

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450204

研究課題名(和文) カバノアナタケ菌に感染したシラカンバ幼植物体に生成する特異的タンパク質の画像解析

研究課題名(英文) Image analysis of infection-specific proteins formed in the Japanese birch plantlet infected with *Inonotus obliquus*

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌腫病菌カバノアナタケ10-U1株に感染した、3ヶ月生シラカンバ幼植物体No.8に発現する、菌感染特異的タンパク質及びフェノール性化合物の組織内分布を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化・飛行時間型質量分析法イメージング解析法を用いて検討した。その結果、菌感染特異的ペルオキシダーゼが、横断面切片の木部全体に分布していることが判明した。また、フェノール性化合物として縮合型タンニンが、菌接種部付近に生成していることが示唆された。更に、細胞骨格タンパク質の一種であるアクチン繊維が、菌接種部付近に局在していることが明らかになった。また、新たに12種類の菌感染特異的タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, distribution of fungal-infection-specific proteins and phenolic compounds, which were produced in 3-month-old Japanese birch plantlet No.8 infected with a canker-rot fungus *Inonotus obliquus* strain 10-U1, were investigated using matrix-assisted laser desorption/ionization/time-of-flight mass spectrometry imaging analysis. As the results, fungal-infection-specific peroxidase was found to be distributed in the whole xylem part of the cross section. In addition, the production of condensed tannin was suggested as the phenolic compound in the vicinity of the fungus-inoculated part. Moreover, actin filament bundles, one of the cytoskeleton proteins, were located nearby the fungus-inoculated part. Furthermore, 12 fungal-infection-specific proteins were newly identified.

研究分野：森林化学

キーワード：シラカンバ カバノアナタケ 菌感染特異的タンパク質 MALDI/TOF/MSイメージング 樹病

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 質量分析計を用いたマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) イメージングは、現在まで、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を対象とし、これらの物質の組織及び細胞における局在・分布を画像解析するために世界中で使用されてきている。一方、植物において、穀物、モデル植物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かった。

(2) これまで研究代表者が行って来た研究において、カンパ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 POX が感染後 2 時間で既に検出され、時間経過と共にその活性が強まり、活性分布域も拡大することを見出した。また、菌感染特異的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域も時間経過と共に強くなり、拡大することを見出した。また、別の研究において、菌感染した幼植物体内に、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た。これらのタンパク質は、オキシダティブバースト及び全身獲得抵抗性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内で生じていることを解明した。

## 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、菌感染特異的タンパク質及び PHE について、MALDI イメージング質量分析法を用いて画像解析を行う。また、未同定の菌感染特異的タンパク質を、シークエンスタグ法を用いて同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 無菌シラカンバ・クローン幼植物体 No.8 の腋芽を、Murashige & Skoog 培地に 2% ショ糖、2.5 $\mu$ M インドール酪酸、0.1 $\mu$ M ナフタレン酢酸及び 1% 寒天を添加した培地で培養し、3 ヶ月生の幼植物体を大量に育成した。得られた幼植物体は、3 ヶ月毎に同組成の培地で腋芽培養により、継代・増殖させた。また、3 ヶ月生の幼植物体を更に 3 ヶ月間培養し、6 ヶ月生の植物体を調製した。

(2) 6 ヶ月生の植物体苗長の 1/5 の基部付近に傷を付け、ここにカバノアナタケ IO-U1 株の菌系体を接種した (T)。対照として、無傷・無菌 (C1) 及び有傷 (C2) の植物体も用意した。各処理後、植物体を 2, 10, 30 日間培養し、各植物体を収集して処理部を採取した。これに POX 活性染色、または PHE 呈色反応を施し、横断面切片を作成後、光学顕微鏡で観察した。

(3) 3 ヶ月生の幼植物体 (処理部は茎頂か

ら 3 番目の節間) 及び 6 ヶ月生の植物体について、それぞれ T, C1, C2 の植物体を調製し、2, 10, 30 日間培養した。培養後、植物体を収集し、処理部を採取した。採取試料を液体窒素で急速凍結し、横断面切片を作成した。得られた切片を用いて、菌感染特異的 POX の MALDI/TOF/MS により得られたマススペクトルピークを基に、MALDI/TOF/MS イメージング解析を行った。

(4) 3 ヶ月生の幼植物体について T, C1, C2 の植物体を調製し、2, 10, 30 日間培養した。培養後、植物体を収集し、処理部を採取した。採取試料部から横断面切片を作成し、これにマトリックス試薬 (2,5-DHB 及びセシウム塩) をスプレーした。一晚乾燥後、この切片を MALDI/TOF/MS により分析し、PHE の定性分析及び分布解析を行った。

(5) (4) と同様に横断面及び縦断面切片を作成し、これを Rhodamine Phalloidin で染色した。染色した切片を蛍光顕微鏡で観察し、アクチン繊維の局在を調べた。

(6) 3 ヶ月生の幼植物体について T, C1, C2 の植物体を調製し、2 日間培養した。培養後、幼植物体を収集し、液体窒素で急速凍結後、タンパク質を抽出した。タンパク質サンプルを二次元電気泳動にかけ、CBB で染色後、画像解析により菌感染特異的タンパク質を検出した。別の CBB 染色した泳動ゲルから菌感染特異的タンパク質を切り出し、トリプシンでゲル内消化後、得られたペプチドサンプルを液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法により分析した。得られたデータをデータベース検索にかけ、菌感染特異的タンパク質を同定した。

## 4. 研究成果

(1) 6 ヶ月生の植物体における POX 及び PHE に関する組織化学的観察

培養 2 日後の横断面切片において、POX 活性及び PHE の堆積が、菌接種部位付近で観察された。また、道管内腔や放射柔細胞などの木部でも同様に観察された。培養 10 日後及び 30 日後の切片において、培養日数の増加と共に、POX 活性及び PHE の堆積とも木部の他の部分に拡大して行った。

3 ヶ月生の幼植物体の場合と比較して、6 ヶ月生の植物体では、より発達した菌に対する防御応答 (POX 活性及び PHE の堆積) を示すことが明らかになった。

(2) 3 ヶ月生及び 6 ヶ月生の植物体の横断面切片における POX 活性の分布

3 ヶ月生及び 6 ヶ月生の植物体から得られたタンパク質サンプルの POX アイソザイム分析により、酸性 POX (pI5.6, 5.9) 及び塩基性 POX (pI8.6, 9.1) が、菌感染特異的 POX であることが判明した。これらの POX アイソザイムの MALDI/TOF/MS 分析により、アイソザイムに特徴的なマススペクトルピークを得た。これらのマススペクトルを基に、MALDI/TOF/MS イメージング解析を行った。そ

の結果、各横断面切片における各菌感染特異的 POX アイソザイムに由来すると思われるシグナルは、3 ヶ月生及び 6 ヶ月生の植物体の横断面切片の両方において、木部全体で検出された。しかしながら、組織化学的染色によって観察された、菌感染特異的 POX の局在化は認められなかった。

#### (3) PHE の定性分析及び分布解析

T の横断面切片の MALDI/TOF/MS 分析により、菌接種部位付近で得られたマススペクトルは、縮合型タンニンのもので非常に良く類似していた。また、マススペクトルの解析結果を合わせて考えると、この局在が認められた物質は、エピカテキンの 4 量体から成る縮合型タンニンである可能性が示唆された。更に、この物質の局在が認められた部位は、これまでに組織化学的観察によって認められた、PHE の堆積部位と類似していた。

#### (4) アクチン繊維の蛍光顕微鏡観察

培養 2 日及び 10 日後の T の横断面切片において、菌接種部位の皮層及び師部から広範囲の木部において、アクチン繊維が観察された。また、培養 30 日後の横断面切片では、木部及びカルス外周部で顕著なアクチン繊維の局在が観察された。一方、培養 2 日後の縦断面切片においては、師部、菌接種部位及び木部において、軸方向にアクチン繊維の局在が観察された。また、培養 30 日後では、カルス外周部でアクチン繊維の局在が認められた。

これまでに、草本植物において病原菌に対するアクチン繊維の防御応答が報告されている。これと同様に、木本植物であるシラカンバ幼植物体 No.8 においても、カバノアナタケ 10-U1 株への防御応答の一つとして、アクチン繊維が関与することが示唆された。

#### (5) 未同定の菌感染特異的タンパク質の同定

T の二次元電気泳動ゲルを、C1 及び C2 のものと比較しながら画像解析した結果、12 個の菌感染特異的タンパク質スポットが検出された。これらのタンパク質を LC/MS/MS 分析後、データベース検索した結果、10 種類のタンパク質(Cell division control protein 48 homolog A, Heat shock 70kDa protein, NADP-Isocitrate dehydrogenase, Ferredoxin-NADP reductase, Omega-amidase, Proteasome subunit beta type-6, Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein, Temperature-induced lipocalin-1, Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, Ribulose biphosphate carboxylase small chain) が同定された。これらのタンパク質は、エネルギー生産、タンパク質合成、タンパク質分解、タンパク質修復、有害因子の減少、及び代謝に関与するものである。従って、これらのタンパク質が、シラカンバ幼植物体 No.8 における、カバノアナタケ 10-U1 株に対する病害抵抗性に関与していることが示唆された。

## 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)

[雑誌論文](計 1 件)

Suzuki H., Takashima Y., Ishiguri F., Yoshizawa N., Yokota S., "Proteomic analysis of responsive proteins induced in Japanese birch plantlet treated with salicylic acid", *proteomes*, 2, 323-340 (2014)

[学会発表](計 9 件)

宮内優、吉永新、上高原浩、石栗太、飯塚和也、横田信三、カバノアナタケ菌 10-U1 株に感染したシラカンバ幼植物体 No.8 に発現するペルオキシダーゼの MALDI/TOF/MS イメージング、第 58 回リグニン討論会、2013 年 11 月 12 日、サンポートホール高松

宮内優、吉永新、上高原浩、高島有哉、石栗太、飯塚和也、横田信三、カバノアナタケ菌 10-U1 株に感染した 6 ヶ月生シラカンバ幼植物体 No.8 に発現するペルオキシダーゼの組織内分布、第 64 回日本木材学会大会、2014 年 3 月 14 日、愛媛県民文化会館

宮内優、吉永新、上高原浩、高島有哉、石栗太、飯塚和也、横田信三、カバノアナタケ菌 10-U1 株に感染したシラカンバ幼植物体 No.8 におけるフェノール性物質の堆積およびペルオキシダーゼ活性の組織観察、平成 26 年度日本植物病理学会大会、2014 年 6 月 3 日、札幌コンベンションセンター

Ichikawa T., Ishiguri F., Iizuka K., Yokota S., Proteomic analysis of the specific proteins produced in each organ of Japanese birch plantlet treated with azelaic acid, XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2014 年 7 月 6 日~10 日、ロードス島、ギリシャ

宮内優、吉永新、上高原浩、石栗太、飯塚和也、横田信三、カバノアナタケ菌 10-U1 株に感染したシラカンバ幼植物体 No.8 に発現するペルオキシダーゼ活性およびフェノール性化合物の組織化学的観察、第 32 回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会・シンポジウム、2014 年 8 月 22 日、いわて県情報交流センター

Miyauchi Y., Yoshinaga A., Kamitakahara H., Ishiguri F., Iizuka K., Yokota S., Distribution of the specific phenolics produced in the tissue of Japanese birch plant infected with a canker-rot fungus *Inonotus obliquus*, XXVIIth International Conference on Polyphenols & 8<sup>th</sup> Tannin Conference,

2014年9月2日～6日、名古屋大学  
Ichikawa T., Ishiguri F., Iizuka K.,  
Yokota S., Identification of  
specific proteins produced in each  
organ of Japanese birch plantlet  
treated with azelaic acid,  
International Symposium on Wood  
Science and Technology 2015, 2015年3  
月15日～17日、タワーホール船堀、東  
京

福田慎一郎、相蘇春菜、上高原浩、吉永  
新、大島潤一、石栗太、飯塚和也、横田  
信三、カバノアナタケ菌 10-U1 株に感染  
したシラカンバ幼植物体 No.8 における  
フェノール性化合物及びアクチン繊維の  
組織内分布、第33回日本植物細胞分子生  
物学会(東京)大会・シンポジウム、2015  
年8月11日、東京大学農学部キャンパス  
飯塚早紀、大島潤一、石栗太、横田信三、  
カバノアナタケ菌 10-U1 株に感染したシ  
ラカンバ幼植物体 No.8 に生成する菌感  
染特異的タンパク質の同定及び発現量解  
析、第66回日本木材学会大会、2016年3  
月28日、名古屋大学

〔図書〕(計 1件)

Suzuki H., Takashima Y., Ishiguri F.,  
Yoshizawa N., Yokota S., “Proteomic  
analysis of responsive proteins induced in  
Japanese birch plantlet treated with  
salicylic acid”, In Komatsu S. & Hossain Z.  
eds. Plant Proteomics, MDPI, Basel,  
Beijing, Wuhan, pp. 140-157 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

特になし。

## 6. 研究組織

### (1)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

### (2)研究分担者

上高原 浩 (KAMITAKAHARA HIROSHI)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10293911

吉永 新 (YOSHINAGA ARATA)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60273489