がみられず、それら 3 か所は CERK1 自身のキナーゼの活性制御に関わらないことが示唆された (Fig. 2-3, 4, 7)。Y428、S493 については、ベンサミアナタバコー過的発現系を用いて、それぞれを一アミノ酸残基置換した CERK1 の C 末端側に 3HA タグを融合した CERK1(Y428F)-3HA および CERK1(S493A)3HA を調製し、*in vivo* の自己リン酸化能を解析した。その結果、CERK1(Y428F)-3HA では、*in vitro* の結果とは異なり、自己リン酸化の消失が観察された (Fig. 2-6)。このことから、*in vitro* の結果とは異なり、*in vivo* では Y428 のリン酸化が CERK1 自身のリン酸化の起動に関わることが示唆された。この結果はまた、*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もあることを示している。一方、CERK1(S493A)では、野生型の CERK1 と同程度の自己リン酸化が確認され、*in vivo* でも S493 のリン酸化が CERK1 自身の自己リン酸化の亢進に関わらないことが示唆された (Fig. 2-8)。そこで、S493 が CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化に関わる可能性を考え、大腸菌発現系で GST-CERK1(S493A)_{cyt} および CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子を調製し、GST-CERK1(S493A)_{cyt} によるシグナル伝達因子のリン酸化を評価した。その結果、GST-CERK1(S493A)_{cyt} でシグナル伝達因子に対するリン酸化の低下が観察されたことから (Fig. 2-10)、S493 のリン酸化が CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化・活性制御に関わる可能性が示された。

以上の CERK1 の自己リン酸化部位の機能解析から、CERK1 は T479、Y428 の自己リン酸化を通じて自己リン酸化を促進し、T573 をリン酸化することでさらに自己リン酸化およびキナーゼ活性化を亢進させ、S493 のリン酸化でシグナル伝達因子をリン酸化できるようになると考えられ、自己リン酸化を介した CERK1 の多段階的な活性化機構の理解が進んだと考えられる。CERK1 の T479、Y428 は、RLK で高度に保存され

るアミノ酸残基で、いくつかの RLK では自己リン酸化部位として同定され、RLK 自身のリン酸化の起動に関わる可能性が示されている (73, 91, 92, 117)。そのため、RLK は、それらのアミノ酸残基のリン酸化を通じて、共通した制御で自己リン酸化を起動する可能性が考えられる。T479 および Y428 のリン酸化が、どのように誘発されるかはわかっていないが、動物の受容体様キナーゼの知見を踏まえると、RLK のホモダイマー化もしくはヘテロダイマー化で、RLK 同士の構造変化が促され、T479、Y428 と対応するアミノ酸残基をリン酸化できるようになるのではないかと考えている。つまり、CERK1 においては、キチンを介したホモダイマー化で、細胞内ドメインの構造変化が誘導され、T479、Y428 の自己リン酸化が誘導されると考えている。

CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化に関わることを示された S493 については、GST-CERK1(S493A)cyt および Strep-CERK1(D441V)cyt を用いた自己リン酸化モードの解析では、GST-CERK1(S493A)cyt で CERK1 の分子間リン酸化能の低下が確認されており、S493 のリン酸化が CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のリン酸化のみに関わるわけではないことが示されている (Fig. 2-11)。こうした点から見て、S493 の役割を理解するためには、多方面からの機能解析が必要と考えられる。その一つとして、GST-CERK1(S493A)cyt によるシグナル伝達因子のリン酸化の低下が、その因子の活性化に関わるかを明らかにすることを計画している。また、GST-CERK1(S493A)cyt でシグナル伝達因子のリン酸化が低下したことの理由の一つに、S493 がシグナル伝達因子の相互作用の制御に関わるリン酸化部位で、GST-CERK1(S493A)cyt では基質との相互作用がうまくいかなかったことによる可能性が考えられる。しかし、GST-CERK1(S493A)cyt によるリン酸化が低下した CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子の PBL27 は、CERK1 が自己リン酸化すると解離することがわかっており、GST-CERK1(S493A)cyt によるリン酸化を評価したもう一方のシグナル伝達因子の PUB4 は、自己リン酸化した CERK1 と相互作用するようになることがわかっている (64, Desaki et al., *in prep*)。そのため S493 のリン酸化がそれらシグナル伝達因子の相互作用に関わるとすると、その一か所で、相反する相互作用をすべて制御するということになってしまう。そうした相互作用を S493 だけで制御することは考えにくく、S493 はシグナル伝達因子との相互作用の制御には直接的には関わらない可能性が高いのではないかと考える。今後、CERK1 の立体構造を明らかにすることで、S493 のリン酸化による CERK1 の構造・機能への影響が考察でき、S493 の本来の機能が明らかになることを期待している。

RLK は植物のゲノム中に数多くコードされ、シロイヌナズナでは 410 以上、また、イネにおいては 640 以上が存在すると報告されている (118, 119)。それら RLK は、直接相互作用するシグナル伝達因子を選択的にリン酸化することで、生体応答を適切に制御しなければならない。そのため、キナーゼの基質特異性の理解は、RLK のシグナル伝達制御機構を理解する上で極めて重要なテーマである。動物の受容体のチロシンキナーゼでは、チロシンリン酸化部位がシグナル伝達因子との相互作用に直接関わることを示され、SH2 ドメインを持つタンパク質が結合することがわかっている (120)。植物においても、SH2 ドメインを持つタンパク質は確認されているが、RLK のシグナル伝達系に関わるとの報告はなく、植物の RLK は動物のチロシンキナーゼとは異なる方法でキナーゼの基質特異性を制御する可能性が考えられる。一方、タンパク質の相互作用の特異性は、カギと鍵穴の関係に例えられ、タンパク質の構造・形が重要であることもわかっている (109)。そのため、RLK のキナーゼの基質特異性を理解するためにも、その細胞内ドメインの立体構造の理解が重要であると言える。

本論文では、CERK1 細胞内ドメインの立体構造の解明を基に、自己リン酸化を介した CERK1 の活性・機能制御機構を理解するため、X 線結晶構造解析に用いるタンパク質試料の調製系の確立を目指した。これまでに、高純度の CERK1 細胞内ドメインタンパク質を十分量調製できる系を確立し、得られたタンパク質試料を用いて結晶化条件の検討を行っている。今後、CERK1 細胞内ドメインタンパク質の結晶ができ次第、X 線結晶構造解析を行う予定である。CERK1 細胞内ドメインの立体構造を明らかにできれば、それぞれの自己リン酸化部位が分子内のどのようなアミノ酸側鎖と相互作用するかを解析し、機能調節機構を考察する予定である。将来的には、リン酸化部位と相互作用するアミノ酸残基を一アミノ酸残基置換法により変異させ、対応するリン酸化部位のアミノ酸残基置換で認められた表現型と一致するかを評価したいと考えている。また、CERK1 の細胞内ドメインの立体構造と、CERK1 と直接相互作用するシグナル伝達因子のドッキングシミュレーションにより、相互作用に関与し得る領域を推定し、そこに位置するアミノ酸残基の変異の導入などから、その領域が相互作用に与える影響を評価するといったアプローチも考えている。一方、これまでの研究から、CERK1 細胞内ドメインにミヤコグサの NFR1 に特徴的な 3 アミノ酸配列 (YAQ) を導入すると、共生応答誘導能を付与できることが示されている (39)。そこで、本実験系で構築した CERK1 細胞内ドメインタンパク質の調製系および結晶化条件を用いて、CERK1(YAQ) 細胞内ドメインタンパク質の X 線結晶構造解析を行うことを計画している。YAQ 配列

は、キナーゼの立体構造変化に大きく寄与するとされる α EF ヘリックス上に存在しており (39, 103)、CERK1 細胞内ドメインタンパク質と CERK1(YAQ)の細胞内ドメインタンパク質の立体構造の比較から、YAQ 配列が CERK1 の構造・機能に与える影響を考察できるのではないかと期待している。

当研究室の研究から、シロイヌナズナにキチンオリゴ糖を処理すると、CERK1 がユビキチン化され分解されることが示唆されている (Desaki et al., *in prep*)。これは、CERK1 を介したシグナル伝達の活性化が過剰にならないようにするためのネガティブフィードバック制御であると考えられる。また、植物は常に微生物に曝されているため、シグナル伝達を行った CERK1 のみを分解させて、その他の CERK1 は細胞膜上で次の微生物の侵入に備えなければならない。つまり、活性化した CERK1 のみをユビキチン化して分解する必要がある。どのようにして、活性化した CERK1 のみをユビキチン化するかという制御機構は明らかになっていないが、CERK1 は自己リン酸化とそれに伴う構造変化で活性化することから、CERK1 のリン酸化に伴う活性型の構造が E3 ユビキチンリガーゼなどによって識別され、ユビキチン化されることで分解方向に向かう可能性が考えられる。実際に CERK1 の LC-MS/MS 解析から、リン酸化した CERK1 で特異的にユビキチン化されるリジン残基も同定されている (Desaki et al., *in prep*)。こうしたことから、上記のような CERK1 のリン酸化およびその細胞内ドメインの構造解析は、シグナル伝達活性化機構の理解に重要なだけでなく、ダウンレギュレーションを含む CERK1 を介した生体制御機構全体を理解するための基盤になると考えている。

本論文では、CERK1 型分子の細胞内ドメインの構造と誘導される生物応答の違いにも着目して解析を進めた。マメ科植物であるミヤコグサの最も相同性の高い CERK1 ホモログは、根粒菌共生に関わる NFR1 であることがわかっている (82)。NFR1 は、根粒菌が分泌する共生応答誘導因子である Nod factor の認識に関わるとされている (76)。これまでにミヤコグサの *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キメラ分子である NFR1-CERK1 を導入した形質転換体では根粒菌共生が見られなかったが、NFR1 の細胞内ドメインの特徴的な 3 アミノ酸配列 (YAQ) を CERK1 細胞内ドメインに導入した NFR1-CERK1(YAQ)形質転換体では、根粒菌共生が観察されており、CERK1 型分子の細胞内ドメインのわずかな違いで防御と

共生応答の切り替えが可能であることが明らかにされた (39)。しかし、こうしたわずかなアミノ酸配列の違いが、どのようにして相反する応答の切り替えにつながるかはわかっていなかった。

そこで、NFR1-CERK1 と NFR1-CERK1(YAQ)で、細胞内ドメインのリン酸化パターンの違いによって応答が異なるのではないかと仮定し、大腸菌発現系を用いて調製した、GST-CERK1_{cyt} と GST-CERK1(YAQ)_{cyt} を用いて、自己リン酸化部位を同定し、その比較を行った (Fig. 4-2)。しかし、解析上の問題から GST-CERK1_{cyt} と GST-CERK1(YAQ)_{cyt} の自己リン酸化部位の数にも大きな違いがみられ、十分に議論できる段階にはなかった。

そこで NFR1-CERK1 で共生応答が誘導できず、NFR1-CERK1(YAQ)および NFR1 で共生応答が誘導できる理由として、前者では NFR1 の共役受容体である NFR5 と相互作用ができないが、後者では相互作用が可能であるためではないかと考え、解析を行った。NFR5 は NFR1 とともに Nod factor を受容するとされ (37, 38)、NFR1 と NFR5 は相互作用することがわかっている (77)。NFR5 は細胞外に LysM 構造を持ち、細胞内ドメインはキナーゼ活性を持たないが、根粒菌共生に必須なドメインで、また、細胞膜上の複合体形成に関わることも示されている (79, 80)。そこで、NFR1 と NFR5 の相互作用と NFR1-CERK1 キメラと NFR5 の相互作用に差があるかを評価することにした。これらの相互作用は、ベンサムアタバコの葉にそれぞれを共発現し、その葉を用いた共免疫沈降法で評価した。その結果、NFR1-CERK1 と NFR5 の相互作用は、NFR1 と NFR5 の相互作用に比べて、弱いことが示された (Fig. 4-4)。よって、NFR1 細胞内ドメインの構造の違いによって NFR5 との相互作用に影響がみられ、その結果は生物応答の結果とよく相関することがわかった。

NFR1 と NFR5 は、SYMRK と呼ばれる細胞膜上の RLK と複合体を形成することで、根粒菌共生を制御することも示唆されている (79, 80, 114)。また、それら分子は主に細胞内ドメインを介しての相互作用することもわかっている (79, 80)。加えて、SYMRK は NFR1 よりも NFR5 との相互作用の方が強いことも示されており (79, 80)、NFR5 が NFR1 を含む SYMRK 複合体形成の仲介役として機能することで、NFR1-NFR5-SYMRK 複合体が形成されると考えられる。こうしたことから Nod factor 認識・応答系は、NFR1 と NFR5 が Nod factor を受容し、NFR1 の細胞内ドメインが自己リン酸化され、NFR5 を介して相互作用する SYMRK をリン酸化することで、根粒菌共生応答が導されると考えられる。本論文の結果を踏まえると、NFR1-CERK1 キメラの

場合には **NFR5** と共同して **Nod factor** を受容しても、**NFR1-CERK1** と **NFR5** との相互作用が弱いため、**SYMRK** をリクルート・活性化できず、結果として根粒菌共生が起動されなかったと考えられる。

植物の菌根菌共生の初期過程は、根粒菌共生と極めて類似した機構であることがマメ科植物およびイネの研究から明らかにされている (Fig. 5-1) (110)。それら植物は、菌根菌が分泌する **Nod factor** と類似した構造の **Myc factor** を、細胞膜上の受容体で認識したのち、**SYMRK** を介して根粒菌共生と共通したシグナル伝達系を活性化することによって、菌根菌共生を成立させるとされている (15, 110, 121)。

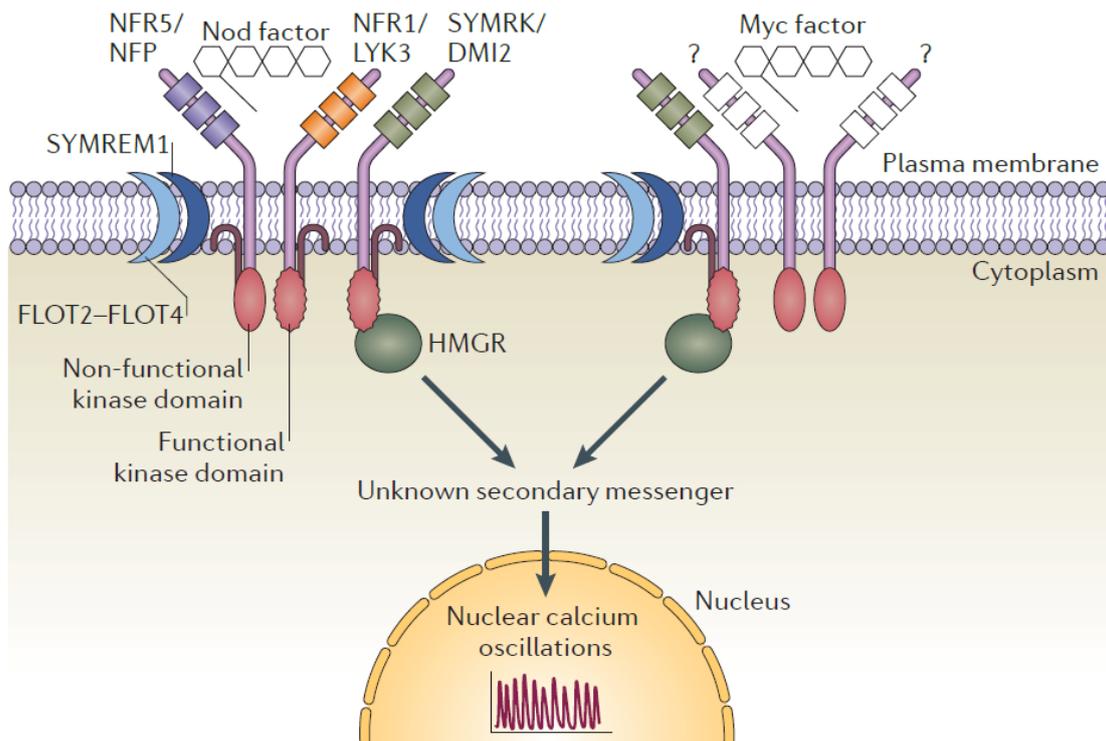


Fig. 5-1 Nod factor 認識・応答系と Myc factor 認識・応答系の模式図

(Giles E. D. Oldroyd, Nature Reviews Microbiology, 2013 から引用)

Nod factor および Myc factor 認識・応答系は類似したシステムで制御されることがわかっている。

近年いくつかの菌根菌で、Nod-factorと同様にキチン骨格を有するMyc factor様の分子が同定され、それら分子がイネの菌根菌共生シグナル伝達系を活性化することが明らかにされた(122, 123)。またイネの*oscerk1*変異体では、そのMyc-factor様分子で誘導される共生応答指標が消失することも示されている(124)。OsCERK1はCEBiPと協調してキチン認識・応答に関わること一方で(64)、細胞内ドメインにYAQ配列と類似したYAR配列をもっており、ミヤコグサの*nfr1*変異体に、NFR1の細胞内ドメインをOsCERK1の細胞内ドメインに置換したNFR1-OsCERK1キメラを導入した形質転換体では、根粒菌共生も観察され、OsCERK1は共生応答誘導能も持つことが示されている(39)。また*oscerk1*変異体では、キチン応答のみならず、菌根菌共生が消失することも明らかになっている(81)。このことから、OsCERK1はCEBiPと協調してキチン認識・応答系を制御することに加えて、菌根菌共生およびMyc-factor様分子の認識・応答系にも関わるということがわかってきた。OsCERK1がどのようにしてキチン認識・応答系と、菌根菌共生応答系という相反する方向性をもった応答を制御するかは不明であるが、NFR1-CERK1キメラ分子を用いた相互作用解析の結果からモデルを考えると(Fig. 5-2)、キチン認識・応答系では、細胞内ドメインを持たないCEBiPがキチンオリゴ糖を受容して、OsCERK1と複合体を形成することで、防御応答を誘導するが(64, 65)、Myc-factor認識・応答系では、OsCERK1と未知のLysM-RLKがMyc-factorを受容し、OsCERK1はそのLysM-RLKと細胞内ドメイン間を通じてSYMRKと複合体を形成することでSYMRKを活性化し、共生応答を制御するかもしれない。

イネには、LysM型の受容体様キナーゼがOsCERK1を含めて10遺伝子存在している(64)。これまでに、NFR5のホモログであるOsRLK2の欠損変異体で菌根菌共生の影響が評価されたが、OsRLK2の有無に関わらず菌根菌共生が誘導されることが示されている(113)。そのため、OsCERK1を介した共生応答の制御には、OsRLK2が関わらないか、もしくは重複した機能を持つ分子に関わる可能性が考えられる。しかし菌根菌共生におけるイネLysM型分子の役割に関してはまだ不明の点が多く、現段階では、まずはOsCERK1がMyc-factorの受容に関わるかということや、菌根菌共生における役割をより詳細に明らかにする必要があると考えられる。本論文で示したCERK1型分子の細胞内ドメインの違いがNFR5との相互作用に与える影響に関する知見は、OsCERK1の菌根菌共生における役割が明らかにされた後、どのようにして相反する応答を制御するかを理解するうえで重要な知見になると期待している。

本論文では、**CERK1** の活性化機構と細胞内ドメインリン酸化との関連、また、細胞内ドメインの構造と下流の応答の制御機構に着目して解析を進めた結果、**CERK1** のシグナル伝達起動機構および、**CERK1** 型分子を介した共生応答の切り替えに関していくつかの重要な知見を得ることができたと考えている。序論で述べたように、近年、植物・微生物相互作用システムを人為的に制御することで、病害や農薬・窒素肥料の使用を低減し、持続可能な農業を目指す戦略が注目されている。本研究で得られた知見が、こうした方向性をもった技術開発の基盤的な知見として役立つことを期待している。

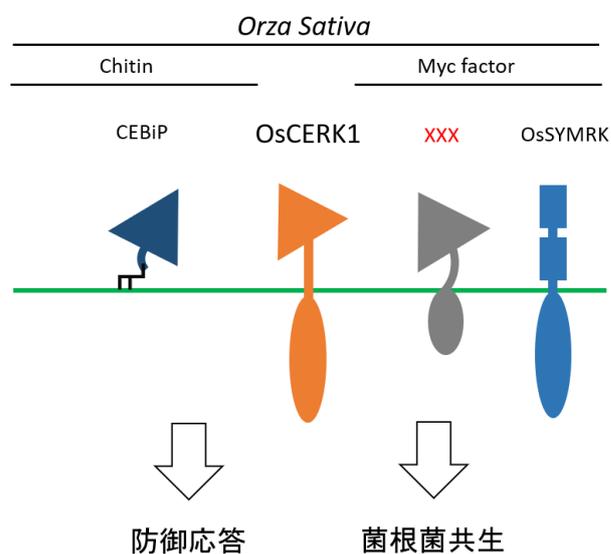


Fig. 5-2 OsCERK1 を介した防御応答系と共生応答系のモデル図

OsCERK1 は細胞内ドメインを持たない CEBiP と複合体を形成し、キチン防御シグナル伝達をする。一方で、OsCERK1 は CEBiP とは異なる細胞内ドメインを持つパートナー分子と相互作用することで、共生応答を起動すると推測している。

抗体リスト

抗 HA タグ抗体...roche (11867423001) 、溶液に対して 10000 倍希釈して使用した。

抗 GST タグ抗体...Wako (017-21854) 、溶液に対して 10000 倍希釈して使用した。

抗 6×His タグ抗体...Wako (011-023091) 、溶液に対して 10000 倍希釈して使用した。

抗 Strep タグ抗体...MBL (m221-3) 、溶液に対して 10000 倍希釈して使用した。

抗 MBP タグ抗体...Wako (016-24141) 、溶液に対して 10000 倍希釈して使用した。

抗 Myc タグ抗体...Cell signaling (2278) 、溶液に対して 10000 倍希釈して使用した。

抗ホスホセリン抗体...Millipore (ab1603) 、溶液に対して 10000 倍希釈して使用した。

抗ホスホチロシン抗体...Millipore (05-321) 、溶液に対して 10000 倍希釈して使用した。

抗 CERK1 抗体...CERK1 の細胞外領域のペプチド (CSNIKDKDRIQMGSRV) を認識する抗体でラビットを用いて作製した。2000 倍希釈で使用した。

抗 AtCEBiP 抗体...大腸菌発現 AtCEBiP を抗原として作製した AtCEBiP ポリクローナル抗体。5000 倍希釈で使用した。

抗 MBP 抗体...GeneTex (GTX11161) 、溶液に対して 2000 倍希釈して使用した。

<in vitro ターゲット MS/MS 解析>

In_vitro_exp#2									
MH+ [Da]	m/z [Da]		Modifications	Missed Cleavages	Sequence	Length	Ser	Thr	Tyr
	Charge 2	Charge 3							
1425.6199	713.3136		1Phospho	0	AGSAAAFPTIAYR	13	1	1	2
1505.5862	753.2967	502.5336	2Phospho	0	AGSAAAFPTIAYR	13	1	1	2
1553.7148	777.3610	518.5764	1Phospho	1	AGSAAAFPTIAYRK	14	1	1	2
1633.6812	817.3442	545.2319	2Phospho	1	AGSAAAFPTIAYRK	14	1	1	2
2818.3236	1409.6654	940.1127	1Phospho	1	ATDNFNLSFKGGGGGFGAVYYAELR	25	1	1	2
2898.2900	1449.6486	966.7682	2Phospho	1	ATDNFNLSFKGGGGGFGAVYYAELR	25	1	1	2
2245.9545	1123.4809	749.3230	1Phospho	0	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	21	1	2	2
2325.9209	1163.4641	775.9785	2Phospho	0	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	21	1	2	2
4112.9677		1371.6607	1Phospho	1	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAKDVYAFQVWLYELISAK	38	2	2	4
4192.9340		1398.3162	2Phospho	1	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAKDVYAFQVWLYELISAK	38	2	2	4
4272.9003		1424.9716	3Phospho	1	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAKDVYAFQVWLYELISAK	38	2	2	4
4352.8667		1451.6271	4Phospho	1	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAKDVYAFQVWLYELISAK	38	2	2	4
2028.9691	1014.9882	576.9945	1Phospho	0	GLEYIHEHTVPVYVHR	16	0	1	2
2108.9355	1054.9714	703.6500	2Phospho	0	GLEYIHEHTVPVYVHR	16	0	1	2
2385.1751	1193.0912	795.7289	1Phospho	1	GLEYIHEHTVPVYVHRDK	19	0	1	2
2465.1414	1233.0743	822.3853	2Phospho	1	GLEYIHEHTVPVYVHRDK	19	0	1	2
2369.2166	1185.1119	790.4104	1Phospho	1	GLEYIHEHTVPVYVHRVK	19	0	1	2
2449.1829	1225.0951	817.0658	2Phospho	1	GLEYIHEHTVPVYVHRVK	19	0	1	2
1680.7781	840.8927	560.9309	1Phospho	0	IGGGGFGAVYYAELR	15	0	0	2
1760.7445	880.8759	587.5863	2Phospho	0	IGGGGFGAVYYAELR	15	0	0	2
1994.9372	997.9722	665.6505	1Phospho	1	IGGGGFGAVYYAELRGEK	18	0	0	2
2074.9035	1037.9554	692.3060	2Phospho	1	IGGGGFGAVYYAELRGEK	18	0	0	2
2064.9678	1032.9875	688.9941	1Phospho	1	IDRFLGDSYFFDSVYK	17	2	0	2
2144.9341	1072.9707	715.6495	2Phospho	1	IDRFLGDSYFFDSVYK	17	2	0	2
1553.7148	777.3610	518.5764	1Phospho	1	KAGSAAAFPTIAYR	14	1	1	2
1633.6812	817.3442	545.2319	2Phospho	1	KAGSAAAFPTIAYRK	14	1	1	2
1470.6189	735.8131		1Phospho	0	LQDSYFFDSVYK	12	2	0	2
1560.5852	775.7962	517.5332	2Phospho	0	LQDSYFFDSVYK	12	2	0	2
2099.9395	1050.4734	700.6513	1Phospho	1	LQDSYFFDSVYKMAELGK	18	2	0	2
2179.9059	1090.4566	727.3068	2Phospho	1	LQDSYFFDSVYKMAELGK	18	2	0	2
3960.6668		1187.5604	1Phospho	0	LIGYCVGSLFLVYEVYENGNGQLHGSGR	31	2	0	3
3640.6332		1214.2159	2Phospho	0	LIGYCVGSLFLVYEVYENGNGQLHGSGR	31	2	0	3
3720.5995		1240.8713	3Phospho	0	LIGYCVGSLFLVYEVYENGNGQLHGSGR	31	2	0	3
4412.1210		1471.3795	1Phospho	1	LIGYCVGSLFLVYEVYENGNGQLHGSGRREPLPWTK	38	2	1	3
4482.0873		1498.0339	2Phospho	1	LIGYCVGSLFLVYEVYENGNGQLHGSGRREPLPWTK	38	2	1	3
3217.4581		1073.1575	1Phospho	1	LTEVGGSATRQAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	31	2	4	2
3297.4245		1099.8130	2Phospho	1	LTEVGGSATRQAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	31	2	4	2
1965.9973	983.5023	656.0039	1Phospho	0	VDVYAFQVWLYELISAK	17	1	0	2
2045.9636	1023.4854	682.6594	2Phospho	0	VDVYAFQVWLYELISAK	17	1	0	2
3420.2877	1210.6475	807.4341	1Phospho	1	VDVYAFQVWLYELISAKQAVK	22	1	0	2
2500.2540	1250.6306	834.0895	2Phospho	1	VDVYAFQVWLYELISAKQAVK	22	1	0	2
2982.4986	1491.7529	994.8377	1Phospho	1	VQALDLSARQLEYIHEHTVPVYVHR	25	1	1	2
3062.4649		1021.4931	2Phospho	1	VQALDLSARQLEYIHEHTVPVYVHR	25	1	1	2
3699.7401		1233.9182	1Phospho	0	YIVVALSTLFSSTGNWDVGNFQNEQLVLSMSGR	33	5	2	1

In_vitro_exp#5									
MH+ [Da]	m/z [Da]		Modifications	Missed Cleavages	Sequence	Length	Ser	Thr	Tyr
	Charge 2	Charge 3							
2790.3306		930.7817	1Phospho	0	ADHASSTSLGSGGLGGAGVSPQIAAISVDK	30	6	1	0
1236.5296	618.7684	412.8480	1Phospho	0	ATDNFNLSFK	10	1	1	0
2245.9545	1123.4809	749.3230	1Phospho	0	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	21	1	2	2
1405.6247	703.3160		1Phospho	0	QDSFSSSIPLSTK	13	5	1	0
2028.9691	1014.9882	576.9945	1Phospho	0	GLEYIHEHTVPVYVHR	16	0	1	2
2108.9355	1054.9714	703.6500	2Phospho	0	GLEYIHEHTVPVYVHR	16	0	1	2
1470.6189	735.8131	490.8778	1Phospho	0	LQDSYFFDSVYK	12	2	0	2
1070.4878	535.7475		1Phospho	0	LTEVGGSATR	10	1	2	0
1620.7517	810.8795		1Phospho	1	SKQDSFSSSIPLSTK	15	6	1	0
930.4332	465.7202		1Phospho	0	VADRGLTK	8	0	1	0
1901.9368	951.4720	634.6504	1Phospho	1	VADRGLTKLTVGGSATR	18	1	3	0
1965.9973	983.5023	656.0039	1Phospho	0	VDVYAFQVWLYELISAK	17	1	0	2

In_vitro_exp#1,2									
MH+ [Da]	m/z [Da]		Modifications	Missed Cleavages	Sequence	Length	Ser	Thr	Tyr
	Charge 2	Charge 3							
2790.3306		930.7817	1Phospho	0	ADHASSTSLGSGGLGGAGVSPQIAAISVDK	30	6	1	0
1236.5296	618.7684	412.8480	1Phospho	0	ATDNFNLSFK	10	1	1	0
2245.9545	1123.4809	749.3230	1Phospho	0	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	21	1	2	2
1405.6247	703.3160		1Phospho	0	QDSFSSSIPLSTK	13	5	1	0
2028.9691	1014.9882	576.9945	1Phospho	0	GLEYIHEHTVPVYVHR	16	0	1	2
2108.9355	1054.9714	703.6500	2Phospho	0	GLEYIHEHTVPVYVHR	16	0	1	2
1470.6189	735.8131	490.8778	1Phospho	0	LQDSYFFDSVYK	12	2	0	2
1070.4878	535.7475		1Phospho	0	LTEVGGSATR	10	1	2	0
1620.7517	810.8795		1Phospho	1	SKQDSFSSSIPLSTK	15	6	1	0
930.4332	465.7202		1Phospho	0	VADRGLTK	8	0	1	0
1901.9368	951.4720	634.6504	1Phospho	1	VADRGLTKLTVGGSATR	18	1	3	0
1965.9973	983.5023	656.0039	1Phospho	0	VDVYAFQVWLYELISAK	17	1	0	2

Fig. 5-4 CERK1 の in vitro 自己リン酸化部位のターゲット MS/MS 解析
 示したペプチドに対して、MS/MS を行い、リン酸化部位の同定を進めた。

<in vivo ターゲット MS/MS 解析>

in_vivo_exp#3

MH+ [Da]	m/z [Da]		Modifications	Missed Cleavages	Sequence	Length	Ser	Thr	Tyr
	Charge 2	Charge 3							
1434.6368	717.8220	478.8838	2Oxidation	2	AAIKKMDMEASK	12	1	0	0
1129.5653	565.2983		1Phospho	1	AKVADFLTK	10	0	1	0
1236.5296	618.7684	412.8480	1Phospho	0	ATDNFNLSFK	10	1	1	0
2818.3236	1409.6654	940.1127	1Phospho	1	ATDNFNLSFKIQGGFGAVYYAELR	25	1	1	2
2261.9494	1131.4783	754.6546	1Oxidation	0	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	21	1	2	2
			1Phospho						
2341.9158	1171.4615	781.3101	1Oxidation	0	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	21	1	2	2
			2Phospho						
2245.9545	1123.4809	749.3230	1Phospho	0	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	21	1	2	2
2357.9107	1179.4590	786.6417	2Oxidation	0	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	21	1	2	2
			2Phospho						
2325.9209	1163.4641	775.9785	2Phospho	0	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	21	1	2	2
4128.9626		1376.9924	1Oxidation	1	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAKVDVYAFGWLYELISAK	38	2	2	4
			1Phospho						
4208.9289		1403.6478	1Oxidation	1	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAKVDVYAFGWLYELISAK	38	2	2	4
			2Phospho						
4112.9677		1371.6607	1Phospho	1	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAKVDVYAFGWLYELISAK	38	2	2	4
			2Oxidation						
4224.9238		1408.9794	2Phospho	1	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAKVDVYAFGWLYELISAK	38	2	2	4
4192.9340		1398.3182	2Phospho	1	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAKVDVYAFGWLYELISAK	38	2	2	4
2028.9691	1014.9882	676.9645	1Phospho	0	GLEVIHEHTVPVYVHR	16	0	1	2
2108.9355	1054.9714	703.6500	2Phospho	0	GLEVIHEHTVPVYVHR	16	0	1	2
2385.1751	1193.0912	785.7299	1Phospho	1	GLEVIHEHTVPVYVHRDIK	19	0	1	2
2465.1414	1233.0743	822.3853	2Phospho	1	GLEVIHEHTVPVYVHRDIK	19	0	1	2
2064.9678	1032.9875	688.9941	1Phospho	1	IIDPRLGDSYPFDSVYK	17	2	0	2
2144.9341	1072.9707	715.6495	2Phospho	1	IIDPRLGDSYPFDSVYK	17	2	0	2
1035.3887	518.1980		1Oxidation	1	KMDMEASK	8	1	0	0
			1Phospho						
1019.3937	510.2005		1Phospho	1	KMDMEASK	8	1	0	0
1051.3836	526.1954		2Oxidation	1	KMDMEASK	8	1	0	0
			1Phospho						
1470.6189	735.8131	490.8778	1Phospho	0	LGDSYPFDSVYK	12	2	0	2
1550.5852	775.7962	517.5332	2Phospho	0	LGDSYPFDSVYK	12	2	0	2
2115.9345	1058.4709	705.9830	1Oxidation	1	LGDSYPFDSVYKMAELGK	18	2	0	2
			1Phospho						
2195.9008	1098.4540	732.6384	1Oxidation	1	LGDSYPFDSVYKMAELGK	18	2	0	2
			2Phospho						
2099.9395	1050.4734	700.6513	1Phospho	1	LGDSYPFDSVYKMAELGK	18	2	0	2
2179.9059	1090.4566	727.3068	2Phospho	1	LGDSYPFDSVYKMAELGK	18	2	0	2
3560.6688		1187.5604	1Phospho	0	LIGYCVEGSLFLVYEVENGNLGQHLHGSGR	31	2	0	3
3640.6332		1214.2159	2Phospho	0	LIGYCVEGSLFLVYEVENGNLGQHLHGSGR	31	2	0	3
4412.1210		1471.3785	1Phospho	1	LIGYCVEGSLFLVYEVENGNLGQHLHGSGREPLPWTK	38	2	1	3
4492.0873		1498.0339	2Phospho	1	LIGYCVEGSLFLVYEVENGNLGQHLHGSGREPLPWTK	38	2	1	3
1070.4878	535.7475		1Phospho	0	LTEVGGSATR	10	1	2	0
3233.4531		1078.4892	1Oxidation	1	LTEVGGSATR	31	2	4	2
			1Phospho						
3313.4194		1105.1446	1Oxidation	1	LTEVGGSATR	31	2	4	2
			2Phospho						
3393.3857		1131.8001	1Oxidation	1	LTEVGGSATR	31	2	4	2
			3Phospho						
3217.4581		1073.1575	1Phospho	1	LTEVGGSATR	31	2	4	2
3329.4143		1110.4763	2Oxidation	1	LTEVGGSATR	31	2	4	2
			2Phospho						
3409.3806		1137.1317	2Oxidation	1	LTEVGGSATR	31	2	4	2
			3Phospho						
3297.4245		1099.8130	2Phospho	1	LTEVGGSATR	31	2	4	2
3377.3908		1126.4684	3Phospho	1	LTEVGGSATR	31	2	4	2
907.2937	454.1505		1Oxidation	0	MDMEASK	7	1	0	0
			1Phospho						
891.2988	446.1530		1Phospho	0	MDMEASK	7	1	0	0
923.2886	462.1479		2Oxidation	0	MDMEASK	7	1	0	0
			1Phospho						
1736.7635	868.8854	579.5927	1Oxidation	1	MDMEASKQLAELK	14	1	0	0
			1Phospho						
1720.7686	860.8879	574.2610	1Phospho	1	MDMEASKQLAELK	14	1	0	0
1752.7584	876.8828	584.9243	2Oxidation	1	MDMEASKQLAELK	14	1	0	0
			1Phospho						
2222.0597	1111.5335	741.3581	2Oxidation	2	MDMEASKQLAELKVLTR	18	1	1	0
			1Phospho						
2469.1585	1235.0829	823.7243	1Phospho	1	SVEFSLLEELAKATDNFNLSFK	21	3	1	0
930.4332	465.7202		1Phospho	0	VADFLTK	8	0	1	0
1901.9388	951.4720	634.6504	1Phospho	1	VADFLTKLTVGVGSSATR	18	1	3	0
2982.4988	1491.7529	994.8377	1Phospho	1	VQIALDSARGLEYIHEHTVPVYVHR	25	1	1	2
3082.4649		1021.4931	2Phospho	1	VQIALDSARGLEYIHEHTVPVYVHR	25	1	1	2

in_vivo_exp#5,6

MH+ [Da]	m/z [Da]			Modifications	Missed Cleavages	Sequence	Length	Ser	Thr	Tyr
	Charge 2	Charge 3	Charge 4							
1757.7459	879.3766			1Oxidation	0	ACTQENAQLRPSMR	14	1	1	0
				1Phospho	0	ACTQENAQLRPSMR	14	1	1	0
1741.7510	871.3791	581.2552		1Phospho	0	ADHASSTSLQSGGLGGAGVSPGIAAISVDK	30	6	1	0
2790.3306	1395.6689	930.7817		1Phospho	0	ADHASSTSLQSGGLGGAGVSPGIAAISVDK	41	8	1	0
4022.9594		1341.6580		1Phospho	1	ADHASSTSLQSGGLGGAGVSPGIAAISVDK	41	8	1	0
1425.6199	713.3136			1Phospho	0	AGSAAAPFTYAYR	13	1	1	2
1553.7148	777.3610			1Phospho	1	AGSAAAPFTYAYR	14	1	1	2
1236.5296	618.7684			1Phospho	0	ATDNFNLSFK	10	1	1	0
1521.7237	761.3655			1Phospho	1	DFETLKVDLFSK	12	1	1	0
1437.7349	719.3711			1Phospho	1	DIKSANLIDQK	12	1	0	0
2245.9545	1123.4809			1Phospho	0	GAMGTFGYMAPETVYGEVSAK	21	1	2	2
1405.6247	703.3160			1Phospho	0	GDSFSSSIPLSTK	13	5	1	0
2028.9691	1014.9882			1Phospho	0	GLEYIHEHTVPVYVHR	16	0	1	2
2108.9355		703.6500		2Phospho	0	GLEYIHEHTVPVYVHR	16	0	1	2
2363.1166		788.3770		1Phospho	2	GLVGVFEESFKETDKEEALR	20	1	1	0
1394.6603	697.83379			1Phospho	1	IAYSKDFETLK	11	1	1	1
1553.7148	777.3610			1Phospho	1	KAGSAAAPFTYAYR	14	1	1	2
1633.6812	817.3442			2Phospho	1	KAGSAAAPFTYAYR	14	1	1	2
1864.8584		622.2910		1Oxidation	2	KMDMEASKQFLAELK	15	1	0	0
				1Phospho	2	KMDMEASKQFLAELK	15	1	0	0
1848.8635	924.9354	616.9593		1Phospho	2	KMDMEASKQFLAELK	15	1	0	0
1470.6189	735.8131			1Phospho	0	LGDSYFPDSVYK	12	2	0	2
4412.1210			1103.7857	1Phospho	1	LIGYCVESGSLFLVYEVENGLGQHLHGSGREPLPWTK	38	2	1	3
1070.4878	535.7475			1Phospho	0	LTEVGGSATR	10	1	2	0
1720.7686	860.8879			1Phospho	1	MDMEASKQFLAELK	14	1	0	0
1119.4540	560.2308			1Phospho	0	MTEAVGEFR	9	0	1	0
1081.5289	541.2881			1Phospho	0	SANLIDQK	9	1	0	0
1970.9372	985.9722			1Phospho	0	SDLVPRPWSNQTSLYK	16	3	1	1
2099.0321	1050.0197	700.3489		1Phospho	1	SDLVPRPWSNQTSLYK	17	3	1	1
1620.7517	810.8795			1Phospho	1	SKGDSFSSSIPLSTK	15	6	1	0
930.4332	465.7202			1Phospho	0	VADFGLTK	8	0	1	0
1901.9368	951.4720			1Phospho	1	VADFGLTKLTEVGGSATR	18	1	3	0
1965.9973	983.5023			1Phospho	0	VQVYAFGVLYELISAK	17	1	0	2
2406.1067	1203.5570			1Phospho	0	YIAWPLGGWQATFGGDDHPPK	21	0	1	1

Fig. 5-6 CERK1 の *in vivo* 自己リン酸化部位のターゲット MS/MS 解析
 示したペプチドに対して、MS/MS を行い、リン酸化部位の同定を進めた。

謝辞

本研究の遂行ならびに論文を完成させるにあたって多くの方にご指導、ご協力を頂きました。ここに皆様に感謝を申し上げます。

本研究テーマを与えていただき、技術面から論文作成に至るまで終始あたたかいご指導と激励を賜りました明治大学 賀来華江 教授に心から感謝申し上げます。

本論文の審査をしていただき、ご助言、ご指導いただき、また、LC/MS/MS 解析にも協力していただきました明治大学 紀藤圭治 准教授に深く感謝申し上げます。

同じく本論文の審査をしていただき、ご助言、ご指導いただき、また、研究に対する考え方などを示してくださいました明治大学 川上直人 教授に深く感謝申し上げます。

研究遂行の過程で多くの、ご助言、ご指導、さらには研究に対する姿勢など、あらゆる面で多大なるご指導と激励を賜りました明治大学 澁谷直人 名誉教授に心から感謝申し上げます。

CERK1 細胞内ドメインの分子モデリングを作製していただき、また、研究遂行過程での技術面のご指導、論文作成過程においては、ご助言をいただきました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 藤本瑞 博士に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり多くのご助言、ご協力を頂き、ご指導くださり、また、公私ともに大変お世話になりました、明治大学 出崎能丈 博士に深く感謝申し上げます。

本研究で用いたエントリークローンを分与して頂き、また、研究に対する考え方などを示してくださり、公私ともに大変お世話になりました、名古屋大学 中川知己 特任助教に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、研究室の入室時から多くの技術的指導、ご助言、ご協力を頂きました、岡山大学 新屋友規 助教、本研究室卒業生 早船真広 博士に感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、ご助言、ご協力ご指導を頂きました 宮田佳奈 博士、霜野真幸 博士に感謝いたします。

そして、研究を進めるにあたり、技術指導、ご助言、ご協力など、公私ともに多大にお世話になった、環境応答植物学研究室、環境応答生物学研究室内の、宇都宮駿介、佐藤健太、末永貴義、元山記子、大友一平、小林佳弘、前田佳菜子を始めとした諸先輩方、島田日加瑠、十文字純一、竹田潤、宮本綾乃、谷本匠を始めとした同期の方々、中島正登、渋谷匡俊、須藤健吉、八嶋航平、高橋昌平、田中優太、小針政輝、小泉春樹、吉田一誠、松井紗樹、渡邊巧、沼崎椋太、を始めとした後輩の皆様に感謝いたします。特に、須藤健吉、吉田一誠には、4年間にわたって同じグループのメンバーとして研究を支えてくださり、多大なご協力を頂きました。改めて感謝申し上げます。

また、あらゆる面で大きなサポートをしてくださった家族、親族ならびに友人に感謝いたします。

最後に私が9年間も大学に通い、研究を続けてこられたのは両親の理解なくしてなし得なかったものだと思います。この場をかりて両親に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. The_World_Bank (2014):<http://data.worldbank.org/indicator/AG.PRD.CREL.MT>.
2. United_Nations (2015):<https://esa.un.org/unpd/wpp/>.
3. The_World_Bank (2010) world development report 2010.
4. Boller T & Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:379-406.
5. Thomma BP, Nurnberger T, & Joosten MH (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant cell* 23(1):4-15.
6. Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, & Henson JM (2002) Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 298(5598):1581.
7. Rodriguez RJ, *et al.* (2008) Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME J* 2(4):404-416.
8. Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, & Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* 17(10):458-466.
9. Gutjahr C & Parniske M (2013) Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29:593-617.
10. Almario J, *et al.* (2017) Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal *Arabis alpina* and its contribution to plant phosphorus nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114(44):E9403-E9412.
11. van der Heijden MGA, Dombrowski N, & Schlaeppi K (2017) Continuum of root-fungal symbioses for plant nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114(44):11574-11576.
12. van der Heijden MG, Martin FM, Selosse MA, & Sanders IR (2015) Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *The New phytologist* 205(4):1406-1423.
13. Miwa H & Okazaki S (2017) How effectors promote beneficial interactions. *Current opinion in plant biology* 38:148-154.
14. Zhang X, Dodds PN, & Bernoux M (2017) What Do We Know About NOD-Like Receptors in Plant Immunity? *Annu. Rev. Phytopathol.* 55:205-229.
15. Zipfel C & Oldroyd GE (2017) Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543(7645):328-336.
16. Burketova L, Trda L, Ott PG, & Valentova O (2015) Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnol Adv* 33(6 Pt 2):994-1004.

17. Gomez-Gomez L & Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular cell* 5(6):1003-1011.
18. Zipfel C, *et al.* (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* 125(4):749-760.
19. Kaku H, *et al.* (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(29):11086-11091.
20. Nurnberger T & Brunner F (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current opinion in plant biology* 5(4):318-324.
21. Flor HH (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32:653-669.
22. Yoshida K, *et al.* (2016) Host specialization of the blast fungus *Magnaporthe oryzae* is associated with dynamic gain and loss of genes linked to transposable elements. *BMC Genomics* 17:370.
23. Rouxel T & Balesdent MH (2017) Life, death and rebirth of avirulence effectors in a fungal pathogen of Brassica crops, *Leptosphaeria maculans*. *The New phytologist* 214(2):526-532.
24. Liu W, Liu J, Triplett L, Leach JE, & Wang GL (2014) Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52:213-241.
25. Van der Biezen EA & Jones JD (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in biochemical sciences* 23(12):454-456.
26. van der Hoorn RA & Kamoun S (2008) From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant cell* 20(8):2009-2017.
27. Jones JD & Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444(7117):323-329.
28. Tsuda K & Katagiri F (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current opinion in plant biology* 13(4):459-465.
29. Gust AA & Felix G (2014) Receptor like proteins associate with SOBIR1-type of adaptors to form bimolecular receptor kinases. *Current opinion in plant biology* 21:104-111.
30. Che FS, *et al.* (2000) Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. *The Journal of biological chemistry* 275(41):32347-32356.

31. Taguchi F, *et al.* (2003) Post-translational modification of flagellin determines the specificity of HR induction. *Plant & cell physiology* 44(3):342-349.
32. Wirthmueller L, Zhang Y, Jones JD, & Parker JE (2007) Nuclear accumulation of the Arabidopsis immune receptor RPS4 is necessary for triggering EDS1-dependent defense. *Curr. Biol.* 17(23):2023-2029.
33. Boutrot F & Zipfel C (2017) Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55:257-286.
34. Lerouge P, *et al.* (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344(6268):781-784.
35. Broghammer A, *et al.* (2012) Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(34):13859-13864.
36. Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, & Downie JA (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45:119-144.
37. Radutoiu S, *et al.* (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425(6958):585-592.
38. Madsen EB, *et al.* (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425(6958):637-640.
39. Nakagawa T, *et al.* (2011) From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium symbiosis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 65(2):169-180.
40. Okazaki S, Kaneko T, Sato S, & Saeki K (2013) Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(42):17131-17136.
41. Cook DE, Mesarich CH, & Thomma BP (2015) Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53:541-563.
42. Yu X, Feng B, He P, & Shan L (2017) From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55:109-137.
43. Gomez-Gomez L, Felix G, & Boller T (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 18(3):277-284.
44. Gomez-Gomez L, Bauer Z, & Boller T (2001) Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and

- signaling in Arabidopsis. *The Plant cell* 13(5):1155-1163.
45. Chinchilla D, *et al.* (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448(7152):497-500.
 46. Heese A, *et al.* (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(29):12217-12222.
 47. Sun Y, *et al.* (2013) Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. *Science* 342(6158):624-628.
 48. Schulze B, *et al.* (2010) Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *The Journal of biological chemistry* 285(13):9444-9451.
 49. Lu D, *et al.* (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(1):496-501.
 50. Zhang J, *et al.* (2010) Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell host & microbe* 7(4):290-301.
 51. Kadota Y, *et al.* (2014) Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Molecular cell* 54(1):43-55.
 52. Day RB, *et al.* (2001) Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. *Plant physiology* 126(3):1162-1173.
 53. Okada M, Matsumura M, Ito Y, & Shibuya N (2002) High-affinity binding proteins for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membranes from wheat, barley and carrot cells: conserved presence and correlation with the responsiveness to the elicitor. *Plant & cell physiology* 43(5):505-512.
 54. Miya A, *et al.* (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(49):19613-19618.
 55. Wan J, *et al.* (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. *The Plant cell* 20(2):471-481.
 56. Shinya T, *et al.* (2012) Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in arabidopsis and rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants. *Plant & cell physiology* 53(10):1696-1706.
 57. Iizasa E, Mitsutomi M, & Nagano Y (2010) Direct binding of a plant LysM receptor-like kinase, LysM RLK1/CERK1, to chitin in vitro. *The Journal of biological chemistry* 285(5):2996-3004.
 58. Petutschnig EK, Jones AM, Serazetdinova L, Lipka U, & Lipka V (2010) The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in

- Arabidopsis thaliana and subject to chitin-induced phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 285(37):28902-28911.
59. Liu T, *et al.* (2012) Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science* 336(6085):1160-1164.
 60. Wan J, *et al.* (2012) LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in Arabidopsis. *Plant physiology* 160(1):396-406.
 61. Cao Y, *et al.* (2014) The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife* 3:e03766.
 62. Desaki Y, *et al.* (2017) OsCERK1 plays a crucial role in the lipopolysaccharide-induced immune response of rice. *The New phytologist*.
 63. Gong BQ, *et al.* (2017) Rice Chitin Receptor OsCEBiP Is Not a Transmembrane Protein but Targets the Plasma Membrane via a GPI Anchor. *Molecular plant* 10(5):767-770.
 64. Shimizu T, *et al.* (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 64(2):204-214.
 65. Hayafune M, *et al.* (2014) Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111(3):E404-413.
 66. Wang W, Xie ZP, & Staehelin C (2014) Functional analysis of chimeric lysin motif domain receptors mediating Nod factor-induced defense signaling in Arabidopsis thaliana and chitin-induced nodulation signaling in Lotus japonicus. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 78(1):56-69.
 67. Shinya T, *et al.* (2014) Selective regulation of the chitin-induced defense response by the Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinase PBL27. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 79(1):56-66.
 68. Yamada K, *et al.* (2016) The Arabidopsis CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation. *The EMBO journal* 35(22):2468-2483.
 69. Yamaguchi K, *et al.* (2013) A receptor-like cytoplasmic kinase targeted by a plant pathogen effector is directly phosphorylated by the chitin receptor and mediates rice immunity. *Cell host & microbe* 13(3):347-357.
 70. Ao Y, *et al.* (2014) OsCERK1 and OsRLCK176 play important roles in peptidoglycan and chitin signaling in rice innate immunity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 80(6):1072-1084.
 71. Li Z, *et al.* (2017) OsRLCK 57, OsRLCK107 and OsRLCK118 Positively Regulate Chitin- and PGN-Induced Immunity in Rice. *Rice* 10(1):6.

72. Yamada K, Yamaguchi K, Yoshimura S, Terauchi A, & Kawasaki T (2017) Conservation of Chitin-Induced MAPK Signaling Pathways in Rice and Arabidopsis. *Plant & cell physiology* 58(6):993-1002.
73. Wang X, *et al.* (2008) Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Developmental cell* 15(2):220-235.
74. Cao Y, *et al.* (2013) Mutations in FLS2 Ser-938 dissect signaling activation in FLS2-mediated Arabidopsis immunity. *PLoS pathogens* 9(4):e1003313.
75. Yan L, *et al.* (2012) Structural basis for the impact of phosphorylation on the activation of plant receptor-like kinase BAK1. *Cell research* 22(8):1304-1308.
76. Kouchi H, *et al.* (2010) How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant & cell physiology* 51(9):1381-1397.
77. Madsen EB, *et al.* (2011) Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the Lotus japonicus Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 65(3):404-417.
78. Stracke S, *et al.* (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417(6892):959-962.
79. Antolin-Llovera M, Ried MK, & Parniske M (2014) Cleavage of the SYMBIOSIS RECEPTOR-LIKE KINASE ectodomain promotes complex formation with Nod factor receptor 5. *Curr. Biol.* 24(4):422-427.
80. Ried MK, Antolin-Llovera M, & Parniske M (2014) Spontaneous symbiotic reprogramming of plant roots triggered by receptor-like kinases. *eLife* 3:e03891.
81. Miyata K, *et al.* (2014) The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant & cell physiology* 55(11):1864-1872.
82. Zhang X, *et al.* (2015) The receptor kinase CERK1 has dual functions in symbiosis and immunity signalling. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 81(2):258-267.
83. Kouzai Y, Kaku H, Shibuya N, Minami E, & Nishizawa Y (2013) Expression of the chimeric receptor between the chitin elicitor receptor CEBiP and the receptor-like protein kinase Pi-d2 leads to enhanced responses to the chitin elicitor and disease resistance against Magnaporthe oryzae in rice. *Plant molecular biology* 81(3):287-295.
84. Desaki Y, Miyata K, Suzuki M, Shibuya N, & Kaku H (2017) Plant immunity and symbiosis signaling mediated by LysM receptors. *Innate immunity* in press:1753425917738885.

85. Li L, Yu Y, Zhou Z, & Zhou JM (2016) Plant pattern-recognition receptors controlling innate immunity. *Science China. Life sciences* 59(9):878-888.
86. Xu WH, *et al.* (2006) The autophosphorylated Ser686, Thr688, and Ser689 residues in the intracellular juxtamembrane domain of XA21 are implicated in stability control of rice receptor-like kinase. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 45(5):740-751.
87. Karlova R, *et al.* (2009) Identification of in vitro phosphorylation sites in the Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor-like kinases. *Proteomics* 9(2):368-379.
88. Oh MH, *et al.* (2009) Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(2):658-663.
89. Chen X, *et al.* (2010) A conserved threonine residue in the juxtamembrane domain of the XA21 pattern recognition receptor is critical for kinase autophosphorylation and XA21-mediated immunity. *The Journal of biological chemistry* 285(14):10454-10463.
90. Oh MH, *et al.* (2010) Autophosphorylation of Tyr-610 in the receptor kinase BAK1 plays a role in brassinosteroid signaling and basal defense gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(41):17827-17832.
91. Macho AP, *et al.* (2014) A bacterial tyrosine phosphatase inhibits plant pattern recognition receptor activation. *Science* 343(6178):1509-1512.
92. Suzuki M, *et al.* (2016) Autophosphorylation of Specific Threonine and Tyrosine Residues in Arabidopsis CERK1 is Essential for the Activation of Chitin-Induced Immune Signaling. *Plant & cell physiology* 57(11):2312-2322.
93. Nakagawa T, *et al.* (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of bioscience and bioengineering* 104(1):34-41.
94. Curtis MD & Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant physiology* 133(2):462-469.
95. Pietraszewska-Bogiel A, *et al.* (2013) Interaction of Medicago truncatula lysin motif receptor-like kinases, NFP and LYK3, produced in Nicotiana benthamiana induces defence-like responses. *PLoS One* 8(6):e65055.
96. Jura N, *et al.* (2009) Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* 137(7):1293-1307.
97. Sato K (2013) Cellular functions regulated by phosphorylation of EGFR on Tyr845. *Int J Mol Sci* 14(6):10761-10790.
98. Song H, *et al.* (2014) Transphosphorylation of EGFR at Y845 plays an important role

- in its autophosphorylation and kinase activity. *Oncol Rep* 31(5):2393-2398.
99. Yamaguchi K, Mezaki H, Fujiwara M, Hara Y, & Kawasaki T (2017) Arabidopsis ubiquitin ligase PUB12 interacts with and negatively regulates Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 (CERK1). *PLoS One* 12(11):e0188886.
 100. Wan J, Zhang S, & Stacey G (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in Arabidopsis by chitin. *Molecular plant pathology* 5(2):125-135.
 101. Frerigmann H, Glawischnig E, & Gigolashvili T (2015) The role of MYB34, MYB51 and MYB122 in the regulation of camalexin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in plant science* 6:654.
 102. Klaus-Heisen D, *et al.* (2011) Structure-function similarities between a plant receptor-like kinase and the human interleukin-1 receptor-associated kinase-4. *The Journal of biological chemistry* 286(13):11202-11210.
 103. Nolen B, Taylor S, & Ghosh G (2004) Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Molecular cell* 15(5):661-675.
 104. Salazar C & Hofer T (2009) Multisite protein phosphorylation--from molecular mechanisms to kinetic models. *FEBS J* 276(12):3177-3198.
 105. Kim TW & Wang ZY (2010) Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:681-704.
 106. Oh MH, *et al.* (2014) The Carboxy-terminus of BAK1 regulates kinase activity and is required for normal growth of Arabidopsis. *Frontiers in plant science* 5:16.
 107. Dardick C & Ronald P (2006) Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLoS pathogens* 2(1):e2.
 108. Dey M, Mann BR, Anshu A, & Mannan MA (2014) Activation of protein kinase PKR requires dimerization-induced cis-phosphorylation within the activation loop. *The Journal of biological chemistry* 289(9):5747-5757.
 109. Tong M & Seeliger MA (2015) Targeting conformational plasticity of protein kinases. *ACS Chem Biol* 10(1):190-200.
 110. Oldroyd GE (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature reviews. Microbiology* 11(4):252-263.
 111. Couto D & Zipfel C (2016) Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature reviews. Immunology* 16(9):537-552.
 112. Bozsoki Z, *et al.* (2017) Receptor-mediated chitin perception in legume roots is functionally separable from Nod factor perception. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114(38):E8118-E8127.
 113. Miyata K, *et al.* (2016) Evaluation of the Role of the LysM Receptor-Like Kinase,

- OsNFR5/OsRLK2 for AM Symbiosis in Rice. *Plant & cell physiology* 57(11):2283-2290.
114. Antolin-Llovera M, *et al.* (2014) Knowing your friends and foes--plant receptor-like kinases as initiators of symbiosis or defence. *The New phytologist* 204(4):791-802.
115. Bressendorff S, *et al.* (2016) An Innate Immunity Pathway in the Moss *Physcomitrella patens*. *The Plant cell* 28(6):1328-1342.
116. Willmann R, *et al.* (2011) Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(49):19824-19829.
117. Macho AP, Lozano-Duran R, & Zipfel C (2015) Importance of tyrosine phosphorylation in receptor kinase complexes. *Trends in plant science* 20(5):269-272.
118. Shiu SH & Bleeker AB (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(19):10763-10768.
119. Shiu SH, *et al.* (2004) Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *The Plant cell* 16(5):1220-1234.
120. Scheijen B & Griffin JD (2002) Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* 21(21):3314-3333.
121. Maillet F, *et al.* (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469(7328):58-63.
122. Genre A, *et al.* (2013) Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *The New phytologist* 198(1):190-202.
123. Sun J, *et al.* (2015) Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *The Plant cell* 27(3):823-838.
124. Barker DG, Chabaud M, Russo G, & Genre A (2017) Nuclear Ca(2+) signalling in arbuscular mycorrhizal and actinorhizal endosymbioses: on the trail of novel underground signals. *The New phytologist* 214(2):533-538.