JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	ウリ類炭疽病菌が分泌する病原性タンパク質DN3の構造機能解析
Author(s)	大木，進野
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書：1-7
Issue Date	2020-05-08
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/16748
Rights	
Description	基盤研究(C)（一般），研究期間：2017～2019，課題番号：17K08194，研究者番号：70250420，研究分野：構造生物化学

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ５ 月　 ８ 日現在

機関番号：１３３０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ０８１９４

研究課題名（和文）ウリ類炭疽病菌が分泌する病原性タンパク質DN3の構造機能解析

研究課題名（英文）Structuer-function relationship of CoDN3, an effector of Colletotrichum orbiculare

研究代表者
大木　進野（Ohki, Shinya）

北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター・教授

研究者番号：７０２５０４２０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：NMRにより、植物病原性真菌Colletotrichum orbiculare（キュウリ炭疽病の原因菌）の小エフェクターCoDN3とカルモジュリン（CaM）との間にCa2+依存的な相互作用があることが直接的に示された。CoDN3の構造は揺らいでおり、CaM結合部位はC末端の残基34～53である。合成ペプチドを用いた実験で、Ca2+結合型 CaM 複合体中の CoDN3 のCaM 結合部位がヘリカルな構造をとることが示された。また、CaM 結合能を欠損した CoDN3 変異体を用いた細胞死抑制実験から、CoDN3 のCaM 結合部位が 生体内での完全な機能に必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ウリ科植物の病原菌 Colletotrichum orbiculareが植物細胞に分泌するDN3というエフェクターについて、その構造と機能の一端を明らかにした。さらに、このDN3が機能を発揮するメカニズム、すなわち、感染機構に関して、植物タンパク質CaMが重要な役割を担っていることを見出した。この研究結果は、学術的なインパクトだけでなく、植物の感染予防薬を開発するうえでの有益な情報を与えるものである。従って、食糧問題の解決に寄与するポテンシャルを持っている成果であり、社会的にも意義があるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Nuclear magnetic resonance (NMR) data directly indicated a Ca2+-dependent interaction between calmodulin (CaM) and CoDN3, a small effector of the plant pathogenic fungus Colletotrichum orbiculare,which is the causal agent of cucumber anthracnose. The overall conformation of CoDN3 is intrinsicallydisordered, and the CaM-binding site spans residues 34-53 of its C-terminal region. Experimentsemploying a chemically synthesized peptide corresponding to the CaM-binding site indicated that theCaM-binding region of CoDN3 in the Ca2+-bound CaM complex takes ana-helical conformation. Celldeath suppression assay using a CoDN3 mutant lacking the CaM-binding ability suggested that the wildtype CaM-binding site is necessary for full CoDN3 functionin vivo.

研究分野：構造生物化学

キーワード：エフェクター　構造　機能　相互作用

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

１．研究開始当初の背景

植物は日照や気温、湿度、塩といった自身の成長や生命維持を左右する外的な要因に常に暴露されているほか、その生死に関わる病原菌にもさらされている。病原菌はエフェクターと呼ばれるタンパク質を分泌して、植物の生理機能を撹乱することで感染を成立させる。病害からの植物の保護は食料確保や環境保全に直結する地球規模の課題であるため、植物の感染に関する基礎研究の重要度は極めて高くなりつつある。このような背景のもと、近年、エフェクター分子の同定とその機能解析が国内外で活発に行われるようになってきた（*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2012) **76**, 262-310 など）。

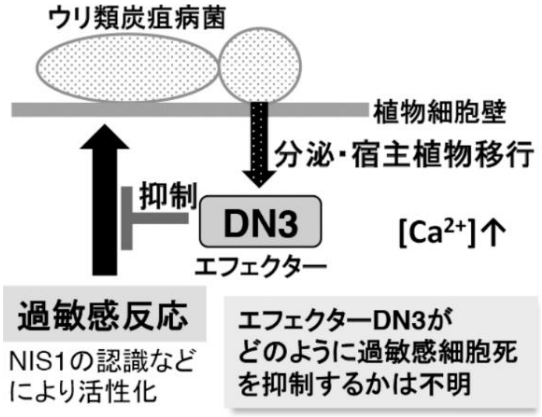

図１　エフェクター分子 DN3 の働き

本課題の研究分担者の 1 人が参画した国際共同研究チームによって、ウリ科作物に病害を引き起こす病原糸状菌のひとつウリ類炭疽病菌（*Colletotrichum orbiculare*）のゲノム解読が完了した（*New Phytol.* (2013) 197, 1236-1249）。この情報をもとに複数のエフェクター分子が同定されている。そのうち 74 残基の小タンパク質 DN3 は、感染拡大を阻止するために植物細胞内で起こる過敏感反応を抑制する機能を有している（*Mol. Plant-Microbe Interact.* (2012) 25, 625-636; *Plant Cell* (2014) 26, 2265-2281）。今日までに、別のエフェクタータンパク質 NIS1（necrosis-inducing secreted protein 1; 143 残基）が誘導する植物の過敏感細胞死を DN3 が抑制することは実験で明らかにされているが、この DN3 の抑制作用についての詳細なメカニズム全くわかっていない（図 1）。

DN3 の機能を理解するためには分子構造レベルでの研究が望まれる。しかし、DN3 と NIS1 は一般的な大腸菌を用いた試料調製が大変困難であることが判明しており、ここが研究を阻むハードルとなっている。植物病原菌エフェクタータンパク質の原子分解能での先行研究も非常に数が限られていて（例えば、*Cell Host & Microbe* (2011) 10, 616-626）、その主要な原因のひとつは、構造研究に必要な質と量の試料を調製することが難しい点である。

一方で、研究代表者ともう１名の研究分担者は、このような試料調製の問題を克服するために植物培養細胞 BY-2 を用いた高効率タンパク質発現システムを構築し（*Plant J.* (2001) 27, 79-86）、これを用いて NMR 実験に必要な安定同位体標識試料を調製する技術を確立してきた（*J. Biomol. NMR* (2008) 41, 271-277）。現在までに、この独自技術を用いて気孔密度調節因子ストマジェンの構造-機能相関の解明や種子形成因子 ESF1.3（embryo surrounding factor）の立体構造解析などの成果をあげている（*Nat. Commun.* (2011) 2, 512; *Science* (2014) 344, 168-172）。両者ともペプチドホルモンとして知られている分子で、一般的な方法での試料調製は難易度が高い。

２．研究の目的

本研究では、この独自の試料調製技術を駆使して DN3 の構造と機能を解明する。研究対象分子が比較的小さいことと、ターゲットとの動的な相互作用を溶液中で詳細に解析できる利点から、分子レベルの実験手法には溶液 NMR 法を活用する。その他、*in silico, in vitro, in vivo* の異なる時間空間分解能で各種実験に取り組み、それらを相互補完しながら研究を推進する。

我々は、アミノ酸配列に基づいたモチーフ解析によって、DN3 がカルシウム結合タンパク質カルモジュリン(CaM)と結合することを予測した（図 2）。本研究では、この未発表データを起点として研究期間内に以下の 4 項目を明らかにする。

(1) エフェクターDN3 の立体構造。
(2) CaM との結合による DN3 の構造変化やダイナミクス。
(3) CaM 非結合型の変異 DN3 は過敏感反応を抑制できるのか？
(4) DN3 が標的とする CaM 以外の因子の探索、および、同定した因子の機能。

*MYASSFVVMLLAIPFAAA*VPVAQQKHNGKPIHVKVPGVGTGEYWPGDHGHDGNVAVWNLAHYGKVTAPGKKGP

図 2.DN3 のアミノ酸配列と予測
斜字はシグナル配列、網掛け部分が CaM 結合部位と予測された領域。

３．研究の方法

大腸菌や植物培養細胞を用いた遺伝子組み換え技術で、DN3 もしくはその変異体を発現するシステムを構築した。それぞれの試料の N 末端側には、His x 6 タグとエンテロキナーゼ切断配列をタンデムに連結して、発現系を構築した。タバコ培養細胞（BY-2 細胞）を利用した実験試料の調製システムは我々の独自技術である。この方法は通常の遺伝子組み換え大腸菌を用いたタンパク質調製システムでは発現することが困難なタンパク質を成熟型の状態で調製することが出来るため、代替法として威力を発揮する。CaM は既に確立されている大腸菌利用のたんぱく質合成系で調製した。

ソニケーションによる細胞破砕、各種カラム操作、塩析、透析、限外濾過の方法を組み合わせて、試料タンパク質、変異体を精製した。

NMR や CD を活用して、DN3 の構造情報を取得した。また、DN3 と CaM の相互作用を観測した。さらに、DN3 の CaM 結合部位に相当する合成ペプチドを用いて、CaM 結合時の DN3 の構造に関する情報を得た。

さらに、DN3 の変異体を用いて植物体に与える影響を調べた。

４．研究成果

はじめに、大腸菌ならびに植物培養細胞 BY-2 を利用して、DN3 およびその変異体、CaM 研究用試料を発現・精製するシステムを確立し、十分量の試料を得た。

均一 ^{15}N 安定同位体標識を施した DN3 の 2 次元 ^{1}H–^{15}N HSQC スペクトルを測定し、DN3 が天然変性タンパク質であることを発見した。また、DN3 が Ca^{2+}依存的に CaM と結合することを NMR スペクトルで示すことが出来た（図 3）。さらに、メチオニン選択的 ^{13}C 標識を施した CaM を 2 次元 ^{1}H–^{13}C HSQC スペクトルでモニターし、DN3 と結合することを確認した（図 4）。

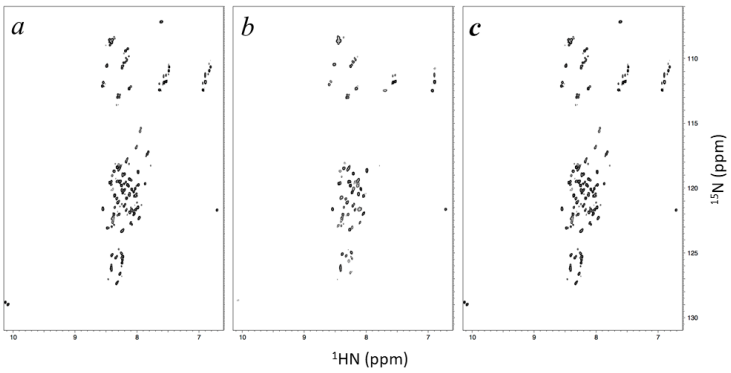

図 3 DN3 の ^{1}H–^{15}N HSQC スペクトル

(a)DN3 のみ、(b)非標識の Ca^{2+}結合型 CaM を添加、(c) 試料 b に EDTA を添加。スペクトル a と c は同一（つまり、DN3 と CaM が結合していないことを意味している）、b のみ幾つかのシグナルが消失。

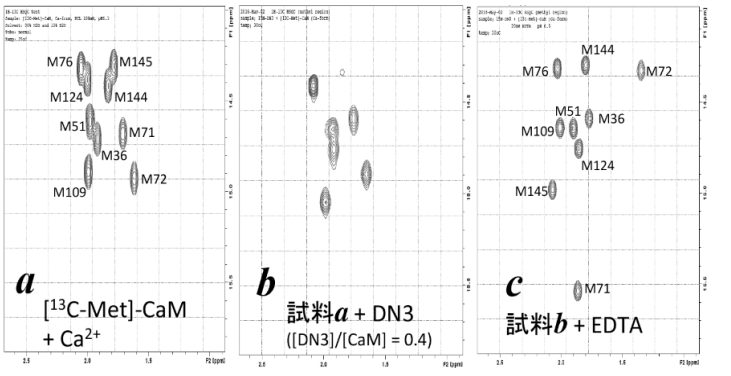

図 4 ^{13}C-Met 選択標識 CaM の NMR データ

2 次元 ^{1}H–^{13}C HSQC メチル領域拡大図。CaM の Met 残基の側鎖メチル基のみを選択的に観測。DN3 添加に伴い CaM のシグナルが変化した(*a*, *b*)。試料(*b*)に EDTA を加えると、既知の Ca^{2+}非結合型 CaM の NMR スペクトル(*c*)になった。この結果は、CaM が Ca^{2+}結合状態にあるときだけ特異的に DN3 と結合することを示している。

図 3、4 のデータから、DN3 と CaM の結合は、よく知られた CaM と標的タンパク質の結合とは異なり、結合定数はそれほど強くなく、結合時にも安定した 1 つの複合体構造を形成していないことが示唆された。

次に、CaM 結合部位と予測された DN3 の C 末端部分に相当する合成ペプチドを準備した。このペプチドが CaM と Ca^{2+}依存的に結合すること、さらに CaM 結合時には α ヘリックス構造を形成することを CD の実験から明らかにした（図 5）。

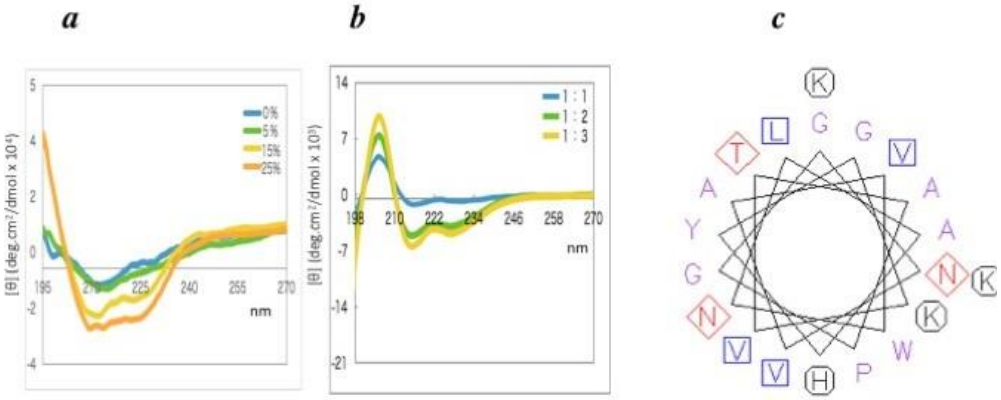

図 5　DN3 CaM 結合領域の遠紫外 CD スペクトルとヘリカルホイールモデル
(a) CaM 結合 DN3 ペプチドの TFE 滴定、および (b) 複合体のスペクトルから CaM のスペクトルを減算したスペクトル。cCaM との複合体における DN3 ペプチドからの寄与を示す。サンプル条件；[タンパク質またはペプチド] ＝20μM、[Ca^{2+}] ＝10mM、KCl＝100mM、pH 6.0. (c) CoDN3 の CaM 結合領域のヘリカルホイールモデル。

最後に、DN3 とその CaM 結合領域を欠損させた変異体について、植物の葉にどのような作用を及ぼすか実際に実験して確認した。結果を図 6 に示す。

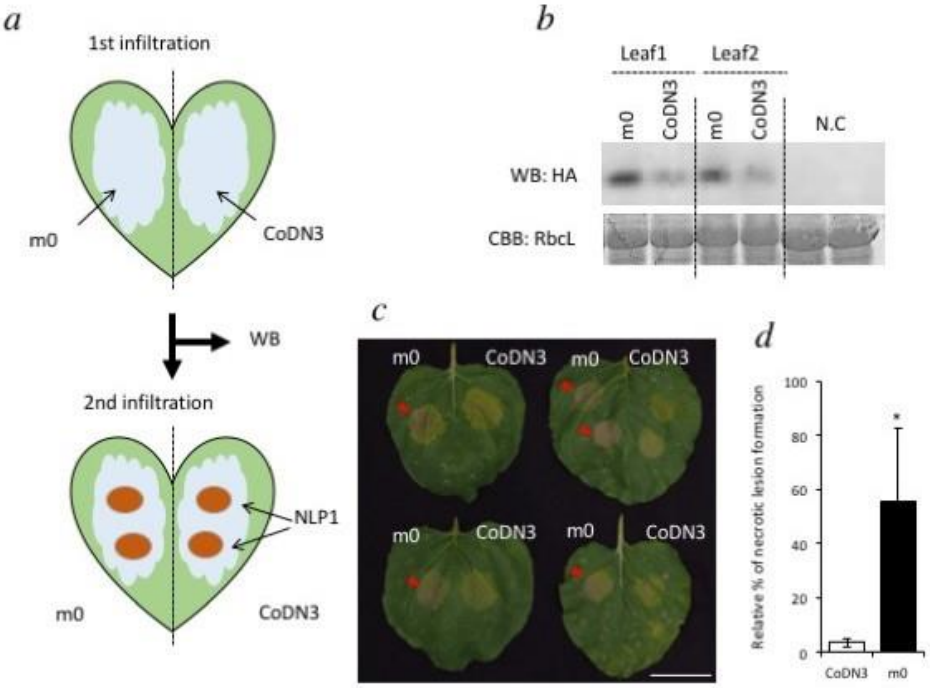

図 6　CoDN3 と変異体 m0 の壊死性病変抑制効果の評価
(a)壊死性病変の評価を模式的に表したもの。緑色のハート形は *N. benthamianaleaves* を表す。水色の部分は第一浸潤、茶色の部分は第二浸潤を示す。WB はウエスタンブロッティングを示す。(b) アグロ浸潤した *N. benthamianaleaves* における CoDN3 と m0 の蓄積を示すウエスタンブロット（上段）。対応するローディングコントロール（RbcL、RuBisCO ラージサブユニット）を CBB で染色した（下のパネル）。(c) CoDN3 と m0 タンパク質を蓄積した NLP1 の組換え発現（*N. benthamianaleaves*）赤矢印は壊死性病変を示す。棒は 4cm を示す。(d) 第二浸潤部における壊死性病変形成の評価。各値は 5 回の独立した測定値の平均±SD を示す。CoDN3 との有意差は Student st-test(*p<0.05)で評価した。

この実験の結果、全長 DN3 では NLP1 の活性が抑制されているのに対し、欠損 DN3 では NLP1 の活性が抑制できていないことが示された。従って、DN3 の CaM 結合部位は、植物細胞内でその機能を発現するためには必須であることが明らかとなった。おそらく植物細胞内でも DN3 と CaM の

結合が起こっていることが強く示唆される。
　最後に、DN3-CaM 複合体がさらなる標的分子と結合してどのように作用するのかを明らかにするため、標的化合物の探索を開始した。しかしながら、課題の採択期間が終了するまでに良好な結果を得られていない。これについては、令和 2 年度から新たに採択となった科研費基盤 C の研究で継続的に実施する計画である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Noriyoshi Isozumi, Yoshihiro Inoue, Tomohiro Imamura, Masashi Mori, Yoshitaka Takano, Shinya Ohki	４．巻 514
２．論文標題 Ca2+ dependent interaction between calmodulin and CoDN3, an effector of Colletotrichum orbiculare	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Commununications	６．最初と最後の頁 803-809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 Chen, J., Inoue, Y., Tanaka, S., Singkaravanit-Ogawa, S., Ohki, S., Kaido, M., Mise, K., and Takano, Y.
２．発表標題 Studies on the plant recognition of the C-terminal region of the Colletotrichum orbiculare NLP1
３．学会等名 植物病理学会
４．発表年 2018年～2019年

１．発表者名 飯野真心、富田沙理、五十棲規嘉、高野義孝、森正之、大木進野
２．発表標題 Colletotrichum Orbiculare由来エフェクターDN3はカルモジュリン結合タンパク質か？
３．学会等名 第59回　日本植物生理学会年会
４．発表年 2017年～2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	森　正之 (MORI MASASHI) (00320911)	石川県立大学・生物資源環境学部・准教授 (23303)	

６．研究組織（つづき）

	氏名 （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	高野　義孝 (TAKANO YOSHITAKA) (80293918)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	