

学 位 論 文 要 旨

氏 名 飯笹英一

題 目 融合タンパク質発現のための酵母を用いた高効率 DNA クローニング法および GFP 融合タンパク質を用いたシロイヌナズナのキチン受容体の生化学的解析
(Biochemical analysis of an *Arabidopsis thaliana* chitin receptor by use of a green fluorescent protein-fused protein and highly efficient yeast-based *in vivo* DNA cloning for the fusion protein expression)

植物も動物と同じような免疫機構を有している。病原菌の構成成分である PAMPs (pathogen associated molecular patterns) を受容体で認識し、自然免疫を活性化する。

カビの細胞壁成分であるキチンも植物の免疫機構を活性化する PAMPs として古くから知られていた。近年の研究で、LysM ドメインを細胞外に持つ受容体キナーゼ、LysM RLK1/CERK1 がキチンによる免疫誘導に不可欠な働きをしていることが逆遺伝学的に明らかにされた。しかし、その分子メカニズムは明らかになっておらず、直接キチンがその受容体に結合するかどうか不明である。

そこで、LysM RLK1 とキチンの結合を調べるために、yeast-enhanced green fluorescence protein (yEGFP) に融合した LysM RLK1 (LysM RLK1-yEGFP) を用いて解析を行った。

このような融合タンパク質を作成する場合、普通は制限酵素とリガーゼを用いてそれらのタンパク質をコードする遺伝子をベクターにクローニングする。しかし、このような従来法はクローニング効率が悪いことがしばしばあり、特に複数の DNA 断片を融合させることは難しいことがある。そこで、今回、酵母相同組み換えを用いた高効率な DNA クローニング法を確立した。

今回この酵母相同組み換えを用いて、yEGFP 融合 LysM RLK1 を作成し、酵母で発現させた。酵母で発現させた LysM RLK1-yEGFP を可溶化したものと、キチンに構造が似た様々な不溶性の多糖類との結合を調べたところ、キチンに特異的に結合することが分かった。さらに、詳細に、LysM RLK1 の生化学的性質を調べるために、キチンビーズとの結合を蛍光顕微鏡によって調べる方法によって解析した。その結果この受容体タンパク質はキチンビーズに対して $K_d \sim 82$ nM という高い親和性を示すことがわかった。

この結合は過剰の可溶性キチンポリマーであるグリコールキチンを加えると阻害されることがわかった。また、高濃度のキチンオリゴ糖 (重合度:4-8) によってもその結合が阻害されることが分かった。しかし、その結合活性はグリコールキチンよりも弱いことが分かった。この結果は LysM RLK1 はより長い *N*-アセチルグルコサミン残基に高い親和性を示すことを示唆している。さらに、LysM RLK1-yEGFP が自己リン酸化能を有し、それはまた、キチンによって影響を受けないことも示した。今回の結果は植物のキチン認識機構において新たな知見をもたらす。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Ei'ichi Iizasa
題 目	Biochemical analysis of an <i>Arabidopsis thaliana</i> chitin receptor by use of a green fluorescent protein-fused protein and highly efficient yeast-based <i>in vivo</i> DNA cloning for the fusion protein expression (融合タンパク質発現のための酵母を用いた高効率 DNA クローニング法および GFP 融合タンパク質を用いたシロイヌナズナのキチン受容体の生化学的解析)
<p>Plants induce immune responses against fungal pathogens by recognition of chitin, which is a component of the fungal cell wall. Recent studies have revealed that LysM receptor-like kinase 1/Chitin elicitor receptor kinase 1 (LysM RLK1/CERK1) is a critical component for the immune responses to chitin in <i>Arabidopsis thaliana</i>. However, the molecular mechanism of the chitin recognition by LysM RLK1 still remains unknown. Here, we present the first evidence for direct binding of LysM RLK1 to chitin.</p> <p>To investigate the direct binding of LysM RLK1 to chitin, we used LysM RLK1 fused with yeast-enhanced green fluorescent protein (LysM RLK1-yEGFP). In order to construct such fusion genes, we usually use DNA cloning methods using restriction enzymes and DNA ligase. However, traditional methods using restriction enzymes and ligase are often inefficient. Therefore, we developed a new efficient yeast-based <i>in vivo</i> DNA cloning method for the fusion protein expression.</p> <p>We expressed the full length of LysM RLK1 fused with yeast-enhanced green fluorescent protein (LysM RLK1-yEGFP) in yeast cells. Binding studies using the solubilized LysM RLK1-yEGFP and several insoluble polysaccharides having similar structures showed that LysM RLK1-yEGFP specifically binds to chitin. Subsequently, the fluorescence microscopic observation of the solubilized LysM RLK1-yEGFP binding to chitin beads revealed that the binding was saturable and had a high affinity, with a $K_d \sim 82$ nM. This binding was competed by the addition of soluble glycol chitin or high concentration of chitin oligosaccharides having 4 to 8 residues of <i>N</i>-acetyl glucosamine. However, the competition of these chitin oligosaccharides is weaker than that of glycol chitin. These data suggest that LysM RLK1 has a higher affinity for chitin having longer residue of <i>N</i>-acetyl glucosamine. We also found that LysM RLK1-yEGFP was autophosphorylated <i>in vitro</i> and chitin does not affect the phosphorylation of LysM RLK1-yEGFP. Our results provide a new dimension to chitin elicitor perception in plants.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	飯笹 英一
審査委員	主査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 佐賀大学 准教授 永野 幸生
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 琉球大学 准教授 平良 東紀
審査協力者	
題目	融合タンパク質発現のための酵母を用いた高効率 DNA クローニング法および GFP 融合タンパク質を用いたシロイヌナズナのキチン受容体の生化学的解析 (Biochemical analysis of an <i>Arabidopsis thaliana</i> chitin receptor by use of a green fluorescent protein-fused protein and highly efficient yeast-based <i>in vivo</i> DNA cloning for the fusion protein expression)
<p>本研究ではモデル植物シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) のキチン受容体がキチンと直接結合することを初めて証明した。また、様々な生物のプラスミドベクターに複数の DNA 断片をワンステップでクローニングできる DNA クローニング法および蛍光顕微鏡を用いてキチンとタンパク質の結合を簡便且つ定量的に調べる方法の開発を行い、本研究に用いた。</p> <p>多細胞生物は、病原体の構成成分である PAMPs (pathogen associated molecular patterns) を受容体で認識し、自然免疫系を活性化する。PAMPs 認識機構に関する研究は動物では進んでいるが植物ではあまり進んでいない。そのため、植物において PAMPs 認識機構を研究することは、免疫学に関する理解を深める上で重要である。</p> <p>真菌の細胞壁成分であるキチンは植物の免疫機構を活性化する PAMPs として古くから知られていた。近年の研究で、キチンの認識において決定的に重要な働きをしていると考えられるタンパク質 LysM 受容体キナーゼ 1 (LysM RLK1: LysM receptor-like kinase 1) がシロイヌナズナから同定された。逆遺伝学的解析によって、LysM RLK1 がキチンによる免疫機構の活性化に不可欠な働きをしていることが明らかにされたのである。LysM RLK1 は、細胞外の LysM ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内キナーゼドメインをもつ。イネの CEBiP (Chitin Elicitor Binding Protein) やシダ (<i>Pteris ryukyuensis</i>) の Chitinase-A の研究から、植物</p>	

の LysM ドメインの中にキチンと結合するものがあることが示されていた。しかし、LysM RLK1 の細胞外 LysM ドメインがキチンと直接結合するかどうか不明であった。そこで、LysM RLK1 とキチンの結合を調べるために、yeast-enhanced green fluorescence protein (yEGFP) に融合した LysM RLK1 (LysM RLK1-yEGFP) を用いて解析を行った。

このような融合タンパク質を作成する場合、普通は制限酵素とリガーゼを用いてそれらのタンパク質をコードする遺伝子をプラスミドベクターにクローニングする。しかし、このような従来法はクローニング効率が悪いことがしばしばあり、特に複数の DNA 断片を融合させることは困難なことが多い。そこで、本研究では、様々な生物由来のプラスミドベクターに複数の DNA 断片をワンステップでクローニングできる高効率な DNA クローニング法を確立した。

さらに本研究では、この酵母相同組換えを用いて、yEGFP 融合 LysM RLK1 を作成し、パン酵母で発現させた。酵母で発現させた LysM RLK1-yEGFP を可溶化したものと、キチンに構造が似た様々な不溶性の多糖類との結合を調べたところ、LysM RLK1 はキチンに特異的に結合することが分かった。さらに、既に生化学的性質がわかっているキチン結合タンパク質をモデルとして、蛍光顕微鏡を用いてキチンとタンパク質の結合を簡便且つ定量的に調べる方法の開発を行った。この新たに開発した方法を用いて、詳細に LysM RLK1 の生化学的性質を調べた。その結果、LysM RLK1 はキチンビーズに対して $K_d \sim 82$ nM という高い親和性を示すことが分かった。

さらに、この結合は過剰の可溶性キチン誘導体であるグリコールキチンを加えると阻害され、高濃度のキチンオリゴ糖（重合度:4-8）によっても阻害された。しかし、キチンオリゴ糖の結合活性はグリコールキチンよりも弱いことが分かった。この結果は、LysM RLK1 がより長いキチンオリゴ糖鎖に高い親和性を示すことを示唆していた。さらに、LysM RLK1-yEGFP が自己リン酸化能を有し、それはまた、キチンによって影響を受けないことも示した。

本研究の結果は、LysM RLK1 が単独でキチンと結合すること、すなわち、キチンの認識において LysM RLK1 が必要かつ十分であることを示している。自然免疫に関わる植物受容体キナーゼが単独で PAMPs と結合することを示したのは、この研究が初めてであり、免疫学研究に大きく貢献するものと期待できる。

以上のように、本研究は、病原体の構成成分である PAMPs の認識機構に新たな知見を提供するものである。したがって、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値があるものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	飯笹 英一
審査委員	主査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 佐賀大学 准教授 永野 幸生
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 琉球大学 准教授 平良 東紀
審査協力者	
実施年月日	平成21年12月28日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成21年12月28日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

飯笹英一

〔質問1〕12-15 merのキチンオリゴ糖とLysM RLK1が結合するというように推論しているが、3つのLysMモチーフのそれぞれがGlcNAc残基を認識していると考えられるのか？

〔回答1〕微生物の既知のLysMモチーフは1つのモチーフで4-5個のGlcNAc残基を認識していると考えられている。しかし、LysMモチーフを2つ持っているキチン受容体CEBiPは4 merや5 merのキチンオリゴ糖とはほとんど結合せず、8 merのキチンオリゴ糖と結合すると考えられている。そのため、CEBiPは2つのLysMモチーフを含む細胞外ドメイン全体で8 merのキチンオリゴ糖と結合し、それよりも短い4 merや5 merのキチンオリゴ糖とはほとんど結合しないと考えられる。今回の実験でLysM RLK1はグリコールキチンとは比較的高い親和性を示すが、比較的長い8 merのキチンオリゴ糖とはほとんど結合しないことがわかった。12-15個という数には明確な根拠はないが、これらのことを踏まえるとLysM RLK1も3つのLysMモチーフを含む細胞外ドメイン全体で9個以上のGlcNAc残基を認識していると考えられる。

〔質問2〕LysM RLK1が12-15 merのキチンオリゴ糖を認識しているということであるが、12-15個のGlcNAc残基がつながったホモオリゴマーを認識しているということか？また、LysM RLK1の立体構造は分かっているのか？もし、分かっていたら、その結合様式を推測することはできないか？

〔回答2〕GlcNAcのホモオリゴマーというわけではなく、ある程度の長さがあるGlcNAc残基の間に脱アセチル化されたGlcN残基があってもよいと考えられる。また、LysM RLK1の立体構造は分かっておらず、立体構造が既知である微生物のLysMモチーフとも分子進化的に遠いため、立体構造のモデルの構築、および、結合様式の推測は困難であると考えられる。

〔質問3〕ある種のシダのキチナーゼはLysMモチーフを2つ持っており、それぞれのLysMモチーフ単独でキチンオリゴ糖またはキチンと結合することが知られているが、LysM RLK1の場合はどうか？

〔回答3〕LysM RLK1の3つのLysMモチーフをそれぞれ別個にしてGFPと融合して大腸菌で発現させ、LysM RLK1全長の実験と同様に、個々のLysMモチーフがキチンピーズと結合するか調べたが、結合しなかった。このことから、やはり、LysMモチーフ単独でなく、3つのLysMモチーフを含む細胞外ドメイン全体でキチンを認識していると考えられる。

〔質問4〕以前報告されているイネのCEBiPとキチンの結合はCEBiPタンパク質を精製して結合を調べたわけではないので、CEBiPとキチンの結合にシロイヌナズナのLysM RLK1のオルソログが関与している可能性は考えられないか？

〔回答4〕LysM RLK1のオルソログは未知であるが、その可能性はある。それを検証するためには、同様にCEBiPとイネのLysMRLK1のオルソログを発現、精製し、CEBiP単独の時とLysM RLK1のオルソログを加えた場合で親和性に变化があるか調べればよいと考えられる。

〔質問5〕今回の実験結果から、LysM RLK1は可溶性の短鎖のキチンオリゴ糖を認識しているのではなく、むしろ不溶性の長鎖のキチンオリゴ糖あるいは真菌自体を直接認識しているようにも考えられるがどのように考えているか？また、それを検証するためには、どうすれば良いか？

〔回答5〕今回の実験結果だけではどちらとも言えないが、そのように菌自体を直接認識している可能性もあると考えられる。少なくとも、今までの植物に対するキチンのエリシター活性の研究などでは8 merのキチンオリゴ糖を用いて様々な実験が行われているが、そうで

はなく、もっと自然に近い状態で実験を行わなければならないと考えられる。RIでラベルした菌と植物細胞の結合を調べるだけでは、菌自体が結合しているのか、その分解物が結合しているのか見分けるのは困難であるが、例えば、菌自体のキチンを蛍光試薬でラベルして、菌と植物細胞の相互作用などを蛍光顕微鏡で直接観察すれば、それを検証できると考えられる。

〔質問6〕 今回の研究ではLysM RLK1の生化学的な解析を行っているが、LysM RLK1の遺伝子をノックダウンあるいはノックアウトした植物体のキチンに対する応答を調べた報告はあるか？

〔回答6〕 LysM RLK1の同定は、元々、シロイヌナズナのゲノムにあるLysMモチーフを細胞外ドメインに持つ受容体を網羅的にノックアウトし、キチンに対する免疫応答を解析するという逆遺伝学的手法で行われたため、LysM RLK1変異体のキチンに対する応答は既に報告されている。

〔質問7〕 LysM RLK1は*in vitro*でリン酸化するという実験結果であるが、これは*in vivo*の状態を反映しているのか？動物の受容体型キナーゼでは、一般的に界面活性剤で可溶化して*in vitro*でリガンド依存的なリン酸化を調べるとリン酸化が見られるが、なぜLysM RLK1ではそうならないのか？

〔回答7〕 *in vivo*の状態を必ずしも反映しているかどうかはこの実験からでは断定できない。しかし、植物の別の受容体型キナーゼであるBRI1は、別の受容体キナーゼBAK1が無いと、*in vitro*では、リガンドのブラシノリドが存在しても自己リン酸化の活性が著しく低下することが知られている。LysM RLK1の場合も同様にリガンドと結合しても、受容体を活性化させるためには他の因子が必要であるのではないかと考えている。

〔質問8〕 今回開発した酵母の相同組換えを利用した多断片DNAクローニング法はGatewayやIn-Fusionといったクローニング法と比べてどこが優れているのか？

〔回答8〕 GatewayやIn-fusionでも数個のDNA断片であれば同時にクローニングできることが知られているが、数十個のDNA断片を同時にクローニングすることは困難である。酵母の相同組換えは数十個のDNA断片でも長さに関わらず、同時に効率良くクローニングすることができる。また、その2つの方法に比べこの酵母の相同組み換えを利用した方法の方が安価である。さらに、Gatewayでは、組換えに特異的なatt配列を必要とするため、ベクターに組込む場所が限定されるが、この方法ではそのようなことはない。また、一般的にIn-Fusionも組換え配列がDNA断片の末端にあることが必要であると言われているため、やはり、この方法ほど自由が効かない。

〔質問9〕 酵母の相同組換えを利用したDNAクローニング法でクローニングする断片を増やすとクローニング効率は指数関数的に低下するのか？例えば、8断片であれば、1断片をクローニングした場合の効率の8乗倍低下するのか？

〔回答9〕 やはり断片の数が増えるとある程度クローニング効率は低下する。しかし、そこまで劇的に低下することはない。我々の研究室で行った実験によると、クローニング効率は6断片で約10%に低下する。しかし、DNA断片を酵母に導入する際に、我々が用いた形質転換法はあまり効率の良い方法ではない。別の形質転換法を用いれば、もっとクローニング効率は上がると考えられる。実際に、その別の形質転換法を用いた場合、高効率で多断片のDNA断片をベクターにクローニングすることが可能であることが報告されている。

〔質問10〕 酵母の相同組み換えを利用したDNAクローニング法でDNA断片をクローニングした場合、プライマーの部位に変異が入りやすいということであったが、その頻度はどれくらいで、原因は何か？

〔回答10〕 原因はプライマー合成の際に起こる合成ミスのためであると考えられる。頻度は、プライマーの外注先によってまちまちであるが、全体的にそう高い頻度ではない。