

カンキツ白かび病菌の病原性株および非病原性株を用いたドラフトゲノム解析とアノテーション解析から見るポリガラクトナーゼ遺伝子について

中村正幸

鹿児島大学農学部食料生命科学科植物病理学研究室

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-2 1-2 4

TEL:099-285-8683

要旨

本実験では、ゲノム解析とアノテーション解析により、白かび病菌の病原性株 S31 および非病原性株 S63 が保持する全てのポリガラクトナーゼ (PG) 遺伝子について特定を行った。その結果、S31 株は 6 個、S63 株は 3 個の PG 遺伝子を保持していた。各 PG のタンパク質発現を大腸菌で行ったところ、S31 株由来では S31PG1、S31PG2 および S31PG6 の 3 つ、S63 株由来では S63PG1 と S63PG2 の 2 つで発現に成功した。それらの中で、レモン果皮分解能 (PP 活性) が認められたものは、S31PG1、S31PG2 および S63PG2 の 3 つであった。PP 活性を保持する PG に共通するアミノ酸を調べたところ、グルタミン酸とトレオニンが基質結合部位の上部に隣接して位置することが分かった。S31 株の PDB およびレモン果皮上での RNA-Seq 解析では、それぞれの PG 遺伝子の発現パターンは異なり、また、カタボライト抑制を受けるものと受けないものが混在していることも判明した。以上の結果から、白かび病菌の病原性発現には、PG が保持する PP 活性に加え、遺伝子の発現制御が、極めて重要であることが示唆された。

緒言

白かび病菌 (*Geotrichum candidum*) は、土壌、乳製品、動植物遺体上に一般的に存在し、汚水の指標菌にも利用され¹⁾、主に腐生生活を営む酵母様糸状菌である。白かび病菌には、カンキツ果実に病原性を示す病原性株と示さない非病原性株が存在する²⁾。病原性株による白かび症状は、水浸状の軟腐症状を示し、病斑進展が極めて早い。一般的に軟腐症状は、病原菌の分泌する植物細胞壁分解酵素 (クチナーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、キシリナーゼなど) が関わっていると考えられている³⁻⁵⁾。しかし、これまでの報告で、これらの酵素が病原性に関与するとの報告がある一方で⁶⁻⁸⁾、病原性に関与しないとする報告もある

ことや^{9,10)}、また病原微生物に限らず、非病原微生物や有用微生物、さらには植物自体にも存在していることなどから、植物細胞壁分解酵素と病原性との関わりにおいては明確な結論が得られていない部分があった。白かび病菌もまた、ペクチン分解酵素の一種であるポリガラクトナーゼ (PG; poly (1, 4-D-galacturonide) glycanohydrolase, E. C. 3. 2. 1. 15) を分泌するが、非病原性株にも PG 遺伝子が存在しており、PG と病原性との関わりが判然としていなかった。しかし、筆者はこれまでに、病原性株 S31 および非病原性株 S63 より、それぞれの PG 遺伝子 (*S31pg1*、*S63pg1*) をクローニングし、組換えタンパク質を用いることで、病原性と非病原性を左右しているのは、PG の持つレモン果皮分解能 (プロトペクチナーゼ活性: PP 活性) であることを明らかにした¹¹⁾。

PG 活性と PP 活性の作用は、同じ触媒部位で行われ、PG 活性の基質は可溶性ペクチンであるの対し、PP 活性の基質は不溶性ペクチン (プロトペクチン) である。プロトペクチンは、植物組織内で重合度が高く、他の多糖類やタンパク質とも結合し、複雑な構造をとっている。しかし、PG が PP 活性を発揮する際、触媒部位と結合するのは、PG 活性と同じく、プロトペクチンを構成しているポリガラクトン酸である。つまり、PG の PP 活性は、プロトペクチン内に存在するポリガラクトン酸に結合できる能力があるかどうか鍵となり、その結合能には、PG の立体構造が影響していると予想される。

そこで、本研究では、病原性株と非病原性株のそれぞれのドラフトゲノム解析を行い、ゲノム上に存在する全ての PG 遺伝子を明らかにし、それを基に、それぞれのアミノ酸配列および予測立体構造の比較を行うと共に、病原性株 S31 由来 PG 遺伝子の RNA 発現パターンも調べることで、白かび病菌における PG の病原性発現機構について考察した。

1. 材料と方法

1.1 供試菌株と培養

供試菌株は、当研究室のフリーザー (−80℃) に保存されている S31 株 (病原性株) と S63 株 (非病原性株) を用いた。培養は、PDA または PDB 培地を用いて行った。

発現用ベクターの構築には、大腸菌 JM109、タンパク質発現用の大腸菌には ShuffleT7 を用いた。大腸菌の培養には LB 培地を用い、プラスミド保持株の選抜にはアンピシリン (100μg/ml) を添加した。

1.2 ドラフトゲノム解析と RNA-Seq 解析

DNA の抽出は、Takara NucleoSpin Plant II を用い、抽出 DNA は、Covaris により断片化を行った。ゲノムライブラリーは、MGIEasy Universal DNA Library Prep Set と MGISP-100 を用いて構築した。また、アダプターには、MGIEasy DNA Adapters-16 Kit を用いた。環状化 DNA は、MGIEasy Circularization Kit を用いて行い、DNA ボールは、DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Kit により構築した。シーケンシング解析は、DNBSEQ-G400 を用いて、2X150 bp の条件で実施した。

Total RNA の抽出は、Takara NucleoSpin RNA Plant を用いて行い、ライブラリーは、MGIEasy RNA Directional Library Prep Set を用いて構築した。環状化 DNA と DNA ボール

は、上述の通りに作成し、シーケンシング解析も同じく、DNBSEQ-G400 を用いて、2X150 bp の条件で実施した。

1.3 アセンブリとアノテーション解析

ゲノムアセンブリは、まず、フォワードとリバースそれぞれのリードを Fastp と Trimmomatic のプログラムを用いて、アダプター除去とトリミングを行った後に、Shovill Faster SPAdes assembly プログラムを用いて、実行した。いずれのプログラムも Galaxy (<https://usegalaxy.org/>)内のウェブツールを利用した。

アノテーション解析は、AUGUSTUS¹²⁾を用い、パラメーターとして *Candida albicans* を利用し、コード遺伝子の推定を行った。タンパク質の機能は、GhostKOALA¹³⁾を用いて予測した。

1.4 RNA 発現(TPM)解析

アセンブリの際と同じように、フォワードとリバースそれぞれのリードを Fastp と Trimmomatic のプログラムを用いて、アダプター除去とトリミングを行った後に、Kallisto quant を用いて発現量(TPM)を解析した。

1.5 PG タンパク質発現

発現用ベクターは、各 PG 遺伝子を PCR 増幅後 (Table 1)、pET23-b に挿入し構築した。構築ベクターは、大腸菌 ShuffleT7 にエレクトロポレーションで導入後、IPTG で目的タンパク質の発現を誘導した。発現タンパク質は、集菌した大腸菌から BugBuster (Merck) を用いて抽出を行った。

1.6 PG 活性および PP 活性測定

PG 活性は、2%アガロースに 1%ペクチンを添加した cup-plate 法¹⁴⁾により活性の有無を調べた。PP 活性は、直径 5mm のレモン果皮片(アルベド、フラベド含)を用い、分解程度により活性の有無を調べた。

1.7 タンパク質立体構造の予測

人口知能プログラムである AlphaFold2¹⁵⁾を用いて各 PG のタンパク質立体構造を予測解析した。

Table 1 Primers used for vector construction

S31pg1-F	AAGGAGATATACATATGGGCGGCGCCTGTGTTTTCA
S31pg1-R	GGTGGTGGTGCTCGAGAAGTCTGCAAGTAGCACCA
S31pg2-F	AAGGAGATATACATATGGGCGGCGCCTGTGTTTTCAA
S31pg2-R	GGTGGTGGTGCTCGAGAATGTTGCAAGTAGCACCAG
S31pg3-F	AAGGAGATATACATATGGCGCCACCGAGTCTGAGGT
S31pg3-R	GGTGGTGGTGCTCGAGGTTCTTGCAAGAGGCGTTGG
S31pg4-F	AAGGAGATATACATATGGCCCCTATCAACCCCACTA
S31pg4-R	GGTGGTGGTGCTCGAGGGTCTCACAAGCAATACCAG
S31pg5-F	AAGGAGATATACATATGCAAGTTAATTGTGTTTTAC
S31pg5-R	GGTGGTGGTGCTCGAGGGAAGCCTGGCAAGAGGCAG
S31pg6-F	AAGGAGATATACATATGGGCAGCGCCTGTGTTTTAA
S31pg6-R	GGTGGTGGTGCTCGAGAAGTTTGCAAGTAGCACCAG
S63pg1-F	AAGGAGATATACATATGGCGCCCACTGAGACTGAGG
S63pg1-R	GGTGGTGGTGCTCGAGGTTCTTGCAAGTAGCGTTG
S63pg2-F	AAGGAGATATACATATGGCTAGCTCTTGTGTTTTCAA
S63pg2-R	GGTGGTGGTGCTCGAGGACCTTGCAAGTAGCAGGAG
S63pg3-A	AAGGAGATATACATATGCAGCAAACTGCGTTTTTAC
S63pg3-B	GAGTTCTTGACGCCGTTACCTCCATGGTAA
S63pg3-C	GGTAACGGCGTCAAGAACTCCCCGTCCAT
S63pg3-D	GGTGGTGGTGCTCGAGGGCAGCACTGCAAGAAGCAG

Italic letters indicate restriction sites: *Nde*I, *Xho*I.

2. 結果と考察

2.1 S31 株と S63 株のアノテーション解析

S31 株(病原性株)のゲノムサイズは 25.3Mb、GC 含量 39.64%、推定遺伝子数 6,514 個、総外分泌タンパク質数は 239 個であり、PG をコードしている遺伝子数は全部で 6 個であった (Table 2)。いずれの PG 遺伝子にもイントロンは存在しなかった。それぞれの PG 遺伝子名を *S31pg1*~*S31pg6* とした。一方、S63 株(非病原性株)のゲノムサイズは、24.0Mb、GC 含量 41.2%、推定遺伝子数 6,507 個、総外分泌タンパク質数は 272 個、PG コード遺伝子数は 3 個であった (Table 2)。それぞれの PG 遺伝子名を *S63pg1*~*S63pg3* とした。また、*S63pg3* のみにイントロン (1 箇所) の存在が認められた。全 9 種類の PG アミノ酸配列間における一致性 (%) は、Table 3 に示した。

今回得られた塩基配列を基に再同定を行ったところ、S31 株はカンキツ白かび病菌であ

る *Geotrichum candidum* var. *citri-aurantii* であり、S63 株は、*G. candidum* に極めて近縁である *G. pseudocandidum* であることが判明した。

Table 2 Genome and annotation analyses

	Genome size	GC content	Coding genes	Secretome	PG genes
S31	25.3 Mb	39.64 %	6,514	239	6
S63	24.0 Mb	41.2%	6,507	272	3

Table 3 Identity (%) of amino acid sequences among PGs

PG	S31PG1	S31PG2	S31PG3	S31PG4	S31PG5	S31PG6	S63PG1	S63PG2	S63PG3
S31PG1	-	93.5	64.4	59.1	48.0	91.0	64.1	81.5	46.1
S31PG2	-	-	62.8	58.4	46.4	88.8	62.5	82.6	44.4
S31PG3	-	-	-	51.2	51.7	67.0	88.9	66.5	49.7
S31PG4	-	-	-	-	46.1	60.3	51.2	60.5	44.0
S31PG5	-	-	-	-	-	50.0	50.3	50.3	74.6
S31PG6	-	-	-	-	-	-	67.0	84.5	48.2
S63PG1	-	-	-	-	-	-	-	64.9	48.8
S63PG2	-	-	-	-	-	-	-	-	47.6

2.2 PG タンパク質発現と PG 活性

S31 株由来の PG 遺伝子 6 個と S63 株由来の 3 個、計 9 遺伝子について、それぞれの PG タンパク質を発現させた。抽出したそれぞれのタンパク質を用いて、cup-plate 法により、クリアゾーンによる PG 活性の検出を行ったところ、S31 株由来 PG では、S31PG1、S31PG2 および S31PG6 で明瞭な活性が認められ、S31PG3 では僅かな活性が認められた (Fig. 1a)。残りの S31PG4 と S31PG5 では、活性が確認できなかった。S63 株由来 PG では、S63PG1 と S63PG2 で、明瞭な活性が認められ、S63PG3 では、活性が認められなかった (Fig. 1b)。今回、活性が認められなかった PG については、ShuffleT7 とは異なる系統である Origami を用いた場合でも、PG 活性は検出できなかったことから (データは示していない)、これらの PG タンパク質は、大腸菌内でのコンフォメーションが正常に行われず、封入体を形成したと思われる。発現しなかった PG については、今後、真核生物である酵母 (*Pichia pastoris*) などを用いて発現させ、可溶化タンパク質を得る必要がある。

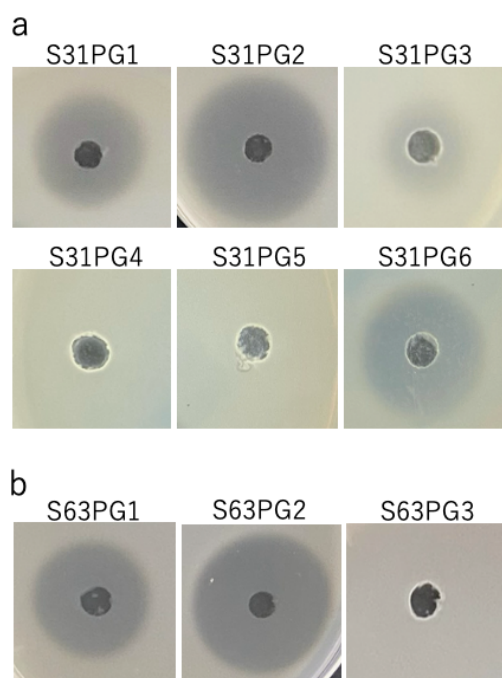


Fig. 1 PG activity of expressed PGs.

2.3 発現 PG の PP 活性 (レモン果皮分解能)

タンパク質発現に成功した S31PG1、S31PG2、S31PG6、S63PG1 および S63PG2 を用いて、それぞれをレモン果皮片(フラベドとアルベドを含む)に作用させたところ、S31PG1、S31PG2、S63PG2 で PP 活性が認められ、S31PG6、S63PG1 では認められなかった(Fig. 2)。S31 株由来 S31PG1 は、本菌株の病原性因子であることを既に報告しているが¹¹⁾、驚いたことに、非病原性株である S63 株由来 S63PG2 にも PP 活性が認められた。もし、S63PG2 がレモン果実上で高発現するならば、腐敗症状を示すと考えられる。つまり、*S63pg2* の遺伝子発現制御システムが S63 株の非病原性に影響している可能性があり、今後、S63 株の PG 遺伝子発現パターンを RNA-seq 解析等で解明していく必要がある。

2.4 PG タンパク質の予測立体構造

各 PG のアミノ酸配列を基に、AI アルゴリズムの AlphaFold2 を用いて、PG タンパク質立体構造を予測した(Fig. 3)。その結果、基質結合部位(cleft)を挟んだ上下の二次構造に違いが見られた。結合部位上部に存在する α -ヘリックス構造の長さや下部に存在するコイル構造に違いが認められた。これらの構造の違いが、PP 活性(病原性)に実際、影響しているかは、今回の解析だけでは判断できない

が、基質結合部位から離れた部分のサブサイト構造が、酵素活性に影響を与えるとする報告があることから¹⁶⁾、これらの領域が PP 活性を左右している可能性が考えられる。PP 活性は、PG 活性と同じく、結合する基質は、ポリガラクトuron酸である。しかし、植物組織内に存在するプロペクチンは、重合度も高く、ホモガラクトuron、ラムノガラクトuron I および II の 3 つから構成されており、かつ他の多糖類とも結合していることから、極めて複雑な構造をとっている。つまり、その複雑な構造内のポリガラクトuron酸領域に結合する際に、このサブサイト構造が影響を与えている可能性がある。

今回、タンパク質発現に成功した 5 つの PG の内、PP 活性を保持していた S31PG1、S31PG2、および S63PG2 と PP 活性を保持していなかった S31PG6 と S63PG1 のアミノ酸配列を基にアライメントを行ったところ、PP 活性を保持している 3 つの PG のみに特異的に存在する 2

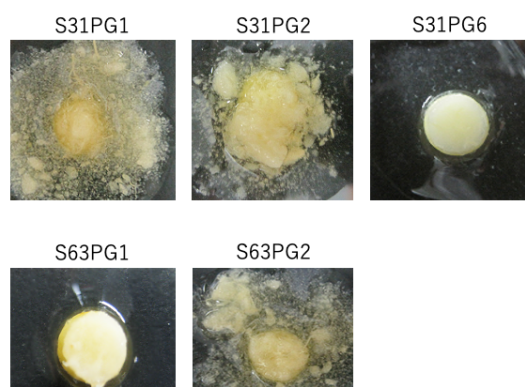


Fig. 2 PP activity of expressed PGs.

つのアミノ酸、グルタミン酸(E)とトレオニン(T)が認められた (Fig. 4)。非常に興味深いことに、この 2 アミノ酸は、立体構造上では、cleft の上部に隣接して位置していることが分かった (Fig. 4)。おそらく、この領域が基質結合に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。今後は、今回発現に至らなかった PG も発現せし、全 9 種における PP 活性の有無を明らかにすることで、PP 活性を保有するものに特徴的なアミノ酸配列と立体構造が見出されれば、病原性を決定づけている PG の発病機構の解明に繋がることが期待される。

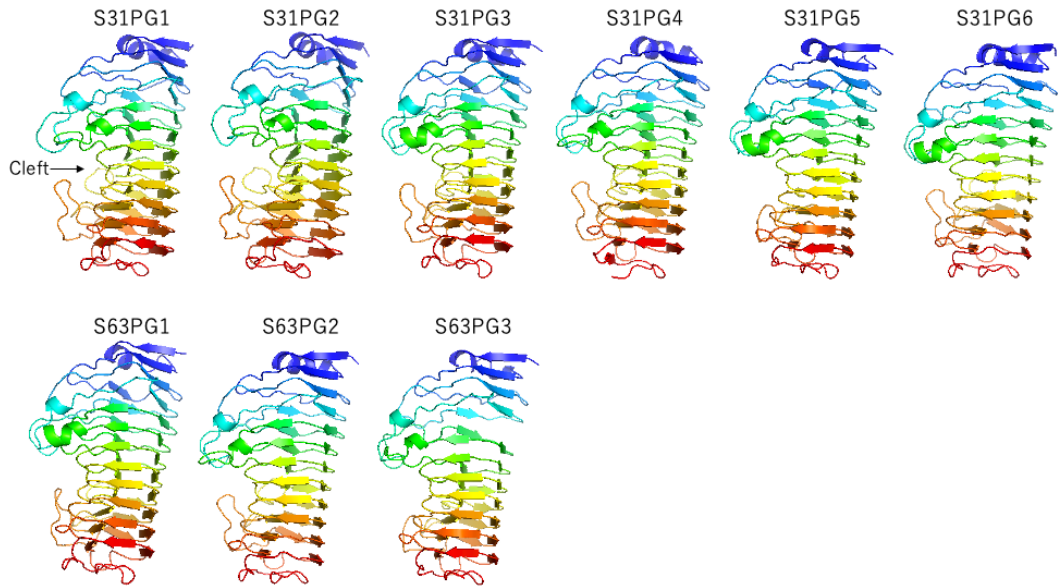


Fig. 3 Predicted protein structures of PGs.

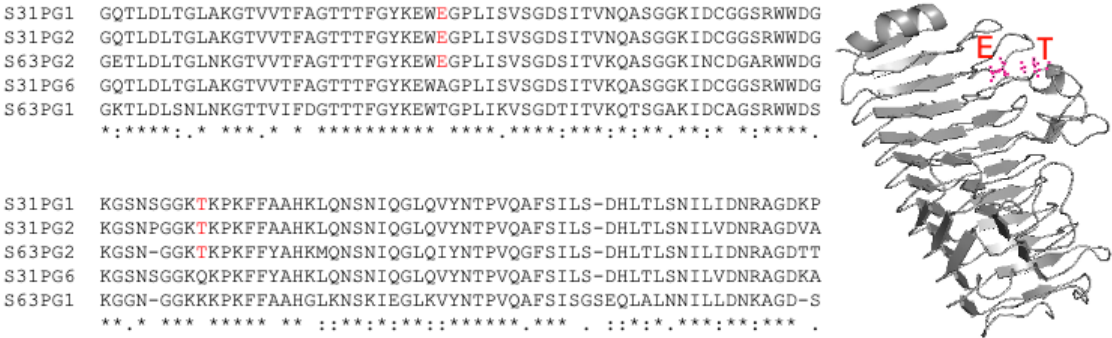


Fig. 4 Conserved amino acids of PGs with PP activity in common.

2.5 S31 株由来 PG 遺伝子の RNA 発現解析

S31 株の PDB 培地およびレモン果皮上での RNA-seq 解析を行い、S31 株が保持する全 6 つの PG 遺伝子発現量を調査した (Fig. 5)。その結果、レモン果皮上で最も高く発現していたのは *S31pg4* で、TPM 値が 1105.28 であり、最も発現量の低かった *S31pg3* の 6.0 とは大きく差が認められた。興味深いことに、既に病原性因子として認められている *S31pg1* の発現量は 23.84 であり、予想に反しそれほど高い発現ではなかった。

グルコースによるカタボライト抑制を受けたものは、*S31pg3*、*S31pg4*、*S31pg6* で、特にレモン果皮上で最も発現量が高かった *S31pg4* は、PDB 培地での発現が 0.8 となり、極めて強い抑制を受けていた。逆に、*S31pg1*、*S31pg2*、*S31pg5* は、グルコース存在下でも発現が促進される結果となった。

以上の結果から、レモン果皮上で発現が最も高かった *S31pg4* が、病原性に関与している可能性も考えられるが、PP 活性を保持していた PG に特異的に保存されていたグルタミン酸が S31PG4 ではアスパラギン酸であったことから、PP 活性を保持していない可能性があり、その場合、どれだけ高発現していようと、レモン果皮分解は起こらないことになる。今回の実験で、S31PG4 のタンパク質発現は成功しなかったことから、本 PG タンパク質が PP 活性を保持しているかは不明である。今後は、S31PG4 の酵母などによるタンパク質発現を行うことで、本タンパク質の特性を明らかにできれば、S31 株の病原性発現機構の全容解明に繋がることとが期待される。

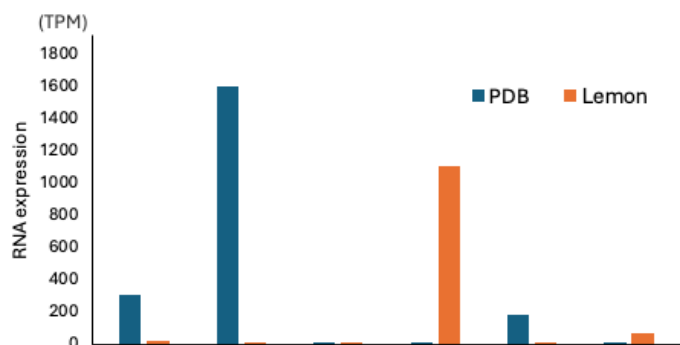


Fig. 5 RNA expression analysis of PG genes from strain S31.

3. 結論

白かび病菌の病原性株 S31 のゲノム上には 6 個 (*S31pg1* ~ *S31pg6*) の PG 遺伝子が、非病原性株 S63 株のゲノム上には 3 個 (*S63pg1* ~ *S63pg3*) の PG 遺伝子が、それぞれコードされていることが分かった。S31 株由来の PG では、今回発現に成功した 3 つの PG の内 S31PG1 と S31PG2 に PP 活性

が認められ、S31PG6 には認められなかった。興味深いことに、非病原性である S63 株の PG でも、S63PG2 に強い PP 活性が認められた。PP 活性が認められた 3 つの PG には、基質結合部位の上部に隣接して存在する 2 つのアミノ酸 (グルタミン酸、トレオニン) が共通していたことから、これらのアミノ酸が PP 活性に関与している可能性が示唆された。S31 株の RNA-Seq 解析では、レモン果皮上での PG 遺伝子発現パターンがそれぞれ大きく異なっており、カタボライト抑制を受けるものと受けないものが混在していた。以上の結果から、白かび病菌の病原性発揮には、PG の持つ PP 活性に加え、感染時の遺伝子発現制御が大きく関わっていることが示唆された。

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究費助成をしていただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

5. 引用文献

1. Tubaki, K. (1962). Studies on a slime-forming fungus in polluted water. Trans. Mycol. Soc. Jpn. 3: 29-35
2. Butler, E. E., Webster, R. K. and Eckert, J.W. (1965). Taxonomy, pathogenicity and physiological properties of the fungus causing sour rot of citrus. Phytopathology 55:1262-1268
3. Barmore, C. R. and Brown, G. E. (1979). Role of pectolytic enzymes and galacturonic acid in citrus fruit decay caused by *Penicillium digitatum*. Phytopathology 69: 765-768
4. Bateman, D. F. and Millar, R. L. (1966). Pectic enzyme in tissue degradation. Ann. Rev. Phytopathol. 4: 119-146
5. Brown, W. (1965). Toxins and cell-wall dissolving enzymes in relation to plant disease. Ann. Rev. Phytopathol. 3: 1-18
6. Dickman, M. B., Podila, G. K. and Kolattukudy, P. E. (1989). Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. Nature 342:446-448
7. Isshiki, A., Akimitsu, K., Yamamoto, M. and Yamamoto, H. (2001). Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 749-757
8. Yakoby, N., Freeman, S., Dinoor, A., Keen, N. T. and Prusky, D. (2000). Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides* in *C. magna* promotes pathogenicity. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 887-891
9. Apel-Birkhold, P. C. and Walton, J. D. (1996). Cloning, disruption, and expression of two endo-beta-1, 4-xylanase genes, *XYL2* and *XYL3*, from *Cochliobolus carbonum*. Appl. Environ. Microbiol. 62:4129-4135
10. Di Pietro, A. and Roncero, M. I. G. (1998). Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 91-98
11. Nakamura M, Iwai H, Arai K. (2003). Polygalacturonase S31PG1 from *Geotrichum candidum* citrus race S31 expressed in *Schizosaccharomyces pombe* versus S31PG2 regarding soft rot on lemon fruit. J. Gen. Plant Pathol. 69: 283-291
12. Hoff, K. J. and Stanke, M. (2013). WebAUGUSTUS - a web service for training AUGUSTUS and predicting genes in eukaryotes. Nucleic Acids Res. 41: W123-W128

13. Kanehisa, M., Sato Y. and Morishima, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. (2016) *J. Mol. Biol.* 428: 726-731
14. Dingle, J., Reid, W.W. and Solomos G.L. (1953). The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the “cupplate” assay to estimation of enzymes. *J. Sci. Food Agric* 4:149-155
15. Jumper, J., Evans R., Pritzel A., Green, T., Figurnov M. et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589
16. Mercadante, D., Melton, L.D., Jameson, G.B., Williams, M.A. and De Simone, A. (2013). Substrate dynamics in enzyme action: rotations of monosaccharide subunits in the binding groove are essential for pectin methylesterase processivity. *Biophys. J.* 104: 1731-1739

Polygalacturonase genes in terms of draft genome and annotation analyses using citrus sour rot pathogen S31 and nonpathogen S63

Masayuki Nakamura

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University

1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan

In this experiment, the pathogenic strain S31 and the non-pathogenic strain S63 of the sour rot pathogen were used to identify all genes encoding polygalacturonases (PGs), which are important for soft rot symptoms, retained by each strain by draft genome and annotation analyses. The results showed that strain S31 and S63 harbor six and three PG genes, respectively. Expression of each PG was performed in *E. coli*, and S31PG1, S31PG2 and S31PG6 were successfully expressed from strain S31, and S63PG1 and S63PG2 from strain S63. Among them, three were found to have lemon peel degrading ability (PP activity): S31PG1,

S31PG2 and S63PG2. Examination of the amino acids common to PGs retaining PP activity revealed that glutamic acid and threonine were located above the substrate binding site. RNA-Seq analysis of S31 on PDB and lemon peel showed that the expression patterns of the respective genes were different and some of them were found to be catabolite-suppressed or non-catabolite-suppressed. These results suggest that gene expression patterns, in addition to the PP activity maintained by the PGs, are extremely important for the virulence of the sour rot pathogen.