

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17104

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0176

研究課題名（和文）バナナの抗菌性ペプチドの網羅的探索

研究課題名（英文）Exhaustive search of anti-pathogenic peptides in *Musa acuminata*

研究代表者

花田 耕介（Hanada, Kousuke）

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：50462718

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、フザリウムに耐性を持つ品種を探し出し、その品種のトランスクリプトームで、耐性に関わると考えられるペプチド候補を探索する。マレーシアの共同研究者グループによって、フザリウムへの抗菌性が高い品種と低い品種を選んだ。選抜した品種に、フザリウムを感染させた後、トランスクリプトーム解析用サンプルとして全RNAを抽出し、日本で、トランスクリプトーム解析を実施した。特に、抗菌性が低い品種で高誘導されている26個の分泌性ペプチドをコードする遺伝子に着目し、そのペプチドをフザリウムに添加することで抗菌活性を調べた。その結果、2個のペプチドで、抗菌活性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バナナは世界中の熱帯地方で栽培されているにも関わらず、バナナの栽培品種は種子ができず、クローンを上次ぐことで栽培面積を増やしている。そのため、栽培品種は均一化しており、特有の病害や環境ストレスに非常に弱いストレスを持つことが近年大きな問題になっている。特に、バナナの出荷を不可能にさせるパナマ病あるいは新パナマ病を引き起こすバナナ型フザリウムは、様々な地域で栽培されているバナナに感染し、絶滅に瀕している品種も存在する。そこで、本研究の目的は、バナナに大きな問題を引き起こし続けている *Fusarium oxysporum*（フザリウム）を攻撃する抗菌性ペプチドの候補を見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we search for varieties that are resistant to *Fusarium*, and search for peptide candidates that are thought to be involved in resistance in the transcriptome of those varieties. A group of Malaysian collaborators selected varieties with high and low antibacterial properties against *Fusarium*. After infecting the selected varieties with *Fusarium*, total RNA was extracted as a sample for transcriptome analysis, and transcriptome analysis was performed in Japan. In particular, we focused on the genes encoding 26 secretory peptides that are highly induced in varieties with low antibacterial properties, and investigated the antibacterial activity by adding the peptides to *Fusarium*. As a result, it was clarified that the two peptides show antibacterial activity.

研究分野：ゲノム生物

キーワード：バナナ 抗菌性ペプチド フザリウム

1. 研究開始当初の背景

抗菌性ペプチドは、幅広い生物種に見出されるペプチドであり、真正細菌(バクテリア)・真菌類・ウイルス・ウイロイドに対して活性を持つ抗菌性ペプチドが存在する。植物においても、抗菌性活性を示すペプチドの探索が盛んにおこなわれている。しかしながら、細胞外に分泌される抗菌活性ペプチドは、100 アミノ酸以下のタンパク質をコードする短い遺伝子(ペプチド性遺伝子)に由来しているものが多い。このようなペプチド性遺伝子を正確に予測することが困難であるため、ペプチド性遺伝子の機能解析がほとんど進んでいない。そのような中、我々は、未同定のペプチド性遺伝子の機能に強い興味を持ち、一般に使われている遺伝子予測プログラムを改良して、ペプチド性遺伝子を高確率で推定できる新しい方法を構築した。その後、植物のモデル生物種であるシロイヌナズナで、約 8000 個のペプチド性遺伝子領域を予測し、様々な生理活性に関係するペプチドを見出した。これらの中には、新規の抗菌ペプチドをコードするペプチド性遺伝子があることが示唆された。そのため、植物の防御応答ホルモンであるサリチル酸およびジャスモン酸を植物に添加させ、シロイヌナズナの葉の細胞外(アポプラスト)に分泌する約 400 個のペプチド性遺伝子をトランスクリプトーム解析によって同定し、これらのペプチドを人工的に合成し、病原菌に直接投与することで抗菌性ペプチドを探索し、強い抗菌活性を示すペプチドを見出した実績があった。

2. 研究の目的

本研究では、世界での生産量が1億トンを唯一超える最重要果実のバナナで抗菌性ペプチドの探索を目指す。バナナは世界中の熱帯地方で栽培されているにも関わらず、バナナの栽培品種は種子ができず、クローンを上次ぐことで栽培面積を増やしている。そのため、栽培品種は均一化しており、特有の病害や環境ストレスに非常に弱いストレスを持つことが近年大きな問題になっている。特に、バナナの出荷を不可能にさせるパナマ病あるいは新パナマ病を引き起こすバナ型フザリウムは、様々な地域で栽培されているバナナに感染し、絶滅に瀕している品種も存在する。そのため、バナナは、世界でもっとも、糸状菌に対して抗菌性を示すものが必要とされている作物種の一つといえる。

このように、新パナマ病を引き起こす「*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4」は、現在、使用されている栽培品種に大きな損害を与え続けている。そこで、本研究の目的は、バナナに大きな問題を引き起こし続けている *Fusarium oxysporum* (フザリウム) を攻撃する抗菌性ペプチドを同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(ア) バナナの品種の選択、感染実験

マレーシアの共同研究者グループ(Harikrishna 博士、Teo 博士、マラヤ大学)によって、バナナの原種であるマレーヤマバショウが存在しており、それは、フザリウムの抗菌性が高い品種であることを見出していた。そして、研究グループが、耐性株として *Musa acuminata* ssp. *Malaccensis* (マレーヤマバショウ) 感受性品種として *Musa acuminata* cv. *Berangan* (ベランガム) を用意した。その後、分担者の近藤がマレーシアのマラヤ大学に滞在し、Teo 博士とともに、*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (TR4) を感染させ、感染後の96時間後に、ベランガムのみで軽度な感染症状を示すことを確認した(図1)。

そこで、二つの株に感染後、48時間ごと、96時間後に、RNA抽出し、RNAのQualityをバイオアナライザで確認後に、Qualityスコアが7以上のRNAを利用し、4つのbiological replicaeで150bpのPAIR-ENDのRNA-SEQ解析をマクロジェン社で委託した。



図1. TR4に感染した二つのバナナ株

(イ) 情報解析

マレーヤマバショウのゲノムデータは、Banana Genome Hubに登録されている「DH Pahang」のゲノムを利用した。遺伝子数は、45855個が登録されているが、100アミノ酸以下の遺伝子も約10%が登録されていたため、ペプチド性遺伝子の登録は十分にされていた。申請者が開発したsORFfinderを利用して、遺伝子間領域に存在するペプチド性遺伝子の候補を推定した。TR4のデータは、JGIのFungal Genome Resourcesに登録されているゲノムを利用した。遺伝子数は、22487個が登録されていた。

RNA-SEQ解析は、TrimmomaticでQualityが40以下で、長さが36ntのものを取り除いたものを利用した。RNA-SEQのマッピングソフトであるHISAT2で二つの全ゲノムに対して、相

同姓検索を行った。

(ウ) 抗菌性ペプチドの同定

病害菌感染によりRNA発言が上昇している120アミノ酸以下のペプチドをコードしている遺伝子の内、分泌シグナルを有すXX個の遺伝子に着目し、先行研究と同じ方法(図2参照)で、5アミノ酸重なる20アミノ酸の断片化ペプチドを人工的に合成した。ペプチドの抗菌性を調べるために、フザリウムの孢子濃度を血球計算盤で計算し、 1×10^6 個/mlにし、96穴プレートに200 μ lずつ添加する。それらのプレートには、50 μ Mになるようにペプチドを添加し、抗菌活性を調べた。

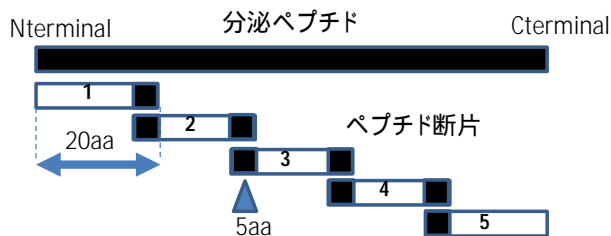


図2. ペプチド断片の構築方法

4. 研究成果

● トランスクリプトーム解析

1条件に対して、4個のReplicateでRNA-SEQ解析を行い、バナナゲノムにマッピングした(図3)。しかしながら、9割以上のREADがバナナゲノムにマッピングされている一方で、マッピング率が5割を切っているものも存在した。これらの多くは、コンタミを受けている可能性があるため、これらのサンプルを除去し、TriPLICATEのデータを再構築し、cuffdiffで発現誘導を調べた(False Discovery

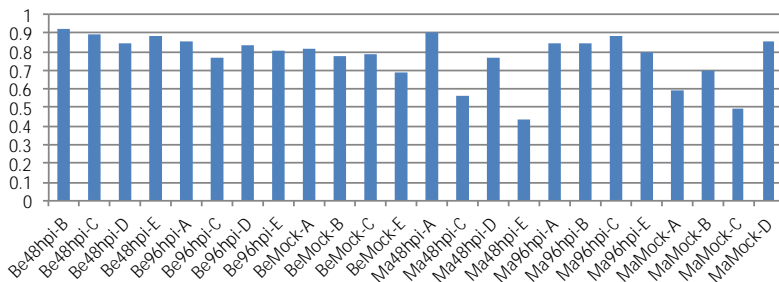


図3. バナナに登録されている遺伝子にMappingされたReadの割合

(Ma: マレーヤマバショウ, Be: ベランガム), Mock: 感染前, 48hpi: 感染後48時間, 96hpi: 感染後96時間)

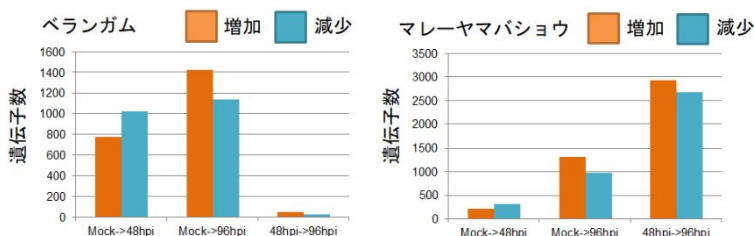


図4. 有意な発現変動している遺伝子の同定

Mock: 感染前, 48hpi: 感染後48時間, 96hpi: 感染後96時間

Rate<0.05)。その結果、マレーヤマバショウでは、感染後に時間が経過するにつれて発現変動遺伝子が増加するものの、ベランガムにおいては、感染後48時間後に変動した遺伝子は感染後96時間後も変化がなかった(図4)。そこで、ベランガムとマレーヤマバショウ間での遺伝子発現の差を調べるために、ベン図を作製した(図5)。その結果、マレーヤマバショウと、ベランガムに特異的な発現があることが明らかとなった。さらに、それらの発現を示す遺伝子群がどのような機能を示すかをGene Ontologyに基づいたenrich解析を行った。その結果、ベランガムにおいては、細胞壁関連や一時代謝関連の遺伝子が発現誘導しており、病原関連遺伝子の発現誘導は少なかった。一方で、マレーヤマバショウにおいては、病害関連遺伝子が発現誘導をされており、免疫活性が起きていることが示唆された。このように、マレーヤマバショウにおいては、TR4での免疫誘導が起きていること、フザリウムへの抗菌活性が起きていることが示唆された。

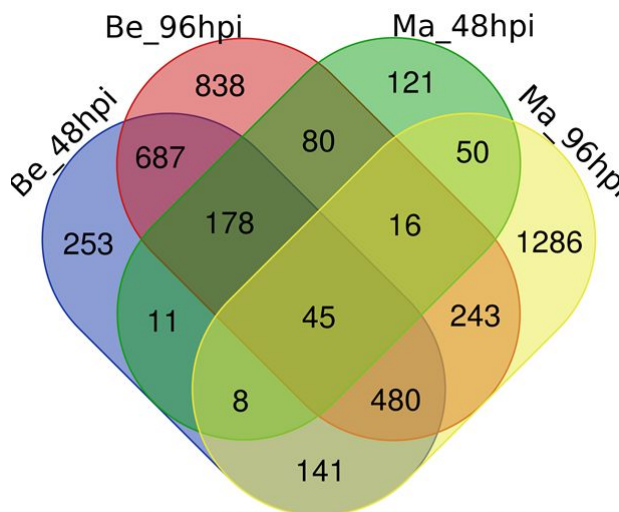


図5. 発現変動している遺伝子群の関係

Be: ベランガム, Ma: マレーヤマバショウ, 48hpi: 感染後48時間, 96hpi: 感染後96時間

● フザリウムへの抗菌性ペプチドの同定

世界中のコロナウイルスの蔓延によって、マレーシアへの渡航が困難になったことから、上

記で見出された分泌性の遺伝子の内、シロイヌナズナにも相同なものがあるもので、26 遺伝子に着目し、フザリウムへの抗菌活性を調べた。その結果、抗菌活性を示す 2 つのペプチドを見出した。そのペプチドをコードする遺伝子の機能解析を今後は実施したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Pingyu Wang, Shaolun Yao, Ken ichi Kosami, Ting Guo, Jing Li, Yuanyuan Zhang, Yoichiro Fukao, Takako Kaneko Kawano, Heng Zhang, Yi Min She, Pengcheng Wang, Weiman Xing, Kousuke Hanada, Renyi Liu, Yoji Kawano	4. 巻 18
2. 論文標題 Identification of endogenous small peptides involved in rice immunity through transcriptomics and proteomics based screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant biotechnology journal	6. 最初と最後の頁 415-428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pbi.13208	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 -

1. 著者名 Mieko Higuchi-Takeuchi, Takayuki Kondo, Minami Shimizu, You-Wang Kim, Kazuo Shinozaki, Kousuke Hanada	4. 巻 104
2. 論文標題 Effect of small coding genes on the circadian rhythms under elevated CO2 conditions in plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 55-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-020-01023-w	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 -

1. 著者名 Akihiro Ezoe, Kazumasa Shirai, Kousuke Hanada	4. 巻 38
2. 論文標題 Degree of functional divergence in duplicates is associated with distinct roles in plant evolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular biology and evolution	6. 最初と最後の頁 1447-1459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molbev/msaa302	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 -

1. 著者名 Fuminori Takahashi, Kousuke Hanada, Takayuki Kondo, Kazuo Shinozaki	4. 巻 51
2. 論文標題 Hormone-like peptides and small coding genes in plant stress signaling and development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology	6. 最初と最後の頁 88-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbi.2019.05.011	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 -

1. 著者名 Kazumasa Shirai, Kousuke Hanada	4. 巻 10
2. 論文標題 Contribution of Functional Divergence through Copy Number Variations to the Inter-species and Intra-species Diversity in Specialized Metabolites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01567	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0件

〔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	平 順一 (Taira Junichi) (20549612)	九州工業大学・大学院情報工学研究院・助教 (17104)	
研究分担者	白井 一正 (Shirai Kazumasa) (90816654)	九州工業大学・大学院情報工学研究院・特任助教 (17104)	
研究分担者	近藤 隆之 (Takayuki Kondo) (90826174)	九州工業大学・大学院情報工学研究院・博士研究員 (17104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------