

令和 5 年度 学内研究助成金 研究報告書

研 究 種 目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 一般研究助成金	<input type="checkbox"/>
研 究 課 題 名	生体防御タンパク質によるイネの病害抵抗機構の解明	
研究者所属・氏名	研究代表者： 農学部生物機能科学科・大沼貴之 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

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原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。

2. 研究経過及び成果

(1). イネ XIP である riceXIP とイネ立枯れ病菌キシラナーゼ RXyn1 と RXyn2 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、riceXIP は GH10 と 11 どちらのキシラナーゼも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、riceXIP の阻害様式は、いずれも競合阻害であった。

(3). riceXIP 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。riceXIP/RXyn1 混合液および riceXIP/RXyn2 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。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よりも早く、このことから riceXIP は RXyn1 および RXyn2 とそれぞれ安定的な二量体を形成することが示された。

また、3種のタンパク質からなる riceXIP/RXyn1/RXyn2 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が得られ、その溶出時間は riceXIP/RXyn1 および riceXIP/RXyn2 二量体よりも早かった。この結果は riceXIP が RXyn1 および RXyn2 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、riceXIP 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、また、riceXIP 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。これまでに同様の実験を OsXIP を用いて行くと、OsXIP は GH11 キシラナーゼのみと安定的な二量体を形成することを報告している。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 は GH11 のみを阻害する Single Xylanase Inhibitor Protein (sXIP11) であり、riceXIP 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). 本研究の遂行により、イネの XIP には GH11 のみを阻害する Single Xylanase Inhibitor Protein (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。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。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

(4) riceXIP, riceXIP/RXyn1 複合体, riceXIP/RXyn2 複合体および riceXIP/RXyn1/RXyn3 複合体の蒸気拡散法による結晶化とそれに続く X 線結晶構造解析を行うことを予定している。riceXIP, riceXIP/RXyn1 複合体と riceXIP/RXyn2 複合体についてはすでに結晶が得られているので、順次回折実験に供し、構造解析を進める。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)