

令和元年5月29日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07619

研究課題名(和文) シンクロトロン放射光による病原性および非病原性ポリガラクトナーゼの立体構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of pathogenic and nonpathogenic polygalacturonases by synchrotron radiation

研究代表者

中村 正幸 (Nakamura, Masayuki)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：90404475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カンキツ類に感染する白かび病菌には、病原性株と非病原性株が存在する。本菌の病原性因子は、ペクチン分解酵素の一種であるポリガラクトナーゼ(PG)であるが、非病原性株にもPGは存在する。病原性株由来S31PG1に病原性が有るものの、非病原性株由来S63PG1には無い。そこで本研究では、PGの病原性を決定している原因を立体構造学的に解析した。その結果、PGが病原性を発揮するためには、基質結合部位であるクレフト構造がある決まった特定の構造をしているわけではなく、クレフト全体で、基質であるプロトペクチンに結合できるよう柔軟に適合しており、偶然に生まれた構造が病原性につながっていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、植物病原菌の保持するペクチン分解酵素のポリガラクトナーゼ(PG)は、病原微生物だけでなく、有用微生物や植物自体にも存在していたことから、PGと病原性との関わりについては、不明な点が多かった。しかし、本研究により、PGが病原性を獲得する場合の原因は、基質結合部位の溝(クレフト)が、植物組織内に存在している高分子ペクチンに対し、ある特定の共通した構造で対応している訳ではなく、構造の異なるペクチンそれぞれに対し、クレフト全体で奇跡的に偶然対応していることが明らかとなった。以上の結果は、学術上意義が高いだけでなく、新たな病害防除の確立にもつながる基礎的成果となった。

研究成果の概要(英文)：Geotrichum candidum causes soft rot which is an important cause of postharvest losses of citrus fruits in the world. There are both pathogenic and nonpathogenic isolates in the fungus. A polygalacturonase (PG), one of pectic enzymes, from the pathogenic isolates is a key factor to pathogenicity. However, the nonpathogenic isolates also have PGs. In this research, the pathogenesis of PGs was analyzed structurally using S31PG1 from the pathogenic isolate and S63PG1 from the nonpathogenic isolate. As a result, the structure of their active site clefts is crucial to pathogenicity and the specificity of the cleft structure to pathogenicity is not determined in a certain region but dictated by the whole region of the cleft. These results suggest that the cleft structure involved in pathogenicity was likely created accidentally, leading to the ability to act on complex substrates for pathogenesis, and the difference between the pathogenic and the nonpathogenic isolates of the fungus.

研究分野：植物病理学

キーワード：ポリガラクトナーゼ 病原性 立体構造 糸状菌 ペクチン プロトペクチナーゼ

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物病原糸状菌の病原性因子には、侵入器官形成因子、宿主特異的毒素、植物抵抗性打破のためのエフェクターなどが挙げられるが、植物細胞壁分解酵素に関しては、病原性に関与しているとする報告がある一方で、関与していないとする報告もあり、病原性との関わりを論ずる場合は考慮する必要があった。特に、ペクチン分解酵素の一種であるポリガラクトナーゼ(PG)は、植物病原微生物だけでなく、有用微生物や植物自体にも存在しており、PGと病原性との関わりについては、不明な点が残されていた。

本研究で扱う白かび病菌には、カンキツに病原性を示す株と病原性を示さない株が存在し、その病原性の違いを生み出しているものは PG であるということを筆者は明らかにしていた。病原性株由来 PG (S31PG1)は、レモン果実に対し高い病原性を示す一方で、非病原性株由来 PG (S63PG1)は、レモン果実に対し全く病原性を示さなかった。つまり、これらの両 PG は、PG が病原性を獲得する原因を探るための理想的なサンプルであった。

2. 研究の目的

ペクチンの主成分であるポリガラクトン酸を分解可能な PG の中には病原性を示すものと、示さないものが存在している。有用微生物や植物が PG を保持していても病害が起らないのは、それらが持つ PG には、病原性が無いことを意味している。そこで、何が PG の病原性を左右しているのかを明にするため、病原性 S31PG1 および非病原性 S63PG1 を用い立体構造学的に解析することが目的である。

3. 研究の方法

まず、異種微生物(*Escherichia coli*, *Brevibacillus choshinensis*, *Pichia pastoris*)を用い、各 PG の大量発現系の構築を行った。次に、発現 PG を用い、酵素活性の性状解析を行った。また、立体構造解析に向けた結晶化、さらに S31PG1 および S63PG1 を用いたキメラタンパク質も構築し、病原性発現メカニズムの解析を行った。

4. 研究成果

(1) PG 大量発現系の構築

原核生物である *E. coli* および *B. choshinensis* では、可溶化タンパク質の発現が認められなかったため、真核生物であるメタノール資化酵母の *P. pastoris* を用いたところ、PG の大量発現系の構築に成功した(図 1)。

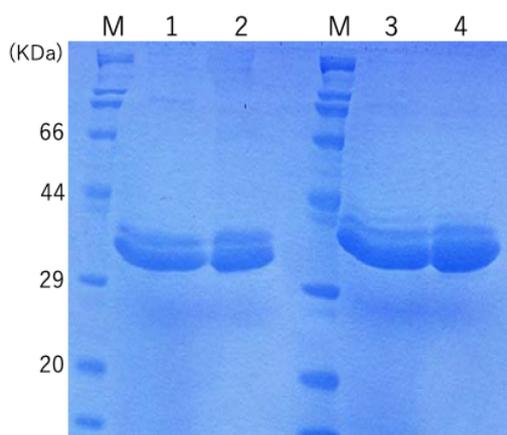


図 1 *Pichia pastoris* により発現させた PG の SDS-PAGE 解析. M, マーカー; レーン 1, 3, S31PG1; レーン 2, 4, S63PG1. 右側は培養液, 左側は His タグ精製.

(2) 発現 PG の性状解析

P. pastoris より分泌発現させた各 PG を His タグ精製し、ポリガラクトン酸に対する PG 活性(図 2, 3)と植物組織内に存在している不溶化ペクチンであるプロトペクチンに対するプロトペクチナーゼ(PP)活性を調べた(図 4)。その結果、病原性を示さない S63PG1 が、病原性を示す S31PG1 よりも非常に高い PG 活性を示すことが分かった。一方、病原性を左右する PP 活性に関しては、これまで明らかになっていたように、S63PG1 には全く活性がなく、S31PG1 に非常に高い活性が認められた。以上の結果は、PG 活性がどれだけ高くとも、PP 活性が無ければ病原性は発揮されないことを強く示している。つまり、有用微生物や植物が保持している PG には、PP 活性が無い、もしくは低いことが推察される。

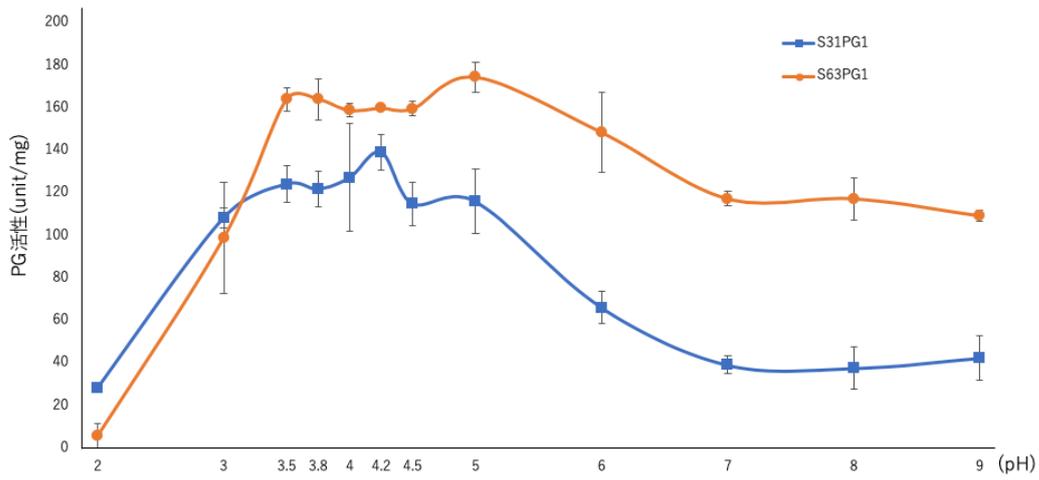


図2 各 pH における PG 活性.

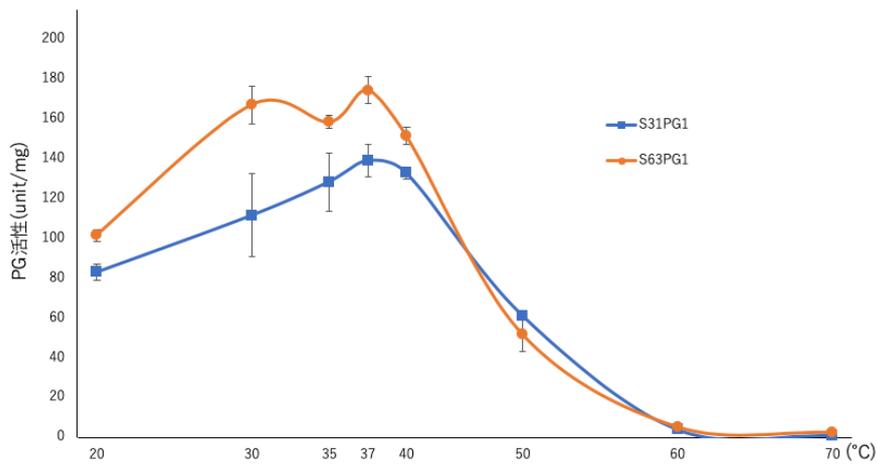


図3 各温度における PG 活性.

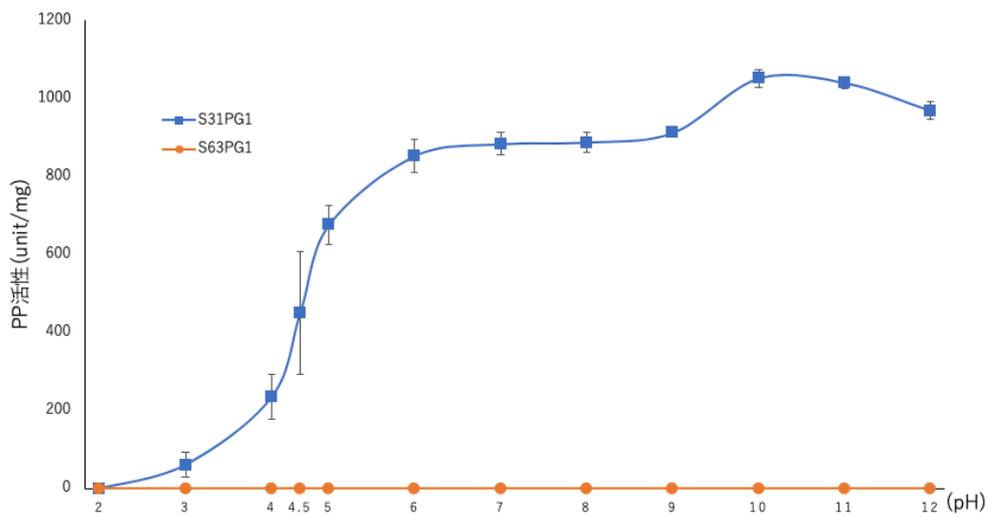


図4 各 pH における PP 活性.

(3)c-myc タグ付き PG の性状解析

P. pastoris に用いる発現用ベクター pPICZ α B には元々ウエスタン解析用に c-myc エピトープが付加されている。上記(2)の実験では、余計な配列を付けないう、c-myc を付加せずに PG を発現させ使用した。しかし、c-myc を付加した PG も作成していたため、実験に用いてみたところ、c-myc が付加されたことで両 PG の PG 活性は低下したものの(図 5)、非常に興味深いことに PP 活性を保持していなかった S63PG1 に PP 活性が生じる現象が確認された(図 6)。これはおそらく、S63PG1 の C 末端側に 10 個のアミノ酸が付加されたことにより、立体構造に変化が生じ、PP 活性を獲得したものと考えられた。つまり、PG の C 末端側に PP 活性に重要な領域が存在していることが示唆された。

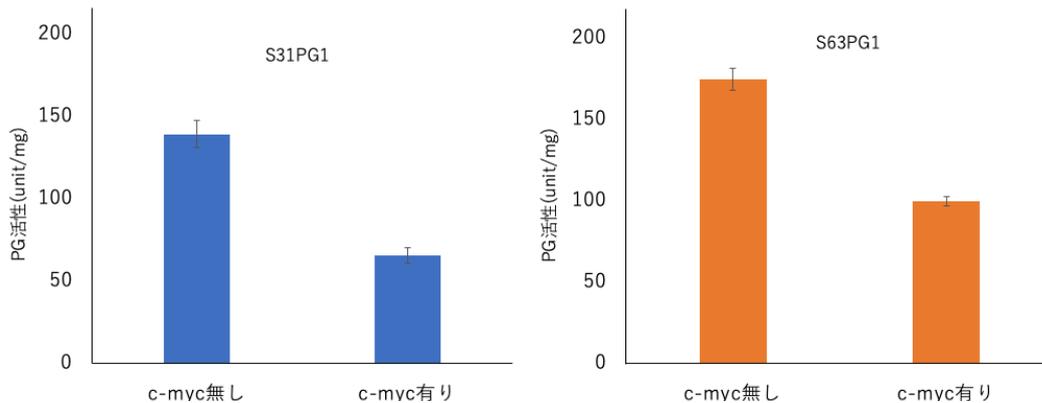


図 5 c-myc 付き PG の PG 活性

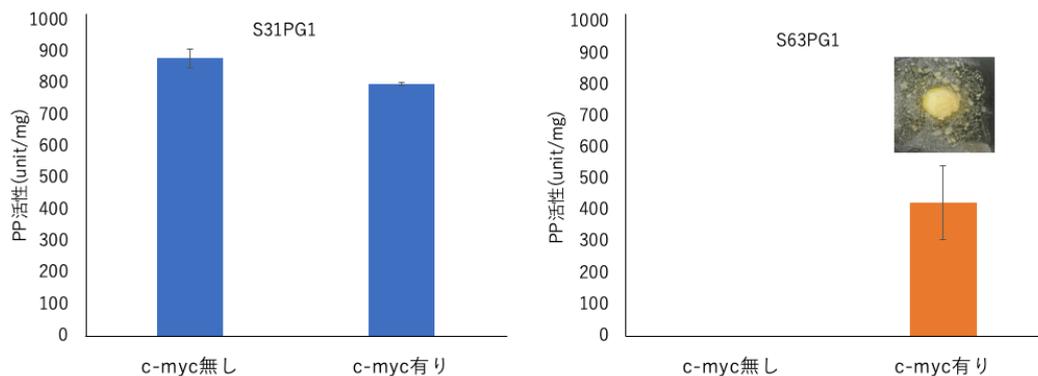


図 6 c-myc 付き PG の PP 活性

(4)PG キメラタンパク質の作出

上記結果から、PG の C 末端側に PP 活性(病原性)を左右する領域が存在していることが示唆されたため、病原性 S31PG1 と非病原性 S63PG1 を用い、それぞれの N 末端側と C 末端側を入れ替えたキメラタンパク質を作出し、PP 活性への影響を調査した(図 7)。その結果、驚いたことに予想に反し、N 末端側に PP 活性に重要な領域がある結果となった。予想としては、S63PG1 の C 末端側半分を S31PG1 の C 末端に入れ替えた場合、PP 活性が生じると思っていたが、それとは全く逆に、N 末端側半分が S31PG1 で、C 末端側半分が S63PG1 である場合に PP 活性が生じ、N 末端側が S63PG1 で、C 末端側が S31PG1 の場合は、PP 活性が認められない結果となった。c-myc 付き PG の結果とキメラ PG の結果を合わせて考えると、PG が PP 活性(病原性)を発揮するためには、ある特定の共通した構造が存在するわけではなく、N 末端側と C 末端側に広がっている基質結合部位(クレフト)の構造が、N 末端側から C 末端側までの全体を使って、基質であるプロトペクチンに対する結合に、あらゆる構造パターンで対応しているものと考えられた。すなわち、S31PG1 にとって、確かに N 末端領域が重要であると言えるが、N 末端側が S63PG1 の構造であっても、C 末端側の構造の変化により、プロトペクチンに結合できる構造に対応できるということである。

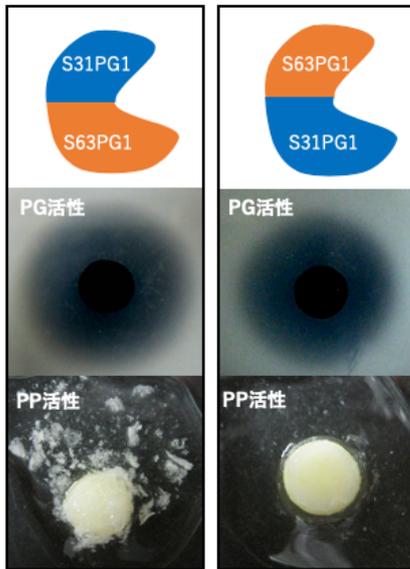


図7 キメラ PG における PP 活性

言い換えると、S31PG1 の C 末端側を S63PG1 の C 末端とは異なる構造のもので置き換えた場合、PP 活性が消失する可能性もあるということである。これらのことを考えると、S31PG1 の病原性獲得は、進化の過程で偶然生み出された PG のクレフト構造がもたらしたものであり、その後、生きていく上で重要な因子になっていったと考えられる。(5)シンクロトロン光による構造解析に向けた PG タンパク質の結晶化

P. pastoris で発現させた各 PG を His タグ精製し濃縮後、蒸気拡散法の 1 つであるシッティングドロップ法により結晶化を試みた。その結果、S31PG1 に関しては、結晶化に成功し(図 8)、現在シンクロトロン光による構造解析を進めている。一方、S63PG1 は、蒸気拡散法では得られる結晶が小さかったため、現在マクロシーディング法によるさらなる結晶の成長を進めている。

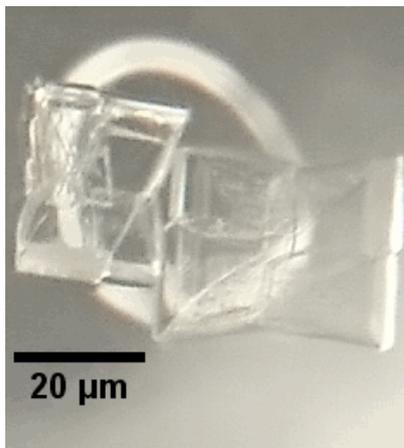


図8 S31PG1 タンパク質の結晶化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakamura M, Iwai H. Functions and mechanisms: polygalacturonases from plant pathogenic fungi as pathogenicity and virulence factors. (2019) *Journal of General Plant Pathology* 85: (In press) (査読有り)

〔学会発表〕(計 1 件)

上田智也・中村正幸・岩井 久. 白かび病菌由来ポリガラクトナーゼの異種タンパク質高発現系の構築. (2018 年 2 月 1 日) 九州病害虫研究会 熊本ユウベルホテル

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：藤田 清貴

ローマ字氏名：Fujita Kiyotaka

研究協力者氏名：南 雄二

ローマ字氏名 : Minami Yuji

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。