

2014年1月14日
明治大学

報道関係各社 各位

病原菌を検出し防御応答を誘導する植物免疫受容体の活性化機構を解明 —動物とも共通する受容体 2 量体化を介したシグナル伝達機構の解明—

本研究成果のポイント

- カビの特徴的分子「キチン」を認識するイネ受容体の活性化機構を解明
- 2つの受容体がキチンオリゴ糖をサンドイッチのようにはさんで2量体を形成するユニークな活性化機構
- 免疫受容体や調節分子のデザインによる新たな病害防除技術開発の基盤的知見

明治大学（福宮賢一学長）、ナポリ大学（イタリア）、イタリア国立生体構造・バイオイメージング研究所（IBB-CNR）の研究グループは、カビなどの病原菌の感染を検出し、防御応答を誘導する機能を持つ植物免疫受容体の活性化機構を解明しました。

植物は、感染しようとするカビや細菌などの病原菌を検出し、さまざまな防御応答を開始する能力（植物免疫）を持っており、この能力を強化することが病害に強い作物の開発につながると期待されています。植物はこうした微生物に特徴的な分子群（微生物分子パターン；MAMPs^{※1}）を対応する受容体によって検出し、防御応答を開始することが知られていますが、微生物由来の分子が受容体を活性化する機構についてはまだほとんど分かっていません。

今回、研究グループは、真菌類（カビ）に特徴的な分子であるキチン^{※2}をイネが検出するのに必要な受容体である CEBiP^{※3}2 分子が、キチンの断片（キチンオリゴ糖）をサンドイッチのように両側から挟みこんで2量体を形成すること、またこの2量体形成が受容体複合体の活性化と防御応答誘導の引き金になることを明らかにしました。また、こうしたキチンオリゴ糖の結合に CEBiP 側のどの部分関わっているかも明らかにしました。

これらの知見は、キチンオリゴ糖による植物免疫活性化の機構を明らかにする上で重要であるとともに、親和性の高いキチン受容体のデザインと導入による病害に強い作物の開発や、キチンより防御応答誘導活性の高い低分子の開発による新たな病害防除技術開発などを考えるための基盤となることが期待されます。一方、動物系においても受容体の2量体形成がさまざまな細胞の応答を誘導する引き金になることが知られていることから、今回の知見は植物と動物の受容体活性化機構の共通性を示すものとしても興味深いと考えられます。

本研究成果は、米国科学アカデミー紀要『*Proceedings of National Academy of Science of the United States of America : PNAS*』電子版に1月6日付で掲載されました。

【研究代表者】【研究内容の問い合わせ先】

明治大学農学部生命科学科教授

渋谷直人

電話：044-934-7039

e-mail: shibuya@isc.meiji.ac.jp

明治大学農学部生命科学科教授

賀来華江

電話：044-934-7805

e-mail: kaku@isc.meiji.ac.jp

【研究担当者】

明治大学大学院農学研究科生命科学専攻	大学院生	早船 真広（共同筆頭著者）
同 大学院生		加山 実祐
明治大学農学部生命科学科	博士研究員	出崎 能丈
同 学部学生		有馬 祥子
IBB-CNR	主任研究員	Rita Berisio（共同筆頭著者）
同 博士研究員		Flavia Squeglia
同 研究員		Alessia Ruggiero
ナポリ大学	教授	Antonio Molinaro
同 博士研究員		Roberta Marchetti（共同筆頭著者）
同 研究員		Alba Silipo
食品総合研究所	ユニット長	徳安 健

【背景】

高等植物は、病原菌の感染を、微生物に特徴的な分子（MAMPs）の検出を通じて認識し、防御応答を開始する能力を備えています（図1）。MAMPsの認識に基づく防御応答機構は、ヒトなど高等動物の先天性免疫系でも重要な役割を果たしていることが知られており、動植物に共通して保存されている生体防御機構として注目されています。また応用面では、このような広範な微生物を認識し、防御応答できる能力を活用することによって、幅広い病害に対して抵抗性を示す作物を開発することが期待されています。MAMPsの中でも、植物にさまざまな病気を引き起こす真菌類（カビ）の細胞壁成分であるキチンの断片（キチンオリゴ糖）、とくにN-アセチル-グルコサミン残基が6個以上つながった大きなオリゴ糖が、さまざまな植物に防御応答を誘導することがよく知られています。日本側の研究グループはこれまでに、このキチンの認識と免疫活性化に関わる2種類の受容体分子、CEBiPとCERK1^{*4}を発見し報告してきました（PNAS、103巻11086ページ、2006年および104巻19613ページ、2007年）。イネではこれら2つのタンパク質が、キチンオリゴ糖が存在すると細胞膜上である種の受容体複合体を形成することが分かっていますが、こうした受容体複合体の形成機構や活性化機構については分かっていませんでした。また、なぜある大きさ以上のオリゴ糖だけが強い活性を示すのかも不明でした。

【研究手法と成果】

研究グループは、細胞膜上でのキチンオリゴ糖の受容体への結合がどのようにして細胞内への情報の伝達と防御応答の活性化につながるのか、その初期段階を明らかに

するために研究を行いました。このため、まず、細胞膜上でキチンに結合する役割をもつ CEBiP のどの部分がキチンオリゴ糖の結合に関与しているのかを調べました。CEBiP は細胞外領域にキチンの結合に関わると推定される 3 つの LysM ドメイン^{*5} を持っていますが、今回の研究では、これらをそれぞれ欠失させたタンパク質や、キチンオリゴ糖に結合性を持たないシロイヌナズナの CEBiP 型分子の対応する部分と入れ替えたタンパク質をベンサミアナタバコ等の植物で作製し、キチンオリゴ糖との結合実験を行いました。その結果、細胞外領域の中間に位置する LysM ドメインがリガンドの結合に必須な部位であることがわかりました。また、コンピューターによる分子モデリングとドッキングシミュレーション^{*6} および部位特異的変異導入実験から、この LysM ドメインの特定のイソロイシン残基がキチンの結合に重要であることも明らかにしました。

一方、キチンオリゴ糖と CEBiP の相互作用を特殊な NMR 測定法 (STD-NMR^{*7}) によって調べた結果とドッキングシミュレーションの結果から、2 分子の CEBiP が 1 分子のキチンオリゴ糖をその分子表面に存在する複数のアセチル基を介してサンドイッチ状に挟み 2 量体を形成していることを示唆する結果が得られました (図 2-A)。このモデルは、結合に重要と考えられる *N*-アセチル-グルコサミン残基のアセチル基が分子の片側にしか存在しない特殊なオリゴ糖 ((GlcN β 1,4GlcNAc)₄) では CEBiP の 2 量体形成を誘導できず、また、キチンオリゴ糖による CEBiP の 2 量体形成やイネ細胞における活性酸素の生成を阻害することからも裏付けられました (図 2-B)。

これらの結果は、これまで知られていた、ある大きさ以上 (6 量体以上) のキチンオリゴ糖が選択的に植物細胞の防御応答を誘導できるという実験結果を分子認識の面から説明するものです。また、キチンオリゴ糖により誘導される CEBiP の 2 量体形成が、もう一つの受容体構成成分である CERK1 型受容体キナーゼ^{*8} を含む複合体の形成と活性化の引き金となることをも示唆するものであり、キチンシグナル伝達系の起動のメカニズムを明らかにするうえで重要な成果と考えられます (図 2-A)。

【今後の期待】

キチンオリゴ糖による CEBiP の 2 量体形成機構が明らかになり、これが免疫応答誘導の引き金になることが分かったことから、今後、CERK1 型受容体キナーゼを含む受容体複合体の活性化とシグナル伝達系起動の詳細な分子機構の解明がさらに進むと期待されます。また、こうした知見をもとにした受容体の高機能化や受容体に高い親和性をもった薬剤の開発など、病害抵抗性の高い作物や新規な病害防除技術開発に向けたアイデアが生まれることが期待されます。

【発表論文】

Masahiro Hayafune, Rita Berisio, Roberta Marchetti, Alba Silipo, Miyu Kayama, Yoshitake Desaki, Sakiko Arima, Flavia Squeglia, Alessia Ruggiero, Ken Tokuyasu, Antonio Molinaro, Hanae Kaku, Naoto Shibuya.

Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization.

Proceedings of National Academy of Science of the United States of America,
doi/10.1073/pnas.1312099111

【予算】

日本学術振興会科学研究費補助金、水谷糖質科学研究財団研究助成、生研センター基礎研究推進事業

【用語説明】

※1 MAMPs

キチン、フラジェリン、リポ多糖など、広範囲の微生物に存在する一方、高等動植物には存在しない分子。PAMPsとも呼ばれる。動植物先天性免疫系による微生物の検出において、目印として利用される。

※2 キチン

N-アセチルグルコサミンが β -1,4結合した多糖。真菌類の細胞壁の主要な構成多糖の一つである。エビやカニ、昆虫等の殻の主要成分でもある。

※3 CEBiP

Chitin Elicitor Binding Protein の略。本研究グループによって発見されたイネのキチン受容体分子で、細胞表層でキチン断片（キチンオリゴ糖）に特異的に結合し、防御応答誘導の引き金を引くと考えられている。

※4 CERK1

Chitin Elicitor Receptor Kinase の略。本研究グループによって最初にシロイヌナズナで発見された受容体キナーゼ様分子^{※7}で、細胞のキチン応答に必須の分子。この分子の細胞内に存在するキナーゼドメインの活性がシグナル伝達に必須であることが分かっている。イネにも構造、機能的に類似した分子（OsCERK1）が存在することが示されている。

※5 LysM ドメイン

多糖分解酵素などに見られる特徴的な構造の一つで、ペプチドグリカン（細菌の細胞壁成分の一つでキチンとよく似た多糖を骨格とする高分子）と結合することが知られているアミノ酸配列。

※6 分子モデリング・ドッキングシミュレーション

コンピューターを利用して分子の構造や挙動を可視化する方法を分子モデリングという。こうして得られた分子構造をもとに、タンパク質などの高分子と低分子リガンドの結合状態を予測することをドッキングシミュレーションと呼ぶ。

※7 STD-NMR

Saturation-transfer difference NMR の略。核磁気共鳴（Nuclear Magnetic Resonance, NMR）を利用してタンパク質と低分子（リガンド）の相互作用を解析する手法の一つで、リガンド中のどの部分がタンパク質と相互作用しているかを解析できる。

※8 受容体キナーゼ

情報伝達に関わる受容体の一種で、シグナルとなる分子と結合する部分とタンパク質をリン酸化する酵素（タンパクキナーゼ）の部分をもつ。通常、この2つの構造は細胞膜を隔てて外側と内側に位置している。

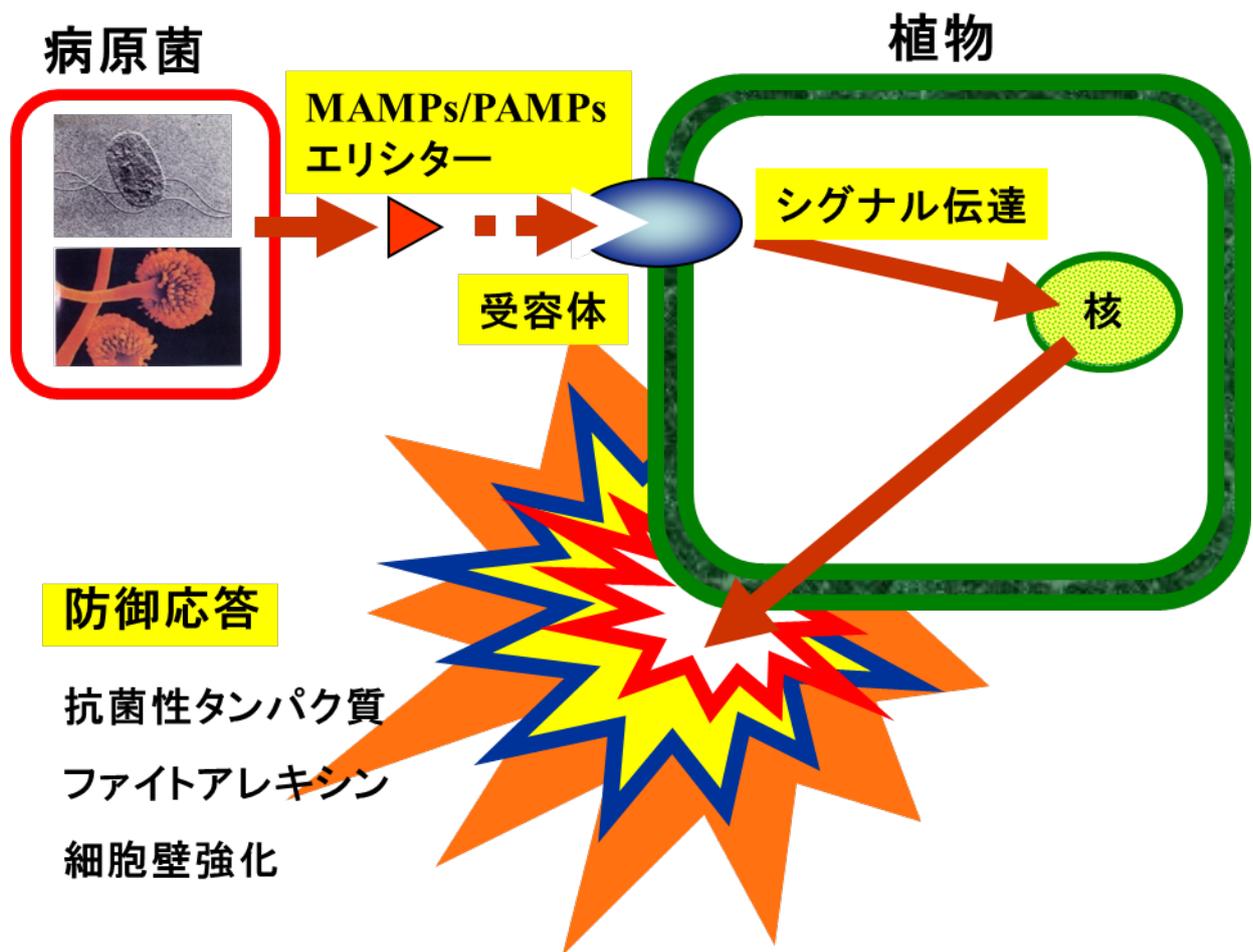


図1. 植物は多くの微生物に共通して存在する特徴的な分子群(MAMPs/PAMPs)を対応する受容体で認識し、さまざまな防御応答を誘導する能力をもっている。

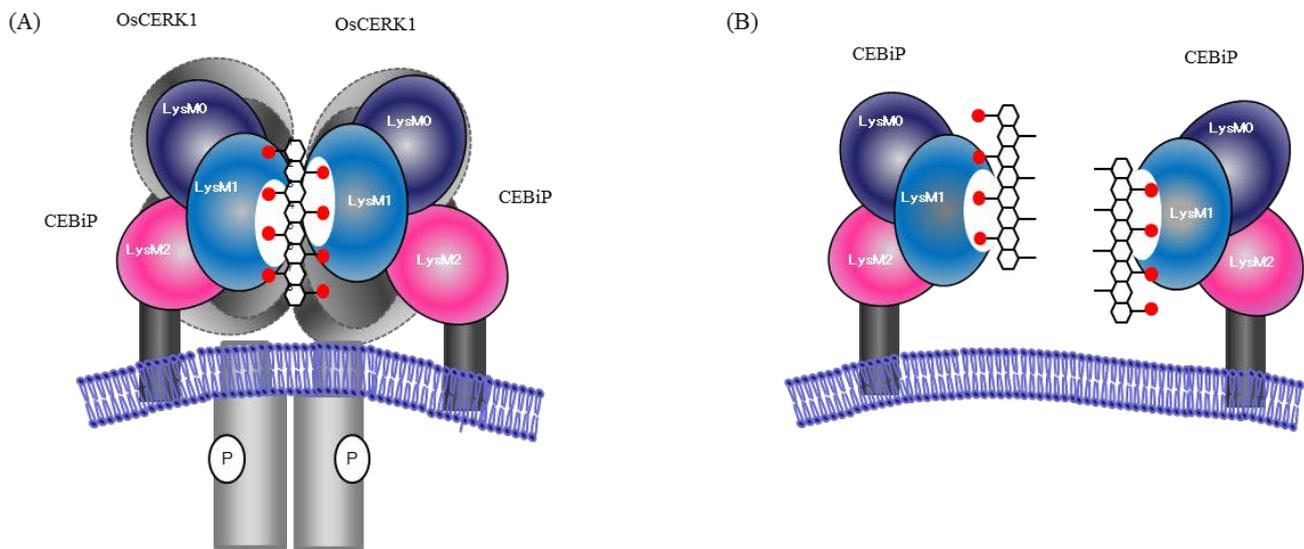


図2. キチンオリゴ糖による細胞膜上での受容体活性化のモデル図。(A) 2分子の CEBiP が中央部の LysMドメインを介してキチンオリゴ糖外側に配向した *N*-アセチル基 (赤丸) に結合し、2量体を形成する。これが引き金となって OsCERK1 を含む受容体複合体が形成され、細胞内へ情報が伝わる。(B) *N*-アセチル基が分子の片側にしか存在しないオリゴ糖、(GlcNβ1,4GlcNAc)₄ は CEBiP に結合できるが2量体を形成できず、細胞内への情報伝達ができない。