

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07833

研究課題名(和文) 癌腫病菌に感染したシラカンバ植物体に生成するタンパク質の3次元画像網羅解析

研究課題名(英文) Three-dimensional image comprehensive analysis of the proteins produced in the Japanese birch plantlet infected with a canker-rot fungus

研究代表者

横田 信三 (Yokota, Shinso)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：60210613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：カンバ類の癌腫病菌カバノアナタケ10-U1株に感染したシラカンバ幼植物体No.8の葉・葉柄及びカルスに生成する菌感染特異的タンパク質のプロテオーム解析を行った。その結果、光合成、エネルギー生産、解毒、二次細胞壁形成、およびPR-10タンパク質生成などの菌感染応答が生じることが判明した。菌感染部位から切片を作製してMALDIイメージング分析を行ったが、縮合型タンニンに相当する特徴的な画像は得られなかった。また、カバノアナタケ10-B2株の全ゲノムの塩基配列、及びミトコンドリア・ゲノムの塩基配列を解読した。その結果、この菌が真正担子菌綱のメシマコブと近縁であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シラカンバのカンバ類の癌腫病菌カバノアナタケに対する菌感染応答機構を、分子レベルである程度明らかにすることができた。この研究成果は、シラカンバ樹木の病原菌に対する防護方法の開発に応用できるのみならず、他の木本性植物についても適用できる可能性がある。

カバノアナタケの全ゲノム及びミトコンドリア・ゲノムの塩基配列を解読することが出来た。これらの成果は、この菌の病原性及びシラカンバ樹木との相互応答機構の解明に大きく寄与する。また、この菌の菌核(チャーガ)は、抗腫瘍活性等の様々な薬理活性化合物を有しており、これらの化合物の生合成機構の解明等、医学・薬学分野への貢献も期待される。

研究成果の概要(英文)：Proteome analysis was performed for the infection specific proteins produced in leaf and petiole, and callus from Japanese birch plantlet No.8 infected with a canker-rot fungus *Inonotus obliquus* strain 10-U1. As the results, it was revealed that fungal-infection responses are induced for photosynthesis, energy production, detoxification, secondary cell wall formation, PR-10 proteins synthesis, and etc. in the organ and the cells.

Although MALDI imaging analysis was performed for the sections prepared from the infected internodes, specific images for condensed tannins were not obtained. In addition, the whole genome and mitochondrial genome were sequenced for *Inonotus obliquus* strain 10-B2. As the results, this fungus was found to be closely related to *Sanghuangporus sanghuang* belonging to Agaricomycetes.

研究分野：森林化学

キーワード：MALDIイメージング シラカンバ カバノアナタケ プロテオーム解析 菌感染特異的タンパク質 ゲノム解析 縮合型タンニン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界最初の MALDI イメージングは、Kaufmann のグループ<sup>1)</sup>により、ペプチドを対象に行われた。その後、Caprioli のグループ<sup>2)</sup>が中心となって、この技術を発達させた。そして今日まで、実験用動物とヒトの切片を用いて、特定のタンパク質、ペプチド、脂質、投与薬物代謝物などの組織及び細胞における局在・分布を可視化するために、世界的に使用されている。また、最近では、3次元の MALDI イメージング手法も開発されている<sup>3)</sup>。一方、植物においては、穀物<sup>4)</sup>、モデル植物<sup>5)</sup>などで応用されているが、樹木については殆ど行われていない<sup>6)</sup>。

これまで研究代表者が行って来た研究において、カンバ類の癌腫病菌カバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体を経時的に採取し、横断面切片のペルオキシダーゼ (POX) 活性染色を行ったところ、菌感染特異的な POX が検出され、時間の経過と共にその活性が強くなり、活性分布も広がって行くことを見出した<sup>7)</sup>。POX と並行して、菌感染特異的なフェノール性化合物 (PHE) の堆積も観察され、その染色強度と分布も、時間経過と共に強く、広くなることを見出した<sup>7)</sup>。また別の研究において、菌感染したシラカンバ幼植物体内に、感染初期特異的なタンパク質として、2種類のヒートショックタンパク質 (Hsp70, Hsp60) 及びグルタチオン S-トランスフェラーゼが生成することを見出している<sup>8)</sup>。これらのタンパク質は、オキシダティブバースト (OB) 及び全身獲得抵抗性 (SAR) に関与するタンパク質であり、これら2つの機構が、菌感染シラカンバ幼植物体で生じていることが判明した。更に、POX、PHE、及び植物細胞骨格形成タンパク質であるアクチンについて、幼植物体の横断面切片における MALDI イメージングを行い、各物質の経時的局在をインタクトな状態で解明した。

### 2. 研究の目的

本研究では、カバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体内に生成する菌感染特異的なタンパク質について、3次元 MALDI イメージングを行う。また、これらのタンパク質について、経時的な網羅的定量解析 (定量プロテオミクス) を行う。対象とするタンパク質は、POX、ヒートショックタンパク質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、及びアクチンである。また、菌感染特異的な PHE についても、同様に解析する。得られるデータを基に、菌感染に対するシラカンバ幼植物体内の OB や SAR などの動的な感染初期病害抵抗性機構を、組織及び細胞において経時的に解析し、その機構を分子レベルで解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 菌感染特異的なタンパク質及び PHE の 3次元 MALDI イメージング: カバノアナタケ IO-U1 株 (NBRC 113406) に感染したシラカンバ幼植物体の菌接種部位 (主茎の茎頂から3番目の節間) から、横断面及び縦断面切片を作製した。これにマトリックスを塗布し、MALDI-TOF-MS を用いて、POX、ヒートショックタンパク質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、アクチン、及び PHE について、3次元 MALDI イメージング分析を行った。

(2) 菌感染特異的なタンパク質の定量プロテオーム解析: カバノアナタケ IO-U1 株感染幼植物体からタンパク質を抽出し、このタンパク質サンプルを LC/MS/MS を用いて、POX、ヒートショックタンパク質、及びグルタチオン S-トランスフェラーゼを対象として定量分析を行った。

(3) 菌感染幼植物体の葉・葉柄及び葉柄由来カルスにおけるプロテオーム解析: カバノアナタケ IO-U1 株感染幼植物体の葉・葉柄及び葉柄由来カルスからタンパク質サンプルを調製し、このサンプルについてプロテオーム解析を行い、生成する菌感染特異的なタンパク質を同定した。

(4) カバノアナタケの全ゲノム及びミトコンドリア・ゲノムの解読: カバノアナタケ IO-B2 株 (NBRC 113408) の全ゲノム及びミトコンドリア・ゲノムについて、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を解読し、ゲノムの特徴を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 菌感染特異的なタンパク質及び PHE の 3次元 MALDI イメージング: 幼植物体の菌接種部位から横断面及び縦断面切片を作製し、菌感染特異的なタンパク質について、先ず2次元の MALDI イメージング解析を行った。しかしながら、POX、ヒートショックタンパク質、グルタチオン S-トランスフェラーゼについては、絶対量の不足及び特異的な MALDI/TOF/MS ピークの未検出により、これらのタンパク質の特徴的な分布が認められなかった。また、アクチンについては、特異的な MALDI/TOF/MS ピーク情報の不足により、特徴的な分布が観察されなかった。図1に PHE (縮合型タンニン) に関する二次元 MALDI イメージングの結果を示す。一部の MS ピークに、特徴的な局在が見られたが、バックグラウンドにも局在が認められ、良好な結果が得られなかった。結果として、菌感染特異的なタンパク質及び PHE に関する3次元 MALDI イメージング図を得ることが出来なかった。

(2) 菌感染特異的なタンパク質の定量プロテオーム解析: タンパク質サンプルを LC/MS/MS 分析に供したが、既存のシステムでは各タンパク質の絶対量が不足していた。結果として、POX、ヒートショックタンパク質、及びグルタチオン S-トランスフェラーゼ何れについても、良好な

定量結果が得られなかった。

(3) 菌感染幼植物体の葉・葉柄及び葉柄由来カルスにおけるプロテオーム解析： 菌感染幼植物体の葉・葉柄からのタンパク質サンプルの二次元電気泳動の結果、合計 508 個のタンパク質スポットが検出され、その内、菌感染特異的タンパク質は 180 個であった。これらの特異的タンパク質の内、2 個を同定し、それぞれ AAA 型 ATP アーゼ及びリブローズニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ・アクティパーゼであった。従って、菌感染幼植物体の葉・葉柄では、光合成の促進によるエネルギー生産が活

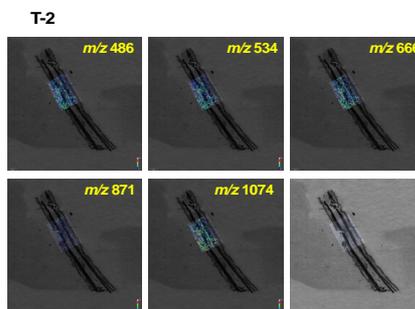


図 1. PHE の MALDI イメージング

性化されていることが判明した。一方、菌感染した葉柄由来カルスにおいては、二次元電気泳動の結果、合計 1,720 個、菌感染特異的タンパク質が 134 個、それぞれ検出された。これらの特異的タンパク質の内、発現量の多い 10 個のタンパク質の同定を行った。その結果、葉緑体プロトクロロフィリド・レダクターゼ、エノラーゼ、ミトコンドリア・プロセッシング・ペプチダーゼ・サブユニット 様、ミトコンドリア・プロセッシング・ペプチダーゼ・サブユニット イソフォーム B、T-コンプレックス・タンパク質 1 サブユニット、グルタチオン S-トランスフェラーゼ様タンパク質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ様タンパク質部分、タンパク質 WALLS ARE THIN 1 様、及び 2 種類の 1 SC-3 が、それぞれ同定された。従って、菌感染した葉柄由来カルスでは、菌感染に対する防御応答として、光合成、エネルギー生産、ミトコンドリアでのタンパク質取り込み機構、タンパク質の折り畳み、解毒、二次細胞壁形成、及び PR-10 タンパク質に関わる機構が活性化することが判明した。

(4) カバノアナタケの全ゲノム及びミトコンドリア・ゲノムの解読： カバノアナタケ IO-B2 株の全ゲノムを解読した。その結果、この菌のゲノムは、42.5 Mbp のヌクレオチドから成り、47.6%の GC 含量であった。ゲノム集合は、2 個のリボソーム RNA、136 個のトランスファー RNA、及び 21,203 個のタンパク質コード化遺伝子で構成されていた。予測されたコード化遺伝子の特定化により、幾つかの遺伝子が薬用化合物合成及び病原性に関与していることが判明した。予測された全ての遺伝子の内、136 個の遺伝子が木材化学成分の分解に関与していた。これらの遺伝子は白色腐朽菌に典型的なものであり、36 個のセルラーゼ候補遺伝子、35 個のヘミセルラーゼ候補遺伝子、16 個のペクチナーゼ候補遺伝子、39 個のリグニン修飾酵素候補遺伝子、及び 10 個のリグニン分解補助酵素候補遺伝子をそれぞれ含んでいた。これらの結果から、この菌が病原菌として作用し、薬用成分も合成する複雑な菌種であることが判明した。また、この菌が、木材細胞壁の全ての化学成分を分解可能であることも明らかになった。

カバノアナタケ IO-B2 株の完全ミトコンドリア・ゲノム (mtDNA) 配列、及び他の担子菌類との系統発生関係について検討した。その結果、この菌の mtDNA は、119,110 bp の長さで 25% の GC 含量を持つ、典型的な環状 DNA 分子であった。このゲノムには、2 個のリボソーム RNA、30 個のトランスファー RNA、及び 58 個のタンパク質コード化遺伝子が含まれていた。このタンパク質コード化遺伝子の内、14 個は保存ミトコンドリア・タンパク質をコード化し、1 個はリボソーム・タンパク質 S3、そして 43 個は推定タンパク質をコード化していた。14 個の保存ミトコンドリア・タンパク質コード化遺伝子は、7 種類の NADH デヒドロゲナーゼ、1 種類のアポチトクローム b、3 種類のチトクローム c オキシダーゼ、及び 3 種類の ATP シンターゼをコード化していた。これらの遺伝子は、菌のミトコンドリア・ゲノムにおいては典型的なものであり、カバノアナタケにおいて良く保存されていた。また、系統発生解析を行った結果、この菌はメシマコブと近縁であり、タバコウロコタケ科に属する *Pyrrhoderma noxium* とクラスターを形成した。得られた結果から、カバノアナタケは、薬用化合物を生産するメシマコブと系統発生関係上近縁であり、また、木本植物の病原菌である *P. noxium* と関係しており、全ゲノム解読の結果と同様に、カバノアナタケが、薬用菌と木本植物の病原菌の二面性を有する複雑な菌種であることが確認された。

#### < 引用文献 >

- 1) B. Spengler et al., 42<sup>nd</sup> ASMS conference on Mass Spectrometry, 1041 (1994)
- 2) R.M. Caprioli et al., Anal. Chem., 69, 4751-4760 (1997)
- 3) J. Oetjen et al., J. Proteomics, 90, 52-60 (2013)
- 4) S. Robinson et al., New Phytologist, 173, 438-444 (2007)
- 5) J.H. Jun et al., Anal. Chem., 82, 3255-3265 (2010)
- 6) V. Vrkoslav et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 21, 220-231 (2010)
- 7) M.M. Rahman et al., Plant Biotechnol., 25, 183-189 (2008)
- 8) Takashima et al., Plant Biotechnol., 30, 83-87 (2013)

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 1件）

1. 著者名 Agnestisia Retno, Ono Akiko, Nakamura Luna, Chino Rei, Nodera Kaito, Aiso-Sanada Haruna, Nezu Ikumi, Ishiguri Futoshi, Suzuki Tomohiro, Yokota Shinso	4. 巻 4
2. 論文標題 The complete mitochondrial genome sequence of the medicinal fungus <i>Inonotus obliquus</i> (Hymenochaetaceae, Basidiomycota)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mitochondrial DNA Part B	6. 最初と最後の頁 3504 ~ 3506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1675548">https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1675548</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 千野 怜、野寺開斗、石栗 太、大島潤一、横田信三
2. 発表標題 癌腫病菌カバノアナタケIO-U1株を接種したシラカンバ幼植物体No.8の菌感染部位に生成する特異的タンパク質のプロテオーム解析
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会（金沢）大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Retno Agnestisia, Rei Chino, Kaito Nodera, Futoshi Ishiguri, Shinso Yokota
2. 発表標題 Two-dimensional electrophoresis analysis of infection-specific proteins produced in the callus of Japanese birch plantlet No.8 infected with a canker-rot fungus <i>Inonotus obliquus</i> strain IO-U1 (NBRC 113406)
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野寺開斗、千野 怜、石栗 太、大島潤一、横田信三
2. 発表標題 カバノアナタケ菌IO-U1株に感染したシラカンバ幼植物体No.8の葉・葉柄に生成する特異的タンパク質のプロテオーム解析
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会（京都）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千野 怜、野寺開斗、石栗 太、大島潤一、横田信三
2. 発表標題 カバノアナタケ菌I0-U1株に感染したシラカンバ幼植物体No.8の根における菌感染応答
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会（京都）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千野 怜、野寺開斗、大島潤一、石栗 太、横田信三
2. 発表標題 癌腫病菌カバノアナタケI0-U1株に感染したシラカンバ幼植物体No.8の主茎に生成する特異的タンパク質のプロテオーム解析
3. 学会等名 第35回日本植物細胞分子生物学会（さいたま）大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Retno Agnestisia, Rei Chino, Kaito Nodera, Haruna Aiso-Sanada, Ikumi Nezu, Tomohiro Suzuki, Futoshi Ishiguri, Shinso Yokota
2. 発表標題 Genome sequence of fungus <i>Inonotus obliquus</i> strain I0-B2 (NBRC 113408) reveals insights into wood degradation
3. 学会等名 1st International Lignin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Retno Agnestisia, Tomohiro Suzuki, Kaito Nodera, Haruna Aiso-Sanada, Luna Nakamura, Futoshi Ishiguri, Shinso Yokota
2. 発表標題 Wood-degradation-related genes from genome sequence of fungus <i>Inonotus obliquus</i> strain I0-B2 (NBRC 113408)
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 アグネスティシア・レトノ、小野晶子、中村瑠奈、千野 怜、野寺開斗、相蘇春菜、根津郁実、石栗 太、鈴木智大、横田信三
2. 発表標題 カンパ類癌腫病菌カバノアナタケ10-B2株の木材化学成分分解関連遺伝子
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020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	上高原 浩  (Kamitakahara Hiroshi)  (10293911)	京都大学・農学研究科・教授   (14301)	
研究分担者	鈴木 智大  (Suzuki Tomohiro)  (10649601)	宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授   (12201)	
研究分担者	吉永 新  (Yoshinaga Arata)  (60273489)	京都大学・農学研究科・准教授   (14301)	