

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05834

研究課題名(和文) イネXIPによる病原菌抵抗機構の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of rice resistance to the phytopathogen using xylanase inhibitor proteins

研究代表者

大沼 貴之 (Ohnuma, Takayuki)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：60446482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：イネが植物病原菌の感染から身を守るために分泌する生体防御タンパク質の一つであるキシラナーゼ阻害タンパク質XIP (Xylanase Inhibitor Protein) は、イネの細胞壁を分解する病原菌由来のGH10もしくはGH11キシラナーゼを阻害する活性がある。本研究の遂行により、イネXIPにはGH10もしくはGH11のみを阻害するシングルキシラナーゼインヒビターと、両キシラナーゼを阻害するデュアルキシラナーゼインヒビターがあることがわかった。また、デュアルキシラナーゼインヒビターは、一分子でGH10とGH11キシラナーゼを同時に阻害する機能ももつことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

XIPをターゲットとしたイネの耐病性の強化を行った場合、必然的に高い耐病性と難糖化性(難分解性)という形質を付与することとなる。高い耐病性はコメの収量増大をもたらすメリットがあるものの、難糖化性は生物によるイネ植物体の完全分解をしにくくし、持続可能な循環型農業の確立にとって好ましくないデメリットを与えるものと考えられる。本研究の遂行によって得られた成果は、イネのXIPを用いた生体防御の仕組みを分子レベルの解像度で明らかにしたものであり、耐病性強化一辺倒ではなく、このようなシレンマに抵触しない高い耐病性を備えかつ微生物分解され易い栽培品種の開発に役立てられるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Xylanase inhibitor protein XIP (Xylanase Inhibitor Protein), which is one of the Pathogenesis-related (PR) proteins secreted by rice to protect itself from infection by plant pathogens, has an activity of inhibiting GH10 and/or GH11 xylanases derived from pathogens that degrade the cell wall polysaccharides of rice. In this study, it was found that rice has single xylanase inhibitor that inhibits only GH10 or GH11 and dual xylanase inhibitor that inhibits both xylanases. It was also found that the dual xylanase inhibitor has the function of simultaneously inhibiting GH10 and GH11 xylanases.

研究分野：応用生物化学

キーワード：植物病原菌 阻害タンパク質 キシラナーゼ キチナーゼ

1. 研究開始当初の背景

生体防御タンパク質 (Pathogenesis-related proteins) を利用した、細胞外におけるイネの植物病原菌に対する抵抗方法には、病原菌細胞壁成分である多糖を標的とした、糖質分解酵素群 (キチナーゼやグルカナーゼ等) の分泌とそれによる溶菌 (攻めの抵抗性) と、病原菌が感染時分泌する植物細胞壁分解酵素群 (ヘミセルラーゼやペクチナーゼ等) をターゲットとした、阻害タンパク質による阻害 (守りの抵抗性) とがある。守りの抵抗性は分解酵素群によるイネ細胞壁の分解を低減するため、同性質を強化したイネは優れた耐病性を獲得し、結果としてコメの収量増大をもたらすものと期待される。一方阻害タンパク質を過剰発現した場合、イネ細胞壁の酵素的分解が阻害されることから、自然環境下における土壌微生物由来の酵素が主体となるイネ植物体の糖化 (分解) 反応の効率を悪くし、その後の物質循環を妨げる要因の一つとなり得る。すなわち、守りの抵抗性を強化したイネの育種と栽培は、高耐病性の付与、投与農薬の削減および収量の増加といったメリットをもたらす一方で、難分解性の亢進とそれに伴う循環型農業の妨げといったデメリットももたらすものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではこのような両立させ難い問題に対する対応策を探る一環として、植物病原菌が感染時分泌するヘミセルラーゼである糖質加水分解酵素 GH (Glycoside Hydrolase) ファミリー 10 および 11 キシラナーゼに対する、イネのキシラナーゼ阻害タンパク質 XIPs (Xylanase Inhibitor Proteins) の阻害特異性および阻害活性を評価することを計画した。また、両者の相互作用の物理化学的解析と X 線結晶構造解析による XIP/キシラナーゼ複合体の立体構造の決定により、XIP のキシラナーゼ阻害機構を分子レベルの解像度で明らかにすることを目指した。さらに、イネに存在する複数の XIP の機能解析を行った後その性質を比較することにより、イネによる XIP を利用した生体防御を統合的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 大腸菌発現システム (Expresso Rhamnose Cloning and Expression System, Lucigen 社) を利用して、イネ XIP である OsXIP (Gene ID Os05g15880), riceXIP (Os11g47520) RIXI (Os11g47580), OsHI-XIP (Os05g15770) および OsChib3H-g (Os11g47560) の組換え型タンパク質を生産した。また、同システムを利用してイネ立枯病菌 *Rhizopus oryzae* が感染時分泌する GH10 および GH11 キシラナーゼである RXyn1 (Genbank accession number KF640266) および RXyn2 (KF955009) と、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* の分泌する XYN33 (GenBank accession number L37529) および XYN22 (L37530) も生産した。各組換え型タンパク質の精製は、菌体破砕後の可溶性画分から各種クロマトグラフィーを用いて行った。
- (2) XIP によるキシラナーゼの阻害活性評価は基質に Remazol Brilliant Blue R-D-Xylan もしくは 4-Nitrophenyl- β -xylobioside を用いて行い、50% 阻害濃度 IC_{50} を決定後 Dixon Plot を用いて阻害定数 K_i を決定した。
- (3) XIP とキシラナーゼの相互作用解析は、HiLoad 16/600 Superdex 75 pg カラムを装着した AKTA FPLC システム (GE ヘルスケア) を使用したゲル濾過クロマトグラフィーによって行った。
- (4) タンパク質の結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法によって行った。結晶化条件の初期スクリーニングは Hampton Research 社のタンパク質結晶化スクリーニングキットを使用し (576 条件), 20°C で行った。得られた結晶の X 線回折実験は、茨城県つくば市の高エネルギー加速器研究機構のフotonファクトリーで行った。

4. 研究成果

- (1) イネ XIP の内、OsXIP, riceXIP, OsHI-XIP および OsChib3H-g と、キシラナーゼ RXyn1, RXyn2, XYN33, XYN22 の発現に成功した。SDS-PAGE で均一になるまで精製した各タンパク質の収量は、培養液 1L 当たりいずれも数ミリグラム以上であった。RIXI については組換え型タンパク質が発現されなかったことから、アミノ酸配列の変更を伴わない遺伝子配列の変更、発現用宿主株の変更および付加タグ配列の変更を行い、再度発現系を構築した。しかし、これまでのところ組換え型 RIXI の発現に成功していない。
- (2) キシラナーゼの阻害活性評価を行ったところ、OsXIP は GH11 キシラナーゼのみを阻害すること、OsXIP, riceXIP および OsHI-XIP は GH10 と 11 どちらのキシラナーゼも阻害すること、OsChib3H-g は GH10 キシラナーゼのみを阻害することがわかった。XIP と同じ GH18 に分類されるイネキシナーゼ Oschib1 (Genbank accession number AF296279) と Oschib2 (XM_015759537) を用いて、同様に阻害活性評価を行ったが、どちらのキシラナーゼの活性も阻害されなかった。このことから、XIP とキシナーゼはどちらも $(\beta/\alpha)_8$ barrel フォール

ドのタンパク質であるものの、同活性は XIP に特異的なものであることがわかった。50% 阻害濃度 IC_{50} と阻害定数 K_i を調べたところ、それぞれ μM と nM オーダーの値であり、イネ XIP は病原菌キシラナーゼを比較的強く阻害することがわかった。また Dixon Plot 解析の結果、調べた全ての XIP の阻害様式は、いずれも競合阻害であった。

- (3). OsHI-XIP と各キシラナーゼの複合体形成能をゲルろ過クロマトグラフィーにより調べた。OsHI-XIP/XYN22 混合液および OsHI-XIP/XYN33 混合液をカラムにアプライした場合、それぞれほぼシンメトリーのシングルピークのクロマトグラムを与えた(図1 ピーク2と3)。各ピークの溶出時間はいずれも各タンパク質単体の溶出時間(ピーク4, 5, 6)よりも早く、このことから OsHI-XIP は XYN22 および XYN33 とそれぞれ安定的な二量体を形成することが示唆された。また3種のタンパク質からなる OsHI-XIP/XYN22/XYN33 混合液をアプライした場合も、ほぼシンメトリーのシングルピークのクロマトグラム(ピーク1)が得られ、その溶出時間はXIP/XYN22およびOsHI-XIP/XYN33二量体よりも早かった。この結果はOsHI-XIPがXYN22およびXYN33と1:1:1の比で結合し、安定的な三量体を形成していることを示している。従って、OsHI-XIPはGH10と11キシラナーゼと安定的な二量体を形成し、両酵素の活性を阻害することがわかった。また、OsHI-XIPは両キシラナーゼと同時に結合し、安定的な三量体を形成し、一分子で二種のキシラナーゼを同時に阻害する機能をもつことが示された。さらに、分子表面におけるGH10と11キシラナーゼの結合部位は異なる位置にあることも示唆された。同様の実験をOsXIP、riceXIPおよびOsChib3H-gを用いて行ったところ、興味深い結果が得られた。すなわち、OsXIPとOsChib3H-gはそれぞれ、GH11キシラナーゼとGH10キシラナーゼのみと安定的な二量体を形成するのにに対し、riceXIPはOsHI-XIPと同様にGH10と11両キシラナーゼと安定的な二量体を形成し、さらに同キシラナーゼと三量体を形成することもわかった。各XIPが複合体形成能を示すキシラナーゼは、阻害活性を示すキシラナーゼと一致する結果が得られた。以上の結果から、OsXIPとOsChib3H-gはそれぞれGH11と10のみを阻害するSingle Xylanase Inhibitor Protein(それぞれsXIP11とsXIP10)であり、riceXIPおよびOsHI-XIPはGH10と11を共に阻害するDual Xylanase Inhibitor Protein(dxIP)であることがわかった。

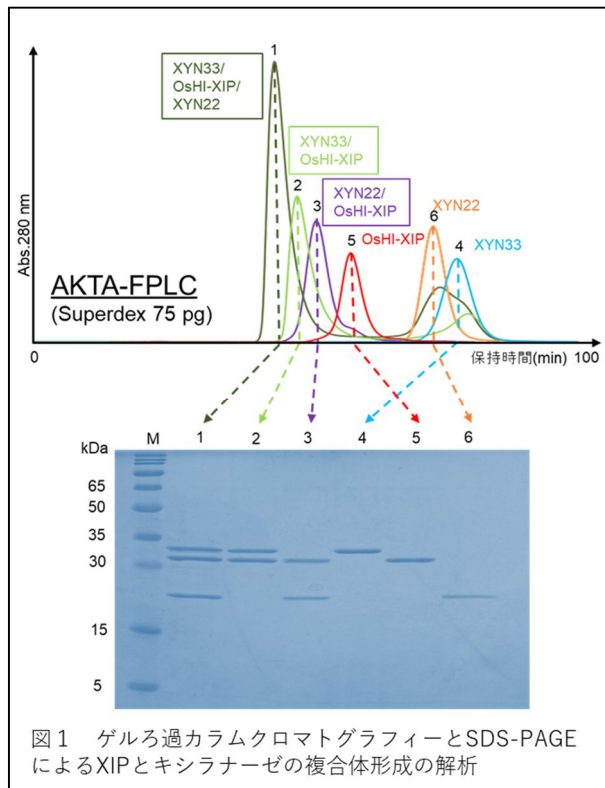


図1 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーとSDS-PAGEによるXIPとキシラナーゼの複合体形成の解析

その溶出時間はXIP/XYN22およびOsHI-XIP/XYN33二量体よりも早かった。この結果はOsHI-XIPがXYN22およびXYN33と1:1:1の比で結合し、安定的な三量体を形成していることを示している。従って、OsHI-XIPはGH10と11キシラナーゼと安定的な二量体を形成し、両酵素の活性を阻害することがわかった。また、OsHI-XIPは両キシラナーゼと同時に結合し、安定的な三量体を形成し、一分子で二種のキシラナーゼを同時に阻害する機能をもつことが示された。さらに、分子表面におけるGH10と11キシラナーゼの結合部位は異なる位置にあることも示唆された。同様の実験をOsXIP、riceXIPおよびOsChib3H-gを用いて行ったところ、興味深い結果が得られた。すなわち、OsXIPとOsChib3H-gはそれぞれ、GH11キシラナーゼとGH10キシラナーゼのみと安定的な二量体を形成するのにに対し、riceXIPはOsHI-XIPと同様にGH10と11両キシラナーゼと安定的な二量体を形成し、さらに同キシラナーゼと三量体を形成することもわかった。各XIPが複合体形成能を示すキシラナーゼは、阻害活性を示すキシラナーゼと一致する結果が得られた。以上の結果から、OsXIPとOsChib3H-gはそれぞれGH11と10のみを阻害するSingle Xylanase Inhibitor Protein(それぞれsXIP11とsXIP10)であり、riceXIPおよびOsHI-XIPはGH10と11を共に阻害するDual Xylanase Inhibitor Protein(dxIP)であることがわかった。

- (4). XIPおよびキシラナーゼの結晶化を行った後、X線結晶構造解析によってこれまでにOsHI-XIPとOsXIP/RXyn2複合体の立体構造を決定した。また、riceXIP/RXyn1/RXyn2複合体、OsHI-XIP/XYN33/XYN22複合体およびOsChib3H-gの結晶が得られているが、今後回折データを得た後、構造決定を行うことを予定している。OsHI-XIPの立体構造はアミノ酸配列から予測された通り、他のGH18キシラナーゼと同様に、 $(\beta/\alpha)_8$ barrel フォールドをもつことがわかった(図2A)。同構造をイネGH18キシラナーゼOsChib2(PDB ID 7XMH)の構造(図2C)と比較したところ(アミノ酸配列の相同性は11.6%)、全体のフォールドはよく似てい

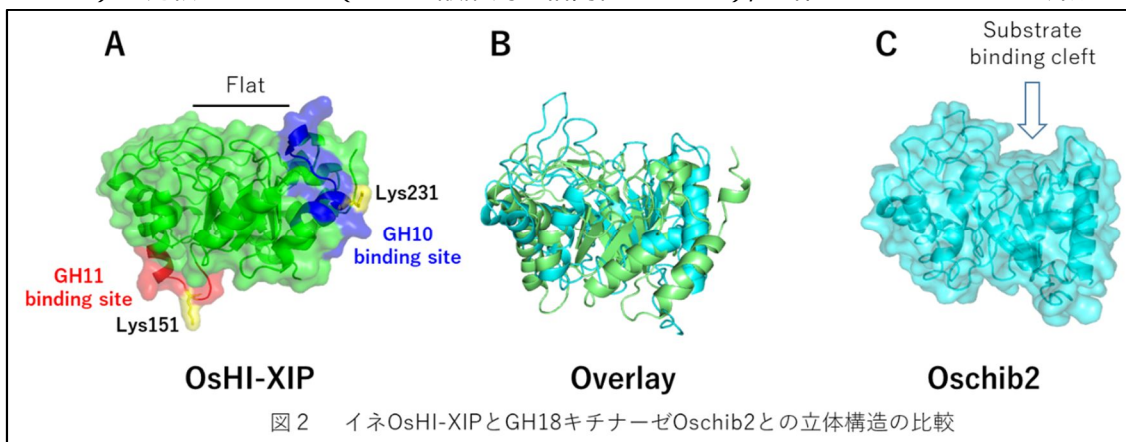
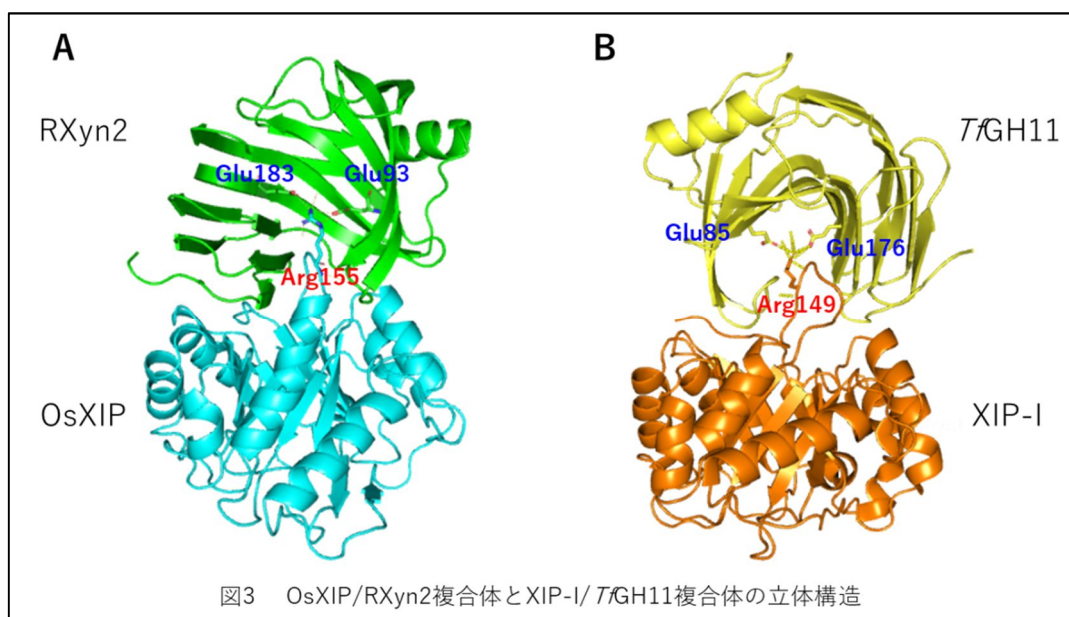


図2 イネOsHI-XIPとGH18キシラナーゼOsChib2との立体構造の比較

るものの、両タンパク質はそれぞれ特徴的な構造をもっていた（図 2B）。すなわち、Oschi2 の $(\beta/\alpha)_8$ barrel フォールド上部には基質結合部位となるクレフト（Substrate binding cleft）が形成されているのに対し、OsHI-XIP の同部位は埋もれており、Flat な構造が分子表面に形成されていた。一方 OsHI-XIP は分子表面の、GH10 および 11 との推定インターフェイス領域に α ヘリックスおよびループ構造をもち、各 XIP との結合に必要なプラットフォームが形成されていることがわかった。コムギの XIP である XIP-I の同領域には、二つの塩基性アミノ酸残基 Lys234 と Arg149 があり、それらが GH10 および GH11 キシラナーゼの酸性触媒基とのイオン結合に関与することが報告されている。OsHI-XIP の同位置にもリシン残基（Lys231 と Lys151）がそれぞれ保存されていることから、XIP における同位置の塩基性アミノ酸残基と各キシラナーゼの二つの酸性触媒残基間に形成されるイオン結合は、両タンパク質の複合体形成時に共通してみられる構造的特徴であることが示された。OsXIP と RXyn2 の複合体の立体構造決定により、両者の結合部位において OsXIP のループ構造上に存在する Arg155 が、RXyn2 の触媒残基である Glu93 および Glu183 とイオン結合を形成していることがわかった。同様の結合は、コムギ由来の XIP-I と *Talaromyces funiculosus* 由来 GH11 (*TjGH11*) キシラナーゼ複合体の Arg149 (XIP-I) と Glu85 および Glu176 (*TjGH11*) の間でも形成されている。しかし両複合体を比べてみると、各 XIP に対する GH11 キシラナーゼの結合様式が明確に異なっていた。すなわち XIP-I/*TjGH11* 複合体では、XIP-I から突き出した Arg149 が *TjGH11* の基質結合クレフト正面から Glu85 と Glu176 の間に入り込み、イオン結合を形成しているのに対し、OsXIP/RXyn2 複合体では Arg155 が RXyn2 クレフトの横から入り込み、Glu93 と Glu183 とイオン結合を形成していた。



本研究の遂行により、イネの XIP には GH10 と 11 のみをそれぞれ阻害する Single Xylanase Inhibitor Protein (sXIP10 と sXIP11) と、GH10 と 11 を共に阻害する Dual Xylanase Inhibitor Protein (dXIP) が存在することがわかった。dXIP は一分子で二種のキシラナーゼを同時に阻害する機能をもつこともわかった。植物由来の XIP のこのような性質はこれまでに報告されておらず、生体防御タンパク質である XIP に関する新たな知見を得ることができた。また、2 例目となる XIP/GH11 キシラナーゼ複合体の立体構造を決定した。同構造は既報の複合体構造と異なっており、XIP の GH11 キシラナーゼ阻害様式に異なる機構が存在することを示した。以上の結果は、今後 XIP の機能を強化した高い耐病性を備えるイネの開発において、有益な情報をもたらすものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takayuki Ohnuma
2. 発表標題 Frontiers in plant-microbe interaction
3. 学会等名 The Workshop on Chitin Biology and Beyond (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大沼貴之、今岡駿、三井圭吾、田中盾
2. 発表標題 イネ立枯病菌Rhizopus oryzaeキシラナーゼに対するイネXIPsの阻害活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部朴二郎、今岡駿、大沼貴之
2. 発表標題 イネの生体防御タンパク質として機能する GH18 キチナーゼとXIP
3. 学会等名 日本応用糖質科学会第 46 回近畿支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部朴二郎、尾崎玄忠、竹下大二郎、大沼貴之
2. 発表標題 イネOsHI-XIPによる植物病菌キシラナーゼの阻害様式
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会（第70回）
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
研究協力者	深溝 慶 (Fukamizo Tamo)		

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