

平成21年 5月22日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19780037  
 研究課題名（和文） 白かび病菌由来ポリガラクトナーゼのキメラタンパク作出による病原性決定構造の解明  
 研究課題名（英文） A study on pathogenicity-determining structures of polygalacturonases from *Geotrichum candidum* by using chimera proteins.

研究代表者  
 中村 正幸（NAKAMURA MASAYUKI）  
 鹿児島大学・農学部・助教  
 研究者番号：90404475

研究成果の概要：カンキツ果実に病気を引き起こす白かび病菌(*Geotrichum candidum*)には、病気を起こさない非病原性株が存在する。この病原性の違いに、植物細胞壁分解酵素の1種であるポリガラクトナーゼ(PG)のプロトペクチナーゼ活性(自然界で植物組織内に存在している不溶性ペクチンを分解する活性)が関わっていることを明らかにした。これまで、PGが病原性に関わっているかどうか不明な点が多く、論争が起きていたが、それを解決する大きな糸口となった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	1,700,000	240,000	1,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：ポリガラクトナーゼ・プロトペクチナーゼ・白かび病菌・病原性

## 1. 研究開始当初の背景

植物病原菌の病原性には、いくつかの因子が知られている。その中で、細胞壁分解酵素に関しては、病原性との関わりにおいて不明な点が残されていた。事実、細胞壁分解酵素は、多くの植物病原菌に存在するが、非病原微生物や植物自体にも存在し、どのように細胞壁分解酵素が病原性に関わっているのか明らかになっていなかった。また、これまで報告された論文においても、細胞壁分解酵素が病原性に関与しているとする報告のある

一方で、関与していないとするものもあり、論争が起きていた。

## 2. 研究の目的

白かび病菌(*Geotrichum candidum*)は、主にカンキツ果実に腐敗症状を示す、貯蔵病害の重要病原体である。一方、本菌には、病原性を示さない非病原性株も存在している。しかしながら、両菌は、病原性の有無に拘わらず、細胞壁分解酵素の1種であるポリガラクトナーゼ(PG)をいずれも分泌する。背景に

も記したように、このような事実から、細胞壁分解酵素は、病原性に関係ないように思われるが、これまでの研究で、病原性由来のPGは、病原性に関与していることが明らかになっている、そこで、本研究では、非病原性株由来のPGも用い、なぜ、同じ酵素でありながら、病原性の有無に影響しているのかを分子レベルで明らかにすることが目的である。

### 3. 研究の方法

これまでに、*G. candidum* の病原性株 S31 および非病原性株 S63 より単離された各 PG 遺伝子 (*S31pg1*, *S63pg1*) を基に発現ベクターを構築し、分裂酵母で PG タンパクを発現させる。キメラタンパクは、各 PG の予測立体構造の比較から、異なっている部位を組み換えたものを作成し、酵母で発現させ、病原性および酵素活性の変化を調査する。

### 4. 研究成果

#### (1) 非病原性株 S63 由来 S63PG1 の酵母を用いた外分泌発現系の確立

これまで、病原性株 S31 由来 S31PG1 の外分泌発現系は確立されていたが、非病原性株 S63 由来 S63PG1 の発現系は、未だ確立されていなかった。そこで、まず、S63PG1 発現のためのベクター構築を行った(図1)。その結果、S63PG1 のシグナルペプチドが、分裂酵母 *Shizosaccharomyces pombe* に認識されないことが分かったため、すでに発現に成功している S31PG1 のシグナルペプチドと置換することにより発現に成功した。さらにプロモーターも PCMV のプロモーターに換え、高発現に成功した。*S. pombe* に認識されるシグナルペプチドは、これまでネイティブのものでもあまり知られておらず<sup>1)</sup>、今回の実験で、S31PG1 由来のシグナルペプチドが、*S. pombe* 内で良く働くことから、*S. pombe* を用いた外分泌発現系に有効に使えることを示した。

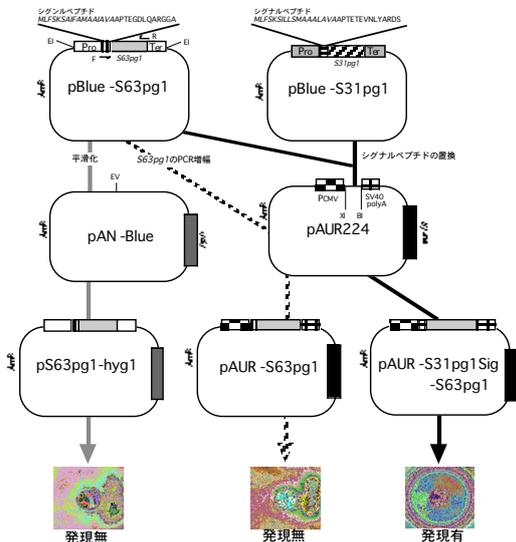


図1 S63PG1 の発現ベクター構築.

#### (2) 発現 S63PG1 の PG およびプロトペクチナーゼ (PP) 活性

外分泌発現系で得られた S63PG1 の PG および PP 活性を測定するため、PG 活性を Milner-Avigad 法<sup>2)</sup>で、PP 活性をカルバゾール・硫酸法<sup>3)</sup>でそれぞれ行った。その結果、発現 S63PG1 は、高い PG 活性を示したが、PP 活性は、全く示さなかった(表1)。

表1 発現S63PG1およびS31PG1のPGおよびPP活性測定

発現 PG	PG 活性 (units/ml)*	PP 活性 (units/ml) †
S63PG1	13.16 ± 0.74	0
S31PG1	6.65 ± 0.28	38.25 ± 2.32

データは、3 反復の平均である。

\*PG 活性の 1unit は、1 時間に 1μmol D-ガラクトuron酸を遊離する活性と定義する。

†PP 活性の 1unit は、1 時間に 1μmol D-ガラクトuron酸に相当する可溶性ペクチンを遊離する活性と定義する。

#### (3) S31PG1 および S63PG1 の予測立体構造の比較

S31PG1 と S63PG1 の立体構造をホモロジーモデリング法により、Swiss-Model Workspace<sup>4)</sup>で予測した(図2)。その結果、基質結合部位の上部(N末端側)の構造に違いが認められ、非病原性株由来 S63PG1 に、S31PG1 に存在しない、α-ヘリックス構造が存在している可能性が示唆された。

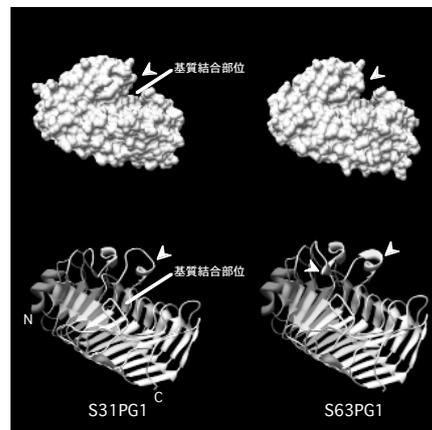


図2 S31PG1 および S63PG1 の予測立体構造. 鑄型に *Colletotrichum lupini* (PDB ID:2iq7)

chain E) を用いた。立体構造は、Chimera 1.3 soft ware 5) で表示した。矢じりは、異なる構造部分を指す。

#### (4) PG キメラタンパクの構築

病原性株由来 S31PG1 および非病原性株由来 S63PG1 の予測立体構造の比較から、基質結合部位の上部の構造に大きな違いが認められた。そこで、この領域を含む S63PG1 のアミノ酸配列を S31PG1 のアミノ酸配列領域と入れ替えたキメラタンパクを構築し、発現酵素の酵素活性を調べた。その結果、発現したキメラタンパク(基質結合領域を含む前後が S63PG1 由来のタンパク)は、S63PG1 同様、PG 活性は有るものの、PP 活性を全く示さなかった。

#### (5) PG キメラタンパクの病原性

非病原性株由来 S63PG1 の活性部位を含む領域を病原性株由来 S31PG1 に挿入した結果、PP 活性が全く消失した。そこで、PG キメラタンパクのレモン果皮分解能と病原性についても調べた(図 3)。その結果、S31PG1 は、高いレモン果皮分解能とレモン果実に腐敗症状を示したのに対し、キメラタンパクは、レモン果皮を分解せず、全く果実にも腐敗症状を示さなかった。以上の結果は、病原性に PP 活性が必須であり、PP 活性には、基質結合部位の上部の構造が関わっていることが考えられた。

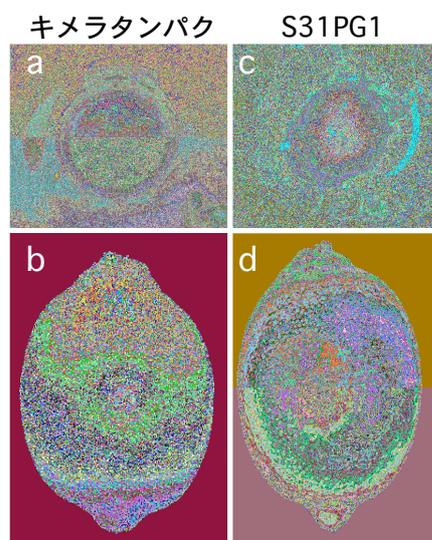


図 3 PG キメラタンパクと S31PG1 のレモン果皮分解能(a, c)およびレモン果実に対する病原性(b, d)。

#### (6) まとめ

これまで PG は、植物病原菌の病原性因子として扱う場合、PG が非病原微生物にも存在していることや、植物にまでも存在していることなどから、PG と病原性との関わりを説明付けることが困難であった。しかし、本研究により、PG が病原性に関わる場合と、関わらない場合のメカニズムを明らかにすることができた。つまり、病原性発現には、PG の持つ PP 活性が重要であることが分かった。自然界では、植物組織内に存在しているペクチン質は、他の多糖類やタンパクなどと結合した、重合度の高い不溶性ペクチン(プロトペクチン)の状態が存在している。PP 活性とは、その不溶性ペクチンを分解する活性である。それに対し PG 活性は、基質が可溶性ペクチンに対して働く活性である。今回の研究から、PG によって、PP 活性が異なり、その違いが病原性を左右していることが分かった。さらに、PP 活性を担っているのは、PG タンパクの基質結合部位の上部(N 末端側)の構造が関わっていることも示された。PG 活性にせよ、PP 活性にせよ、結合できうる基質は、ポリガラクトuron酸(ホモガラクトuron酸)である。そのことから、PP 活性を示すには、複雑な構造の不溶性ペクチン内に埋もれているポリガラクトuron酸と結合できる親和性が必要となる。その際、基質結合部位の上部構造が影響しているのではないかと考えられる。

以上の結果は、これまで論争の起きていた PG と病原性との関わりについての新たな発見であり、非病原性微生物や植物に PG が存在していても、病気が発症しない理由を説明付けることのできる重要な情報となった。また、今後新たな病害防除を確立するための、基礎的研究となった。

#### (7) 引用文献

- ① Kjaerulff S, Jensen MR. Comparison of different signal peptides for secretion of heterologous proteins in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336:974-982 (2005).
- ② Milner Y, Avigad G. A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. *Carbohydr. Res.* 4:359-361 (1967)
- ③ Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 4:330-334 (1962)
- ④ Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195-201 (2006)

## 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 2 件)

- ① Nakamura M, Nakamura K, Iwai H.  
Establishment of heterologous expression of polygalacturonase S63PG1 from nonpathogenic isolate S63 of *Geotrichum candidum*. Journal of General Plant Pathology (2009) (in press) 査読有
- ② Nakamura M, Suprapta DN, Iwai H.  
Differentiation of pathogenic and nonpathogenic isolates of *Geotrichum candidum* sensu Suprapta et al. (1995) on citrus fruit based on PCR-RFLP analysis of rDNA ITS and PCR using specific primers designed in polygalacturonase genes. Mycoscience 49:155-158 (2008) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Nakamura M, Nakamura K, Iwai H.  
Protopectinase activity of polygalacturonases from pathogenic and nonpathogenic isolates of *Geotrichum candidum* governs their pathogenicity to citrus fruit (Aug 24-29, 2008) 9th International Congress of Plant Pathology, Torino, Italy
- ② 中村 格朗・中村 正幸・岩井 久  
*Geotrichum candidum* S63(非病原性株)由来ポリガラクトナーゼの分裂酵母を用いた外分泌系の確立(2008年1月31日)九州病害虫研究会 熊本 メルパルク熊本

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 正幸 (NAKAMURA MASAYUKI)  
鹿児島大学・農学部・助教  
研究者番号：90404475