

令和 5 年 4 月 14 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06049

研究課題名（和文）揺らいだ分子構造の植物病原菌エフェクターDN3の機能発現機構

研究課題名（英文）Functional mechanism of an unstructured protein DN3, one of the effectors of a plant pathogen

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ウリ科植物病原菌由来のエフェクター分子の1つであるDN3について、その構造と機能を明らかにすることが本課題の目的である。特に、特定の安定な立体構造を有していないDN3が液液相分離を起こすのかどうかという点に着目し、その性質を調べた。研究手法にはNMR（核磁気共鳴分光法）のほかSEM（走査型電子顕微鏡）を用いて構造的な情報を取得し、MS（質量分析）を活用することで、DN3の標的分子の探索も行った。NMRやSEMの結果、DN3が液滴（ドロプレット）を形成することを明らかにすることができ、その大きさについても情報を得ることが出来た。また、MSの結果からは標的分子の候補が絞れつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な人口増加による食糧不足を解決するために基礎研究が貢献できる分野のひとつが、植物の感染症のメカニズムの解明である。本課題では、ウリ科植物病原菌が分泌する感染原因タンパク質のひとつに着目し、その分子の構造や性質から機能を解明しようと試みた。

研究成果の概要（英文）：This project had been focusing on the structure and function of DN3, one of the effector molecules of cucurbitaceous plant pathogens. Particularly, we focused on whether DN3, which is known as IDP (intrinsically disordered protein), undergoes liquid-liquid phase separation, and investigated its properties. The results of NMR and SEM showed that DN3 forms droplets (droplets). Moreover, we obtained information about the size of these droplets. In addition, the MS results provided candidates of the target molecules.

研究分野：構造生物化学

キーワード：エフェクター 相分離

1. 研究開始当初の背景

植物病原菌はエフェクターと呼ばれる病原性発現に関与する各種分泌タンパク質を用いて宿主植物の免疫系を攪乱・抑制してその感染を成立させている。なかでも植物病原糸状菌は7割以上の植物病害の原因である。病害から植物を保護することは食料収穫や環境保全に関わる地球規模の課題なので、植物の感染病に関する基礎研究の必要性は高まっている。従って、近年では、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なりつつある (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2012) 76, 262-310 など)。ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) でもゲノムが解読され (New Phytol. (2013) 197, 1236-1249)、このゲノム情報から既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、感染の拡大を阻止するために植物細胞内で起こる過敏反応を抑制する機能を有し、別のエフェクター NIS1 (necrosis-inducing secreted protein 1; 143残基) が誘導する植物の過敏細胞死を抑制することが明らかになっている (Mol. Plant-Microbe Interact. (2012) 25, 625-636; Plant Cell (2014) 26, 2265-2281)。ところが、DN3 と NIS1 は直接結合しないことも知られている。この細胞死の抑制と促進が拮抗する興味深い分子機構については、詳細が全く分かっていない。

ごく最近、研究代表者らは、NMR (核磁気共鳴分光法) や CD (円二色性スペクトル) 等の実験から DN3 が天然変性タンパク質 (IDP ; intrinsically disordered protein) であること、カルシウム結合タンパク質カルモジュリン (CaM) と Ca²⁺ 依存的に比較的弱く結合することを見出した。さらに代表者らは、DN3 が一般的な CaM 結合タンパク質と大きく違い、CaM と複合体になっても特定の立体構造をとらないという独特な性質を有することを発見した。また、DN3 の CaM 結合部位を同定し、この CaM 結合部位が DN3 の機能発現に必須であることを、植物体を使った実験で実証した (Biochem. Biophys. Res. Commun. (2019) 514, 803-808)。

2. 研究の目的

DN3 は IDP という特性を持つため、CaM 以外の標的分子が存在するのであれば、それに結合するときにはある特定の立体構造を形成する可能性がある。一方で、糸状菌から植物細胞内へ放出された際に液液相分離を起こして膜のないオルガネラの液滴 (ドロレット) を形成し、細胞内で不均一に分布する可能性もあるだろう (Curr. Opin. Plant Biol. (2018) 45, 68-74)。この場合、反応場の形成に寄与した DN3 が CaM から一旦解離して効率的に従来知られている CaM-標的複合体が出現する、もしくは、DN3 が単に CaM の拡散を阻害して本来起こるはずのカルシウムイオンを介したシグナル伝達を抑制しているという2つの可能性が考えられる。これら仮説は、相分離生物学の考え方に基づいている。本研究の目的は、このような幾つかの仮説のうちどれが最も確からしいかという裏付けを得るべく、揺らいだ構造の DN3 がどのように CaM と相互作用をしているのかを相分離の観点から調べることである。このような基礎研究は、最終的に DN3 の細胞死抑制機能の作用機序を分子レベルで解明するための大きな礎になると考えた。

3. 研究の方法

DN3 を発現する遺伝子組み換え大腸菌の系を構築し、DN3 の精製方法を確立した。これを用いて安定同位体標識 DN3 を調製し、CaM との相互作用を NMR で調べた。また、メチオニン残基特異的に安定同位体標識を施した CaM を調製した。DN3 と CaM の相互作用を NMR (核磁気共鳴分光法) で調べた。それぞれ滴定実験を行い、スペクトル変化を解析した。また、NMR 緩和時間を測定して、DN3 と CaM の複合体のドロプレット形成に関する情報を得ることを試みた。さらに、NMR 拡散係数測定を計測して、DN3 と CaM の複合体のドロプレット形成に関する情報を得ることを試みた。次に、DN3 と CaM の複合体について、タンパク質濃度、pH、塩濃度などをパラメータとしてドロプレットができるかどうかを確認した。確認には簡易的に吸光度を指標とした。絞り込んだ条件下で、DN3 と CaM が形成するドロプレットの観察を TEM (透過型電子顕微鏡) で行った。DN3 と植物細胞内で相互作用する相手を探るために、MS (質量分析) を利用したプロテオミクス解析を試みた。

4. 研究成果

まず、DN3 を発現する遺伝子組み換え大腸菌の系を確立した。安定な立体構造を持たない DN3 のような分子を大腸菌で発現する場合、内在性のタンパク質分解酵素によって目的タンパク質が分解されやすい傾向にある。これを回避するために、目的タンパク質が沈殿画分に来るような KSI タグを利用した。また、精製用に His₆ タグと HRV 3C Protease 切断配列も挿入した。大腸菌の培養後に沈殿画分を洗浄して回収し、少量の 6M-Urea で溶解した。これを緩衝液で希釈したのちに酵素消化によってタグを切断して DN3 を回収した。試料の純度は電気泳動と MS によって確認した。

既に確立されている手法を用いてメチオニン残基を特異的に ¹³C で標識した CaM を調製した。試料の純度は電気泳動によって確認した。

以前の研究では、DN3 の CaM 結合部位に相当するペプチドと CaM の相互作用を調べたので、今回は改めて全長 DN3 と CaM の相互作用を観測した。CaM はアレイ型をした 2 ドメイン構造を有するカルシウム結合タンパク質である。CaM は、分子構造中に適度に分布した 9 個のメチオニン残基 (残基番号: 36, 51, 71, 72, 76, 109, 124, 144, および 145) を有する。これらの側鎖メチル基は、標的分子との相互作用を NMR で追跡するのによく利用される。本研究でもこの方法を採用して滴定実験を行った。結果を図 1 に示す。測定の結果を解析すると、CaM の C 末端ドメインが N 末端ドメインよりも強く DN3 と相互作用をしていることが示唆された。また、DN3 と CaM の結合は 1 : 1 で起こっていることが明

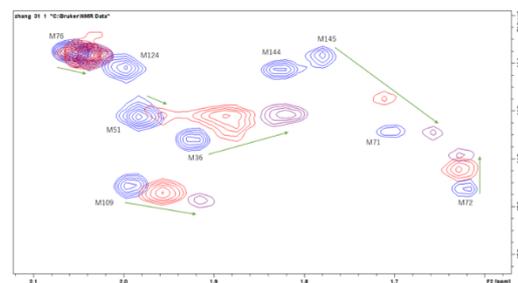


図1 CaMに対する全長DN3の滴定実験
[¹³C-Met]-CaMを¹H-¹³C HSQCでモニターした。
[DN3]/[CaM]=0 (青), 0.2 (赤), 2.0 (紫)の重ね描きを示す。

らかになった。また、N ドメインでは特に Met36, C ドメインでは Met109, Met145 のピークの変化が大きいことから、これらの残基や近傍の残基が結合に深く関与していることが推定された。

次に、安定同位体標識された DN3 の NMR 測定を行い緩和時間の測定を試みた。しかしながら、¹H-¹⁵N HSQC のピークは均一の線形ではなく、一部はブロードニングしていたりオーバーラップしたりしていたため、このスペクトルを用いて緩和時間を解析することが困難だった。従って、溶媒の水のシグナルに着目した緩和時間測定を行った。溶媒の水の横緩和時間の逆数は、自由な

水と溶質に水和した水の横緩和時間それぞれの逆数の和として表されることが合成高分子の研究などで利用されている。今回は、この関係を使って液液相分離に関する情報が得られないか検討した。しかしながら、均一に溶けている溶質とドロプレット中の溶質の2種類を仮定して、それぞれに水和した水が存在するとした場合の分配係数をどのように見積もるかという問題が残った。これは、液液相分離していない状態の試料で緩和時間を測定することから凡その割合を見積もることが出来そうであるが、小角散乱やFCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) など他の手法を併用して確認したほうがよいだろう。

次に、ドロプレットに関する情報を得るために、NMRで拡散係数の測定を行った。よく知られたように、拡散係数はストークスアインシュタインの式に従い、同じ粘度と温度の溶液環境であれば溶質であるタンパク質の形状を球体で近似したときの半径の逆数に比例することになる。ここから見かけの分子量を見積もることが出来、分子が大きければ拡散係数は小さい値を示すことがわかる。この関係性を利用して、ドロプレット形成に関する情報を得ることを試みた。まず、ヒスチジン、インシュリン、リゾチーム、カルモジュリン、ならびにキモトリプシンの個々の拡散係数を測定し、標準曲線を描いた。次に、DN3、DN3+CaM (EDTA存在下)、およびDN3+CaM (Ca²⁺存在下)の各試料の拡散係数を測定した。DN3単体の分子量(5924.6)は、インシュリンのそれ(5734)に近いのであるが、DN3の拡散係数はインシュリンのものより1桁小さかった(D = 1.7x10⁻⁶cm²/s)。これはDN3の見かけの分子量が大きいことを意味している。仮に、この値がドロプレットになっていることを反映しているのであれば、ドロプレット内部でのDN3の拡散係数とドロプレット全体としてのDN3の拡散係数、ドロプレットになっていない均一溶液状態のDN3の拡散係数の寄与が入った値になっているはずである。これ以上の解析は非常に多くの仮定を置かねばならず、このデータだけから詳細な解析をすることは困難であると予想された。しかしながら、興味深いことに、DN3+CaM (EDTA存在下)およびDN3+CaM (Ca²⁺存在下)の各試料の拡散係数を比較すると、DN3+CaM (Ca²⁺存在下)の値のほうが1桁小さいことがわかった(D = 7.8x10⁻⁷cm²/s)。この結果は、DN3がCaMと結合するとより大きなドロプレットを形成することを示しているのではないかとと思われる。

さらに、TEMによるドロプレットの観察を試みた。結果を図2に示す。既に液液相分離することが知られているリゾチームとアルブミンの系をポジティブコントロールとして採用して、DN3、CaM、およびDN3+CaM (Ca²⁺存在下)のTEM観察を行った。CaM単独ではドロプレットが観察できなかったが、DN3とDN3+CaM (Ca²⁺存在下)の試料では、およそ1μm程度のドロプレット様の球体が観測できた。これは、リゾチームとアルブミンの系で見られたドロプレットと比較して小さい。また、CaMの結合の有無に関わらずDN3が同程度の大きさのドロプレットを形成する

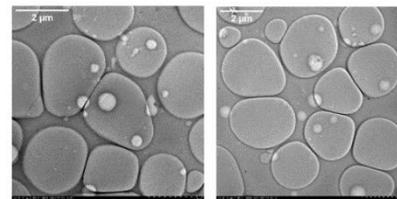


図2 TEM観察像
左：DN3 右：DN3-CaM複合体

ことは大変興味深い。これらTEM観察の結果とNMR拡散係数の結果を合わせて考えると、ドロプレット内部でのDN3分子の動きがCaM結合の有無で変化する可能性があるように見える。

最後に、プロテオミクス的な手法を用いてMSでDN3のCaM以外の標的を探索した。この結果多くの擬陽性・陽性の候補分子を得ることが出来た。引き続き解析をすすめたいと考えている。

以上、本課題で実施した研究結果を簡潔に述べた。植物病原菌のエフェクター分子のDN3が植物細胞内で液液相分離を起こす可能性を初めて示した本結果は、植物病理学における分子レベルの研究に新しい視点を持ち込んだものとして意義があると考えられる。

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 1件）

1. 著者名 N. Isozumi, Y. Masubuchi, T. Imamura, M. Mori, H. Koga, S. Ohki	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure and antimicrobial activity of NCR169, a nodule-specific cysteine-rich peptide of <i>Medicago truncatula</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89485-w	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Maiki Tamura, Eugene Hayato Morita, Shinya Ohki
2. 発表標題 Structure and dynamics of LalT2, a toxic peptide, from Japanese scorpion, <i>Liocheles australasiae</i>
3. 学会等名 60th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (NMRSJ 2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大木進野、五十榎規嘉、高野義孝
2. 発表標題 Colletotrichum Orbiculare由来のエフェクターCoDN3はCa ²⁺ 依存的にカルモジュリンと結合する天然変性タンパク質である
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十榎規嘉、大木進野
2. 発表標題 根粒特異的ペプチドNCR169の立体構造と新規機能
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第38回大会
4. 発表年 2021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	五十棲 規嘉 (Isozumi Noriyoshi) (30804512)	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・研究員 (13302)	令和3年10月31日まで。その後は他機関に移動して外 部資金雇用の研究員となったため、本研究の継続が 出来なくなった。

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
---------	---------