

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380026

研究課題名(和文) 宿主特異的毒素ビクトリンのレセプタータンパク質の単離と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of victorin-binding protein in oat plants

研究代表者

多田 安臣 (Tada, Yasuomi)

香川大学・総合生命科学研究センター・准教授

研究者番号：40552740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：宿主特異的毒素Victorinが標的とする宿主因子を同定するために、イネ品種日本晴より抽出した細胞壁タンパク質をゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより細分画した後、各フラクションをBiacoreに供試し、Victorinとの相互作用の有無を確認した。ビオチン化Victorin(VicBio)を作成し、相互作用が認められたサンプルにVicBioを反応させ、pull-downアッセイを行った結果、15 kDa付近にVicBio特異的なタンパク質が検出された。検出されたタンパク質を質量分析計により解析を行った結果、還元酵素であるチオレドキシンが同定された。

研究成果の概要(英文)：To identify victorin-binding proteins, a crude protein was extracted from the cell wall of the rice plant. The extract was fractionated by a gel filtration chromatography. Then, we have performed Biacore analysis to test if victorin binds to a cell wall protein. The Biacore positive fraction was mixed with the biotin-conjugated victorin (VicBio) and pulled down the victorin-binding proteins. A 15 kDa protein was specifically detected in VicBio-treated fraction, and mass spectrometry identified it as thioredoxin known as a reducing enzyme.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：感染生理

## 1. 研究開始当初の背景

エンバクビクトリア葉枯病菌に対する感受性遺伝子 *Vb* を保有するエンバク品種は、エンバク冠さび病菌に対して常に抵抗性を示すことより、同抵抗性遺伝子 *Pc-2* と *Vb* は同一-或いは強く連鎖した遺伝子であると考えられている。すなわち、*Vb* を同定し、HSTであるビクトリンの作用機作を明らかにすることにより、冠さび病菌に対する誘導抵抗性の分子メカニズムの解明にも繋がると言える。しかし、ビクトリンの発見から 20 年以上もの間、その作用点に関する知見は統一見解に至っていない一方で、アメリカ、オレゴン大学の Wolpert らによる、初期作用点はミトコンドリアマトリックス内に存在するグリシン脱炭酸酵素 (GDC) であるという説が世界的にも長く支持されてきた。これに対し、応募者ら及び秋光らが唱えた、ビクトリン初期認識部位は細胞表面であるとした研究は現在国内外ともに存在しない (Tada et al., 2005; Akimitsu et al., 1993ab; Akimitsu et al., 1992)。

申請者らは、ビクトリンの感受性誘導メカニズムを解明するため、感受性エンバク品種における細胞死誘導機構について研究してきた。特に、ビクトリン処理により原形質膜における迅速な活性酸素種の生成が認められること (Yao et al., 2001)、ビクトリンが誘導する細胞死は動物細胞におけるアポトーシス様細胞死であることを明らかにした (Tada et al., 2001)。これらの研究により、ビクトリンの作用点とされてきたミトコンドリアにおける生理・生化学的或いは形態学的変化はアポトーシス様細胞死の直前或いは直後と比較的時間がかかることを見出し (Yao et al., 2002; Yao et al., 2001)、同毒素の作用点はミトコンドリアではなく、他の細胞構成要素に存在するものと推察した。実際、秋光らはビクトリンの抗イデオタイプ抗体が感受性品種由来のプロトプラストにカロールを誘導することを見出し、ビクトリンの細胞表面認識機構の存在を提唱している (Akimitsu et al., 1993ab)。そこで我々は、蛍光標識ビクトリン (VicFluor) 及び、ビクトリンと牛血清アルブミン (BSA) とのコンジュゲイト (VicBSA) を作成し、それらの毒素活性及び細胞内における動性について調査した。その結果、VicFluor 及び VicBSA の細胞内への流入は、細胞死が生じた後であることを明らかにし、ビクトリンは細胞表面で認識されていることを確認した (Tada et al., 2005)。

さらに、我々はビクトリン結合タンパク質の同定に係る全ての論文を精査し、いずれの研究も高塩濃度で抽出可能な細胞壁タンパク質をサンプルとして供試していないことを見出した。そこで、原形質膜、葉緑体、細胞質、ミトコンドリア及び細胞壁由来のタンパク質を抽出し、ビクトリンとの相互作用を

各々ピアコアにより解析したところ、細胞壁タンパク質にビクトリンとの強い結合能が認められ、ビクトリンの初期作用点である可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

エンバクビクトリア葉枯病菌に対する感受性遺伝子 *Vb* を保有するエンバク品種は、エンバク冠さび病菌に対して常に抵抗性を示すことより、同抵抗性遺伝子 *Pc-2* と *Vb* は同一-或いは強く連鎖した遺伝子であると考えられている。すなわち、*Vb* を同定し、HSTであるビクトリンの作用機作を明らかにすることにより、冠さび病菌に対する誘導抵抗性の分子メカニズムの解明にも繋がると言える。本研究では、申請者らによる細胞表面におけるビクトリン認識機構に関する実験的証明を背景にして (Tada et al., 2005)、新規ビクトリン作用点 (VBCP: victorin-binding cell wall protein) を単離、同定し、同菌感受性誘導に係る特異的毒素認識機構を明らかにするものである。

## 3. 研究の方法

ビクトリンとの相互作用因子を同定するために、以下の手法でビオチン化ビクトリン (VicBio) を作成した。Slufo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan) を 2.1 mg 取り、超純水 315  $\mu$ l で溶解させ、10 mM biotin 溶液とした。Oregon 州立大学の Dr. Thomas J. Wolpert に譲渡して頂いた 2 mg/ml Victorin を PBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で 100  $\mu$ g/ml に希釈し、450  $\mu$ l 取り、ここに 10 mM biotin を 150  $\mu$ l を加えた。反応溶液を室温で 2 hr 静置した後、4°C で一晚インキュベートした。VicBio の精製には Develosil ODS-5 カラム (4.2 mm×250 mm) を用いた。同カラムに流速 1.0 ml/分で 100% メタノールを 30 分流し続け、カラムの洗浄を行った。溶媒を Victorin の精製に用いる移動相 (0.075% トリフルオロ酢酸、25% アセトニトリル) に変更し、上記と同じ流速で 2 hr 流し、カラムの平衡化を行った。検出波長は 245 nm で、反応溶液をカラムに供試し、得られたピークをそれぞれ分画し、エバポレーターでそれぞれ 24°C で減圧濃縮し、乾固させた。その後、100% メタノールを 2 ml 加え、画分を完全に溶解したのちに、再びエバポレーターにより減圧濃縮し、乾固させた。この操作は、トリフルオロ酢酸の臭気がなくなるまで行った。超純水を 1 ml 加え、溶解させ回収した。回収は同様の方法により、3 回行い、4°C で保存した。

作成した VicBio の毒性活性を以下の用に検討した。Dynabeads® M-280 Streptavidin (invitrogen) 25  $\mu$ l を超純水で置換し、精製

した VicBio を 100  $\mu$ l を添加して、ローテター (TAITEC) で回転させながら室温で 1 hr 反応させた。上清を回収し、96 穴タイタープレート (Falcon, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) に 100  $\mu$ l 添加し、そこに裏表皮を剥離した Iowa X469 の初生葉の剥離面を下にして室温で 2 hr 静置した。その後、上記した FDA 染色法を用いて毒素活性検定を行った。コントロールとして、超純水と VicBio を用いた。この観察には HS オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000 シリーズ BIOREVO) と解析ソフトウェア (BZ-解析アプリケーション, BZ-観察アプリケーション) を用いた。

細胞壁タンパク質の抽出は破砕法を用いて行った。播種後 10 日間生育した Iowa X469 の初生葉を 15 g 回収し、液体窒素にて凍結させた後、 $-80^{\circ}\text{C}$  フリーザー内で保存した。以下の操作は氷上で行った。氷冷した乳鉢に凍結させた初生葉を 1 cm 幅に切断し、加えた。20 ml の CW-A buffer (Table 2) を加え、磨砕した。磨砕液を 4 層ガーゼで濾過し、繊維質のみを回収した後、更に 20 ml の CW-A buffer 中で磨砕した。同操作を三回繰り返し、CW-A buffer を CW-B buffer (Table 2) に置換し、磨砕した。磨砕液を 4 層ガーゼで濾過し、繊維質のみを回収し、更に 20 ml の CW-B buffer 中で磨砕した。同操作を得られる繊維質が薄い緑色になるまで繰り返し、得られた繊維に室温で保存した CW-C buffer (Table 2) 6 ml 加え、室温で 15 分間放置した後、遠心分離 (13,000 rpm, 15 分,  $25^{\circ}\text{C}$ ) を行い、上清を回収した。回収した上清を PD-10 Desalting Columns (GH Healthcare, Uppsala, Sweden) に供試し、HBS-N buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl) により脱塩、buffer 交換を行った。カラムの平衡化には HBS-N buffer を用いた。回収した抽出液は、Nano-Drop2000 (Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Japan) を用いて濃度を測定し、 $-80^{\circ}\text{C}$  フリーザーで保存した。同様の方法を用いて、3 週間生育したイネ品種日本晴の初生葉からの細胞壁タンパク質の抽出を行った。

VicBio を用いたプルダウンは以下の手法により遂行した。30  $\mu$ l の Dynabeads® M-280 Streptavidin (invitrogen) を HBS-N buffer 1 ml で置換し、VicBio を 90  $\mu$ l 添加し、ローテター (TAITEC) で回転させながら室温で 1 hr 反応させた。1 ml の buffer で 3 回洗浄し、氷冷した後、イネ品種日本晴の初生葉より抽出した細胞壁タンパク質を 1 ml 加え、 $4^{\circ}\text{C}$  で 4 時間反応させた。上清を除去したビーズを 1 ml の Buffer で 5 回洗浄し、30  $\mu$ l の  $2\times$  サンプルバッファー (20% Glycerol, 0.04% BPB, 100 mM Tris-HCl, pH6.8 200 mM DTT (SIGMA-ALDRICH, Osaka, Japan)) を加え VORTEX で 10 分おきに攪拌しながら 70 のブロックインキュベーターで 30 分静置した。遠心分離 (15,000 rpm,

2 分,  $25^{\circ}\text{C}$ ) した後、Dynabeads® M-280 Streptavidin を除去した。また、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより分画した細胞壁タンパク質を用いて、同様の実験を行った。

#### 4. 研究成果

以前の研究により、Victorin と相互作用する因子は細胞壁中に存在することが明らかになっている。また、同様の相互作用は感受性エンバク品種だけでなく、非感受性エンバク品種、さらには他のイネ科植物においても認められた。そこで、ゲノム解読が終了しているイネ品種日本晴より抽出した細胞壁タンパク質と作成した VicBio を用いて、Victorin が標的とする因子の同定を Pull-down assay により試みた。まず、VicBio と細胞壁タンパク質の反応時間の検討を行った。反応時間を 2、4、12 時間と設定し、反応時間の検討を行ったが、12 時間では非特異的なタンパク質が検出され、2 時間では検出感度が低下したことから、反応時間は 4 時間を選択した。また、反応 buffer についても検討を行った。Biacore の系では、Hepes buffer を使用し、Victorin との相互作用の有無を検出していたため、Hepes buffer を用いた。また、Pull-down assay にはタンパク質を可溶化させることを目的とし、界面活性剤が用いられることが多いが、条件検討を行った結果、Victorin と VBP の相互作用を阻害することが確認できたため、界面活性剤は使用しなかった。Pull-down assay の結果、再現性良く 15 kDa 付近に VicBio 処理区特異的なバンドが検出された。さらに、日本晴より抽出した細胞壁タンパク質をゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより 18 のフラクションに細分画した後、各フラクションを Biacore に供試し、Victorin との相互作用の有無を確認した。その結果、Fraction number 9 において顕著な相互作用が検出された。Fraction number 9 を用いて、Pull-down assay を行ったところ、先述と同様の結果が得られた。また、感受性エンバク品種 Iowa X469 より抽出した細胞壁タンパク質を用いて、Pull-down assay を行ったところ、これまでの結果と同様に再現性良く 15 kDa 付近に VicBio 処理区特異的なバンドが検出された。そのため、このタンパク質を回収し、理化学研究所環境資源科学研究センター植物プロテオミクス研究ユニットの中神 弘史博士に依頼し、質量分析計による解析を行った結果、還元酵素であるチオレドキシンが同定された。同定されたチオレドキシンは機能解析が行われておらず、その詳細は明らかにされていない。また、アライメント解析による局在予測では、葉緑体局在であった。そこで、チオレドキシンは N 末端に移行シグナルを保有していることから、これまでに機能解析が行われている葉緑体局在のチオレドキシ

ン ( Thioredoxin m1, Thioredoxin m2, Thioredoxin m3 )との同定されたチオレドキシンの N 末端の疎水度を Kyte-Doolittle 法による hydropathy plot を用いて、予測し、比較した。その結果、同定されたチオレドキシンの N 末端は葉緑体局在として知られているチオレドキシンの異なる疎水度を有していることが示唆された。また、細胞外へ放出されることが報告されている細胞質局在のチオレドキシンの比較したところ、類似性が認められた。

#### 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 0 件 )

〔学会発表〕( 計 2 件 )

嶋川今日子, 兼市大輝, 劉 小露, 板谷知健, 内橋幸平, 齋藤隆一郎, 日下 広, 中屋敷均, 土佐幸雄, 大谷耕平, 眞山滋志, 秋光和也, 多田安臣, ビクトリンと相互作用する新奇タンパク質の同定, 平成 25 年度 日本植物病理学会大会, 岐阜, 3 月 28 日, 2013 年

Kaneichi, D., Itaya, T., Shimakawa, K., Oka, N., Nomoto, M., Akimitsu, K., and Tada, Y.

Identification of a novel victorin-binding protein in oats, Phytogene Symposium VI, 香川, 10 月 28 日, 2013 年

〔図書〕( 計 0 件 )

〔産業財産権〕

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.gene.nagoya-u.ac.jp/staff.h>

tml

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

多田 安臣 ( Tada Yasuomi )

香川大学・総合生命科学研究センター・准教授

研究者番号 : 40552740

(2) 研究分担者

秋光 和也 ( Akimitsu Kazuya )

香川大学・農学部・教授

研究者番号 : 80263888

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :