

ダイズがもつ他生物種との対話受容体の同定と機能解析

有村源一郎^{*1,2}・Abdelaziz RAMADAN^{1,2,3}・根本圭一郎³・竹田浩之³・

小澤理香¹・Massimo MAFFEI⁴・澤崎達也³

¹京都大学生態学研究センター ²京都大学大学院理学研究科

³愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター ⁴トリノ大学

Isolation and Functional Characterization of Potent Receptors Involved in Insect-Derived Elicitor Recognition in Soybean Cells

Gen-ichiro ARIMURA^{1,2}, Abdelaziz RAMADAN^{1,2,3}, Keiichiro NEMOTO³,
Hiroyuki TAKEDA³, Rika OZAWA¹, Massimo MAFFEI⁴ and Tatsuya SAWASAKI³

¹Center for Ecological Research, Kyoto University, Otsu 520-2113

²Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto 606-8502

³Cell-free Science and Technology Research Center, Ehime University, Matsuyama 790-8577

⁴The University of Torino, Torino, Italy 10124

ABSTRACT

Upon herbivore attack, plants respond to two initial, herbivore-derived factors (physical damage and chemical elicitors included in their saliva). In plants, immunity is initiated through pattern recognition receptors in response to several biotic stresses to provide the first line of inducible defense. Despite the numerous elicitors perceived by plants, however, none of the pattern recognition receptors for insect salivary elicitors have so far been identified so far. As oligosaccharides are predicted to be one of the insect salivary elicitors and a receptor kinase CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase) has been identified as critical receptors for oligosaccharide signaling in rice and Arabidopsis, in the current study we screened the characteristics of soybean CERK1-homologous (receptor-like kinase [RLK]) genes which enabled an interaction with a component in the regurgitant of *Spodoptera litura*. Eight members of CERK1 homologues synthesized by *in vitro* transcription and cell-free protein synthesis exhibited auto-phosphorylation activity. Therefore, the synthesized proteins were analyzed with the biacore system that enables finding the ability of the biomolecule of elicitors to interact with a specific binding protein. Our preliminary analysis showed that one of the nine CERK1-homologous proteins interacted with regurgitant component(s) from *S. litura*. In future research, we intend to assess the characteristic of this receptor, characterize the specific

*〒520-2113 大津市平野2丁目509-3

elicitor, and mine other sets of potent receptors involved in elicitor recognition in plant cells. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 17-20, 2012.

Key words : elicitors, herbivore, oligosaccharide, receptor-like kinase, soybean

植物の食害応答は、機械的な傷害、害虫の唾液成分、あるいは害虫が媒介する菌・細菌を植物が認識することで始まる。中でも、害虫の唾液成分「エリシター」（糖やペプチド等の植物の防御応答を誘導する因子）は、食害によって放出される揮発性化合物のブレンドを決定する要因の一つとして1990年代から注目されてきた。Alborn et al. (1997) によって、ヨトウガ幼虫の吐き戻し液から、ボリシチン（N-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamine）が、幼虫被害トウモロコシの揮発性化合物生産を誘導するエリシター化合物として初めて発見された¹⁾。以来、ボリシチンの類縁体、ペプチド、脂肪酸を基本骨格とするエリシターが発見され、それらのエリシターの特性および特異性が次第に明らかになりつつある^{2, 3)}。しかし、エリシター等の害虫由来の刺激に直接応答する分子の多くやそれらの受容機構が未だ不明であるため、食害初期応答の分子機構は、動物・植物病理学分野において蓄積された結果からの考察を超えることはなかった。

最近、Massimo Maffei教授（トリノ大学）らの研究において、ハスモンヨトウ（*Spodoptera littoralis*）の幼虫の唾液にオリゴ糖が含まれ、それらの化合物が植物の防衛反応を誘導するエリシター様生理特性をもつ可能性が見出されている⁴⁾。一方、害虫エリシターの受容体については、ボリシチン受容体が生体膜たん白質であることは指摘されているものの⁵⁾、たん白質・遺伝子の単離に成功した例はこれまでない。我々は、植物病原性カビのエリシターはキチンに代表されるオリゴ糖であることから、その受容体たん白質であるLysM型receptor-like kinase (RLK) に属するシロイヌナズナのキチン受容体遺伝子（CERK1; Chitin Elicitor Receptor Kinase⁶⁾）が、様々なオリゴ糖分子の認識に関わる可能性があると考え、CERK1様たん白質から害虫エリシターの受容体遺伝子の発掘を試みた。

本研究の目標は、ダイズ完全長cDNAからオリゴ糖型エリシター受容体（RLK）遺伝子の単離とたん白質機能の解明である。シロイヌナズナのキチン受容体キナーゼ遺伝子（CERK1）に相同性を示す候補遺伝子のたん白質合成を、無細胞たん白質合成系を用いて実施し、ハスモンヨトウ唾液成分をリガンドとしたたん白質の分子間相互作用解析を実施した。

方 法

ハスモンヨトウ吐き戻し液の分集

ハスモンヨトウ（*Spodoptera litura*）は住化テクノサービス（株）より卵塊を購入し、人工飼料を用いて16時間明期、25℃の生育条件で育てられた。2齢に生長した幼虫はダイズ葉で更に2～4日間、3、4齢になるまで同条件で育てられた。吐き戻し液はガラスキャピラリー管による吸引により集められた。1匹の幼虫から約2～5 μLの吐き戻し液が回収され、約100 μLの吐き戻し液を1ユニットとして-20℃に保管した。

In vitroキナーゼアッセイ

コムギ無細胞たん白質合成系によって合成したダイズ受容体キナーゼ（RLK）候補の自己リン酸化活性を評価した。ダイズ完全長cDNAクローンを鋳型にコムギ無細胞たん白質合成系を用いて、C末端FLAGタグ（DYKDDDDK）融合の受容体様キナーゼを合成した。合成したキナーゼを抗FLAG M2 抗体アガロースを用いてアフィニティー精製した後、5-20 ng の精製キナーゼを反応溶液中 [Tirs-HCl (pH7.6), 100 mM CH₃COOK, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 37 kBq (γ-32P) ATP] で30℃、30 min 反応させた。反応産物にサンプルバッファーを添加および加熱することで反応を停止した後、12.5% SDS-PAGEによって分離した。分離後、ゲルをTyphoon FLA 9500 (GE healthcare) で分析した。

Biacoreアッセイ

RLK候補と吐き戻し液中のリガンド分子の結合をBiacore X100 (GE healthcare) を用いたキャプチャー法により測定した。センサーチップCM5の測定セルと対象セルの両方に抗FLAGタグ抗体をアミンカップリングで10,000 RU前後固定化した。測定セルのみに受容体キナーゼを流してFLAGタグを介してキャプチャーした。その後、熱処理した吐き戻し液を測定セルと対象セルの両方に流して受容体特異的なリガンドの結合を観察した。測定後、両セルを10 mM水酸化ナトリウムで洗浄し、キャプチャーした受容体などを除いた。受容体キャプチャー、吐き戻し液結合、洗浄のサイクルを連続的にを行い、すべての受容体と吐き戻し液の組み合わせで測定を行った。

結 果

ダイズ完全長cDNAクローンを鋳型に無細胞たん白質合成系を用いてシロイヌナズナのキチン受容体キナーゼ遺伝子 (CERK1) に相同性を示すRLKたん白質を合成し、 γ -32P-ATPを用いた自己リン酸化活性の測定を試みた。In vitro合成したRLKたん白質10クローン中、8クローンにおいて自己リン酸化活性が認められた。さらに、Biacoreシステムを用いて、合成した8クローンのRLKたん白質とハスモンヨトウから抽出された吐き戻し成分の分子間相互作用についての解析を試みた。FLAGタグ付きのRLKたん白質をセンサーチップにキャプチャーさせ、希釈した吐き戻し溶液を添加したところ、GmRLK8において結合が認められた (Fig. 1)。

考 察

本解析はハスモンヨトウから抽出した吐き戻し液成分を用いた予備的な解析である。現在、トリノ大学 (イタリア) との共同研究により、吐き戻し液中のオリゴ糖 (エリシター) の精製および同定を急ピッチで進行している。今回の解析で得られたGmRLK8に加え、追加解析予定の20クローンを精製・合成エリシター化合

物の分子間相互作用をBiacoreシステムを用いて再解析し、エリシター受容体キナーゼとしての確証を得る。更に、GmRLK8の結合特異性や結合部位の決定を段階的に試みる予定である。

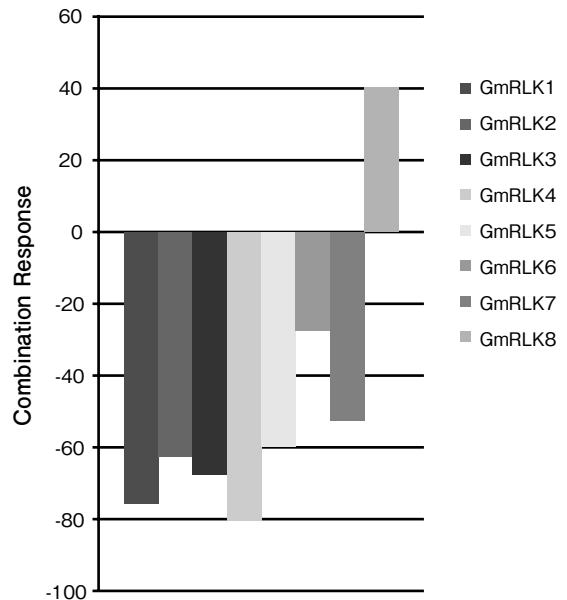


Fig. 1. Molecular interactions between RLK proteins and *Spodoptera litura* regurgitant based on the Biacore system

要 約

「植物-昆虫間相互作用の分子メカニズム」の解明は、植物自身がつつ対植食者防御戦略を積極的に活用する技術のシーズとなり、次世代の作物生産体系を確立する上で非常に重要な研究である。本研究では、昆虫由来エリシター化合物と結合する植物受容体たん白質を探索し、発掘された遺伝子資源を利用した減農薬、無農薬の作物生産体系の確立をめざした。我々が注目する受容体たん白質は、植物ホルモン、病原菌エリシター等がリガンドとして報告されているLysM型receptor-like kinase (RLK)ファミリーである。ダイズ完全長cDNAクローンを鋳型に無細胞たん白質合成系を用いてシロイヌナズナのキチン受容体遺伝子 (CERK1) に相同性を示すRLKたん白質を合成し、ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) の唾液成分をリガンドとするRLKたん白質を探索した。合成に成功したRLKたん白質を用いて自己リン酸化活性を解析した結果、8種のRLKにリン酸化活性が認められた。さらに、これらの活性型RLKのハスモンヨトウ幼虫の唾液成分に対する分子間相互作用をBiacoreシステムにより解析したところ、RLKたん白質クローンGmRLK8に結合活性が認められた。現在、GmRLK8の分子機能的解明および唾液に含まれるエリシター成分の同定を進めており、これらの生化学、分子生物学的解析を統合することで植物の食害受容メカニズムの解明につなげていきたい。

文 献

- 1) Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH and Tumlinson JH (1997): An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, **276**, 945-949.
- 2) Arimura G, Matsui K and Takabayashi J (2009): Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiol*, Plant cell physiol, **50**, 911-923.
- 3) Arimura G, Ozawa R and Maffei ME (2011): Recent advances in plant early signaling in response to herbivory. *Int J Mol Sci*, **12**, 3723-3739.
- 4) Bricchi I, Occhipinti A, Berteaux CM, Zebelo SA, Brillada C, Verrillo F, De Castro C, Molinaro A, Faulkner C, Maule AJ and Mattei ME (2013): Separation of early and late responses to herbivory in Arabidopsis by changing plasmodesmal function, *Plant J*, **73**, 14-25.
- 5) Truitt CL, Wei HX and Paré PW (2004): A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin. *Plant Cell*, **16**, 523-532.
- 6) Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H and Shibuya N (2007): CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Nat Acad Sci USA*, **104**, 19613-19618.