

Title	Structural study of plant small G protein OsRac1
Author(s)	小佐見, 謙一
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52307
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (小佐見 謙一)

論文題名

Structural study of plant small G protein OsRac1
(植物の低分子量G蛋白質OsRac1の構造生物学的研究)

論文内容の要旨

植物は病原体の侵入を認識すると活性酸素種を産生し、局所的な細胞死などの病害抵抗性を示す。低分子量Gタンパク質“OsRac1”を過剰発現したイネではいもち病菌に対して強い抵抗性を示し、キチンなどの微生物関連分子パターンを処理すると野生型のイネと比べ活性酸素種の産生量が増加する。また、GTPが結合したOsRac1は活性酸素種の生成を行うNADPHオキシダーゼ“OsRbohB”と相互作用し、OsRac1が活性酸素種の産生を制御する「分子スイッチ」として機能していると考えられる。しかし、植物ではGTP結合低分子量Gタンパク質の立体構造の報告がなく、OsRac1が活性酸素種の産生を制御する分子メカニズムはよく分かっていない。本研究では、GTP結合OsRac1の立体構造を決定し、得られた構造情報を用いてイネの活性酸素種産生の分子メカニズムの解明を目指した。

安定にGTP結合型OsRac1の結晶化サンプルを得る為にOsRac1^{Q68L}変異体(以下OsRac1)を用い、GTPアナログ“GMPPNP”を用いて結晶化を行った。蒸気拡散法によりGTP型OsRac1の単結晶を得ることに成功し、GTP型OsRac1の構造を1.9 Åの分解能で決定した(図1)。次に表面残基の特徴を解析して、OsRbohBとの相互作用に関わると思われる残基を特定した。試験管内での相互作用実験からOsRac1^{Y39A}、OsRac1^{D45A}でOsRbohBとの結合が弱まった。NMR測定から、これら変異体は構造を保持しており(図2)、Tyr39、Asp45はOsRbohBとの相互作用に関わる残基であることが分かった。このOsRac1^{Y39A}、OsRac1^{D45A}を発現させたイネ培養細胞では活性酸素種の産生の抑制が見られ、Tyr39やAsp45は機能的・生理的に重要な残基であった。これらの残基はOsRac1のSwitch Iに位置し、詳細にOsRbohBの活性化機構を調べるために、Switch Iの全ての残基をAlaに置換し相互作用解析を行った結果、少なくともTyr39、Val43、Phe44、Asp45の残基がOsRbohBとの相互作用に関与すると考えられ、静電的、疎水的な相互作用がOsRac1とOsRbohBの相互作用に重要なものかもしれない。これらの残基周辺はOsRac1のAsp45を中心にして負の電荷を帯びたポケット様の表面構造が見られたが、GDP型AtRop9の構造ではこの表面構造は見られない(図3)。GDP/GTPの交換はOsRac1においてSwitch IのC末端の構造変化を誘導し、正の電荷を持つOsRbohBとの相互作用を引き起こすのかもしれない。

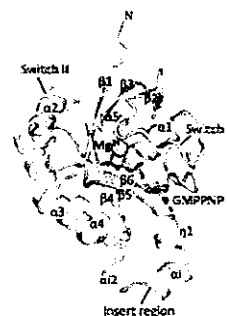


図1. OsRac1の結晶構造

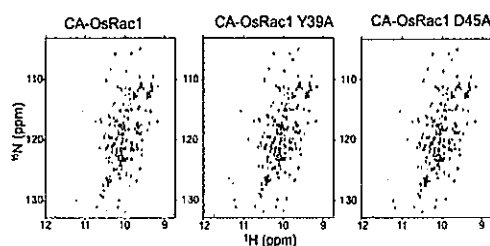


図2. OsRac1と変異体の¹⁵N-¹H HSQC NMRスペクトル

【総括】

植物の低分子量Gタンパク質の機能の重要性は知られているが、GTP結合型の植物の低分子量Gタンパク質の構造生物学的知見はなかった。今回、X線結晶構造解析やNMRなどの物理化学的手法や生化学的解析、分子生物学的解析に基づいた理論的かつ定量的な解析を行い、イネ由来低分子量Gタンパク質OsRac1について、植物で初めてGTP結合型低分子量Gタンパク質の構造解析に成功し、GTPの結合やOsRbohBとの結合に関わるアミノ酸残基の配置を原子レベルで特定した。活性酸素の産生をOsRac1が直接制御する事を証明し、OsRbohBの活性化のためのタンパク質界面の特定や特定アミノ酸残基の重要性を明らかにした。

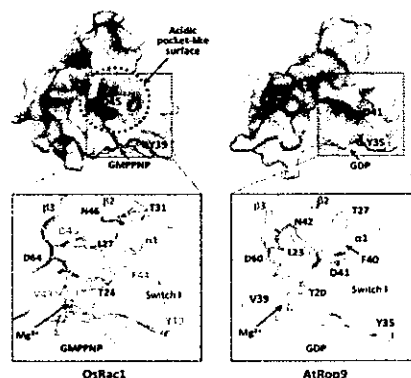


図3. GTP型OsRac1とGDP型AtRop9の表面構造の違い

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (小 佐 見 謙 一)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤原 敏道
	副 査	教授	水谷 泰久
	副 査	教授	中村 春木

論文審査の結果の要旨

低分子量 G タンパク質 “OsRac1” を過剰発現したイネではいもち病菌に対して抵抗性を示し、活性酸素種の産生量が増加する。また、GTP 結合 OsRac1 は活性酸素種の生成を行う NADPH オキシダーゼ “OsRbohB” と強く結合する。このことから、OsRac1 は活性酸素種産生を制御する「分子スイッチ」として機能すると考えられる。しかし、植物では GTP 結合低分子量 G タンパク質の立体構造の報告がなく、また OsRac1 が活性酸素種産生を制御する分子機構はよく分かっていない。

申請者は GTP 結合型 OsRac1 のサンプルを得る為に OsRac1^{Q68L} 変異体 (以下 OsRac1) を使い、GTP アナログ “GMPPNP” を用いて結晶化を行った。蒸気拡散法により GTP 結合型 OsRac1 の単結晶を得ることに成功し、GTP 結合型 OsRac1 構造を 1.9 Å 分解能の X 線結晶構造解析法で決定した。次に GTP 結合型 OsRac1 と OsRbohB の表面構造を解析して、OsRbohB との結合に関わると考えられる残基を特定した。試験管内での相互作用実験から OsRac1^{Y39A}, OsRac1^{D45A} 変異体で OsRbohB との結合が減少することを見出し、NMR の ¹H-¹⁵N HSQC 測定からこれらの変異体が高次構造を保持しており、Tyr39, Asp45 の残基が OsRbohB との結合に関わることを明らかにした。さらに、イネ培養細胞で恒常活性型 OsRac1^{Y39A} や恒常活性型 OsRac1^{D45A} を発現させ、恒常活性型 OsRac1 と比較して活性酸素種の産生の減少が見られ、OsRac1 の Tyr39 や Asp45 は細胞内において機能的に重要であることを明らかにした。この Tyr39, Asp45 は OsRac1 の Switch I に位置していることから、申請者は Switch I が OsRbohB との相互作用領域であると考え、Switch I の全ての残基を Ala に置換し相互作用解析を行い、Tyr39, Asp45 以外にも OsRbohB との結合に Val43, Phe44 に関与することを見出した。これら Tyr39, Val43, Phe44, Asp45 周辺は OsRac1 の Asp45 を中心にして負の電荷を帯びたポケット様の表面構造があり、GDP 結合型 AtRop9 の構造ではこのような表面構造は見られない。このことから OsRac1 は GTP の結合によって Switch I の構造変化を誘導し、負の電荷を帯びたポケット様の領域が形成されることで正の電荷を帯びた OsRbohB との間に静電的な相互作用が働き両者が強く結合して、OsRbohB の活性化が引き起こされると考えられた。

申請者は初めて植物の GTP 結合型低分子量 G タンパク質の構造を X 線結晶解析法で決定した。NMR も含めた原子分解能構造情報に基づき解析を行うことで、OsRbohB の活性化のためのタンパク質界面や特定残基の重要性を明らかにし、OsRac1 が活性酸素の産生を直接制御する事を証明した。また、GTP 結合による植物の低分子量 G タンパク質の活性化機構や活性酸素種産生の分子機構の一端を明らかにした。このことは植物の低分子量 G タンパク質が誘導する分子機構の解明や病害抵抗性の理解、さらに農学・育種への社会的還元にも繋がると考えられる。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。