

実施課題名： 植物病原菌エフェクタータンパク質の構造基盤の確立

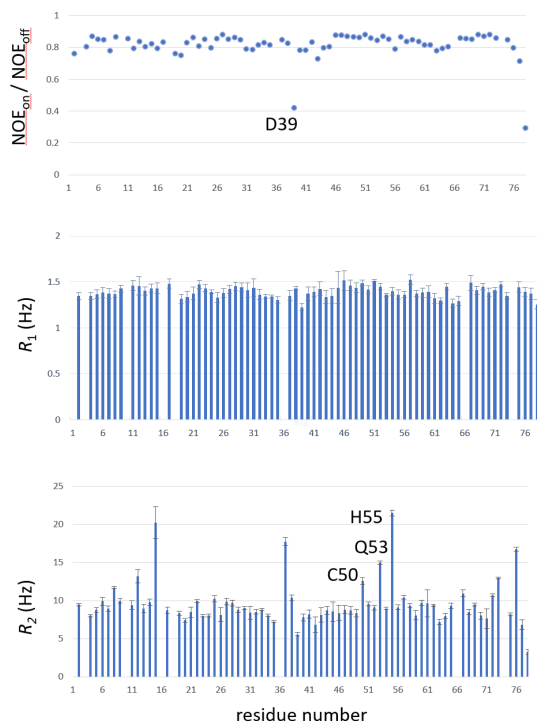
【背景】

植物病原菌は、数百種類ものエフェクターと呼ばれる分泌タンパク質を駆使して感染を成立させる。感染の分子メカニズムは不明な点が多く、全容は定かではない。本課題の研究対象タンパク質は、ウリ科植物の炭疽病の原因となる糸状菌が分泌するエフェクターのうち半共生に必須な分子である。本課題の目的は、この必須エフェクターのダイナミクスをNMRで解明することである。得られたデータを基に、生理活性の発現に重要な役割を果たしているアミノ酸残基を推定する。

【実施内容】

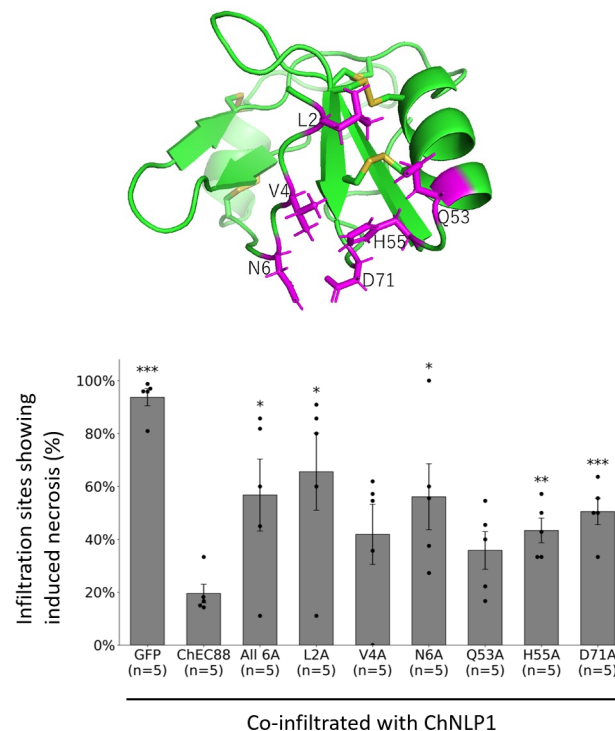
安定同位体 ^{15}N 標識試料を用いて、NMRで緩和測定を行った。

Fig. 1



緩和時間の解析結果

Fig. 2



注目したアミノ酸残基と各変異体の生理活性データ

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF24-01-081			
利用課題名	植物病原菌エフェクタータンパク質の構造基盤の確立			
所属機関	北陸先端科学技術大学院大学			
所属部署	ナノマテリアルテクノロジーセンター			
役職・氏名	役職	教授	氏名	大木進野
利用実施時期、及び期間	2025 年 1 月 1 日～2026 年 3 月 31 日 総利用日数： 7 日 ☐ 当初計画どおり・ ☒ 当初計画変更 (変更理由) 当初は2種類の試料で合計1か月程度の利用を予定していた。最初の分子については緩和測定をしていただいたが、もう1種類の試料は安定性に難があり依頼することができなかった。			

1. 本課題の概要・目的

植物病原菌は、エフェクターと呼ばれる分泌タンパク質を駆使して感染を成立させる。1 種類の病原菌が分泌するエフェクターやエフェクター候補分子は数百種類もあることが知られ、そのうちの幾つかが感染成立に決定的な役割を果たしているのではないかと予想されている。その詳細を解明すべく、現在は、感染に決定的な役割を果たす必須エフェクターの同定やそれらの機能の研究が世界中で進んでいるところである。

本課題の研究対象タンパク質は、ウリ科植物の炭疽病の原因となる糸状菌が分泌するエフェクターのうち近年同定された2つの分子であり、これらはいずれも感染に必須である。また、これらのエフェクターと直接結合する植物のタンパク質も特定されつつある。本課題の目的は、これら必須エフェクターの立体構造やダイナミクス、標的タンパク質との相互作用の NMR 研究を通して、その作用機序を解明することである。

2. 成果の概要

実施内容

大阪大学の 800MHz の装置でエフェクタータンパク質 ChEC88 の緩和測定 (T_1 , T_2 および NOE) を行った。ChEC88 の立体構造は、既に北陸先端大の 800MHz-NMR で取得したデータをもとに解析済みであった。今回の緩和測定の結果を解析することで、分子内部で運動性の高い領域を特定することが出来た。この緩和解析の結果をもとに幾つかのアミノ酸残基をAlaに置換した変異体を作製した。実際に植物体を用いた感染実験を行ってそれら変異体の活性を調べた。感染実験の結果、活性に重要なアミノ酸残基を見出すことが出来た。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

当初は2つの分子について測定を依頼する予定であった。予定していた実験は、既に構造が得られている ChEC88 の緩和時間測定と、立体構造が実験的に決定されていないエフェクター分子の構造解析用のデータセ

ットの取得である。

ChEC88 については、試料の調製方法や NMR 試料の pH や塩濃度などの条件が既に決まっていたため、試料を準備して緩和測定を行っていただいた。しかしながら、もうひとつのエフェクター分子については安定性に難があり、期間内に測定を依頼することが出来なかった。一般に、エフェクター分子は分子内に複数のジスルフィド結合を有するので、試料調製のハードルが高い。また、安定な立体構造を持たないと予想される領域を分子内に持つエフェクターも多く、会合を防ぐ、長時間の試料の安定性を確保する、ドメインを扱うなどの工夫が必要である。

成果発表

学会発表 1 件

BAI, Asihan, 高原浩之, 今村智弘, 坂根光星, 佐々木一紀, 西内巧, 森正之, 大木進野「植物病原菌が分泌するエフェクタータンパク質 ChEC88 の構造とダイナミクス」 第 64 回 NMR 討論会(2025 年、沖縄)

学術論文 1 報

Ohki S, Takahara H, Imamura T, Sakane K, Bai A, Sasaki K, Nishiuchi T, Mori M. Necrosis-Suppressing Effector Protein ChEC88 Adopts a Novel Structural Motif Conserved Among Genus-Spanning Hemibiotrophic Phytopathogens. *Plants*. 2025; 14(16):2562. <https://doi.org/10.3390/plants14162562>

今後の展開

最近、我々は ChEC88 の標的分子を同定することができた(未発表)。今後は、NMRを用いた滴定実験や複合体構造解析を行う予定である。現在は、標的分子の発現系の確立と安定同位体試料の調製を試みている。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

ChEC88 類似タンパク質は半共生の性質を示す病原菌に非常に広く分布していることを我々が報告している。つまり、このエフェクターは宿主特異性に関するものではなく、病原菌が植物へ感染する際の共通のメカニズムを担う重要な役割を果たしていると考えられる。従って、ChEC88 の作用機序を分子レベルで明らかにすることで、いろいろな植物の感染病を阻止するための万能農薬の開発へつながるだろう。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

改善要望はございません。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

今後もこのようなプラットフォームが継続することを期待しています。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

2024 年 1 月 1 日の能登半島地震の影響で、北陸先端科学技術大学院大学が所有している 800MHz-NMR 装置

が全損しました。そのため、今回NMRプラットフォームを初めて利用しました。研究を遅延なく進めることができ、大変感謝しております。どうもありがとうございました。

8. 利用施設

大阪大学

溶液 800MHz

利用期間：2025 年 1 月 1 日～2026 年 3 月 31 日

9. その他の利用施設