

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580082

研究課題名(和文) 低環境負荷微生物農薬利用への昆虫病原性糸状菌代謝メカニズムのプロテオミクス研究

研究課題名(英文) Proteomic analysis of the metabolic mechanism of entomopathogenic fungus for the application of bioinsecticide.

研究代表者

荒木 朋洋 (Araki, Tomohiro)

東海大学・農学部・教授

研究者番号：20193071

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)：昆虫病原性糸状菌 *Nomuraea rileyi* の C14 スフィンゴシン存在下での発芽誘導機序の解明をプロテアーゼ解析手法を用いて試みた。スフィンゴシンで誘導発芽させた胞子について、二次元電気泳動により特異的なタンパク質を21個検出した。これらのタンパク質に対し質量分析を用いタンパク質の同定を試みた。その結果、15スポットについてタンパク質を同定した。また、機能未知であった6スポットはさらに相同性検索により機能性タンパク質の推定を行った。その結果、代謝関連酵素群および生体防御に関するタンパク質群が同定され、発芽促進に際してこれらのタンパク質発現が亢進していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of germination-acceleration of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* in the presence of C14-sphingosine was analyzed by proteomic technique. Twenty-one specific induced proteins were found by 2D electrophoresis on sphingosine induced germinated spore. By the analysis of these proteins by mass spectrometry, 15 proteins were identified and found their functions, and the other unknown 6 proteins were analyzed by further homology search to deduce their functions. The result showed that the specific developed proteins carried the function of metabolic enzymes and self-defense. The specific receptor for C14-sphingosine was now analyzing.

研究分野：タンパク質化学

キーワード：昆虫病原性糸状菌 スフィンゴシン

1. 研究開始当初の背景

従来、生物農薬としての天敵糸状菌製剤は微小害虫を対象とし、その使用方法が煩雑であるため、社会的要請に対してその普及は進んでいない。申請者はこれまで実用化されていない「緑きょう病菌」が大型鱗翅目害虫であるハスモンヨトウの優占天敵糸状菌であることから、その実用化のための使用法の改善技術の開発を行ってきた。従来、糸状菌製剤は高温高湿等の好適条件では感染効率が良く防除効果は上がるが、低湿度等の不適環境下では感染率が悪化し防除効果の低下が問題となっている。

2. 研究の目的

本研究は、ハスモンヨトウの天敵糸状菌である緑きょう病菌について、その発芽を促進する物質を特定したため、これを利用した被害低減技術開発のための学術的基盤を築き、大型鱗翅目害虫に対する生物農薬の開発のみならず、この現象を広く糸状菌に適用し、低環境負荷生物生産に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

糸状菌は極めて固い胞子を形成する。したがって、通常のタンパク質抽出方法ではタンパク質試料の調製が困難であるため、まず胞子からのタンパク質抽出条件の検討を行う。すなわち、物理的方法および化学的方法(界面活性剤による抽出)等を組み合わせ、効果的なタンパク質抽出条件を確立する。その後、2次元電気泳動によりタンパク質のプロファイリングを行い、胞子および発芽始動期における特異的発現タンパク質をディファレンシャルディスプレイにより検出する。2次元電気泳動で分離したターゲットタンパク質は、タンパク質を同定するため、トリプシンを用いて断片化し、質量分析においてデータベース検索を行うが、ゲノム未知生物由来タンパク質については通常のペプチドマスマフィンガープリント(PMF)解析でのMASCOTサーチでは、同定が困難である。したがって、微量HPLCによるペプチドの分離とプロテインシークエンサー解析および、申請者が開発した、トリプシンペプチドのデノボシーケンス(直接配列分析)を質量分析で可能にする手法により、迅速かつ高感度な構造解析が可能である。すなわち、MALDI-TOF-MSでのデノボシーケンス解析のため、インゲル消化したトリプシンペプチドについて2段階の化学修飾を行い、イオン化効率と特異的yイオン検出を促進することによって、ゲノム未知タンパク質の配列分析が可能となる。

具体的な実験方法は以下のとおりである。

本研究に用いた昆虫病原性糸状菌 *N. rileyi* は熊本県農業研究センター内でダイズ圃場において菌叢を形成し死亡していた *Spodoptera litura* の幼虫から分離した菌株(N-37株)を用いた。スフィンゴシンは、製糸工場(碓氷製糸工場、群馬、日本)において繭から紡いだ後に排出されるカイコ

(*Bombyx mori*)の蛹から精製したものをういメタノールで濃度100ppmに調整したものを使用した。

2次元電気泳動(2D-PAGE)は抽出して得られたタンパク質に対して行った。2D-PAGEは、O'Farrell, Nishimaの方法にしたがって行った。すなわち、膨潤緩衝液はDeStreak Rehydration solution(GEヘルスケア)3mlにIPG緩衝液(GEヘルスケア)15 μ lを加え調整した。SDS平衡化緩衝液は、尿素36.04gを高純度蒸留水で溶解した後、1.5Mトリス塩酸緩衝液(pH 6.8) 3.35 ml, SDS 2.0g, グリセロール 30 g, BPB 200 μ lを加え、高純度蒸留水で全容を100 ml加え調整した。試料は膨潤緩衝液を250 μ l加え溶解し、膨潤トレイ(アメシヤムバイオサイエンス社)に流し、その上に固定化pHレンジ3-10の勾配ゲル13 cm(Immobiline Drystrip: GEヘルスケア社)を乗せ、ドライストリップが乾かないようにシリコンオイルを1 ml流し込み一晩膨潤した。膨潤後のゲルで等電点電気泳動を行った。泳動プログラムは20で500V 60分間、8000V30分間で行った。2次元目は、ゲルサイズ16 \times 16 cm(W \times L)のSDS-PAGE(濃縮ゲル4.5%,分離ゲル12.5%)で実施し、ゲル一枚当たり20mAの定電流で電気泳動を行った。

トリプシン消化

ゲルを切り取り、50 μ lの蒸留水を浸透後、遠心(9800 \times g, 30秒)し上清を除去した。次に、25mM重炭酸アンモニウム/50%アセトニトリルを50 μ l加え、10分間振とう後、遠心(1812.36 \times g, 30秒)後上清除去を2回行った。次に、0.1M重炭酸水素アンモニウムを100 μ l用い、攪拌後5分間静置した。そして、遠心(9800 \times g 30秒)し、上清を除去した。その後、100%アセトニトリルを50 μ l加え攪拌後、遠心(9800 \times g 30秒)後上清を除去した。ゲルは30分間乾燥後トリプシン(0.2 μ g/ μ l in 50mM酢酸)6 μ l、および10%アセトニトリルを含む50mM炭酸水素アンモニウム100 μ lを加え、氷上で0, 45分間ゲルを膨潤した。その後、遠心(9800 \times g 30秒)し、上清のトリプシン溶液を除去した。遠心(9800 \times g 30秒)後上清を除去し50 μ lまで濃縮した。

トリプシンペプチドの化学修飾

(2段階化学修飾法)

化学修飾は、グアニジン化とSPITCによるスルホン化を用いた2段階化学修飾を行った。すなわち、ペプチドはゲルから抽出後、回収した上清を減圧濃縮遠心機で乾燥させ、5 μ lの高純度蒸留水を加え溶解した。次に、1.5 μ lの7.5M O-メチルイソ尿素溶液と5.5 μ lの7M水酸化アンモニウム溶液を加え、65, 15分間反応させグアニジン化を行った。反応液は、Zip Tipにより試料から修飾剤の除去を行った。すなわち、50%アセトニトリルを含む0.1%トリフルオロ酢酸でZip Tipの膨潤を行い、0.1%トリフルオロ酢酸で洗浄を行った。次に50%アセトニトリルを含む0.1%トリフ

ルオロ酢酸でペプチドを溶出した。Zip Tip 処理後、ペプチド溶液に対し等量の SPITC (4-Sulfophenyl Isothiocyanate)を 100 μ l のピリジン：蒸留水：エタノール=1：1：2 で調製した溶液に 1 mg 溶解した溶液を加え混合し、50、30 分間反応させスルホン化を行った。反応後、減圧濃縮遠心機で溶媒を除去し、20 μ l の蒸留水に溶解した。

質量分析

質量分析は、ESI(Electro Spray Ionization) Q(Quadruple)-TOF(Time Of Flight)及び 5800 Proteomics Analyzer MALDI (Matrix Associated Laser Desorption Ionization)-TOF(Time Of Flight) -TOF(Time Of Flight)を用いて行った。

タンパク質同定

PMF(Peptide Mass Fingerprint)解析は、Web サーバー上に構築されたアプリケーション Mascot Server を用いる解析手法であり、質量分析で得られた TOF/MS 解析のペプチドイオンシグナルとゲノムが明らかになっているタンパク質の配列を理論的にトリプシン消化したものと比較することで、同定を行う手法である。MALDI で得られた TOF/MS の 1 価イオンのペプチドシグナルについてシグナル相同性検索を行った。シグナル相同性検索はデータベース National Center for Biotechnology Information (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 内の nr(Non-redundant protein sequence)を用いて行った。検索対象は fungi を選択した。

Blast(Basic local alignment search tool)解析は、データベース上に登録されている配列と、質量分析で得られた MS/MS 解析の配列(デノボシーケンス)との比較で推定を行うために用いた。すなわち、National Center for Biotechnology Information (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)内の Basic local alignment search tool(Blast)を用いて相同性検索を行った。データベースは、nr(Non-redundant protein sequence)を選択した。検索対象は fungi を選択した。複数の同一の機能を持つタンパク質がヒットした場合、配列の相同性を調べるため、clustalw(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)を用いた。

4. 研究成果

二次元電気泳動ディファレンシャルディスプレイ

発現されるタンパク質の全容 - プロテオーム - を網羅的に解析することが出来るプロテオーム解析を *N. rileyi* 発芽胞子の発現タンパク質に対して行った。タンパク質の抽出は、種々の抽出キットを用いたが、胞子の細胞壁が強固であることと、膜タンパク質の抽出を目的としてフェノール法を用いた。スフィンゴシン誘導で、特異的に発現するタンパク質と増加しているタンパク質を検出するため、スフィンゴシン無添加とスフィンゴシンを添加した培養後 24 時間後の

N. rileyi 胞子の二次元電気泳動像に対しタンパク質発現の比較のディファレンシャルディスプレイを行った。その結果、スフィンゴシン無添加泳動像において、577 スポットが観察され、スフィンゴシンを添加した泳動像においては、全体で 589 スポットが観察され、スフィンゴシン添加泳動像でスポットが小さいものを含む特異的発現スポットが 12 個、特異的增加スポットが 31 個観察された。そして、これらの特異的発現スポットと特異的增加スポットから発現、増加が顕著なスポット 21 個を選択し、解析を行った (Fig. 1)。

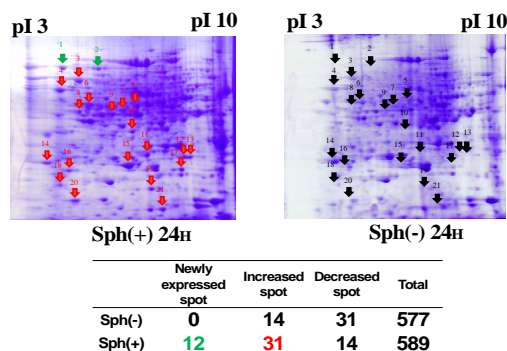


Fig.1 二次元電気泳動比較と特異的発現タンパク質スポット。Sph：スフィンゴシン

質量分析

本菌はゲノム未知であるため、通常のプロテオーム解析ではタンパク質を同定することが困難である。特異的タンパク質と検出された 21 スポットの中で、PMF 解析で同定できたスポットは 2 スポットのみであった。

したがって、本研究室で開発した 2 段階化学修飾法を用いた MALDI 型質量分析計によるデノボシーケンス法を適用してタンパク質の同定を試みた。本法は、質量分析でプロテインシーケンサーと同等の精度でアミノ酸配列を決定できるもので、これにより、ゲノム未知生物のタンパク質スポットから配列情報を得ることができ、その配列を用いた相同性検索で、タンパク質の同定が可能となった。

その結果、Table 1 に示すように、21 スポットのすべてのタンパク質を同定することができた。一部のタンパク質は機能未知であったが、当該タンパク質の全配列をさらに相同性検索することで、類縁タンパク質の機能を推定することができた。これらのタンパク質が正しく同定されているかは、複数のペプチドの配列相同性から検証した。

得られたタンパク質は機能から大きく「代謝活性促進関連タンパク質」(緑)、「生体防御関連タンパク質」(橙)、および「その他の機能タンパク質」(灰)に分類された。これらのタンパク質は、スフィンゴシン無添加の発芽においては誘導されていないことから、スフィンゴシン添加によるシグナルを受けて発芽促進されたことから、スフィンゴシン

レセプターからのシグナルトランスダクションの経路に関連すると考えられたが、本研究において、レセプター分子を特定することはできなかった。

Table 1 スフィンゴシンにより *N. rileyi* に特異的に発現した発芽期タンパク質

spot	Protein
1	Putative Hsp70-like protein
2	Heat shock protein ST1 1
3	HSP60-like protein
4	ATP synthase beta chain
5	phosphoglycerate kinase
6	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family protein
7	UDP-glucose 4-epimerase
8	Aha1 domain family
9	glucosyltransferase
10	cytochrome c peroxidase
11	GTP-binding nuclear protein GSP1/Ran
12	HEX-1 like protein
13	HEX-1 like protein
14	translationally controlled tumor protein-like variant 1
15	nitroreductase
16	N-alpha-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit
17	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin B, variant 2
18	allantoin permease
19	superoxide dismutase Cu-Zn
20	cofilin/tropomyosin-type actin-binding protein
21	Ubc5p

一方、スフィンゴシンは *N. rileyi* には発芽促進活性は示すが、現在糸状菌製剤として用いられている *Beauveria bassiana* には促進活性を示さない。したがって、両者のプロテオームを比較すれば、*N. rileyi* に特異的なレセプターの存在が見出せると考えられた。そこで、両者の2次元電気泳動像を比較したが、そのプロファイルは大きく異なり、特異的レセプターの同定には繋がらなかった。しかし、今後両者の詳細な比較を行うことにより、*N. rileyi* に特異的な代謝経路が見出される可能性がある。

以上の結果より、Fig.2 に示すように、*N. rileyi* にはスフィンゴシンに特異的なレセプターが存在し、その刺激によって、多くの代謝関連酵素発現（緑）が亢進し、また、その急速な発芽促進に対して、新たに生体防御系のタンパク質（橙）が発現していることが明らかとなった。なお、この促進には Ala と His が必要であることも明らかにしている。

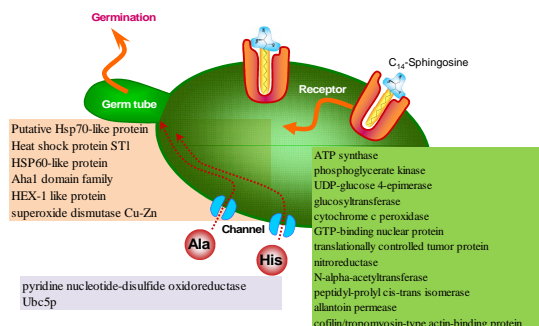


Fig.2 スフィンゴシンにより特異的に促進する *N. rileyi* の発芽と特異的に発現した発芽期タンパク質群

なお、下記の通り、産業財産権については研究開始前に出願済みであり、本研究機関中に取得済である。

名称：スフィンゴシンを含有する昆虫病原糸状菌発芽促進剤

発明者：荒木朋洋・小野政輝・野田孝博

権利者：学校法人東海大学

種類：PCT

番号：PCT/JP2010/057363

出願年月日：2010年4月26日

国内外の別：国際

取得状況

名称：スフィンゴシンを含有する昆虫病原性糸状菌発芽促進剤

発明者：荒木朋洋・小野政輝・野田孝博

権利者：学校法人東海大学

種類：

番号：5309335

出願年月日：2009年4月28日

取得年月日：2013年7月12日

国内外の別：国内

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)

[学会発表](計 4件)

1. Tomofumi Nakajima, Takahiro Noda and Tomohiro Araki (2013.12.7) Germination Acceleration of Entomopathogenic Fungus. 17th Asian Agricultural Symposium. Proceedings of The 17th Asian Agricultural Symposium P40, Kumamoto, Japan.

2. Tomofumi Nakajima, Takahiro Noda, Tomohiro Araki (2013.9.15) Proteomic analysis of C14-sphingosine-triggered germination of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. 12th Human Proteome Organization Congress. Abstract p132. Yokohama, Japan.

3. 中島智史, 野田孝博, 荒木朋洋 (2013.3.25) 昆虫病原性糸状菌の発芽に関するプロテオミクス研究. 日本農芸化学会2013年度大会(東北大学, 仙台市, 宮城県)講演要旨集 p300.

4. 中島智史, 野田孝博, 荒木朋洋 (2012.9.28) 昆虫病原性糸状菌の発芽に関するプロテオミクス研究. 日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会(鹿児島大学, 鹿児島市, 鹿児島県)講演要旨集 p40.

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒木 朋洋 (ARAKI, Tomohiro)

東海大学・農学部・教授

研究者番号：20193071