

ダイズの食害応答を制御する糖エリシターの受容機構の解明

有村源一郎^{*1,2}・澤崎達也³・Abdelaziz RAMADAN³・根本圭一郎³・

竹田浩之³・Massimo E. MAFFEI⁴

¹京都大学生態学研究センター ²東京理科大学基礎工学部生物工学科

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

Oligosaccharide Elicitor Perception Systems for Herbivory Defense in Soybeans

Gen-ichiro ARIMURA^{*1,2}, Tatsuya SAWASAKI³, Abdelaziz RAMADAN³,
Keiichiro NEMOTO³, Hiroyuki TAKEDA³ and Massimo E. MAFFEI⁴

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

²Department of Biological Science & Technology, Faculty of Industrial Science & Technology,
Tokyo University of Science, Tokyo 125-8585

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

⁴University of Turin, Turin 10135, Italy

ABSTRACT

Upon herbivore attack, plants respond to herbivore-derived factors including chemical elicitors included in their saliva. In plants, immunity is initiated through pattern recognition receptors in response to herbivory to provide the first line of inducible defense. Despite the numerous elicitors perceived by plants, however, no pattern recognition receptors for insect salivary elicitors have been identified so far. As factors present in *Spodoptera littoralis* oral secretions (including a putative beta-galactofuranose polysaccharide) are predicted to be among the insect salivary elicitors and a receptor kinase CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase) has been identified as critical receptors for oligosaccharide signaling in plants, in the current study we screened the characteristics of soybean CERK1-homologous (receptor-like kinase [RLK]) genes which enabled interaction with a component in the regurgitant of *S. littoralis*. The recombinant proteins of 24 members of soybean cDNAs (Arabidopsis CERK1 homologues), fused with glutathione S-transferase (GST) and FLAG tag at the C-terminus, were successfully synthesized *in vitro* transcription and cell-free protein synthesis. The synthesized proteins were analyzed with the biacore system that enables to find the ability of the biomolecule to interact with a binding protein. Our preliminary analysis showed that some of the twenty-four CERK1-homologous proteins interacted with regurgitant component(s) from *S.*

*〒125-8585 東京都葛飾区新宿6-3-1

littoralis. We intend to establish the biacore system to identify with certainty the receptor candidates, and mine other sets of potent receptors involved in elicitor recognition in plant cells. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 35-38, 2013.

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

植物の食害応答は、食害による物理的な傷害と害虫が分泌するエリシター化合物によって誘導される。Alborn et al. (1997) によって、ヨトウガ (*Spodoptera exigua*) 幼虫の吐き戻し液からの中にポリシチン (N-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamine) と呼ばれる脂肪酸とアミノ酸によって構成されるエリシター化合物が、トウモロコシの揮発性化合物生産を誘導することが報告された¹⁾。以降、ポリシチンの類縁体、ペプチド、脂肪酸を基本骨格とする、虫の唾液に含まれる様々なエリシターが同定されてきた²⁾。中でも、共同研究者であるMaffei教授 (イタリア, トリノ大学) によって同定されたヨトウガ (*Spodoptera littoralis*) 幼虫の唾液に含まれるbeta-galactofuranose polysaccharideは、昆虫の唾液に含まれる多糖類としての初めてのエリシターの発見につながり、精製された糖エリシターはシロイヌナズナの活性酸素類、ジャスモン酸の蓄積、ジャスモン酸に制御された防御関連遺伝子を誘導することが見出された³⁾。これらの誘導には細胞間隙に局在するpdko3たん白質が関与することも見出されている³⁾。

本研究では、ヨトウガ幼虫の唾液に含まれる糖エリシターと結合するダイズ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す。これまで、害虫エリシターの受容体については、ポ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⁴⁾、受容体遺伝子の単離に成功した例はない。我々は、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 (AtCERK1; Chitin Elicitor Receptor Kinase⁵⁾) が、beta-galactofuranose polysaccharideを含めた昆虫由来の様々なオリゴ糖分子の認識に関わっていると考え、ダイズCERK1様たん白質からエリシター受容体の発掘を試みた。本年度は、共同研究者であるMaffei教授によるbeta-galactofuranose polysaccharideの精製が経過途中であったことを理由に、ヨトウガ幼虫の唾液 (吐き戻し液) をリガンドとして用い、糖リガンドと受容体たん白質の分子間相互作用実験の手法を確立することに努めた。

方 法

ヨトウガ幼虫の吐き戻し液の分集

人工飼料を餌として、ヨトウガ (*S. littoralis*) を16時間明期、25℃の生育条件で3、4齢になるまで育てられた。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2～5μLの吐き戻し液が回収され、分集された100～200μLの吐き戻し液は-20℃に保管した。

ダイズ受容体キナーゼ候補たん白質の*in vitro*合成

ダイズ完全長cDNAクローンライブラリーから選抜した24種ダイズ受容体キナーゼ (RLK) 候補遺伝子およびシロイヌナズナCERK1遺伝子のORFをPCRによって増幅し、pDONR221ベクターへサブクローニングした。ついで、ORF領域を発現ベクター pEU-E01-GW-TEV-GST-FLAGへLR反応によって組込み、コムギ無細胞たん白質合成系によって*in vitro*たん白質合成を実施した。合成したたん白質をanti-FLAG M2-HRP抗体を用いたイムノプロットにより解析し、合成たん白質の発現を確認した。

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前後に固定した。測定セルのみにRLK-GST-FLAG融合たん白質を流して、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、キャプチャーした融合たん白質などを除いた。融合たん白質キャプチャー、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

NBRPミヤコグサ・ダイズ中核機関 (LegumeBase) より, シロイヌナズナのキチン受容体キナーゼ遺伝子 (AtCERK1) に相同性を示すダイズRLK遺伝子の完全長cDNAを入手した. cDNAクローンを鋳型に無細胞たん白質合成系を用いてRLKとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) + FLAGタグの融合たん白質を合成した. anti-FLAG-HRP抗体を用いたウエスタンブ

ロット解析を実施した結果, 合成を試みた25種類すべての融合たん白質クローン (AtCERK1を含む) の合成に成功した (Fig. 1).

Biacoreシステムを用いて, AtCERK1を含む25種のRLK融合たん白質とヨトウガ幼虫から抽出した吐き戻し液成分の分子間相互作用の検出を試みた. 融合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, 06C24や42P16クローン等において, 他クローンよりも強い結合活性が認められた (Fig. 2).

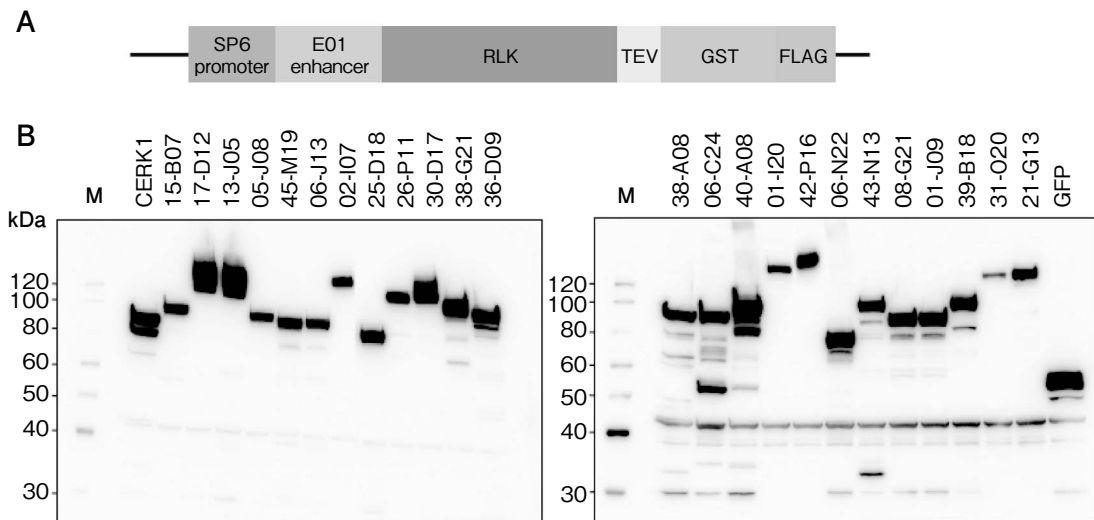


Fig. 1 Immunoblot analysis of RLK proteins fused with glutathione S-transferase (GST) and FLAG tag synthesized with the wheat germ cell-free protein production system. (A) Plasmid used for the wheat germ cell-free protein production system. (B) Immunoblot analysis using anti-FLAG HRP antibodies. M, molecular weight marker.

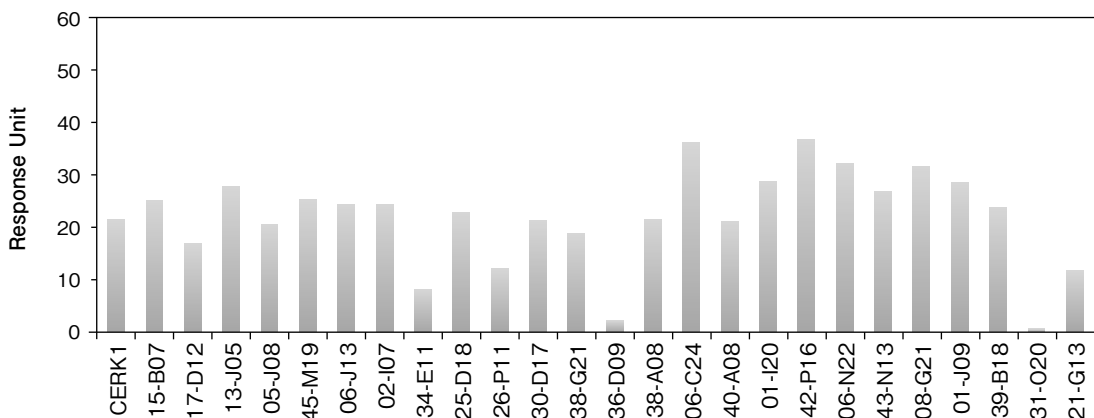


Fig. 2 Molecular interactions between RLK proteins and *Spodoptera littoralis* regurgitant based on the biacore system.

考 察

本解析はヨトウガ幼虫から分集した吐き戻し液成分を用いた予備的な解析である。本年度は、昨年度に安定的に合成出来なかったRLKたん白質を、GSTと融合させることで安定的に合成することに成功した。現在、トリノ大学との共同研究により、吐き戻し液中の

beta-galactofuranose polysaccharideの精製を急ピッチで進んでいる。精製度の高いリガンドを用いることで、特異的結合活性を検出出来るものと期待される。さらに、キチンエリシターをリガンドとして用いたCERK1の結合実験等を実施することで、Biacoreシステムに関する基礎情報を蓄え、エリシター受容体候補の選抜をより堅固にすることを目指す。

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、次世代のダイズ生産体系を確立する上で非常に重要な研究課題である。本研究では、害虫が分泌して植物の防御応答を誘導するエリシター化合物ならびにエリシター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す。本年度は、共同研究者であるMaffei教授によってヨトウガ幼虫から単離された唾液エリシター「beta-galactofuranose polysaccharide」をリガンドとする受容体たん白質を同定するための基盤研究を行った。NBRPミヤコグサ・ダイズ中核機関 (LegumeBase) よりダイズ完全長cDNAを入手し、病原菌エリシターをリガンドとして受容するLysM型receptor-like kinase (RLK) の相同性遺伝子 (24クローン) のたん白質を無細胞たん白質合成系を用いて合成した。受容体たん白質とGST+FLAGタグとの融合たん白質を発現させることで、受容体とオリゴ糖リガンドの分子間相互作用実験「BIACOREシステム」に適した合成受容体たん白質を得ることが出来た。これらの合成たん白質と精製オリゴ糖エリシターを用いた解析を実施し、害虫防除に資する植物—昆虫相互作用メカニズムを解明する。

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) Maffei ME, Arimura G and Mitöfer A (2012): Natural elicitors, effectors and modulators of plant responses. *Nat Prod Rep*, **29**, 1288-1303.
- 3) Bricchi I, Occhipinti A, Berteau CM, Zebelo SA, Brillada C, Verrillo F, De Castro C, Molinaro A, Faulkner C, Maule AJ and Maffei ME (2012): Separation of early and late responses to herbivory in Arabidopsis by changing plasmodesmal function. *Plant J*, **73**, 14-25.
- 4) 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 Natl Acad Sci USA*, **104**, 19613-19618.
- 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.