

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580063

研究課題名(和文) タマネギ乾腐病菌が生産するファイトトキシン様タンパク質

研究課題名(英文) Phytotoxin-like proteins produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*

研究代表者

伊藤 真一 (Ito, Shin-ichi)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：30243629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：タマネギ乾腐病菌(FOC)は、宿主植物の根に含まれる抗菌成分に遭遇すると、培養細胞に壊死を引き起こすタンパク質(NIP8およびNIP8-S)を分泌する。本研究は、FOCの病原性におけるこれらのタンパク質の役割を明らかにすることを目的とした。研究の結果、NIP8はヒドロフォビンの部分断片産物であることが判明したが、病原性との関連性はみとめられなかった。一方、NIP8-Sは、ジスルフィド結合を3か所持つ塩基性タンパク質(pI 9.4)で、組換え大腸菌で生産したNIP8-Sは宿主植物に萎ちょうを引き起こした。このことから、NIP8-SはFOCの病徴発現に關与するタンパク質と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Fusarium oxysporum f. sp. *cepae* (FOC) secretes proteins (NIP8 and NIP8-S) that can induce necrosis of the suspension-cultured host cells when the fungus is treated with antifungal compounds from the host roots. The present study was performed to clarify the roles of these proteins in the pathogenicity of FOC. NIP8 was proved to be a degraded protein fragment of hydrophobin and unrelated to the pathogenicity of FOC. NIP8-S was a basic protein (pI=9.4) of unknown function with three deduced disulfide bridges. Recombinant NIP8-S produced by *Escherichia coli* induced wilting on the host plants, suggesting that NIP8-S plays a role for causing the symptoms of Fusarium wilt.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：Fusarium oxysporum タンパク質 萎ちょう

1. 研究開始当初の背景

夏期の気温の高温化とともに、タマネギ乾腐病（北海道）およびネギ萎ちょう病（西南日本）が多発するようになった。これらの病害の原因菌は *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) であるが、FOC の病原性については不明な点が多く、遺伝子レベルでの解析はほとんど行われていない。

著者は、FOC による病害の特徴であるタマネギ（ネギ）盤茎組織の褐変壊死に注目し、FOC と宿主盤茎組織との相互作用によって FOC に何らかの代謝物生産が誘導され、その物質が盤茎に褐変壊死をひき起こしているのではないかと予想した。実際に、タマネギやネギの根に含まれているサポニン類の存在下で FOC を培養すると、FOC は 8 kDa のタンパク質 (necrosis-inducing protein 8 kDa: NIP8) を新たに分泌するようになり、NIP8 はタマネギ培養細胞に対して壊死作用を示した。

FOC はタマネギ（ネギ）の盤茎や根に含まれる抗菌性サポニンを感知し、ファイトトキシン様の NIP8 を新たに生産することによって、組織にダメージを与え、感染を有利に進めているという仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究は、FOC の病原性における NIP8 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究開始当初は、ファイトトキシン様タンパク質は NIP8 のみと考えていたが、詳細に解析した結果、電気泳動で同じ移動度を示す別のタンパク質 (NIP8-S) が存在することがわかった。しかしながら、NIP8-S は発現量が少なく、精製が困難だったため、NIP8 の解析を優先した。

(1) NIP8

NIP8 の構造決定と NIP8 遺伝子のクローン化

限外濾過、イオンクロマトグラフィー、および SDS-PAGE によって精製した NIP8 を用いて N 末端配列を決定した。このアミノ酸配列に基づいて設計した縮重プライマーを用いて RT-PCR を行い、5' および 3' RACE により NIP8 をコードしている完全 cDNA 配列を得た。また、cDNA の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いて TAIL-PCR を行い、cDNA に対応するゲノム DNA (NIP8 遺伝子) およびその隣接領域の塩基配列をクローン化した。

NIP8 遺伝子破壊株および NIP8 過剰発現株の作製

split-marker 法によって NIP8 遺伝子破壊株を得た。gpdA プロモーター配列および trpC ターミネーターを NIP8 遺伝子の上流および下流に連結したコンストラクトで FOC を形質転換し、NIP8 過剰発現株を作製した。

NIP8 遺伝子破壊株および NIP8 過剰発現株の性状および病原性

定法によって、NIP8 遺伝子破壊株および NIP8 過剰発現株の培養性状、ストレス耐性、孢子形成能、および病原性を調査した。病原性試験には、ネギおよびタマネギの幼苗を使用した。

(2) NIP8-S

NIP8-S の構造決定と NIP8-S 遺伝子のクローン化

NIP8 と同様、プロテインシーケンサーを用いて NIP8-S の N 末端アミノ酸配列を決定した。また、LC-MS/MS 解析によって NIP8-S の同定を試みた。上述の NIP8 と同様の方法で NIP8-S をコードしている遺伝子 (cDNA およびゲノム DNA) をクローン化した。

NIP8-S 遺伝子破壊株の作製

NIP8 と同様、split-marker 法によって NIP8-S 遺伝子破壊株を得た。

NIP8-S 遺伝子破壊株の性状および病原性

定法によって、NIP8-S 遺伝子破壊株の培養性状、ストレス耐性、孢子形成能、および病原性を調査した。病原性試験には、NIP8 と同様、ネギおよびタマネギの幼苗を使用した。

大腸菌による NIP8 の生産

NIP8-S のプロセッシング産物 (52 アミノ酸) を翻訳するように設計したコンストラクトを用いて、ジスルフィド結合を有するタンパク質を生産できる大腸菌を形質転換した。得られた形質転換体を用いて、NIP8-S プロセッシング産物を生産し、イオン交換およびアフィニティーカラムで目的タンパク質を精製した。

NIP8-S のプロセッシング産物 (52 アミノ酸) の生物活性

精製した NIP8-S プロセッシング産物 (52 アミノ酸) を含む滅菌水に、ネギおよびタマネギの幼苗の根部分を浸漬し、葉先の萎ちょう誘導の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) NIP8

NIP8 の構造

NIP8 遺伝子の全塩基配列解析から、NIP8 はクラス II のハイドロフォピンタンパク質の C 末端側断片 (プロセッシング産物) であることが判明した (図 1)。

NIP8 遺伝子ファミリーの発現

Fusarium oxysporum のデータベースでハイドロフォピンモチーフを有するタンパク質を検索したところ 5 つのタンパク質 (*hyd1*, *hyd3*, *hyd4*, *hyd5*, *hyd-like*) がヒットした。これらの配列に基づいて設計したプライマ

ーで増幅される DNA 断片をプローブにしたサザン解析の結果、これらの5つの遺伝子は、いずれも FOC ゲノムに単コピーで存在し、NIP8 遺伝子は *hyd4* のホモログであることが判明した。

FOC を、窒素源・炭素源、およびを窒素源・炭素源欠乏培地で培養し、各ハイドロフォピン遺伝子の発現を RT-PCR で調べたところ、*hyd1* および *hyd3* は炭素源欠乏で発現が誘導され、窒素源・炭素源欠乏でさらに強く発現が誘導された。*hyd4* と *hyd-like* は窒素源・炭素源欠乏で発現が強く誘導された。*hyd5* は、窒素源・炭素源に関係なく、常に発現していた。

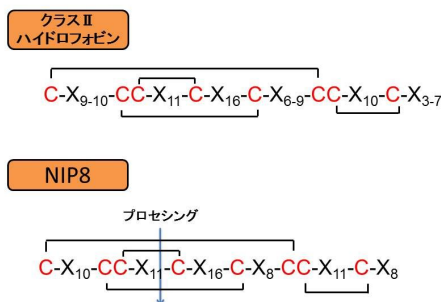


図 1. NIP8 のプロセシング

NIP8 遺伝子ファミリーの発現

Fusarium oxysporum のデータベースでハイドロフォピンモチーフを有するタンパク質を検索したところ 5 つのタンパク質 (*hyd1*, *hyd3*, *hyd4*, *hyd5*, *hyd-like*) がヒットした。これらの配列に基づいて設計したプライマーで増幅される DNA 断片をプローブにしたサザン解析の結果、これらの5つの遺伝子は、いずれも FOC ゲノムに単コピーで存在し、NIP8 遺伝子は *hyd4* のホモログであることが判明した。

FOC を、窒素源・炭素源、およびを窒素源・炭素源欠乏培地で培養し、各ハイドロフォピン遺伝子の発現を RT-PCR で調べたところ、*hyd1* および *hyd3* は炭素源欠乏で発現が誘導され、窒素源・炭素源欠乏でさらに強く発現が誘導された。*hyd4* と *hyd-like* は窒素源・炭素源欠乏で発現が強く誘導された。*hyd5* は、窒素源・炭素源に関係なく、常に発現していた。

FOC のハイドロフォピン (*hyd*) 遺伝子破壊株の性状

FOC が有する 5 つの *hyd* 遺伝子について、シングルノックアウト、ダブルノックアウト、およびトリプルノックアウト変異株を作製し、培養性状、ストレス耐性、孢子形成能、および病原性を調査した。その結果、いずれの変異株も、野生株の性状と有意な差を示さなかった。NIP8 過剰発現株については、気中

菌糸が旺盛で、ヒ素耐性が増大したが、病原性を含め野生株との差異は認められなかった。

ハイドロフォピンは、酵母以外の子う菌および担子菌の細胞壁に局在する低分子タンパク質で、ニレ立枯れ病菌のハイドロフォピンについては病原性への関与が示唆されている。しかしながら、本研究の結果から、FOC のハイドロフォピンは病原性に関与しないことが示唆された。

(2) NIP8-S

NIP8-S の構造

LC-MS/MS 解析の結果、NIP8-S の質量はデータベースに存在する *F. oxysporum* の推定タンパク質 FOXB_07839 と一致することがわかった。

FOXB_07839 の塩基配列に基づいてプライマーを設計し、FOC の FOXB_07839 ホモログ遺伝子をクローン化して塩基配列を決定した。本遺伝子は、イントロンがなく、アミノ酸配列は FOXB_07839 と 100% の相同性を示した。NIP8-S の全長は 85 アミノ酸で、NIP8 と同様、N 末端側がプロセシングで除去されていた。生物活性 (ファイトトキシン様活性) を有するタンパク質断片は C 末端側の 52 アミノ酸残基と考えられた (図 2)。

この 52 アミノ酸からなるタンパク質の pI は 9.39、分子量は 6088.10Da と予測された。アミノ酸組成に非常に偏りがあり、ヒスチジンを 9 残基、リジンを 13 残基含んでいた。また、システインを 6 残基含んでおり、ジスルフィド結合が 3 か所存在すると推定された。タンパク質の二次構造を予測した結果、ヘリックス構造が 3 か所、シート構造が 1 ヶ所存在することが推定された (図 3)。

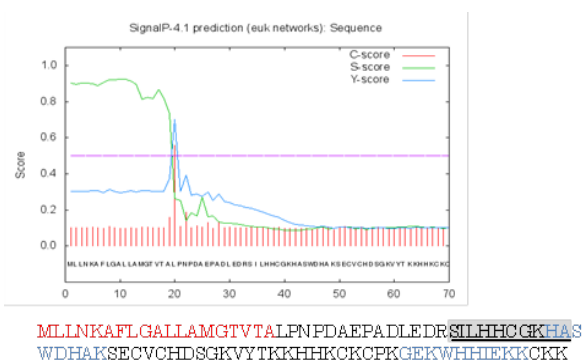


図 2. NIP8-S のアミノ酸配列

赤文字は SignalP による推定シグナル配列。青文字は LC-MS/MS 解析で得られたペプチド断片。下線 (SILHHCCKHAKS) はプロセシング後の N 末端 (プロテインシーケンサーによって決定したアミノ酸)。



図3. NIP8-Sの推定二次構造

NIP8-S遺伝子の発現

ネギ幼苗にFOCを接種し、接種後4および8日後に根からRNAを抽出し、RT-PCRによってNIP8-S遺伝子の発現を調べた。その結果、NIP8-S遺伝子は接種後4日以降に発現していたが、発現量は他の遺伝子に比べてかなり少ないことが示唆された。

NIP8-S遺伝子破壊株の病原性

ネギから分離したFOC (AF22, AF91)およびタマネギから分離したFOC (TA)の計3株を用いてそれぞれの株のNIP8-S遺伝子破壊株を作製した。各遺伝子破壊株のネギ幼苗に対する病原性を調べた結果、病原性の低下傾向が見られたが、野生株との有意な差はみとめられなかった。

NIP8-Sプロセッシング産物の生物活性

遺伝子組換え大腸菌で生産したNIP8-Sプロセッシング産物(52アミノ酸)のネギおよびタマネギ幼苗に対する活性を調べた結果、萎ちょう症状を誘導することがわかった(図4)。

本結果および上述(2)の結果から、NIP8-SはFOCの病原性を決定している因子ではないが、病徴(萎ちょう症状)の発現に関与する因子であることが強く示唆された。

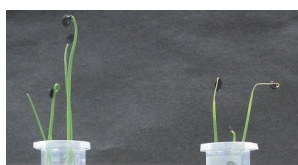


図4. NIP8-Sプロセッシング産物によって引き起こされたネギ幼苗の萎ちょう症状
左：対照区、右：NIP8-Sプロセッシング産物(52アミノ酸)処理区

(3)研究成果の位置づけ、インパクト、および今後の展望

本研究により、NIP8-Sの52アミノ酸プロセッシング産物(52アミノ酸)がネギおよびタマネギの幼苗に萎ちょう症状を引き起こすことがわかった。FOCを含めて、*Fusarium oxysporum*がこのようなファイトトキシン様の低分子量タンパク質を生産する例は知られておらず、本研究が世界で初めて明らかにした。また、データベースのタンパク質(FOX_B_07839)は推定タンパク質としてデータベースに存在していたが、その実体についてはまったく不明であった。本研究によって、FOX_B_07839の性状および生物活性が明らかになった。

NIP8-Sのように、完全型のタンパク質がプロセスされることによって生物活性を示すようになるタンパク質として、*Fusarium tricinctum*の抗菌タンパク質Trtesinが知られている。NIP8-SとTrtesinには部分的な相同性がみとめられることから、今後NIP8-Sの抗菌活性についても調べる必要がある。また、NIP8-Sおよびtrtesinは*Fusarium*属菌以外にはホモログがまったく見当たらないことから、これらは*Fusarium*属菌に特異的な新規タンパク質ファミリーの可能性がある。

本研究から、NIP8およびNIP8-Sは、宿主の防御物質(サポニン)によって誘導生産・分泌され、その後プロセッシングされた後に安定して存在・機能するタンパク質であることが明らかになった。植物病原菌において、このようなタンパク質の存在および機能についてはほとんど知られていない。本研究で明らかにした「プロセッシング後に安定して存在する分泌タンパク質」は、*Fusarium*属菌を含む土壌伝染病菌の感染・発病プロセスにおいて重要な役割を果たしている可能性がある。今後、これらのタンパク質の機能を調べることによって、土壌伝染病菌の感染・発病メカニズムの解明が大きく進むことが期待される。本研究の成果は、土壌伝染病の研究における新たな方向性を示したと言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1件)

佐々木一紀・田中秀平・伊藤真一：*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* ハイドロフォビンの構造．日本植物病理学会大会．2012年3月29日、福岡国際会議場(福岡市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 真一 (ITO, Shin-ichi)
山口大学・農学部・教授

研究者番号：30243629

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：