

Title	植物病原菌 Colletotrichum orbiculare 由来エフェクターEPC3の機能ドメインのNMRによる構造解析
Author(s)	許, 喆
Citation	
Issue Date	2026-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	https://hdl.handle.net/10119/20602
Rights	
Description	Supervisor: 大木 進野, 先端科学技術研究科, 博士

博士論文

植物病原菌 *Colletotrichum orbiculare* 由来エフェクター
EPC3 の機能ドメインの NMR による構造解析

許 喆

主指導教員 大木 進野

北陸先端科学技術大学院大学

先端科学技術専攻

マテリアルサイエンス

令和 8 年 3 月

Abstract

Effector proteins secreted by plant-pathogenic fungi play central roles in host colonization by modulating cellular processes and suppressing plant immunity. Despite their importance, the molecular mechanisms underlying the functions of most fungal effectors remain poorly understood, largely due to a lack of structural and biophysical information. This knowledge gap has limited our ability to rationally interpret effector evolution and to develop structure-guided strategies for disease control. EPC3 (Effector Protein for Cucurbit Infection 3), identified from *Colletotrichum orbiculare*, is one such virulence factor required for full pathogenicity during cucurbit anthracnose. Although EPC3 has been shown to contribute to infection in planta, the structural basis of its function and stability has remained unexplored.

In this study, I focused on the N-terminal half of EPC3, a region previously demonstrated to be essential for virulence-associated activity. I successfully established a recombinant expression and purification system for this domain and determined its three-dimensional solution structure by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. This work provides the first experimentally determined structure of EPC3 and represents one of the few high-resolution NMR structures reported for small cysteine-rich fungal effector proteins.

The EPC3-ND (EPC3-N domain) adopts a compact β -rich fold stabilized by three intramolecular disulfide bonds. These covalent constraints generate a rigid structural scaffold composed of five β -strands arranged in a β -sandwich topology, a fold frequently observed among secreted fungal effectors. Backbone dynamics analyses based on ^{15}N relaxation measurements revealed a clear segregation of dynamic properties: the β -sheet core exhibits uniformly high rigidity on the ps-ns timescale, whereas several surface-exposed loop regions display pronounced flexibility, including motions on slower timescales. This structural organization suggests a functional division in which a stable core supports adaptable surface elements that may participate in molecular recognition.

Structural homology searches and direct comparisons with known effector structures, including members of the SIX (SIX; Secreted in xylem) family, revealed significant similarity at the fold level despite low amino acid sequence identity. Notably, conserved cysteine residues and disulfide connectivity patterns underpin this structural conservation, while sequence variability is concentrated in solvent-exposed loop regions. These observations indicate that EPC3 belongs to a conserved structural family of fungal effectors in which functional diversification is achieved primarily through variation in surface residues rather than changes in the overall fold.

To explore the potential involvement of EPC3-ND in carbohydrate recognition, I conducted ^1H - ^{15}N HSQC-based titration experiments using representative soluble disaccharides (maltose, lactose, and D-(+)-cellobiose). No detectable chemical shift perturbations, peak broadening, or intensity changes were observed even at high sugar-to-protein molar ratios. Consistently, structural inspection revealed the absence of a canonical aromatic-rich carbohydrate-binding pocket. These results indicate that EPC3-ND does not directly bind these soluble disaccharides under the experimental conditions tested, suggesting that carbohydrate recognition is unlikely to represent its primary mode of molecular interaction.

Importantly, disruption of individual disulfide bonds by site-directed mutagenesis caused severe structural destabilization and loss of biological activity, demonstrating that correct disulfide bond formation is essential for maintaining the native, functional conformation of EPC3-ND. Together, these findings highlight the critical role of disulfide-stabilized topology in preserving both the structural integrity and functional competence of this effector domain.

Overall, this work provides the first structural and biophysical characterization of EPC3, integrating high-resolution structure determination, backbone dynamics, and exploratory carbohydrate-binding analysis. These findings establish a foundation for future studies aimed at identifying the physiological host targets of EPC3 and elucidating its role in fungal infection and immune modulation.

Keywords: *Colletotrichum orbiculare*, effector, EPC3, NMR, functional domain

目次

第 1 章 緒論	6
1.1 植物病原菌とエフェクターの概説	7
1.2 エフェクター研究における構造解析手法の概要	10
1.2.1 各構造解析手法の発展と比較	10
1.2.1.1 X 線結晶構造解析 (X-ray crystallography)	10
1.2.1.2 クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM)	11
1.2.1.3 溶液核磁気共鳴 (NMR)	11
1.2.2 本研究における手法選択の妥当性	12
1.3 本研究の目的	14
1.4 参考文献	15
第 2 章 試料調製と品質評価	18
2.1 緒言	18
2.2 実験方法	18
2.2.1 構造予測による EPC3 の立体構造モデリング	18
2.2.2 発現ベクターおよびタグ設計	20
2.2.3 形質転換および発現条件	22
2.2.4 可溶性および不溶性画分の解析	23
2.2.5 EPC3-ND 発現条件の最適化	23
2.2.6 アフィニティクロマトグラフィーイオンにおける金属イオンの選択	23
2.2.7 バッファー交換およびタグ除去前処理	24

2.2.8 TEV プロテアーゼ添加量の最適化	25
2.2.9 逆相 HPLC による最終精製	25
2.2.10 MALDI-TOF-MS による目的タンパク質の分子量確認	26
2.2.11 ジスルフィド結合パターンの決定	26
2.2.12 CD 測定による 2 次構造特性の評価	27
2.3 結果と考察	28
2.3.1 タンパク質の発現および可溶性画分の解析	28
2.3.2 EPC3-ND の培養条件最適化	30
2.3.3 IMAC における金属イオン種の選択	31
2.3.4 TEV プロテアーゼによるタグ切断条件の最適化	34
2.3.5 逆相 HPLC による最終精製	36
2.3.6 MALDI-TOF-MS による分子量確認	38
2.3.7 ジスルフィド結合パターンの解析	39
2.3.8 CD 測定結果の解析	40
第 3 章 NMR 実験と解析および構造計算	45
3.1 緒言	45
3.2 実験方法	45
3.2.1 安定同位体標識および試料調製	45
3.2.2 最適測定条件の探索	47
3.2.3 連鎖帰属	48
3.2.4 立体構造の計算	48
3.3 結果と考察	49

3.3.1 NMR 測定条件の最適化	49
3.3.2 連鎖帰属の結果	54
3.3.3 構造計算の結果	57
3.4 参考文献	61
第4章 ダイナミクス解析 (NMR 緩和実験)	63
4.1 緒言	63
4.2 実験方法	63
4.3 結果と考察	64
4.4 参考文献	67
第5章 ジスルフィド結合の役割	69
5.1 緒言	69
5.2 実験方法	70
5.3 結果と考察	70
5.4 参考文献	73
第6章 糖結合解析	74
6.1 緒言	74
6.2 実験方法	75
6.3 結果と考察	76
6.4 参考文献	82
第7章 総括	83
7.1 各章の研究成果とまとめ	83

7.2 考察	84
7.2.1 AF2 予測構造と NMR 実験構造の比較	84
7.2.2 構造ホモロジー解析	85
7.2.3 静電表面ポテンシャル解析	86
7.3 今後の展望	88
7.4 参考文献	90
業績	91
謝辞	92

第1章 緒論

植物病原菌は宿主植物に感染する際、さまざまなエフェクタータンパク質 (effector proteins) を分泌し、植物の免疫応答を抑制あるいは回避することで病原性を発揮する。植物側もこれに対抗して、高度に発達した免疫システムを備えている。代表的なものとして、細胞表面に存在するパターン認識受容体 (PRR; pattern recognition receptor) によるパターン・トリガー免疫 (PTI; pattern-triggered immunity) と、細胞内 NLR (nucleotide-binding leucine-rich repeat receptor) によるエフェクター・トリガー免疫 (ETI; effector-triggered immunity) が知られている。PTI および ETI のいずれにおいても、活性酸素 (ROS; reactive oxygen species) の生成、MAP キナーゼ (MAPK; mitogen-activated protein kinase) 活性化、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇など、多様な防御応答が引き起こされる (Dodds et al., 2010; Bigeard et al., 2015)。

このような植物-病原菌間の共進化的な攻防の中で、病原菌は多様なエフェクターを進化させてきた。エフェクターは一般に 1 次配列の保存性が低く、分子構造や機能が非常に多様であることが知られており、その構造と機能の関係を分子レベルで理解することは依然として大きな課題である (Win et al., 2012)。これまでに多くの植物病原菌のゲノム情報が解析され、多数のエフェクター候補が予測されているが、特に宿主感染に必須な「コアエフェクター (core effectors)」に関する構造的知見は限られている (Stergiopoulos et al., 2009; Win et al., 2012)。

ウリ類炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* においても、RNA-seq 解析により感染過程で特異的に発現するエフェクター群 EPC1 ~ EPC4 (EPC; Effector Protein for Cucurbit infection) が同定されている。その中でも EPC3 は病原性発現に関与することが報告されている (Inoue et al., 2023)。さらに EPC3 は、トマト病原菌 *Fusarium oxysporum* におけるエフェクター SIX6 (Secreted in xylem 6) のホモログであり (Gawehns et al., 2014)、複数の宿主植物において病原性に関与する可能性が示唆されている。このことから、EPC3 は病原菌の感染戦略において保存された機能モチーフを有している可能性があり、その構造的特徴を明らかにすることは、植物病原菌の分子機構を理解する上で重要である。

タンパク質の立体構造解析手法としては、X 線結晶構造解析 (XRC; X-ray crystallography)、核磁気共鳴 (NMR; nuclear magnetic resonance)、クライオ電子顕微鏡

(cryo-EM; cryogenic electron microscopy) などが挙げられる。X 線結晶構造解析は高分解能で構造を決定できる一方、柔軟性の高い小型タンパク質では結晶化が困難な場合が多い。また、cryo-EM は高分子複合体の解析に適しているが、比較的低分子量のタンパク質では分解能が制限される場合がある。これに対して溶液 NMR 法は、溶液中におけるタンパク質の立体構造および動的性質を原子レベルで解析できる手法であり、比較的低分子量のタンパク質や柔軟性を有するタンパク質の解析に適している (Clore et al., 1989; Wüthrich, 2001)。

本研究では、EPC3 の構造と機能との関係を明らかにすることを目的とした。具体的には、病原性に関与する機能ドメインである N 末端領域を対象として、溶液 NMR 法を用いた立体構造および動的特性の解析を行った。また EPC3-ND (EPC3-N domain) 分子内に存在する 3 組のジスルフィド結合の役割を検討するため、これらの結合を欠損させた変異体を作製し、その構造安定性を比較した。さらに、ホモログの SIX6 について指摘されていた糖結合の可能性について、NMR を用いた滴定実験を行って確認した。

これらの解析により、EPC3 の構造的特徴および構造安定化機構を明らかにし、植物病原菌エフェクターの構造基盤の理解に新たな知見を提供することができた。

1.1 植物病原菌とエフェクターの概説

植物と病原菌との相互作用は、長い進化の歴史の中で激しい軍拡競争 (arms race) を繰り返してきた (Jones et al., 2006)。この相互作用の中心的要素が、病原菌が分泌するエフェクターと総称される分子群である。植物病原菌は宿主植物に感染する際、エフェクタータンパク質を宿主細胞内またはアポプラストへ分泌し、植物の免疫応答を抑制あるいは回避することで感染を成立させる。一方、植物はこれに対抗して、PRR や NLR を中核とする多層的な免疫システムを発達させてきた。

植物免疫は一般に「2 層モデル (two-tiered model)」として整理されている。第 1 層は PTI であり、植物細胞表面に存在する PRR が病原体に共通する保存的分子パターン

(PAMP; pathogen-associated molecular pattern; MAMP; microbe-associated molecular pattern) を認識することで誘導される。第 2 層は ETI であり、病原菌エフェクターの侵入あるいはその作用に応答して、植物細胞内の NLR がそれらを感知し、より強力な免疫応答を引き起こす。ETI では、しばしば細胞死や過敏感反応 (hypersensitive response) が誘導され

る。PTIおよびETIのいずれの段階においても、活性酸素（ROS）の生成、MAPキナーゼ経路の活性化、細胞内Ca²⁺濃度の上昇、細胞壁強化、さらにはサリチル酸・ジャスモン酸・エチレンといった植物ホルモンシグナルの変動を伴う多様な下流応答が誘導される（Jones et al., 2006; Tsuda et al., 2010; Bigeard et al., 2015）。植物免疫応答の概略を図1.1に示す。

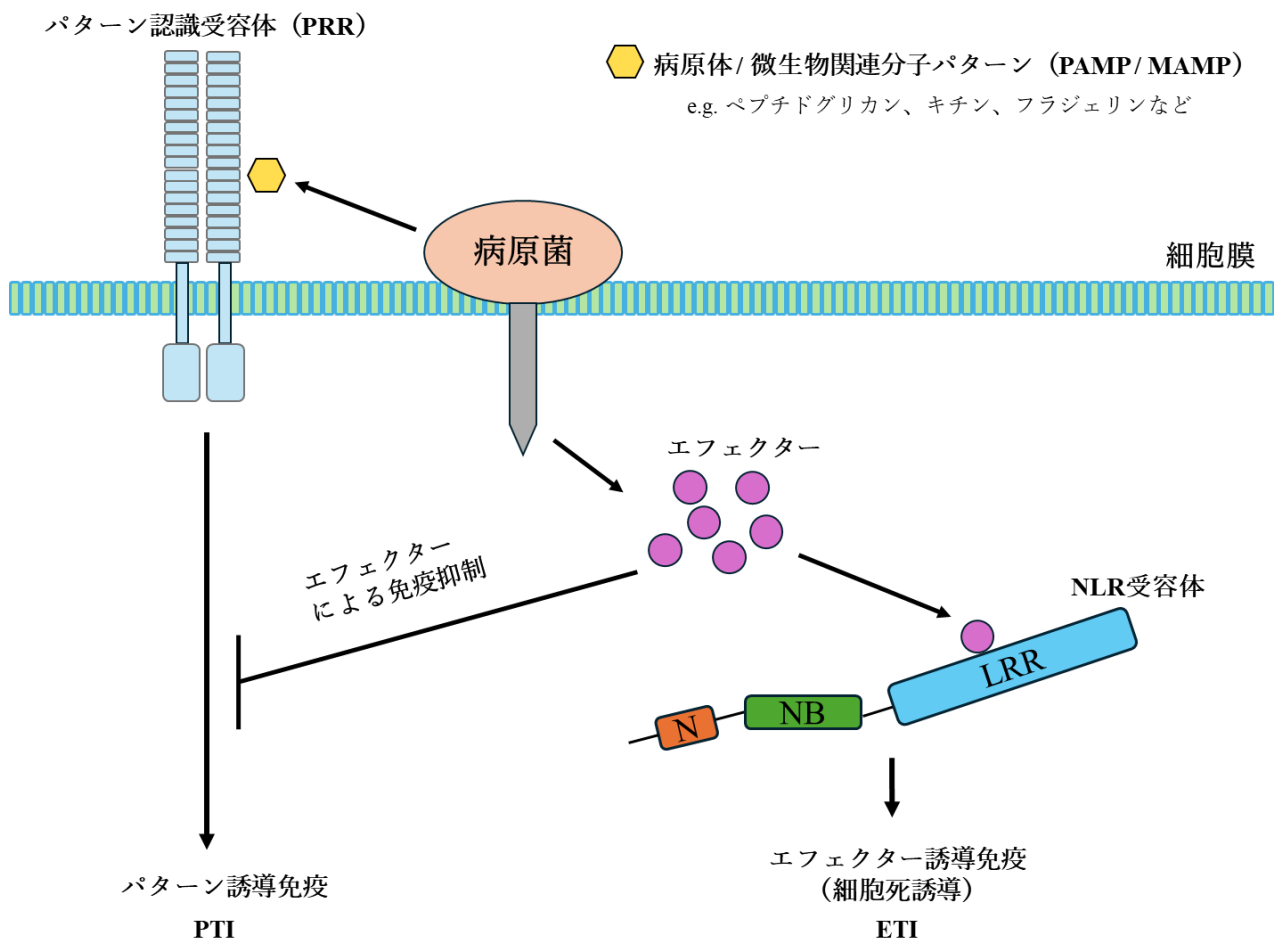


図 1.1. 植物免疫応答の概略図

病原菌側では、このような防御応答に対抗するため、エフェクターの多様化が強い進化的圧力のもとで進行してきた。エフェクターは1次配列レベルでの保存性が低く、構造および機能の多様性が極めて高いため、その同定や機能解析は容易ではない。さらに、一般に小型で可動性が高く、実験条件によっては不安定になりやすい場合があるという特徴も併せ持つ（Lo Presti et al., 2015）。

次世代シーケンス技術、トランスクリプトーム解析、プロテオミクス解析の発展により、多数のエフェクター候補遺伝子が植物病原菌ゲノムから予測されている。しかし、その中で宿主感染や病原性発現に本質的な役割を担うと考えられる「コアエフェクター」については、機能および構造の両面から詳細に解析されている例は依然として限られている

(Stergiopoulos et al., 2009; Win et al., 2012)。そのため、エフェクターにおける構造-機能相関の解明は、植物病原菌-宿主相互作用研究における中心的課題の1つとなっている。

特に、本研究対象である *Colletotrichum* 属は広範な宿主域を有する代表的な植物病原菌群であり、感染初期にはアポプラストを介して進展することが知られている。感染過程の各段階において多様なエフェクターが発現し、宿主細胞応答の制御に関与することが報告されている (Irieda et al., 2019)。

エフェクターは作用局在に基づき、アポプラスティック型とサイトプラスミック型に大別される。アポプラスティックエフェクターは細胞外で機能し、細胞壁分解酵素の阻害や PRR 依存的免疫の抑制を担う。代表例として、*Cladosporium fulvum* の Ecp6 が挙げられ、これは LysM ドメインを介してキチンを高親和性で結合し、PTI の誘導を阻害することが知られている (de Jonge et al., 2010)。一方、サイトプラスミックエフェクターは宿主細胞内に移行し、転写制御やシグナル伝達経路を直接標的化することで、ETI の回避あるいは修飾に関与する。代表例として、*Magnaporthe oryzae* の AVR-Pik や AVR-Pia が挙げられ、これらは宿主 NLR と特異的に相互作用し、免疫応答の活性化または抑制に関与することが示されている (Cesari et al., 2013; Toruño et al., 2016; Maidment et al., 2021)。これらの研究は、エフェクターの立体構造と標的特異性が病原性発現において重要な役割を果たすことを示している (Lo Presti et al., 2015; Toruño et al., 2016)。

さらに、エフェクター遺伝子群の進化動態にも報告されている。ゲノム上での可動性や遺伝子重複および欠失を特徴とする fast-evolving region が宿主適応性の進化に寄与していることが示されている (Dong et al., 2015; Sperschneider et al., 2015)。特に、*Colletotrichum* 属や *Fusarium* 属では、感染様式の違いに応じて異なるエフェクターセットが進化してきたことが報告されている (O'Connell et al., 2012; Gan et al., 2013)。

以上のように、エフェクターの分子機能および進化的背景を体系的に理解することは、植物病原菌の感染メカニズムに共通する原理を解明する上で不可欠である。特に、図 1.1 に

示すように、植物免疫系は PTI と ETI という 2 段階の防御層から構成されており、病原菌はこれらを回避するために多様なエフェクターを進化させてきた。こうした複雑な相互作用を分子レベルで理解するためには、構造生物学的アプローチの導入が鍵となる。

1.2 エフェクター研究における構造解析手法の概要

エフェクターの構造-機能相関を明らかにするためには、その立体構造を正確に決定することが不可欠である。構造情報の取得により、アミノ酸残基の空間配置、分子内および分子間相互作用、柔軟性を示す領域、さらにはジスルフィド結合や疎水性コアといった構造安定化因子の寄与を分子レベルで比較検討することが可能となる (Petsko et al., 2004)。本節では、主要な構造解析手法について、その発展の歴史、技術的進展、ならびに長所と短所を整理し、本研究における解析手法選択の妥当性を論じる。特に、本研究で用いた溶液核磁気共鳴 (NMR) 法については、測定系および解析手法の特徴を踏まえて詳述する。

1.2.1 各構造解析手法の発展と比較

1.2.1.1 X 線結晶構造解析 (X-ray crystallography)

X 線結晶構造解析は 20 世紀半ば以降、タンパク質立体構造決定の中心的手法として発展してきた。現在では Protein Data Bank (PDB) に登録されている構造の大部分が本手法により決定されている。近年では、自動結晶化スクリーニング技術、マイクロフォーカス X 線源、多波長異常散乱法 (MAD; multi-wavelength anomalous diffraction)、単一波異常散乱法 (SAD; single-wavelength anomalous diffraction) などの技術革新により、大型タンパク質複合体や膜タンパク質の解析も大きく進展している。

本手法は非常に高い空間分解能を提供し、原子レベルでの詳細な構造情報を取得できる点において、現在でも最も強力な構造解析手法の 1 つである (Rhodes, 2006)。一方で、構造決定の成否は結晶化の成功率および結晶品質に強く依存するという本質的な制約を有する。特に、柔軟性の高いタンパク質や構造的不均一性を有する試料では結晶化が困難となる場合が多い。また、結晶格子内での拘束により、溶液中とは異なるコンフォメーションが安定化される可能性があり、分子の動的挙動や複数の構造状態を解析するには必ずしも適していない (Garman et al., 2010; Garman et al., 2017)。

1.2.1.2 クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM)

クライオ電子顕微鏡は、試料を急速凍結してガラス状氷中に保持し、ほぼ生理的条件下に近い状態で観察することを可能とする手法であり、近年急速な技術的发展を遂げている。特に単粒子解析法の進歩は「クライオ電顕革命」とも称され (Kühlbrandt et al., 2014)、現在ではサブ 3Å 分解能を達成する構造も数多く報告されている。

Cryo-EM は結晶化を必要としないという利点を有し、巨大タンパク質複合体、ウイルス粒子、膜タンパク質複合体など、従来の X 線結晶構造解析では解析が困難であった試料に対して極めて有効である。また、異なる構造状態を示す粒子を分類し、それぞれのコンフォメーションを再構成できることから、機能的構造変化の解析にも優れている。一方で、分子量が比較的小さいタンパク質 (概ね 40 kDa 未満) ではコントラストの低さから高分解能解析が難しい場合が多く、氷厚の不均一性、支持膜由来の散乱、粒子配向の偏りなど、依然として技術的課題も残されている (Cheng et al., 2015)。

1.2.1.3 溶液核磁気共鳴 (NMR)

溶液核磁気共鳴は、1970 年代に 2 次元 NMR 技術が導入され、1980 年代から 1990 年代にかけて 3 次元 NMR 法および 3 重共鳴 NMR 法の発展により、タンパク質構造解析への応用が飛躍的に進展した。近年では、超高磁場 NMR 装置の普及、TROSY (Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy) 法、部分重水素化 (deuteration)、ならびに自動解析アルゴリズムの発展により、NMR 解析可能な分子量範囲や解析精度が大きく拡張されている。これらの技術的進展は「NMR の静かなルネサンス」とも表現されている (Kleckner et al., 2011)。さらに、in-cell NMR や膜近傍環境における観測手法の開発により、生体に近い条件下での構造および動態解析も可能となっている。

NMR 法の最大の特徴は、溶液中における分子の状態をそのまま観測できる点にあり、時間分解能を伴うコンフォメーション変化や分子間相互作用を残基レベルで解析できることである (Kay et al., 1998)。特に、化学シフト変化 (CSP; chemical shift perturbation)、残余双極子結合 (RDC; residual dipolar coupling)、常磁性緩和増強 (PRE; paramagnetic relaxation enhancement)、核オーバーハウザー効果 (NOE; nuclear overhauser effect) などを組み合わせることで、複合体形成や結合界面の詳細な解析が可能である (Clore et al., 2003)。一方で、高濃度かつ高純度の試料調製が必要であること、信号の重なりや緩和特性の制約により大型タンパク質の解析が困難となる場合があるなど、依然として技術的限界も存在する。

1.2.2 本研究における手法選択の妥当性

EPC3 は 207 アミノ酸残基からなる分泌性の小型タンパク質である（図 1.2）。HMMER を用いたドメインおよび相同性検索（Potter et al., 2018）を行った結果、*Fusarium oxysporum* 由来のエフェクタータンパク質 SIX6 ファミリーに属する配列との間に高い相同性シグナルが検出された（E-value = 8.7×10^{-30} ）（図 1.3）。SIX ファミリーは宿主認識や病原性発現への関与が報告されており（Rep et al., 2004; Ma et al., 2010）、この結果は EPC3 が同様の機能的カテゴリーに属する可能性を示唆している。

>EPC3 (Full-length)

```
1  APLSEVDGSG NSIPTVELSP VDGPPAELEP LNANLTSLVA RDTGPDRTCPAGQTYDRSV60
10  70  YKYNTIRRF70 VANPRSNRED80 IKNTP80 CRADE90 ICVQRNLSNG100 KSFAQ100 CIELV110 KLIRWKTGAG120
    EPC3-ND (residues 44-111)
130  NAEG130 CTSVSV130 KSGGYHSLGT140 ILYDTNSNPI150 QVDKIRYLGE160 PGDVNEGIGG170 GSSYFN180 SDFY
190  NFGGGHSMKA190 CVFTGGYG200 NNL NAFSWVI
```

図 1.2. EPC3 のアミノ酸配列

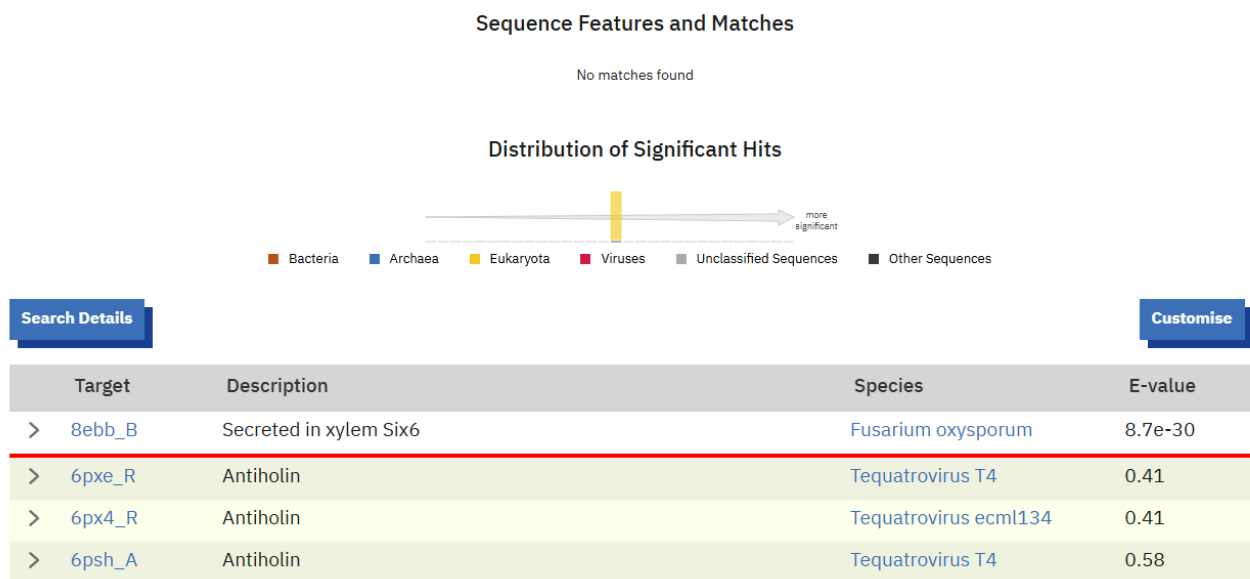


図 1.3. EPC3 の BLAST 検索結果

EPC3 およびそのホモログ配列に対する多重配列アラインメント解析の結果、C 末端ドメインには種を超えて高度に保存されたモチーフが認められた。一方で、N 末端から中央領域にかけては配列の変動が大きく、種間で顕著な多様化が生じていることが明らかとなった（図 1.4）。このような保存性の高い領域と可変領域の共存は、構造的安定性と機能的多様性の両立に寄与している可能性があると考えられている（Tokuriki et al., 2009）。

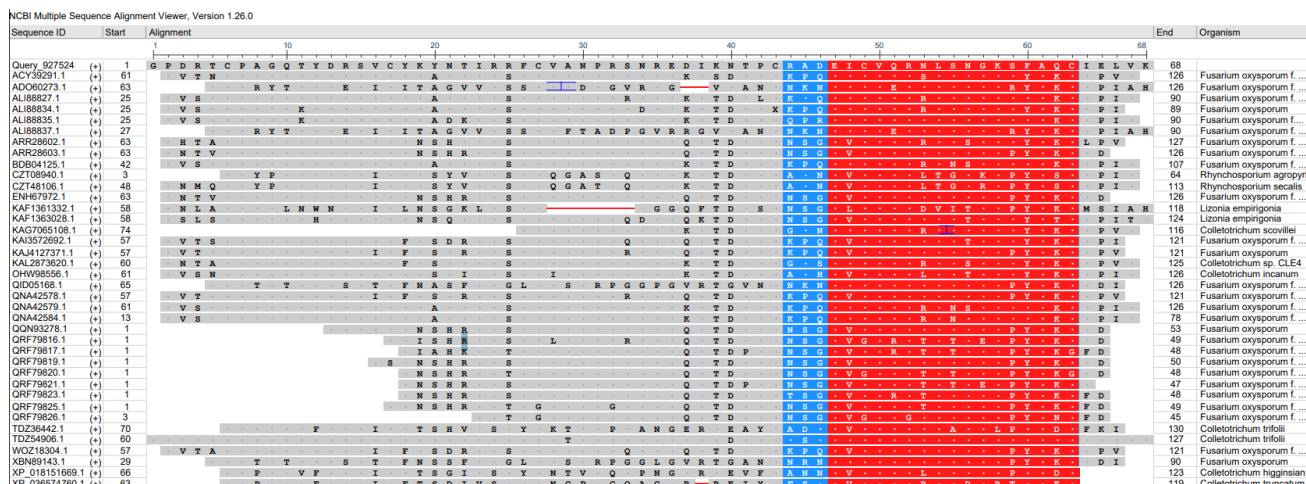


図 1.4. EPC3 ホモログの多重配列アラインメント

これまでの研究により、エフェクタータンパク質における領域特異的な柔軟性や動的性質は、その機能発現に深く関与することが示されている (Rafiqi et al., 2012; Franceschetti et al., 2017)。特に、可動性の高いループ構造や内在性無秩序領域 (IDR; intrinsically disordered region) を含むタンパク質では、静的な立体構造情報のみならず、溶液中における構造分布や動的挙動を解析することが重要である。その点において、溶液中の分子状態を直接観測できる NMR 分光法は極めて有効な解析手法であると考えられている (Petre et al., 2014; Jensen et al., 2014)。

一般に、柔軟性を有する小型タンパク質では、X 線結晶構造解析において結晶化の成否を事前に予測することが困難であり、仮に結晶が得られた場合でも、柔軟領域の電子密度が不明瞭となる可能性が高い (DePristo et al., 2004)。また、クライオ電子顕微鏡法は大型複合体の解析において強力な手法であるが、分子量の小さい単量体タンパク質では高分解能構造の取得が一般に困難である (Cheng et al., 2015)。

以上の点を総合的に考慮し、本研究では、EPC3 の立体構造および動的性質を分子レベルで明らかにするための主要な解析手法として、溶液核磁気共鳴法を採用した。

1.3 本研究の目的

本研究の目的は、ウリ類炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* の病原性発現に関与するエフェクタータンパク質 EPC3 について、その構造的基盤を明らかにし、分子機能との関連性を分子レベルで理解することである。特に、本研究の進展と同時期に病原性への関与が示唆された N ドメイン (EPC3-ND) に着目し、この領域が形成する立体構造および溶液中における動的特性を明らかにすることを主たる目的とした (Inoue et al., 2023)。

さらに、EPC3-ND に特徴的に存在する複数のジスルフィド結合が、構造安定性、フォールド形成、および機能発現にどのように寄与しているかを検討するため (Fass et al., 2012)、各ジスルフィド結合を個別に欠損させた変異体を作製し、野生型との比較解析を行った。これにより、ジスルフィド結合が EPC3-ND の構造形成および安定化構造に果たす役割を明らかにすることを目指す。また、類似エフェクタータンパク質である SIX6 において糖結合能の可能性が指摘されていることから (Gawehns et al., 2014)、EPC3-ND を用いて同様の特性についても検証した。

これらの解析を通じて、EPC3 の構造的特徴と機能発現との関係を体系的に理解するとともに、EPC3 を含む小型システインリッチエフェクターに共通する構造原理の解明を目指した。最終的には、植物病原菌が宿主植物に対して発揮する病原性機構の分子基盤について、新たな知見を提供することを本研究の目的とした。

1.4 参考文献

- Bigeard, J., Colcombet, J., and Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8, 521-539. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.022
- Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., et al. (2013). The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *Plant Cell*, 25, 1463-1481. doi: 10.1105/tpc.112.107201
- Cheng, Y. (2015). Single-particle Cryo-EM at crystallographic resolution. *Cell*, 161, 450-457. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.049
- Clore, G. M., and Gronenborn, A. M. (1989). Determination of three-dimensional structures of proteins and nucleic acids in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology*, 24, 479-564. doi:10.3109/10409238909086962
- Clore, G. M., and Schwieters, C. D. (2003). Docking of protein-protein complexes on the basis of highly ambiguous intermolecular distance restraints derived from $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ chemical shift mapping and backbone ^{15}N - ^1H residual dipolar couplings using conjoined rigid body/torsion angle dynamics. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 2902-12. doi: 10.1021/ja028893d
- de Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., et al. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science*, 329, 953-5. doi: 10.1126/science.1190859
- DePristo, M. A., de Bakker, P. I. W., and Blundell, T. L. (2004). Heterogeneity and inaccuracy in protein structures solved by X-ray crystallography. *Structure*, 12, 831-838. doi: 10.1016/j.str.2004.02.031
- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11, 539-548. doi: 10.1038/nrg2812
- Dong, S., Raffaele, S., and Kamoun, S. (2015). The two-speed genomes of filamentous pathogens: *waltz with plants*. *Current Opinion in Genetics and Development*, 35, 57-65. doi: 10.1016/j.gde.2015.09.001
- Fass, D. (2012). Disulfide bonding in protein biophysics. *Annual Review of Biophysics*, 41, 63-79. doi: 10.1146/annurev-biophys-050511-102321
- Franceschetti, M., Maqbool, A., Jiménez-Dalmaroni, M. J., Pennington, H. G., et al. (2017). Effectors of filamentous plant pathogens: commonalities amid diversity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81, e00066-16. doi: 10.1128/MMBR.00066-16
- Gan, P., Ikeda, K., Irieda, H., Narusaka, M., et al. (2013). Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytologist*, 197, 1236-1249. doi:10.1111/nph.12085
- Garman, E. F. (2010). Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care? *Acta Crystallographica Section D*, 66, 339-51. doi: 10.1107/S0907444910008656

- Garman, E. F., and Weik, M. (2017). Radiation Damage in Macromolecular Crystallography. *Methods in Molecular Biology*, 1607, 467-489. doi: 10.1007/978-1-4939-7000-1_20
- Gawehns, F., Houterman, P. M., Ait Ichou, F., Michielse, C. B., et al. (2014). The *Fusarium oxysporum* effector SIX6 contributes to virulence and suppresses I-2-mediated cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27, 336-48. doi: 10.1094/MPMI-11-13-0330-R
- Inoue, Y., Phuong Vy, T. T., Singkaravanit-Ogawa, S., Zhang, R., et al. (2023). Selective deployment of virulence effectors correlates with host specificity in a fungal plant pathogen. *New Phytologist*, 238, 1578-1592. doi: 10.1111/nph.18790
- Irieda, H., Inoue, Y., Mori, M., and Takano, Y. (2019). Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 116, 496-505. doi: 10.1073/pnas.1807297116
- Jensen, M. R., Zweckstetter, M., Huang, J. R., and Blackledge, M. (2014). Exploring free-energy landscapes of intrinsically disordered proteins at atomic resolution using NMR spectroscopy. *Chemical Reviews*, 114, 6632-6660. doi: 10.1021/cr400688u
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329. doi: 10.1038/nature05286
- Kay, L. E. (1998). Protein dynamics from NMR. *Nature Structural Biology*, 5, 513-7. doi: 10.1038/755
- Kleckner, I. R., and Foster, M. P. (2011). An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814, 942-68. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.10.012
- Kühlbrandt, W. (2014). *The Resolution Revolution*. *Science*, 343, 1443-1444. doi: 10.1126/science.1251652
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., et al. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 513-45. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114623
- Ma, L., van der Does, H. C., Borkovich, K. A., and Coleman, K. A. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464, 267-373. doi: 10.1038/nature08850
- Maidment, J. H. R., Franceschetti, M., Maqbool, A., Saitoh, H., et al. (2021). Multiple variants of fungal effector AVR-Pik bind the HMA domain of the rice protein OshIPP19, providing a foundation to engineer plant defense. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100371. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100371
- O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., et al. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44, 1060-1065. doi: 10.1038/ng.2372
- Petre, B., and Kamoun, S. (2014). How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? *PLoS Biology*, 12, e1001801. doi: 10.1371/journal.pbio.1001801

- Petsko, G. A., and Ringe, D. (2004). *Protein Structure and Function*. New Science Press, London.
- Potter, S. C., Luciani, A., Eddy, S. R., Park, Y., et al. (2018). HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46, W200-W204. doi: 10.1093/nar/gky448
- Rafiqi, M., Ellis, J. G., Ludowici, V. A., Hardham, A. R., et al. (2012). Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 477-482. doi: 10.1016/j.pbi.2012.05.003
- Rep, M., van der Does, H. C., Meijer, M., van Wijk, R., et al. (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology*, 53, 1373-83. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x
- Rhodes, G. (2006). *Crystallography Made Crystal Clear*. Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-587073-3.X5000-4
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Manners, J. M., et al. (2015). Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. *PLoS Pathog*, 11, e1004806. doi: 10.1371/journal.ppat.1004806
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P. J. G. M. (2009). Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 233-263. doi: 10.1146/annurev.phyto.112408.132637
- Tokuriki, N., and Tawfik, D. S. (2009). Protein dynamism and evolvability. *Science*, 324, 203-7. doi: 10.1126/science.1169375
- Toruño, T. Y., Stergiopoulos, I., and Coaker, G. (2016). Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review of Phytopathology*, 54, 419-41. doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100204
- Tsuda, K., and Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 459-65. doi: 10.1016/j.pbi.2010.04.006
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, DG., et al. (2012). Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77, 235-247. doi: 10.1101/sqb.2012.77.015933
- Wüthrich, K. (2001). The way to NMR structures of proteins. *Nature Structural Biology*, 8, 923-5. doi: 10.1038/nsb1101-923

第2章 試料調製と品質評価

2.1 緒言

溶液 NMR 法によるタンパク質立体構造解析を精密に実施するためには、測定条件に適した高純度かつ高い均一性を有するタンパク質試料を調製することが不可欠である。

NMR 法は試料品質の影響を強く受ける解析手法であり、発現系の構築、精製戦略、緩衝液条件の最適化、ならびに物理化学的安定性の評価といった測定前の前処理工程が、構造決定の成否を大きく左右することが知られている (Wand, 2013)。

まず、目的タンパク質の安定発現および正しいフォールディングを確保するためには、適切な発現ベクター、宿主株、ならびに融合タグを検討し、可溶性発現を最大化する発現条件を確立する必要がある (LaVallie et al., 1993; Esposito et al., 2006)。続く精製工程では、NMR 測定に要求される高い純度および試料均一性を達成するため、アフィニティークロマトグラフィー、プロテアーゼによるタグ除去、さらには HPLC などの手法を適切に組み合わせ、凝集体や分解産物を系統的に除去することが重要である (Scopes, 1994)。

さらに、得られた試料の物理化学的性質を評価するため、円二色性 (CD; circular dichroism) 分光法を用いて 2 次構造の形成状態を確認するとともに (Greenfield, 2006)、NMR 測定に適した pH、温度、イオン強度などの条件を最適化する。また、質量分析 (MS; mass spectrometry) による分子量測定および分解の有無の確認は、試料の均一性および科学的完全性を保証する上で不可欠である。

本章では、このような NMR 測定に先立つ一連の前処理工程について概説するとともに、EPC3 の試料調製から測定条件の検証に至るまでの合理的な手順およびその結果を示す。これらの工程を適切に実施することにより、後続の多次元 NMR 解析における化学シフト帰属および立体構造計算の精度を向上させ、EPC3 の構造・機能解析において信頼性の高いデータ取得を可能にした。本研究における多次元 NMR 解析は、確立された NMR 構造解析手法に基づいて実施した (Wüthrich, 1986)。

2.2 実験方法

2.2.1 構造予測による EPC3 の立体構造モデリング

近年、計算アルゴリズムの高度化および人工知能 (artificial intelligence) 技術の発展により、アミノ酸 1 次配列情報からタンパク質の立体構造を高精度に予測する手法が急速に発展している。中でも、DeepMind 社が開発した AlphaFold2 (以下 AF2) は、進化的相関情

報と深層学習アルゴリズムを統合することで、従来の構造予測手法を大きく上回る精度を達成したプログラムである。CASP14 (Critical Assessment of protein Structure Prediction) における評価では、AF2 の平均予測精度 (GDT_TS 値) は 92.4%に達し、実験構造に近いモデルを多数提供できることが示された (Jumper et al., 2021)。AF2 は現在、構造生物学分野における標準的な補助解析ツールの 1 つとして広く利用されている。

本研究対象である EPC3 について AF2 による構造予測を行った結果 (図 2.1)、本タンパク質は構造的特徴の異なる 2 つの領域から構成される可能性が示唆された。予測モデルでは、C 末端側に比較的コンパクトで秩序化されたドメイン構造が形成される一方、N 末端側に柔軟性の高い領域が存在すると推定された。これらの領域を便宜上、それぞれ N ドメイン (EPC3-ND) および C ドメイン (EPC3-CD) と定義した。また、N 末端にはおよそ 40 残基にわたる構造秩序性の低い領域が予測され、このような柔軟領域は、エフェクタータンパク質において宿主認識や細胞内局在化、あるいは機能調節に関与する可能性が指摘されている (petre et al., 2014; Mesarich et al., 2015)。EPC3 についても、当該領域が機能的役割を担う可能性があると考えられた。

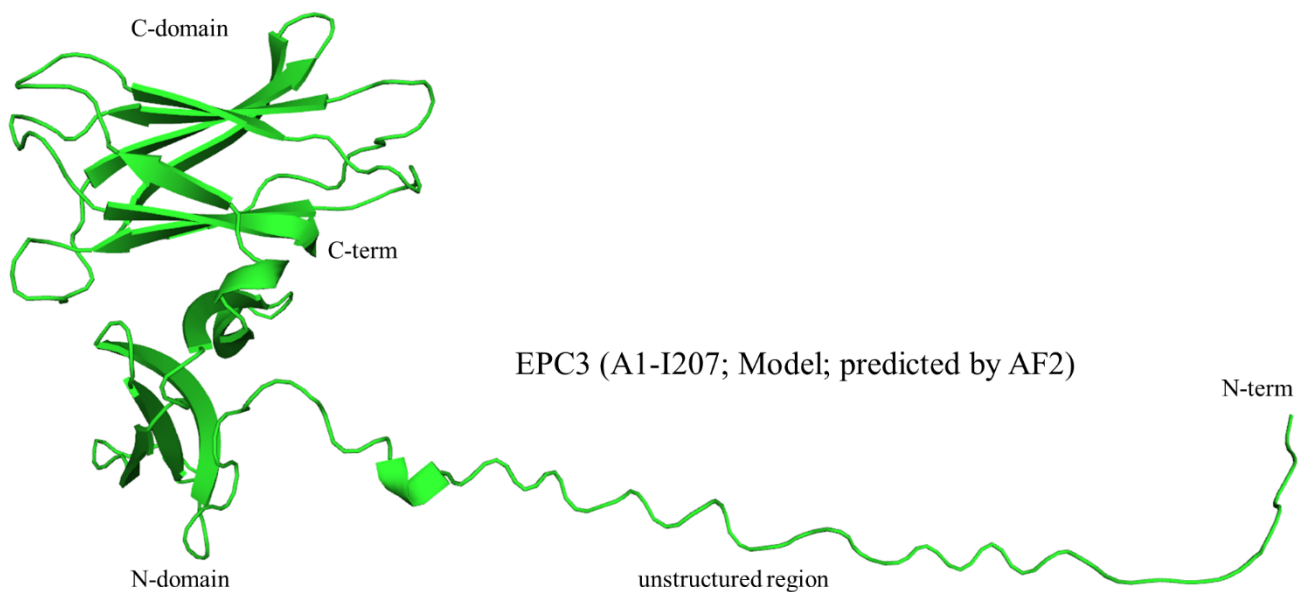


図 2.1. EPC3 全長の構造予測モデル

AF2 による構造予測結果をもとに、本研究では EPC3 を「全長 (Full-length (EPC3))」、「N-domain (EPC3-ND)」、「C-domain (EPC3-CD)」、および両ドメインを含む「NC-domain (EPC3-NCD)」の 4 種類の断片に分割し、それぞれについて独立した発現系を設

計した（図 2.2）。この分割設計は、各領域の構造的安定性および NMR 測定への適合性を個別に評価することを目的としている。

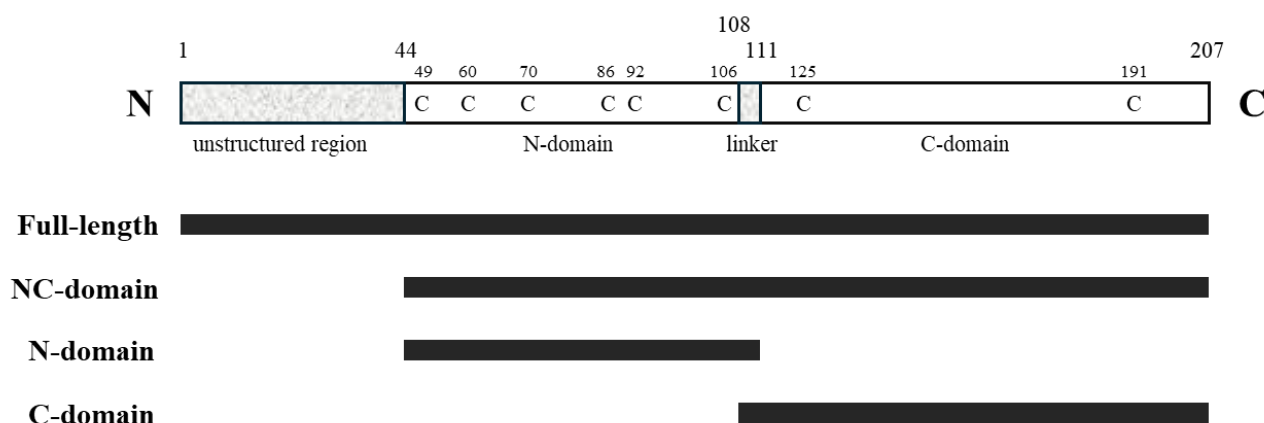


図 2.2. EPC3 のドメイン構成および作製したフラグメント

AF2 モデルにおいては、N ドメインと C ドメインを連結する領域および一部のループ部位に、数残基程度の短い helix-like 構造あるいは 3_{10} -helix 様の局所構造が予測されたものの、いずれも安定したヘリックスとみなせる長さには達していなかった。それ以外の大部分の領域では、 β シートを主体とするフォールドが形成されると予測された。特に C ドメインは、 β バレル (β -barrel) 様の構造をとる可能性が示唆され、これは多くの病原性関連エフェクターに共通して観察される安定な構造骨格と類似している (Franceschetti et al., 2017)。これらの予測結果は、EPC3 が比較的安定な β バレル様フォールドを基盤としつつ、柔軟領域を介して宿主分子との相互作用を担う可能性を示唆するものである。

2.2.2 発現ベクターおよびタグ設計

EPC3 およびその各フラグメントを *Escherichia coli* で発現させるため、本研究では発現ベクターとして pET-32b (+) (Merck, Germany) を採用した。本ベクターにより発現される融合タンパク質は、N 末端に Trx (Thioredoxin) タグおよび $6 \times$ His タグを有しており、発現タンパク質の可溶性向上および正しい立体構造形成の補助に有効であることが報告されている (LaVallie et al., 1993)。特に、EPC3 のように複数のジスルフィド結合を含む小型分泌タンパク質では、Trx タグの導入により、誤ったジスルフィド結合形成や封入体形成が抑制されることが期待される。

pET-32b (+)ベクターは $6 \times$ His タグを有しており、 Ni^{2+} -NTA アフィニティクロマトグラフィーによる精製に適している。さらに本研究では、タグ除去を目的として TEV プロテア

ーゼ認識配列を導入し、精製後にプロテアーゼ処理を行うことで効率的なタグ除去を可能にした。TEV プロテアーゼは高い基質特異性を有し、温和な反応条件下でも効率的に切断できるため、目的タンパク質に対する非特異的切断を最小限に抑えられる利点がある (Parks et al., 1994)。

さらに、TEV プロテアーゼ認識部位と目的タンパク質の間に柔軟な「GGSGGS」スペーサー配列を挿入する設計とした。このスペーサー配列は高い柔軟性を有し、プロテアーゼ認識部位を立体的障害から解放することで、切断効率の向上に寄与すると推測される。特に、EPC3-ND の N 末端側には β シート構造が密に配置される可能性が構造予測から示唆されているため、スペーサーを導入することで切断部位近傍の立体障害を緩和し、効率的かつ完全なタグ除去が可能になると判断した。

pET-32b (+)ベクターは設計上、N 末端または C 末端のいずれにも融合タグを付加することが可能である。しかし、AF2 による構造予測では、EPC3 の C 末端領域が β バレル様構造の中心部を構成し、いわゆるバレル閉鎖に参与する終端ストランドとして機能する可能性が示唆された。一般に β バレルタンパク質では、C 末端ストランドがフォールディングの最終段階に参与し、構造安定性に重要な役割を果たすことが知られている (Murzin, 1998; Kleiger et al., 2002)。そのため、C 末端側に大型の融合タグを付加した場合、折りたたみ過程やバレル閉鎖が阻害されるリスクが相対的に高いと考えられる。

一方、N 末端側は構造コアから相対的に離れていると予測されるため、同様のタグ付加であっても立体構造形成への影響が小さい可能性がある。以上の理由から、本研究では N 末端融合タグを採用する設計とした。

このように、pET-32b (+)ベクターを基盤として、融合タグ、プロテアーゼ認識部位、およびスペーサー配列を体系的に設計することにより、EPC3 の正確なフォールディングと効率的な精製を両立させる発現および精製戦略を構築した (図 2.3)。本設計は、後続の溶液 NMR 解析に必要な高純度かつ高濃度の試料調製を可能にするための基盤となる。

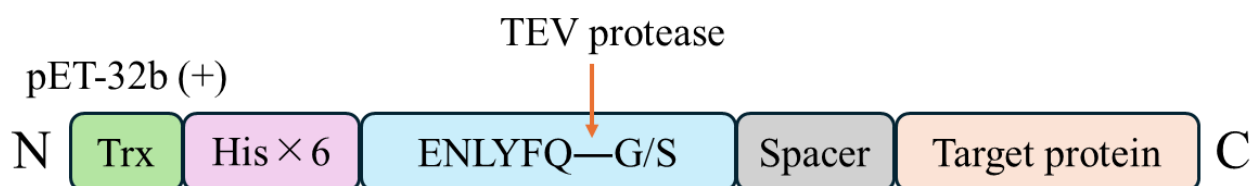


図 2.3. 融合タンパク質のモジュール構成

2.2.3 形質転換および発現条件

EPC3 およびその各フラグメントをコードする DNA 配列について、*E. Coli* における高効率発現を目的としてコドン使用頻度の最適化を行った (Gustafsson et al., 2004)。最適化後の各 DNA フラグメントは GenScript (Japan) により合成され、pET-32b (+) 発現ベクター (Merck, Germany) の NcoI / XhoI 制限酵素認識部位に挿入した。構築した各発現プラスミドは、*E. coli* 発現株 Rosetta-gami™ B (DE3) / pLysS (Merck, Germany) に形質転換した。

形質転換はヒートショック法により行った。プラスミド DNA は TE バッファー (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.0) に溶解し、最終濃度 10 ng/μL に調整した後、その 2 μL を 50 μL のコンピテントセルに添加した。氷上で 5 min 静置後、42 °C で 45 sec のヒートショック処理を行い、再度氷上で 5 min 冷却した。これに SOC 培地 150 μL を加え、37 °C で 1 h 振とう培養した。

回復培養後の細胞懸濁液を、100 μg/mL アンピシリンを含む Luria-Bertani (LB) 寒天培地上に塗布し、37 °C でオーバーナイト培養した。形成された単一コロニーを複数選択し、それぞれを 100 μg/mL アンピシリンを含む 3 mL の LB 液体培地に接種した。37 °C で振とう培養し、培養液の濁度 (OD₆₀₀) が約 0.6 ~ 0.8 に達した時点で、1 M IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) ストック溶液を添加して最終濃度を 1 mM とし、発現誘導を行った。誘導後は 37 °C でさらに 3 h 振とう培養を継続した。

培養終了後、細胞を 4 °C、6,000 × g、20 min 遠心分離 (TOMY High-Speed Refrigerated Centrifuge SRX-201) により回収した。得られた細胞ペレットを 25 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) に懸濁し、超音波破碎 (sonication) により細胞破碎を行った。破碎後、遠心分離により可溶性画分と不溶性画分を分離し、目的タンパク質の可溶性発現の有無を SDS-PAGE 解析により評価した。

2.2.4 可溶性および不溶性画分の解析

遠心によって得られた不溶性画分には、上清と同体積の 8 M 尿素溶液を加え、4 °C で振とうしながら十分に可溶化させた。完全溶解後、同体積の Laemmli 試料バッファーを加えて混合し、SDS-PAGE 解析を行った。

これにより、可溶性画分および不溶性画分の双方における目的タンパク質の発現状態を比較評価した。

2.2.5 EPC3-ND 発現条件の最適化

実験結果の再現性および信頼性を確認するために、保存株が異なる 2 系統の *E. coli* Rosetta-gami™ B (DE3) / pLysS 株を用い、同一条件下で独立に発現実験を行った。

EPC3-ND はアミノ酸配列中に複数のジスルフィド残基を有しており、ジスルフィド結合を形成する可能性が示唆されたことから、発現条件によって誤フォールディングや不溶化が生じる可能性が考えられた (Bessette et al., 1999)。そこで、誘導培養時の温度条件として 37 °C および 30 °C の 2 条件を設定し、発現挙動を比較した。

また、誘導剤であるイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) の濃度は 0.1 mM および 1 mM の 2 条件を設定し、発現量および可溶性への影響を検討した。

各条件下で誘導培養後に菌体を回収し、超音波破碎によって可溶性画分および不溶性画分に分離した。得られた各画分について SDS-PAGE 解析を行い、目的タンパク質の発現量および可溶性の違いを比較評価した。

2.2.6 アフィニティークロマトグラフィーイオンにおける金属イオンの選択

アフィニティークロマトグラフィー (Affinity Chromatography) は、組換えタンパク質の精製に広く用いられる手法である。その中でも、His タグを介して目的タンパク質を固定化金属イオンに結合させる固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC; immobilized metal ion affinity chromatography) は、高効率かつ再現性の高い精製法として広く利用されている。IMAC に用いられる固定化金属イオンとしては、Cu²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Co²⁺などが一般的であり、これらは配位化学的性質および結合定数の違いにより、His タグとの結合親和性および選択性が異なる (図 2.4) (Bornhorst et al., 2000)。

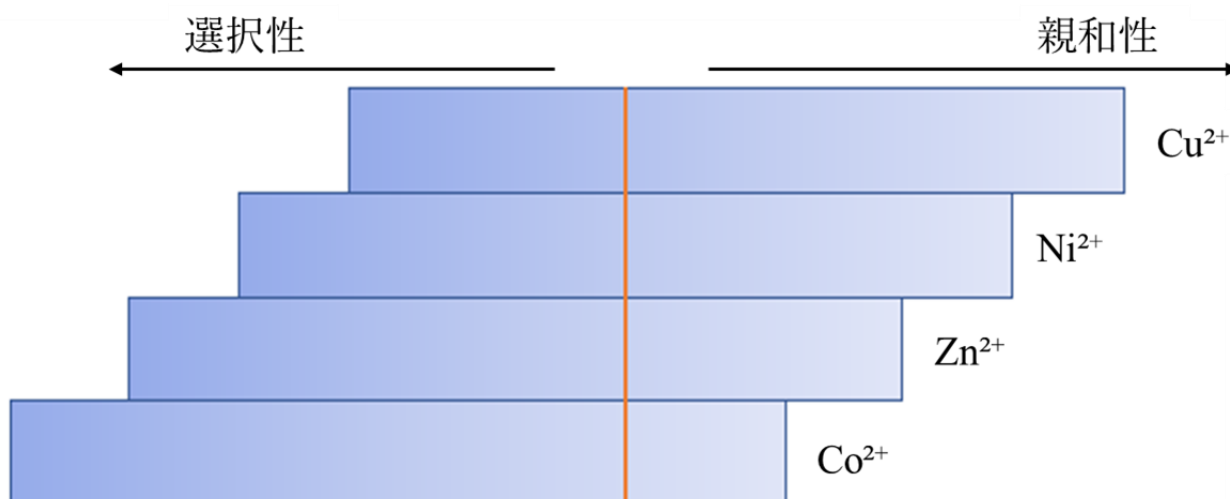


図 2.4. His タグと金属イオンに対する選択性および親和性の比較

Ni^{2+} はイミダゾール環中の窒素原子と比較的安定な配位結合を形成しやすく、結合容量が大きいことから、多量の His タグタンパク質を吸着できる利点を有する。一方で、内在性タンパク質との非特異的相互作用も生じやすく、条件によっては溶出画分中の純度が低下する場合がある。これに対して Co^{2+} は、結合容量は Ni^{2+} に比べて小さいものの、His 残基に対する選択性が高く、背景タンパク質の混入が少ない高純度試料を得やすいとされている。 Zn^{2+} は中程度の親和性および特異性を示し、 Cu^{2+} は最も高い結合親和性を示す一方で、酸化還元活性を有するため、タンパク質の化学的安定性や構造に影響を与える可能性が指摘されている。

以上の特性から、IMAC における金属イオンの選択は、目的タンパク質の性質（分子量、表面電荷分布、構造安定性など）および精製目的（収量重視か純度重視か）を考慮して最適化する必要がある。

本研究では、目的タンパク質の精製条件を検討するため、まず Ni^{2+} -NTA 樹脂を用いた IMAC を実施し、段階的イミダゾール溶出（20、50、100、250、1,000 mM）によって溶出挙動を評価した。さらに、同一条件下で Co^{2+} -NTA 樹脂を用いた精製を行い、得られた各溶出画分を SDS-PAGE により解析することで、金属イオン種による精製効率および純度への影響を比較検討した。

2.2.7 バッファー交換およびタグ除去前処理

His タグ付き目的タンパク質をアフィニティクロマトグラフィーにより回収した後、タグ除去反応に先立つ前処理として、限外濾過（Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, 10

kDa MWCO, Merck Millipore) を用いて試料の濃縮を行った。本操作により溶液体積を低減するとともに、低分子不純物の除去を行い、後続の透析操作を効率化した。

濃縮後のタンパク質溶液を透析膜チューブ (Spectra/Por 1, MWCO 6~8 kDa) に移し、組成の異なる 3 種類の透析バッファーを用いて段階的に透析を行った。各透析は 4~6 h 実施した。使用した透析バッファーの組成は以下の通りである：(1) 1 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0; (2) 25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0; (3) 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0。

初期段階では EDTA 含有バッファーを用いることで、精製過程で残存した金属イオンをキレート除去し、その後、イオン強度を段階的に低下させることで、TEV プロテアーゼ反応に適したバッファー条件へと移行させた。透析終了後、TEV プロテアーゼ (Sigma-Aldrich, T4455, recombinant from *E. coli*) を添加し、His タグの切断反応を行った。反応後の試料は SDS-PAGE により解析し、タグ除去の効率およびタンパク質の完全性を評価した。

2.2.8 TEV プロテアーゼ添加量の最適化

His タグ切断反応における TEV プロテアーゼの最適添加量を決定するため、融合タンパク質に対するプロテアーゼ量を段階的に変化させた条件で反応を行い、切断効率を比較した。

標準条件 (×1) は製品プロトコルに基づき、2.5 mg の融合タンパク質に対して 100 U の TEV プロテアーゼを添加することとした。この条件を基準として、プロテアーゼ量を ×8、×4、×2、×1、×1/2、×1/4、×1/8 に設定し、各条件下で切断反応を実施した。

各反応は同一のバッファー条件下で行い、一定時間インキュベートした後に反応を停止した。反応後の試料は SDS-PAGE に供し、切断産物および未切断融合タンパク質のバンドパターンを比較することで、各条件における切断効率を評価した。これらの結果に基づき、後続の試料調製における適切な TEV プロテアーゼ添加条件を決定した。

2.2.9 逆相 HPLC による最終精製

TEV プロテアーゼによる切断反応終了後、反応液を 4 °C、20,500 × g で 5 min 遠心し、切断に伴って生じた沈殿成分および不溶性夾雑物を除去した。得られた上清にトリフルオロ酢酸 (TFA; trifluoroacetic acid) を添加し、最終濃度 0.1~0.5% とすることで試料の pH を約 1~3 に調整した。pH の確認には pH 試験紙 (pH 1~11; Toyo Roshi Co., Ltd., Japan) を用いた。

TFA 添加後、試料を再度 4 °C、20,500 × g で 5 min 遠心分離し、上清を逆相 HPLC の注入試料とした。試料は精製直前まで 4 °C 下で保存し、変性および容器表面への非特異的吸着を最小限に抑えた。

最終精製は、高速液体クロマトグラフィー装置（SHIMADZU LC-10AD VP）に接続した逆相カラム（COSMOSIL Protein-R, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan）を用いて実施した。分離は室温で行い、流速 0.5 mL/min、分析時間 50 min とした。移動相として、溶媒 A（0.1% TFA を含む水）および溶媒 B（0.1% TFA を含むアセトニトリル（CH₃CN））を使用し、溶媒 B の濃度を線形に増加させるグラジエント条件で溶出を行った。

2.2.10 MALDI-TOF-MS による目的タンパク質の分子量確認

精製後に得られた主成分が目的タンパク質に対応する分子量を有していることを確認するため、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（MALDI-TOF-MS）を用いた測定を行った。測定には Bruker UltrafleXtreme（Bruker Daltonics, Germany）を使用し、リニアモード（linear mode）で解析を行った。

試料は最終濃度が約 100 μM となるよう調製し、その 1 μL と等量のマトリックス溶液を混合した。マトリックスにはシナピン酸（SA; sinapinic acid）を用い、10 μg/μL SA を含む 50% アセトニトリル / 0.1% TFA 溶液として調製した。混合液 1 μL を MALDI ターゲットプレート上に滴下し、室温で自然乾燥させた後、測定を行った。

得られたスペクトルは flexAnalysis ソフトウェア（Bruker Daltonics）を用いて解析し、主要ピークの観測質量を試料の分子量の理論値と比較することで、精製試料が目的タンパク質に対応する分子量を有していることを確認した。

2.2.11 ジスルフィド結合パターンの決定

目的タンパク質中に形成されたジスルフィド結合の組み合わせを決定するため、還元剤を添加しない条件でトリプシン消化を行い、生成したペプチド断片を MALDI-TOF-MS により解析した。

遠心濃縮において乾燥した精製試料に、0.1 M Tris-HCl バッファー（pH 8.0）および 6 M 尿素を含む溶液 10 μL を加え、十分に溶解させた後、尿素濃度を低下させる目的で 0.1 M Tris-HCl バッファー（pH 8.0）30 μL を加えて反応液を調製した。これにトリプシン（ストック濃度 50 ng/μL）を添加し、酵素と基質の比が w/w = 1 : 20（Trypsin : Protein）となるように調製した。反応液を 37 °C で 15 h インキュベートし、消化反応を進行させた。

消化後に得られたペプチド混合物を MALDI-TOF-MS 分析に供し、観測された質量ピークを理論的に予測されるトリプシン消化ペプチドのモノアイソトピック質量と照合した。特に、システイン残基を含む 2 つのペプチド断片の理論質量の合算値が観測ピークと一致する組み合わせに着目し、同一のジスルフィド結合によって連結されたペプチド対の候補を抽出した。

これらの結果は、目的タンパク質中に形成されるジスルフィド結合の組み合わせを支持する基礎的な質量分析データを提供するものであり、後続の構造解析結果と併せて解釈することで、ジスルフィド結合パターンの理解に寄与する (Gorman et al., 2002)。

2.2.12 CD 測定による 2 次構造特性の評価

タンパク質の 2 次構造特性を評価するため、CD 分光法による測定を行った。CD 分光法は、タンパク質中のペプチド結合が左円偏光および右円偏光に対して異なる吸収を示す性質を利用し、2 次構造要素に由来する特徴的なスペクトル形状を観測する手法である。

一般に、 α ヘリックス構造および β シート構造は、それぞれ異なる波長領域に特徴的なシグナルを示すことが知られており、これらのスペクトル形状から 2 次構造組成の推定が可能である (Greenfield, 1969)。

CD 測定には分光計 J-820 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) を使用した。測定条件は、感度 100 mdeg、波長範囲 270 ~ 190 nm、データ取り込み間隔 1 nm、走査モード continuous、走査速度 50 nm/min、レスポンス 2 sec、バンド幅 1 nm、積算回数 4 回、セル長 0.1 cm である。測定はすべて 25 °C で実施した。

溶液条件がタンパク質の 2 次構造特性に及ぼす影響を評価するため、pH 3.0、4.0、5.0、6.0 および 7.0 の条件下で CD スペクトルを測定し、酸性から中性域にかけてのスペクトル形状の変化を比較した。また、イオン強度の影響を検討する目的で、NaCl を 50、100 および 150 mM 含む緩衝液を用いた試料についてそれぞれ CD 測定を行い、スペクトルを比較した。

得られた CD スペクトルについては、観測されたスペクトル形状および負ピークを基に、2 次構造特性を定性的に評価した。

本タンパク質は事前の構造予測により、 β ストランドを主体とする構造を有する可能性が示唆されていたことから、CD スペクトルが β シート構造に特徴的とされるパターンと整合するかどうかに着目して解析を行った。

2.3 結果と考察

2.3.1 タンパク質の発現および可溶性画分の解析

E. coli における EPC3 およびその各フラグメント（EPC3-ND、EPC3-CD、EPC3-NCD）の発現を確認するため、IPTG 誘導後に菌体を回収し、SDS-PAGE により解析を行った。なお、各コンストラクトについては発現の再現性を確認するため、同一条件下で培養した独立コロニー2株を用いて解析を行っており、図 2.5 および図 2.6 にはそれぞれ2レーンずつ結果を示している。

その結果、いずれのコンストラクトにおいても、理論分子量に対応する位置に明瞭なバンドが検出され、融合タンパク質が *E. coli* 内で発現していることが確認された（図 2.5、図 2.6）。

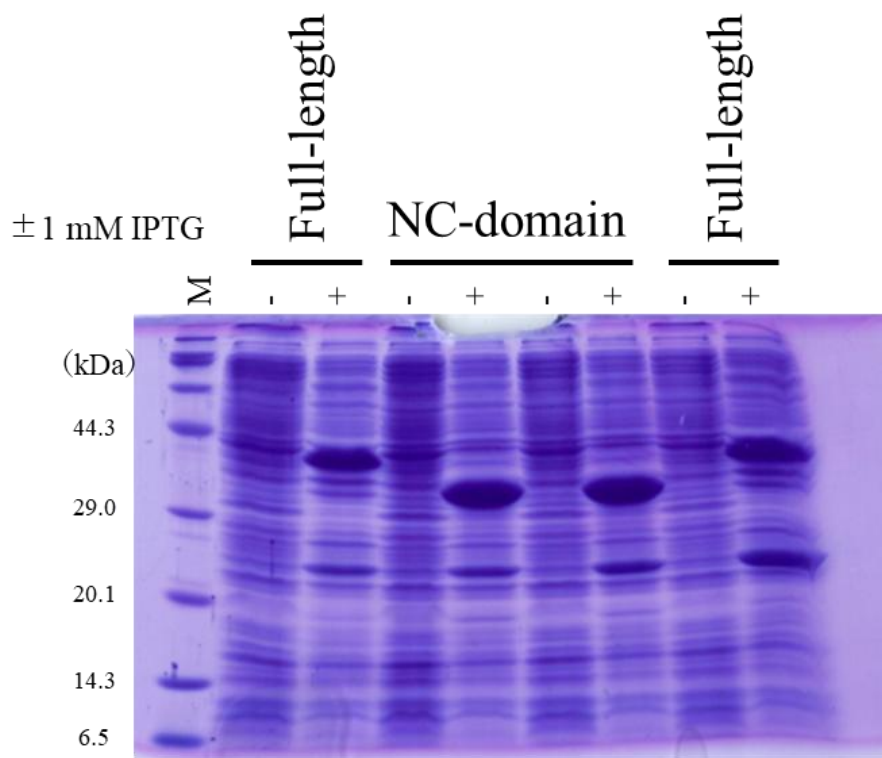


図 2.5. 大腸菌における融合タンパク質の発現解析（Full-length および NC-domain）

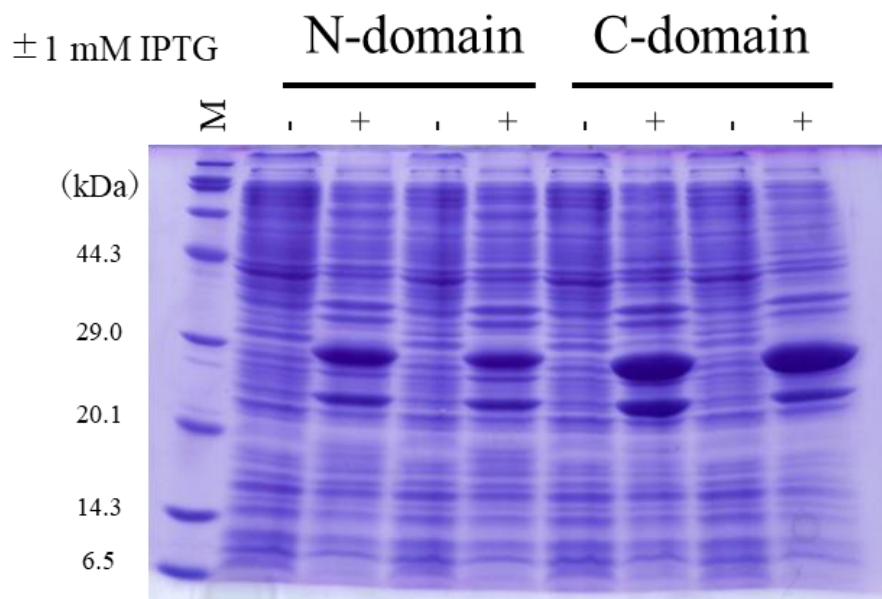


図 2.6. 大腸菌における融合タンパク質の発現解析（N-domain および C-domain）

次に、発現したタンパク質の可溶性を評価するため、超音波破碎後の遠心処理によって得られた上清画分（sup; supernatant）および沈殿画分（ppt; precipitate）をそれぞれ SDS-PAGE により比較解析した。その結果、全長 EPC3、EPC3-NCD および EPC3-CD はいずれも主として沈殿画分に検出されたのに対し、EPC3-ND は上清画分中に明瞭なバンドとして検出された（図 2.7）。この結果から、EPC3-ND は他のコンストラクトと比較して、*E. coli* 発現系において高い可溶性を示すことが示唆された。

EPC3 全長および C ドメインを含むコンストラクトは、*E. coli* 細胞内では凝集あるいは不溶化しやすいのに対し、EPC3-ND 単独では可溶性の状態を維持し得ることが示された。さらに、同時期に共同研究者によって実施された生理活性評価の結果、EPC3 全長と EPC3-ND がほぼ同程度の活性を示すことが明らかとなった（Xu et al., 2025）。この結果は、病原性発現に関わる機能的要素が主として N ドメインに含まれていることを示唆している。

以上の理由から、本研究では、構造解析および動的特性評価対象として、可溶性が高く、かつ生理活性を保持している EPC3-ND に着目して解析を進めることとした。

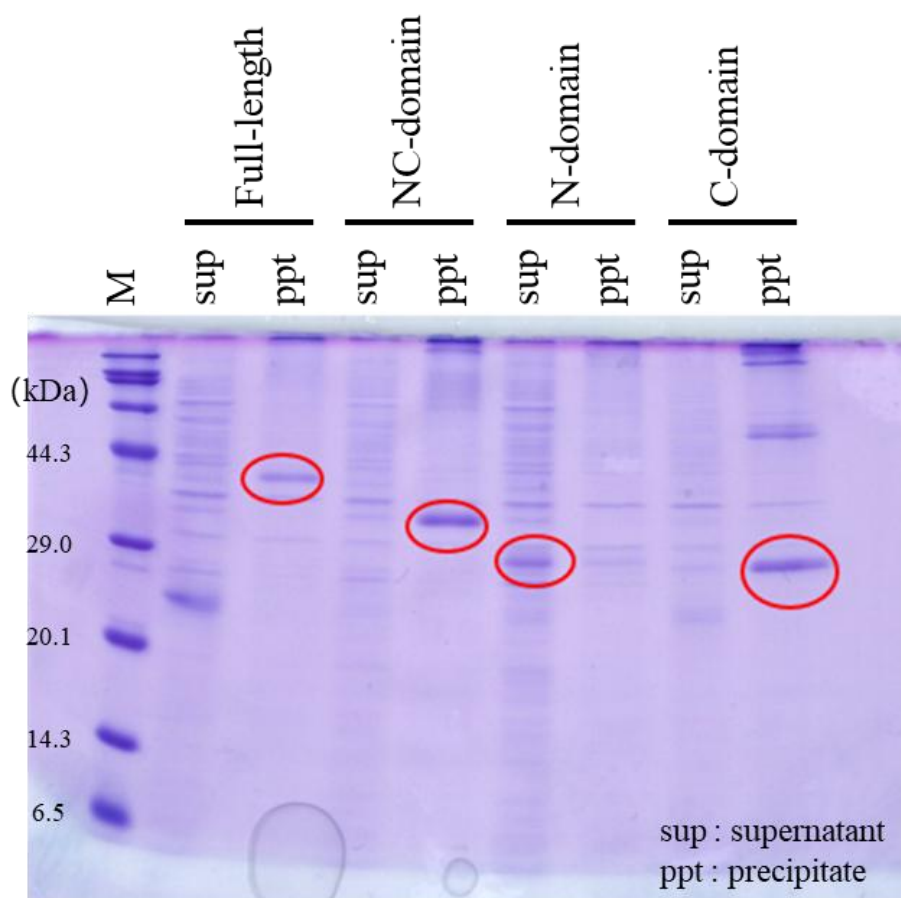


図 2.7. 融合タンパク質の可溶性画分および不溶性画分の解析

2.3.2 EPC3-ND の培養条件最適化

EPC3-ND は複数のジスルフィド結合を含むと予測されることから、誤ったジスルフィド結合形成やフォールディング不全を抑制しつつ、十分な発現量を確保できる培養条件の検討を行った。

まず、培養温度が EPC3-ND の発現量に及ぼす影響を評価するため、*E. coli* Rosetta-gami™ B (DE3) / pLysS 株を用い、37 °C および 30 °C の 2 条件で IPTG 誘導を行った。誘導後に回収した試料を SDS-PAGE により解析した結果、いずれの温度条件においても、理論分子量に対応する位置に EPC3-ND 由来のバンドが検出された（図 2.8）。一方、30 °C 培養では、37 °C 培養と比較して目的バンドの強度がやや低下する傾向が認められた。

一般に、低温培養は翻訳速度の低下によりフォールディング過程に有利に働く場合がある一方で、発現量が低下することも多い（Sørensen et al., 2005）。本研究では、後続の精製

操作に伴う回収率の低下を考慮し、十分な収量を確保できる条件として 37 °C 培養を採用した。

次に、IPTG 濃度が EPC3-ND の発現量に与える影響を検討した。37 °C 培養条件下で 0.1 mM および 1 mM IPTG を用いて誘導を行い、SDS-PAGE により発現量を比較したところ、2 つ条件間で目的バンドの強度に顕著な差は認められなかった（図 2.8）。高濃度 IPTG 条件では、翻訳負荷の増大により誤フォールディングや不溶化が生じる可能性が指摘されている（Sørensen et al., 2005）。本研究では、発現量を維持しつつ翻訳負荷を抑制できる 0.1 mM IPTG を標準条件として採用した。

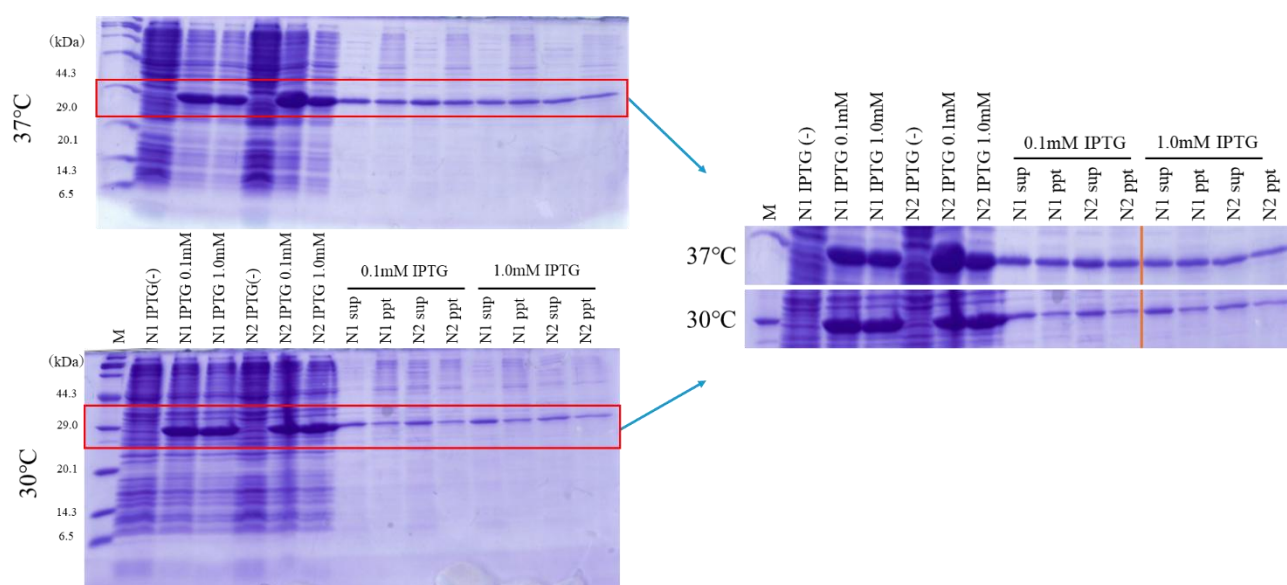


図 2.8. 発現温度および IPTG 濃度による融合タンパク質発現量の比較

N1 および N2 は、同一コンストラクトから独立に取得した 2 つの形質転換体を示す。

なお、これらの培養条件の検討は、同一コンストラクトから独立に取得した 2 つの *E.coli* 形質転換体（N1 および N2）を用い、同一条件下で実施した。その結果、得られた SDS-PAGE パターンおよび EPC3-ND の発現量は両系統間でほぼ一致しており、本発現系および培養条件の再現性が確認された。

2.3.3 IMAC における金属イオン種の選択

発現条件の最適化により EPC3-ND の可溶性画分を安定して取得できる系を確立した後、His タグ融合タンパク質を対象として、IMAC による精製条件の検討を行った。IMAC に

用いられる担体金属イオンとしては Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} などが知られており、これらは His タグとの配位結合能（親和性）および非特異的結合の程度（選択性）が異なる。

一般に、 Ni^{2+} は His タグに対して高い親和性と大きな結合容量を示す一方、 Co^{2+} はより高い選択性を示し、非特異的結合が少ない傾向があるとされている。これに対して、 Zn^{2+} は結合容量が比較的小さく、高収量が求められる精製には必ずしも適さない場合がある。また、 Cu^{2+} は非常に高い親和性を示すものの、システイン残基や芳香族残基との非特異的相互作用や酸化的影響が生じる可能性が指摘されている（Bornhorst et al., 2000）。これらの点を踏まえ、本研究では Ni^{2+} -NTA 樹脂および Co^{2+} -NTA 樹脂の 2 種を用いて、精製挙動の比較検討を行った。

まず、 Ni^{2+} -NTA カラムに EPC3-ND の可溶性画分を供し、イミダゾール濃度 20、50、100、250、500、1,000 mM のステップワイズ溶出を行った。その結果、20 および 50 mM イミダゾール画分には主として宿主由来タンパク質が検出され、目的タンパク質に対応する明瞭なバンドはほとんど認められなかった。一方、EPC3-ND に対応するバンドは 100 ~ 500 mM イミダゾール画分において強く検出され、 Ni^{2+} -NTA 樹脂に対して比較的強い結合挙動を示すことが観察された（図 2.9）。

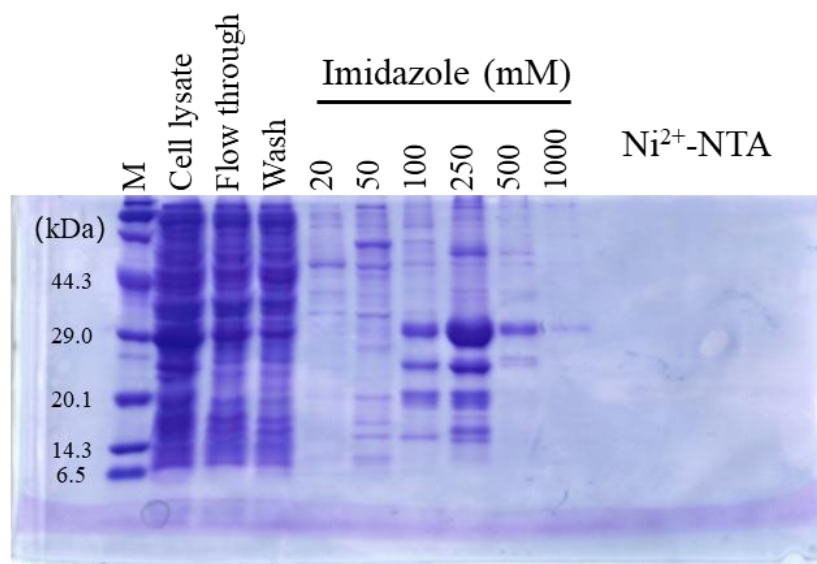


図 2.9. Ni^{2+} アフィニティ精製の SDS-PAGE 解析

同様の条件で Co^{2+} -NTA 樹脂を用いた場合、EPC3-ND は 20 および 50 mM の比較的低濃度イミダゾール画分において溶出した。これらの画分では、 Ni^{2+} 由来画分と比較して背景バ

ンドが少なく、相対的に高い純度が得られた一方で、目的タンパク質バンドの強度は弱く、回収量は全体として低い傾向を示した（図 2.10）。

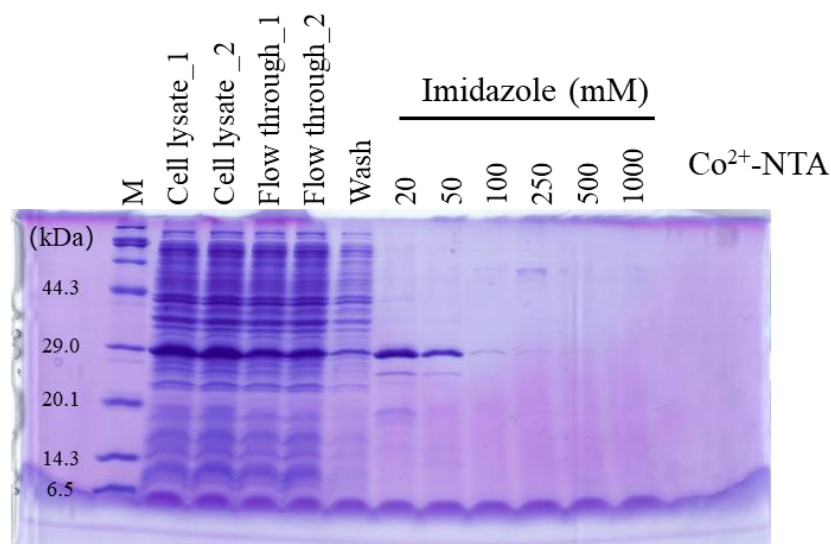


図 2.10. Co^{2+} アフィニティ精製の SDS-PAGE 解析

以上の結果から、 Co^{2+} -NTA 樹脂は非特異的結合が少なく、高純度画分を得やすい一方で、結合容量が小さく、得られるタンパク質量が限られる傾向にあることが示唆された。質量分析、CD 測定および NMR 測定など、本研究で予定する後続解析に必要な試料量を安定して確保する観点からは、回収量が十分でない可能性があると判断した。

一方、 Ni^{2+} -NTA 樹脂では、 Co^{2+} -NTA 樹脂と比較して背景タンパク質の共溶出がやや増加するものの、結合容量が高く、目的タンパク質を比較的安定して回収できることが確認された。さらに、 Ni^{2+} -NTA 樹脂は IMAC において広く利用されており、操作条件や再現性の面で実利的利点を有する。これらを総合的に考慮し、本研究では Ni^{2+} -NTA カラムを標準精製法として採用した。

なお、 Ni^{2+} -NTA カラムからの溶出画分には高濃度のイミダゾール（100～500 mM）が含まれるため、そのままでは TEV プロテアーゼによるタグ切断反応を阻害する。そこで、限外濾過チューブ（Amicon Ultra, MWCO 10 kDa）を用いて試料を濃縮し、反応液体積を低減するとともに、後続の透析によるイミダゾール除去を効率化した。

2.3.4 TEV プロテアーゼによるタグ切断条件の最適化

Ni²⁺-NTA カラムによる精製後、段階的透析により TEV プロテアーゼ反応に適した条件へと移行した EPC3-ND 融合タンパク質を用いて、His タグ切断における TEV プロテアーゼ添加量の最適条件を検討した。

まず、製品プロトコルに基づき、100 U の TEV プロテアーゼを 2.5 mg の融合タンパク質に添加する条件 (×1) を基準とし、×8、×4、×2、×1、×1/2、×1/4、×1/8 の各倍率で反応を行った (表 2.1)。各条件下で反応後の試料を SDS-PAGE により解析した結果、×2 および×1 の条件では未切断の融合タンパク質バンドがほとんど認められず、切断が効率的に進行していることが示された。一方、×1/2 以下の条件では未切断融合タンパク質が明瞭に残存しており、酵素量が不足していることが示唆された (図 2.11)。

×1 is 100 U protease : 2.5 mg fusion protein

TEV protease conc.	Loading amount (μL)	1/10 TEV protease conc. loading amount (μL)	1/100 TEV protease conc. loading amount (μL)
×8	1.2		
×4	0.6		
×2	0.3		
×1	0.15	1.5	
×1/2	0.075	0.75	
×1/4	0.0375	0.375	
×1/8	0.01875		1.875
0	0		

表 2.1. TEV プロテアーゼの添加量条件
融合タンパク質 2.5 mg に対する TEV プロテアーゼ添加量を、各倍率に示す。×1 は TEV プロテアーゼ 100 U に相当する。

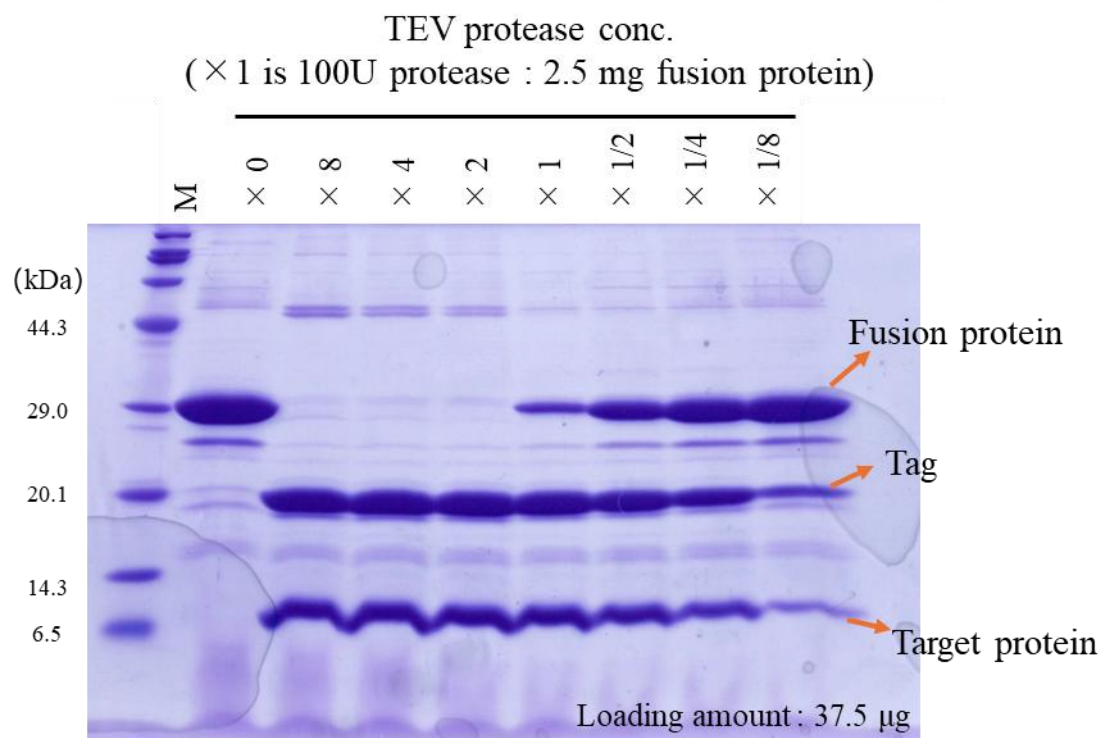


図 2.11. TEV プロテアーゼ量の違いによる融合タンパク質の切断効率

次に、より厳密な至適比率を検討するため、100 U の TEV プロテアーゼを 2.5 mg または 2.0 mg の EPC3-ND 融合タンパク質に対して添加し、それぞれの切断効率を比較した（図 2.12）。その結果、基質量 2.0 mg の条件では、未切断融合タンパク質バンドは検出限界以下まで低下し、効率的な切断が達成されていることが確認された。一方、2.5 mg の条件では、融合タンパク質に対応するバンドが一部残存しており、酵素量に対して基質量が過剰である可能性が示唆された。

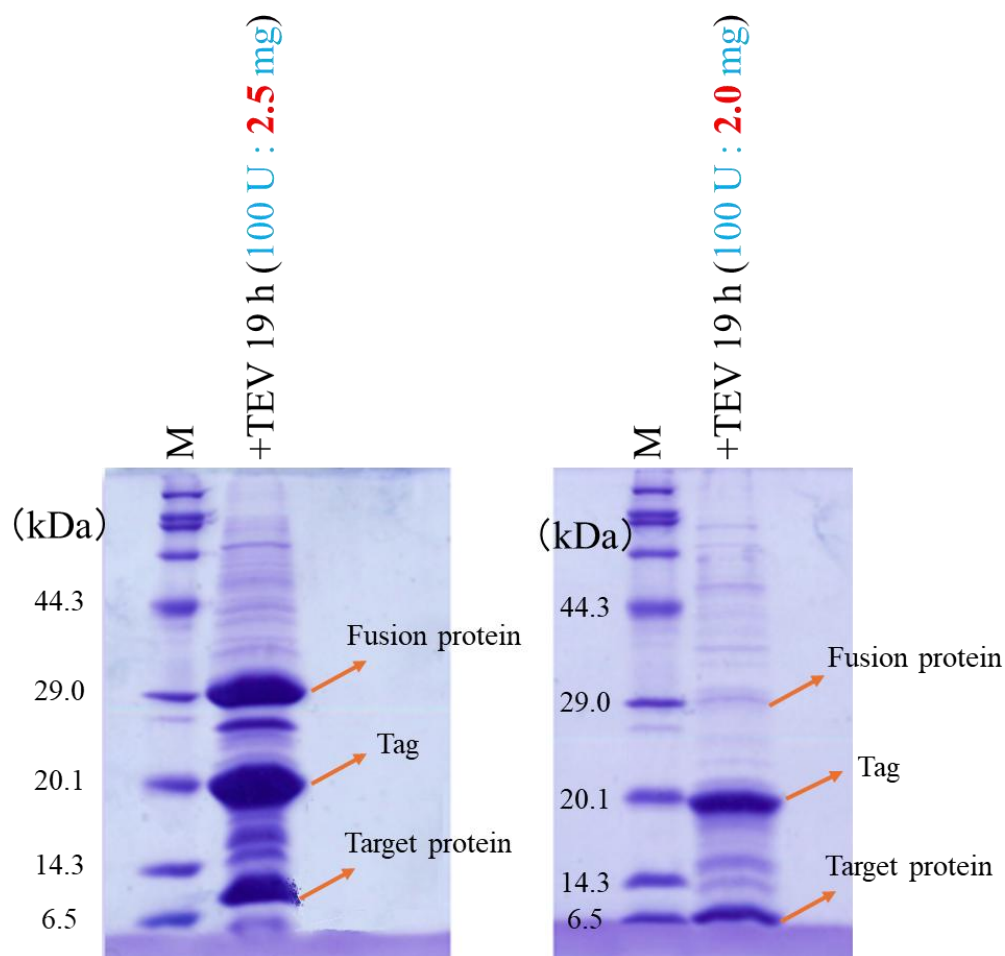


図 2.12. TEV プロテアーゼ添加量の最適化

以上の結果から、本研究条件下においては、TEV プロテアーゼ 100 U あたり約 2.0 mg の融合タンパク質（約 50 U/mg）が、効率的なタグ切断を行う上で実用的な目安となることが示された。そこで本研究では、完全なタグ除去が必要な場合には 40～60 U/mg 程度を標準的な使用範囲とし、必要に応じて基質量や反応時間に応じた調整を行った。

なお、後続の精製工程や解析目的によっては、必ずしも完全切断を要しない場合もあることから、実際のタグ除去操作では、試料収量、反応時間および必要とされる切断率を総合的に考慮して TEV プロテアーゼ量を設定した。

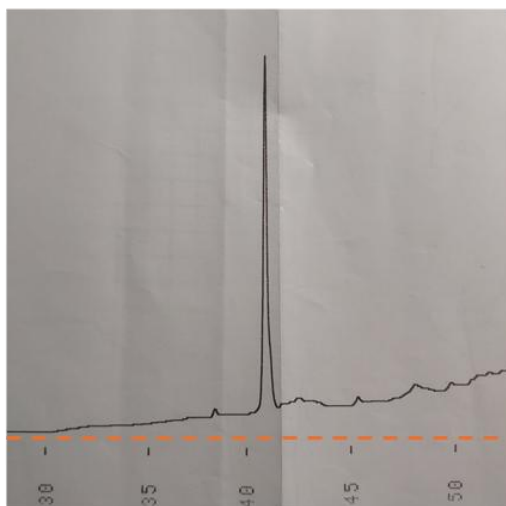
2.3.5 逆相 HPLC による最終精製

初期検討として、カラム上における EPC3-ND の保持挙動を把握するため、溶媒 B（アセトニトリル）の濃度範囲を広く設定し、勾配時間を長めにとった条件で探索的な分析を行

った。このスカウト分析により、主成分ピークのおおよその保持時間を特定し、試料中における主要成分の溶出挙動を確認した。

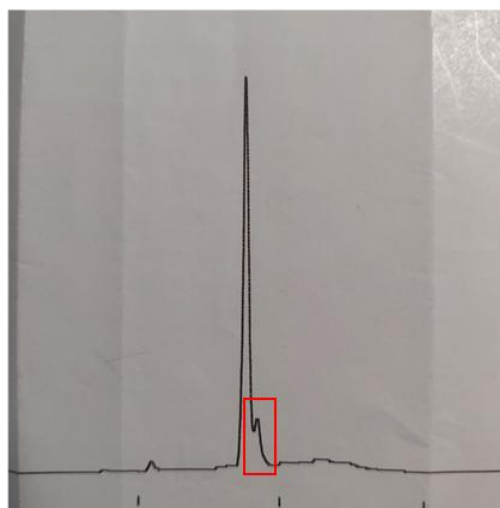
ACN conc. 5~60 %
Gradient time 10~60 min

①



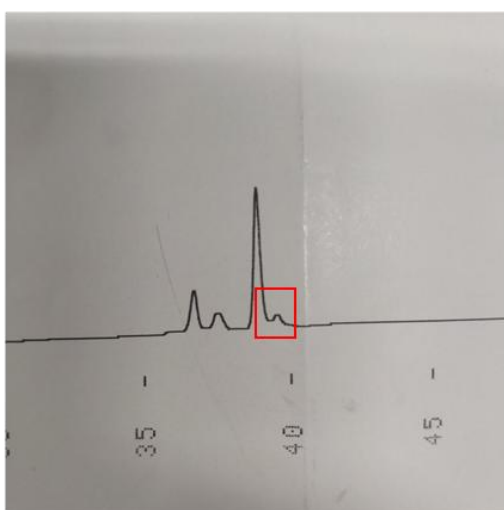
ACN conc. 15~50 %
Gradient time 10~50 min

②



ACN conc. 20~40 %
Gradient time 10~50 min

③



ACN conc. 20~30 %
Gradient time 10~50 min

④

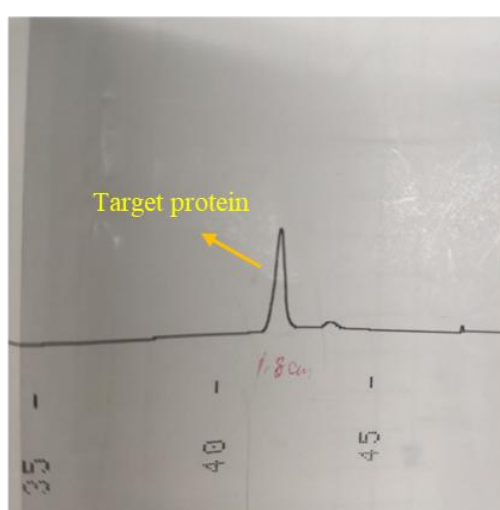


図 2.13. 逆相 HPLC 条件の最適化

一般に、 Ni^{2+} -NTA 精製およびタグ切断後の試料では、主成分として目的タンパク質が含まれる可能性が高いことから、本研究ではこの主ピークを指標として、移動相組成および勾配条件の最適化を段階的に行った（図 2.13）。その結果、溶媒 A（0.1% TFA を含む水）および溶媒 B（0.1% TFA を含むアセトニトリル）を用い、20~30% B の線形勾配において、主成分ピークが他の小ピークから良好に分離されることが確認された。

最終精製は 25 °C 条件下で実施し、溶出は 254 nm および 280 nm の UV 吸収によりモニタリングした。主成分ピークに対応する画分をフラクション回収し、Eppendorf Concentrator plus を用いて遠心濃縮において乾燥することで溶媒を除去し、後続の質量分析および構造解析に供した。

2.3.6 MALDI-TOF-MS による分子量確認

逆相 HPLC により回収した EPC3-ND について、分子量および酸化状態を確認する目的で、MALDI-TOF-MS (linear mode) による質量分析を行った。その結果、 m/z 8226.144 に明瞭な主要ピークが検出された (図 2.14)。

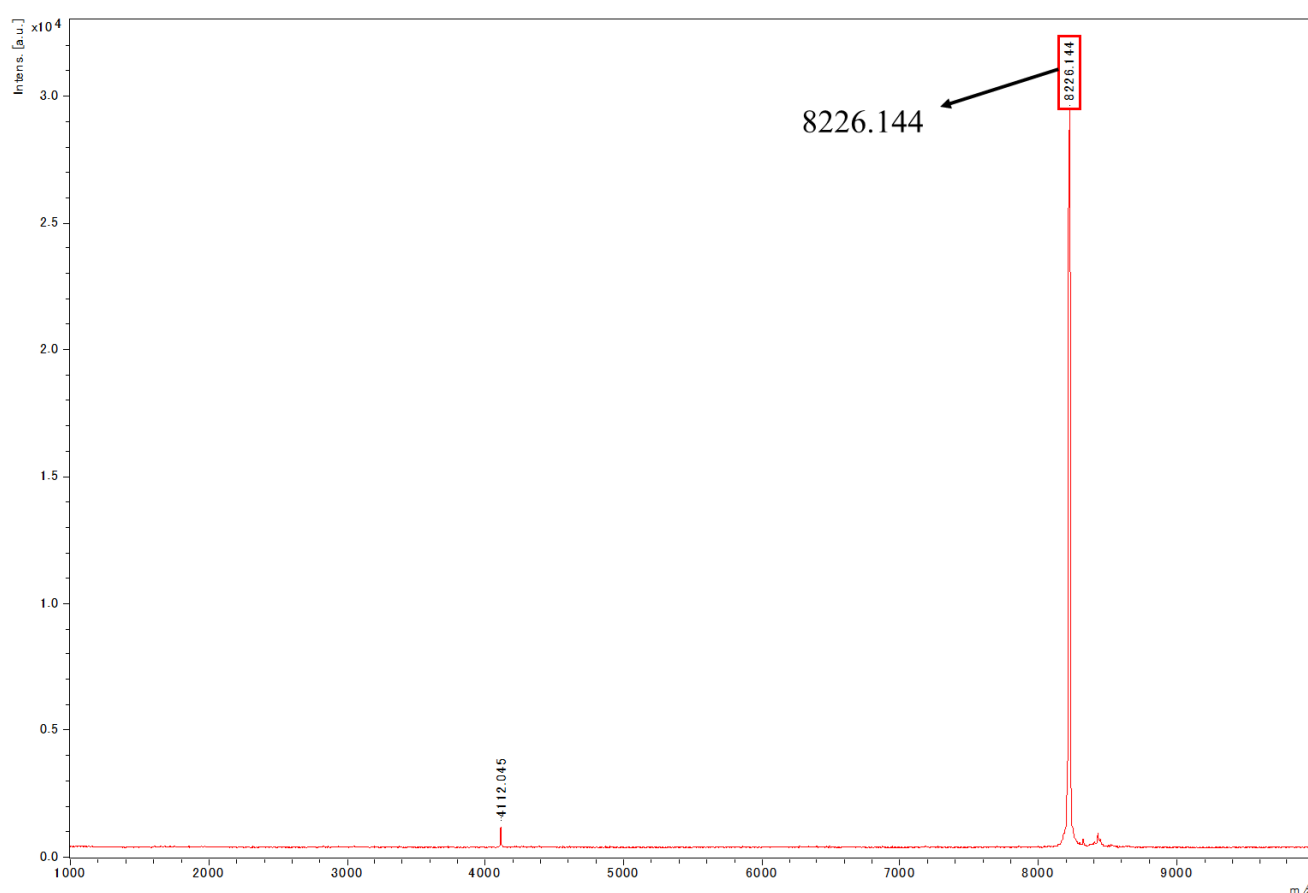


図 2.14. 質量分析による精製タンパク質の確認

EPC3-ND は 6 個のシステイン残基を含み、3 組のジスルフィド結合を形成することが予測されている。ジスルフィド結合 1 組の形成に伴い、2 個の水素原子が失われる (-2 Da) ため (Haniu et al., 1997)、完全還元型の理論分子量 (8231.22 Da) に対して、酸化型の理論分子量は 6 Da 減少し 8225.22 Da となる。さらに、MALDI イオン化過程では 1 個のプロトン (+1 Da) 付加が生じることから、理論 m/z 値は 8226.22 Da と算出される。

本研究で得られた実測値 8226.144 は、この理論値と極めて良好に一致しており、精製した EPC3-ND が 3 組のジスルフィド結合を有する酸化型分子として回収されていることを強く支持する結果である。この結果は、後続の CD 測定および溶液 NMR 解析に供する試料として、分子量および酸化状態の観点から適切であることを示している。

2.3.7 ジスルフィド結合パターンの解析

EPC3-ND に含まれる 6 個のシステイン残基間に形成されるジスルフィド結合の組み合わせを解析するため、還元剤非存在下でトリプシン消化を行い、生成したペプチド断片を MALDI-TOF-MS により解析した。解析に先立ち、アミノ酸配列および構造予測に基づき、形成が想定される 3 組のジスルフィド結合候補をあらかじめ推定し、その組み合わせを図示した（図 2.15）。

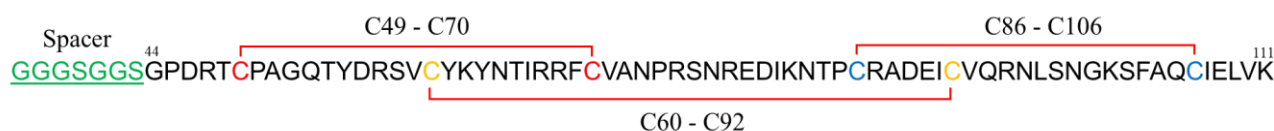


図 2.15. 予測されたジスルフィド結合パターン

MALDI-TOF-MS により得られたスペクトル中には、これらの予測されたジスルフィド結合候補に対応すると考えられるクロスリンクペプチド（cross-linked peptides）が複数検出された。具体的には、 m/z 1529.799 のピークはペプチド SVC⁶⁰YK と ADEIC⁹²VQR がジスルフィド結合によって連結されたフラグメントに対応し、計算値 1529.7315 と良好な一致を示した。また、 m/z 1724.965 のピークは NTPC⁸⁶R と SFAQC¹⁰⁶IELCK の結合体に相当し、計算値 1724.8687 との差は 0.1 Da 前後であった。さらに、 m/z 1914.997 のピークとして検出されたシグナルは、TC⁴⁹PAGQTYDR と FC⁷⁰VANPR がジスルフィド結合で連結されたペプチド断片に対応し、計算値 1914.8814 と高い一致を示した（図 2.16）。

これらのクロスリンクペプチドはいずれも、事前に予測したジスルフィド結合の組み合わせ（C49-C70、C60-C92、C86-C106）に対応しており、EPC3-ND 中において 3 組のジスルフィド結合が形成されていることを示す実験結果である。

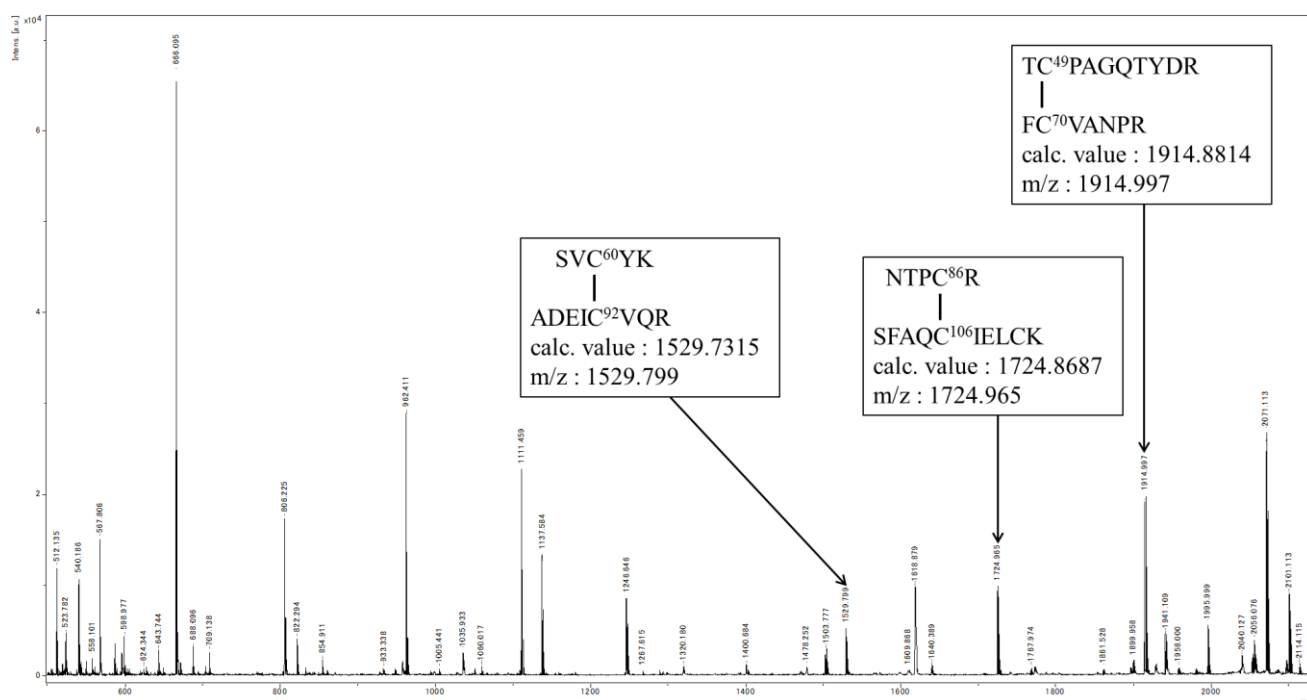


図 2.16. MALDI-TOF-MS によるジスルフィド結合ペプチドの同定

以上の結果から、EPC3-ND に含まれる 6 個のシステイン残基は、3 組のジスルフィド結合を形成していることが質量分析学的に示された。本解析は、EPC3-ND の立体構造安定化に寄与するジスルフィド結合パターンを理解する上で重要な基礎情報を提供するものであり、後続の溶液 NMR 解析に向けた構造的前提条件を与える結果である。

2.3.8 CD 測定結果の解析

EPC3-ND の 2 次構造特性およびその溶液条件依存性を評価するため、CD スペクトル測定を行った。測定にあたっては、各条件に対応する溶媒（バッファー）の CD スペクトルを別途取得し、すべての試料スペクトルについて溶媒スペクトルを差し引いた補正データを用いて解析を行った。

図 2.17 に、pH 3.0、4.0、5.0、6.0 および 7.0 条件下で測定した CD スペクトルを示す。いずれの pH 条件においても、約 205 nm 付近に顕著な負ピークが観測され、EPC3-ND が β 構造に富む折りたたみ構造を形成していることを示すスペクトル形状が得られた。このような短波長側に強い負ピークを示す CD スペクトルは、 β シートを主体としつつ、ターンやループ構造を含むタンパク質において観測されることが報告されている（Greenfield et al., 1969）。

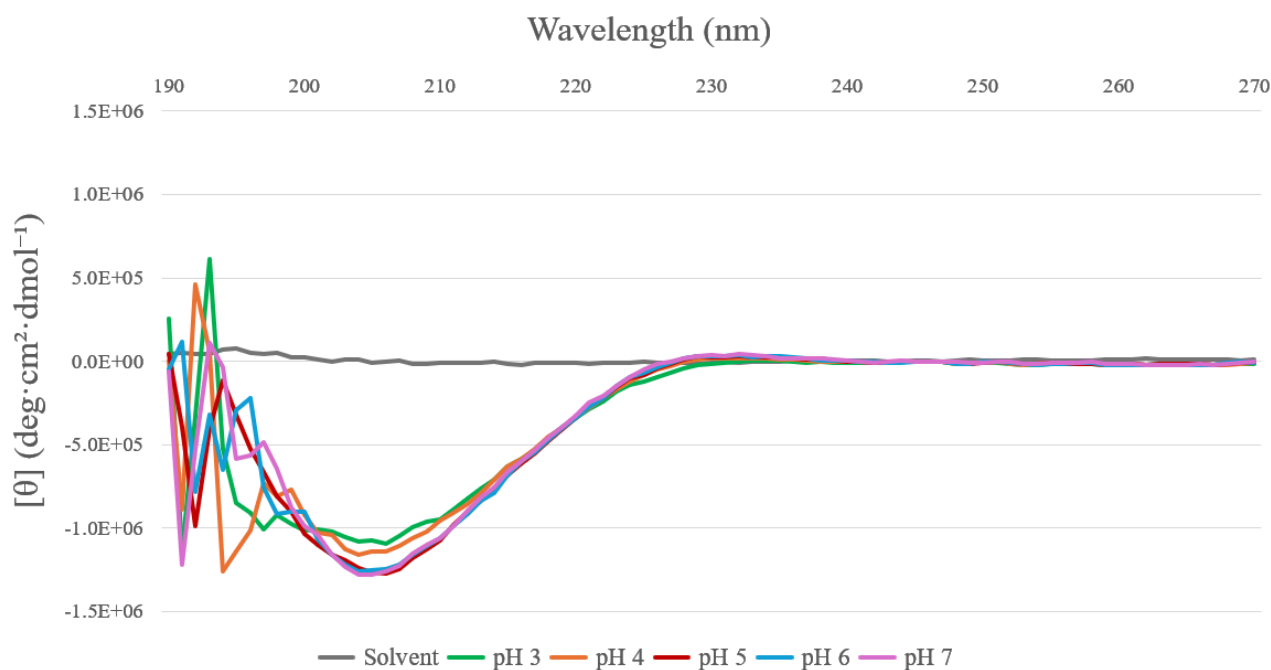


図 2.17. 25 °C における pH 依存的な CD スペクトルの変化

pH 条件間で比較すると、pH 5.0、6.0 および 7.0 におけるスペクトルは全波長域にわたってほぼ完全に重なっており、弱酸性から中性条件下では EPC3-ND の 2 次構造が高い安定性を示すことが明らかとなった。一方、pH 4.0 および 3.0 の強酸性条件では、205 nm 付近の短波長領域においてベースラインの上昇やスペクトル形状のわずかな変化が認められ、強酸性環境下では構造の揺らぎや部分的な無秩序化が生じている可能性が示唆された。

次に、イオン強度の影響を評価するため、pH 7.0 条件下において NaCl 濃度 50、100 および 150 mM の 3 条件で CD スペクトルを測定した（図 2.18）。その結果、いずれの条件においても約 205nm 付近の負ピークを特徴とする β 優位のスペクトル形状は維持されていたものの、負ピークの強度や形状に差異が認められ、イオン強度の変化に応答して 2 次構造のバランスが変化することが示唆された。

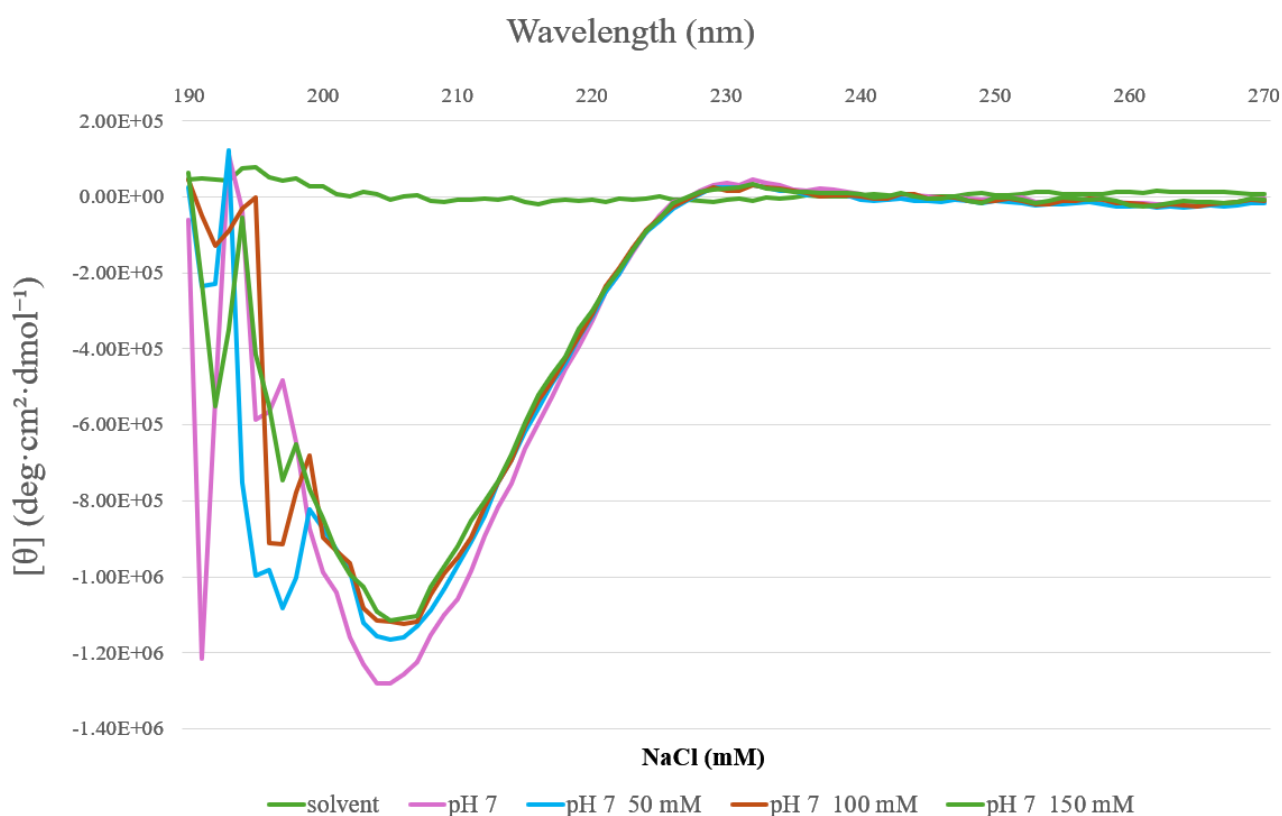


図 2.18. pH 7.0 におけるイオン強度依存的な CD スペクトルの比較

以上を結果より、EPC3-ND は β シートを主体とした 2 次構造を有し、弱酸性から中性域（pH 5.0 ~ 7.0）において高い構造安定性を示す一方で、強酸性条件およびイオン強度の変化に対して構造的応答性を示すことが明らかとなった。このような性質は、溶液環境に応じて構造特性が調整されるエフェクタータンパク質の特徴を反映している可能性がある（Mesarich et al., 2015）。

2.9 参考文献

- Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J., and Georgiou, G. (1999). Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 13703-8. doi: 10.1073/pnas.96.24.13703
- Bornhorst, J. A., and Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245-54. doi: 10.1016/s0076-6879(00)26058-8
- Esposito, D., and Chatterjee, D. K. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 353-8. doi: 10.1016/j.copbio.2006.06.003
- Franceschetti, M., Maqbool, A., Jiménez-Dalmaroni, M. J., Pennington, H. G., et al. (2017). Effectors of filamentous plant pathogens: commonalities amid diversity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81, e00066-16. doi: 10.1128/MMBR.00066-16
- Gorman, J.J., Wallis, T.P., and Pitt, J.J. (2002). Protein disulfide bond determination by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 21, 183-216. doi: 10.1002/mas.10025
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1, 2876-90. doi: 10.1038/nprot.2006.202
- Greenfield, N. J., and Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 8, 4108-16. doi: 10.1021/bi00838a031
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., and Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22, 346-53. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.04.006
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596, 583-589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2
- Kleiger, G., and Eisenberg, D. (2002). GXXXG and GXXXA motifs stabilize FAD and NAD(P)-binding Rossmann folds through a C(alpha)-H...O hydrogen bonds and van der Waals interactions. *Journal of Molecular Biology*, 323, 69-76. doi: 10.1016/s0022-2836(02)00885-9
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., et al. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology*, 11, 187-93. doi: 10.1038/nbt0293-187
- Mesarich, C. H., Bowen, J. K., Hamiaux, C., and Templeton, M. D. (2015). Repeat-containing protein effectors of plant-associated organisms. *Frontiers in Plant Science*, 6, 872. doi: 10.3389/fpls.2015.00872
- Murzin, A. G. (1998). How far divergent evolution goes in proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 8, 380-7. doi: 10.1016/s0959-440x(98)80073-0
- Parks, T. D., Leuther, K. K., Howard, E. D., Johnston, S. A., et al. (1994). Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Analytical Biochemistry*, 216, 413-7. doi: 10.1006/abio.1994.1060

Petre, B., and Kamoun, S. (2014). How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? *PLoS Biology*, 12, e1001801. doi: 10.1371/journal.pbio.1001801

Scopes, R. K. (1994). *Protein Purification: Principles and Practice*. 3rd ed. New York: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-1-4757-2333-5

Sørensen, H. P., and Mortensen, K. K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 4, 1. doi: 10.1186/1475-2859-4-1

Wand, A. J. (2013). The dark energy of proteins comes to light: conformational entropy and its role in protein function revealed by NMR relaxation. *Current Opinion in Structural Biology*, 23, 75-81. doi: 10.1016/j.sbi.2012.11.005

Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. New York: Wiley.

Xu, Z., Singkaravanit-Ogawa, S., Takano, Y., and Ohki, S. (2025). Identification and NMR-based structural characterization of the functional domain of EPC3, a virulence effector of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1691993. doi: 10.3389/fpls.2025.1691993

第3章 NMR 実験と解析および構造計算

3.1 緒言

本研究では、溶液 NMR 解析に適した高品質な $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C}$ 2 重安定同位体標識 EPC3-ND 試料を調製するため、M9 最小培地を用いた同位体標識発現系を構築した。多次元 NMR 測定 (^1H - ^{15}N HSQC、HNCO、HNCACB など) では、観測対象となる核スピンを有する安定同位体の導入が、スペクトル感度および分解能を左右する重要な要因となる。そのため、タンパク質発現段階で ^{15}N および ^{13}C を均一に取り込ませることが、信頼性の高い構造解析を行う上で不可欠である (Clore et al., 1994; Kay et al., 2011)。

M9 培地は、成分組成が厳密に定義された最小培地であり、LB 培地などのリッチ培地と異なり、非標識アミノ酸に由来する同位体希釈が生じないという利点を有する。この特性により、高度に均一な同位体標識が可能となるとともに、副代謝産物の生成が抑制され、後続の精製工程および NMR 解析における再現性の向上に寄与する (Marley et al., 2001; Cavanagh et al., 2007)。

発現宿主には、細胞質におけるジスルフィド結合形成能が強化され、かつ稀少コドンに対応する tRNA を補完する機能を有する *E. coli* Rosetta-gamiTM B (DE3) / pLysS 株を用いた。本菌株は、複数のシステイン残基を含む EPC3-ND の正しいフォールディングおよび可溶性発現を促進する点で、本研究の目的に適していると考えられた (Kane, 1995; Bessette et al., 1999)。

3.2 実験方法

3.2.1 安定同位体標識および試料調製

$^{15}\text{N} / ^{13}\text{C}$ 2 重安定同位体標識 EPC3-ND の調製には、M9 最小培地を用いた発現系を採用した。M9 培地の基本組成を表 3.1 に示す。窒素源として $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 、炭素源として ^{13}C -glucose を用いることで、タンパク質全体への均一な同位体標識を行った。

A solution	121 °C、15 min、Autoclave
Na ₂ HPO ₄	14 g
KH ₂ PO ₄	7 g
¹⁵ NH ₄ Cl	2 g
NaCl	1 g
Vitamin B ₁	40 µg
B solution	Final concentration (Filtered)
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0.1 mM
FeCl ₃	0.02 mM
¹³ C-Glucose	1 g/L
Ampicillin	100 µg/mL

表 3.1. M9 最小培地の基本組成

培地調製にあつたては、まず A 液を 121 °C で 15 min オートクレーブ滅菌し、室温まで冷却した。その後、クリーンベンチ内での無菌操作下で B 液を添加し、十分に混合することで、最終的な同位体標識 M9 培地を調製した。なお、B 液に含まれる各成分はフィルター滅菌したものを使用した。

E.coli Rosetta-gami™ B (DE3) / pLysS 株を調製した同位体標識 M9 培地に接種し、37 °C で振とう培養を行った。培養液の OD₆₀₀が 0.6 ~ 0.8 に達した時点で、IPTG を最終濃度 0.1 mM となるよう添加し、37 °C で 3 h の誘導発現を行った。誘導終了後、6,000 × g、4 °C、20 min の条件で遠心回収した。

回収した菌体は、第 2 章で確立した精製プロトコルに従って処理し、多次元 NMR 測定に供するための高純度 ¹⁵N/¹³C 標識 EPC3-ND 試料を調製した。

3.2.2 最適測定条件の探索

本研究では、高分解能 NMR 測定に適した条件を決定するため、EPC3-ND の pH、温度および前処理条件について系統的な検討を行った。まず、溶液中での構造形成の有無およびスペクトル品質を迅速に評価する目的で、特別な最適化を施さず、pH 3.5、25 °C において ^1H - ^{15}N HSQC 測定を実施し、シグナルの有無および分散状態を確認した (Kay et al., 2011)。

次に、第 2 章で得られた CD 測定による構造安定性評価の結果を参考にし、測定 pH を 7.0 に固定した上で、35 °C から 1 °C まで 5 °C 刻みで ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行い、温度依存的なスペクトル変化を評価した (Palmer, 2004)。得られた結果から、ピーク分散および線幅の観点で最も良好な温度条件を選定した。

さらに、試料中に存在する可能性のある誤フォールディング状態や会合体を低減し、試料の均質性を向上させる目的で、90 °C で 5 min の加熱後、氷上で 30 min 急冷する処理を試みた。この処理は、可逆的な再フォールディング挙動を示す成分が存在する可能性を考慮し、その均一化を促すことを意図した (Bax et al., 1993)。

これらの検討結果を総合的に評価し、最終的な NMR 測定条件を決定した。以降の多次元 NMR 測定は当該条件下で実施した (表 3.2)。

分類	実験名	取得される主な情報	役割
主鎖連鎖帰属	HNCA	i / (i-1) の $\text{C}\alpha$	i / (i-1) の連鎖判定
	HNCACB	i / (i-1) の $\text{C}\alpha$ / $\text{C}\beta$	i / (i-1) の識別強化
	CBCA(CO)NH	(i-1) の $\text{C}\alpha$ / $\text{C}\beta$	前残基の特定
	HNCO	(i-1) の CO	主鎖連鎖帰属の補助
	C(CO)NH	(i-1) 残基の側鎖の ^{13}C 化学シフト	前残基側鎖情報による連鎖帰属の補助
側鎖帰属	^1H - ^{13}C HSQC	H-C 相関	側鎖 H-C 相関の確認
	HCCH-TOCSY	側鎖スピン連鎖情報	側鎖スピン系情報の取得
	H(CCO)NH	(i-1) 残基の側鎖プロトンと主鎖 NH との相関	側鎖-主鎖相関情報の補助
距離情報	^{13}C -NOESY (120 ms)	中距離 / 長距離 NOE	中/長距離情報の取得
	^{15}N -NOESY (120 ms)	NH 近傍 NOE	主鎖近傍の距離情報取得
補助実験	^{15}N -TOCSY	NH スピン連鎖	アミノ酸タイプ推定による帰属の確認

表 3.2. 立体構造決定および動的特性解析のために取得した NMR スペクトル

3.2.3 連鎖帰属

EPC3-ND の化学シフト帰属は、前節で最適化した条件 (pH 7.0、35 °C) において、TCI クライオプローブを搭載した Bruker AVANCE III 800 MHz 分光計を用いて実施した。試料には、均一に ^{15}N および ^{13}C で標識された EPC3-ND を、50 mM NaCl および 10% D_2O を含む水溶液 (pH 7.0) に調製したものをを用いた。

主鎖および側鎖の体系的な帰属を確立するため、多種類の 3 重共鳴実験および NOESY 実験を組み合わせて測定を行った。使用した各 NMR 実験の目的および取得情報の概要を表 3.2 に示す。

まず ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを取得し、観測される主鎖 NH シグナルの全体像を確認した。その後、HNCA、HNCACB、CBCA(CO)NH、HNCO および C(CO)NH 実験を組み合わせることで、残基 i と $(i-1)$ の主鎖および前残基側鎖炭素の化学シフト情報を相補的に取得し、順次的な主鎖の連鎖帰属を行った (Ikura et al., 1990; Grzesiek et al., 1992)。

主鎖の帰属完了後、側鎖スピンシステムの同定には HCCH-TOCSY および ^1H - ^{13}C HSQC を主として用い、必要に応じて H(CCO)NH などの実験により側鎖帰属の補強を行った (Clore et al., 1990)。

立体構造計算に必要な距離拘束情報は、 ^{13}C -separated NOESY および ^{15}N -separated NOESY (mixing time 120 ms) (Marion et al., 1989; Fesik et al., 1990) から得られた NOE ピークに基づいて抽出した。さらに、 ^{15}N -separated TOCSY を用いて NH 近傍のスピン連鎖を確認し、帰属結果の一貫性および妥当性を検証した (Cavanagh et al., 2007)。

3.2.4 立体構造の計算

共鳴線の化学シフト帰属が完了した後、 ^{15}N -separated NOESY および ^{13}C -separated NOESY (mixing time 120 ms) スペクトルから NOE ピークを収集した。NOE ピークリストを用い、CYANA により自動的に NOE 割り当ておよび距離拘束の生成を行い、得られた距離拘束に基づいて構造計算を実施した (Güntert, 2004)。

主鎖の 2 面角拘束については、 ^1H 、 ^{15}N 、 ^{13}C の化学シフト情報を入力として TALOS により推定された ϕ および ψ 角の範囲を採用し、構造計算に組み込んだ (Shen et al., 2009)。これにより、化学シフト情報に基づく局所的な主鎖コンフォメーションの制約を導入した。

さらに、NOE パターンおよび予備的な 2 次構造情報から、安定した 2 次構造要素が形成されている可能性が高いと判断された領域に対して水素結合拘束を付加した。水素結合拘束

は、 $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ の各水素結合につき N と O および H と O の距離拘束として設定し、合計 38 本の水素結合距離拘束を構造計算に導入した (Wüthrich, 1986; Nilges et al., 1995)。

加えて、第 2 章での質量分析およびジスルフィド結合解析の結果に基づき、EPC3-ND に存在する 3 組の共有結合性ジスルフィド結合を拘束条件として設定した。これらのジスルフィド結合拘束は、構造計算中を通して維持される強拘束として扱った (Havel et al., 1983)。

以上の NOE 由来距離拘束、TALOS により推定された主鎖 2 面角拘束、2 次構造領域に対する水素結合拘束、および 3 組のジスルフィド結合拘束を入力情報として CYANA による立体構造計算を実施した。得られた構造アンサンブルおよび構造統計の詳細については、次節において結果と考察として示す。

3.3 結果と考察

3.3.1 NMR 測定条件の最適化

初期条件として、pH 3.5、25 °C において取得した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを図 3.1 に示す。この条件下では、観測されたピーク数は理論的に予想される残基数と大きく乖離していないものの、スペクトル全体にわたってピークの重なりが顕著であり、一部の残基ではピークの分裂やブロードニングが観察された。特に低磁場側 (^1H 8.5 ~ 9.5 ppm 付近) においてピークが密集しており、個々の主鎖 NH シグナルを明確に分離および追跡することは困難であった。これらの特徴は、EPC3-ND が当該条件下において構造的に均一な単一コンフォメーションを形成していない可能性を示唆している。すなわち、複数の構造状態が共存している、あるいは主鎖 NH シグナルが化学交換の影響を受けている可能性が考えられる (Dyson et al., 2004)。

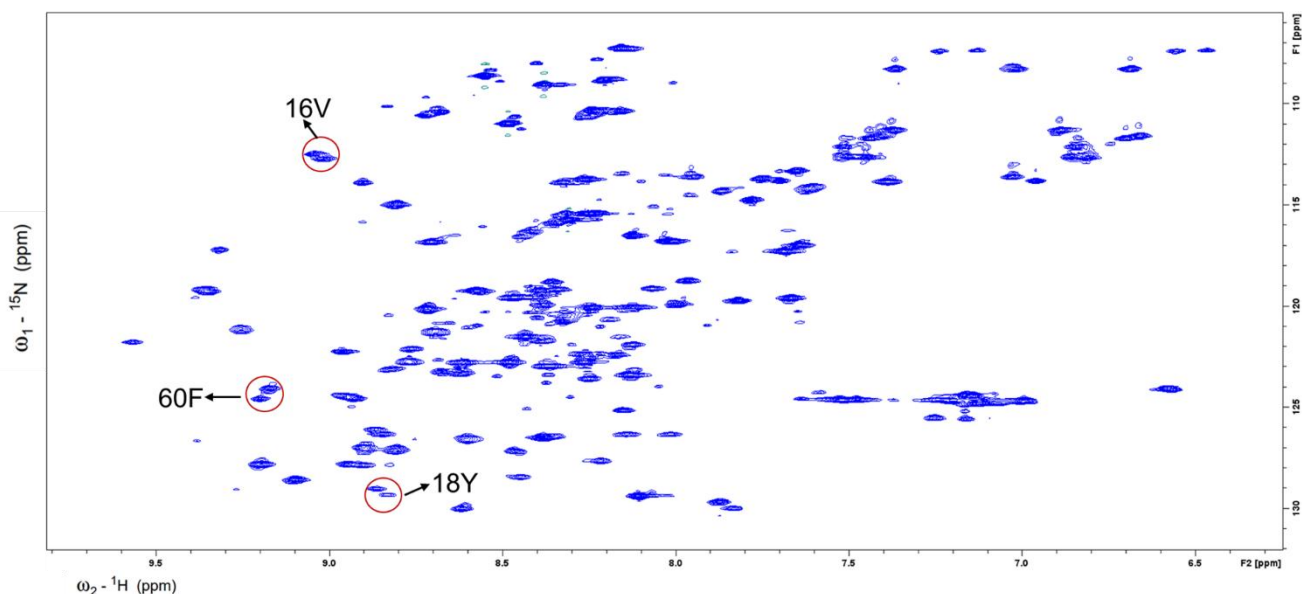


図 3.1. ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル (pH: 3.5、25 °C)

次に、より均一なフォールド状態を与える条件を探索する目的で、pH を 7.0 に固定して異なる温度で HSQC 測定を行った (図 3.2)。35 °C から 1 °C まで 5 °C 刻みで測定した結果、温度低下に伴いピークの線幅が徐々に増大し、特に 25 °C 以下ではピーク強度の著しい低下および分散の悪化が認められた。一方、25 ~ 35 °C の温度範囲では、ピーク分散およびシグナル強度が相対的に良好であった。EPC3-ND がこの温度域において最も均一な構造集団を形成していることが示された。図 3.3 に示す 25 °C、30 °C、35 °C の比較からも、35 °C 条件において最もシャープかつ分離したピークが得られることが明確である。これらの結果から、低温条件は EPC3-ND に対して必ずしもスペクトル品質の向上をもたらさず、分子回転相関時間の増大や化学交換挙動の変化により、結果として線幅の増大およびシグナル感度の低下を引き起こす可能性が示唆された (Palmer, 2004)。

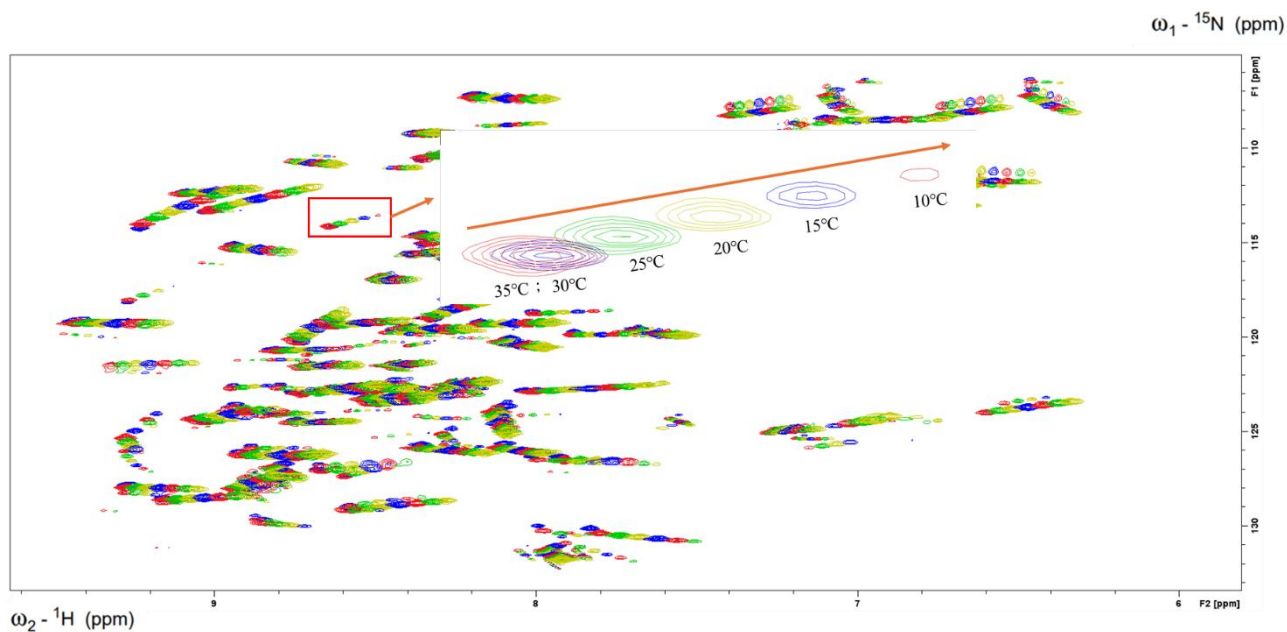


図 3.2. 温度依存的な ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ (pH 7)
pH 7 条件下において、35 °C から 1 °C まで 5 °C 間隔で測定した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせを示す。

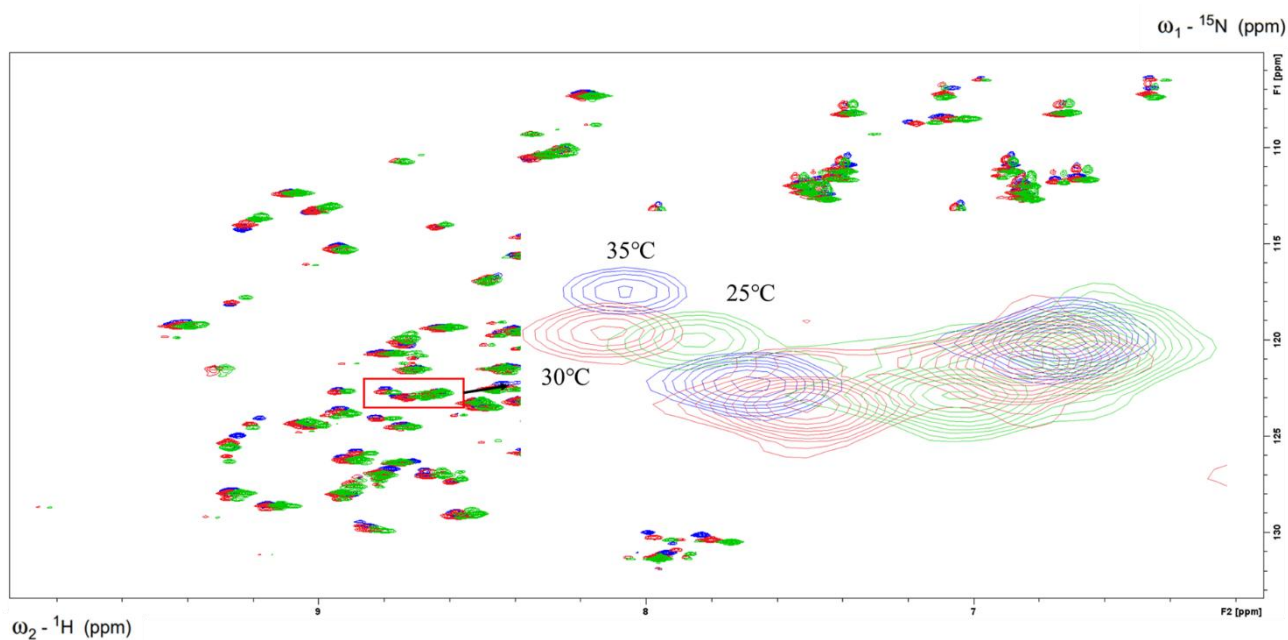


図 3.3. 異なる温度条件における ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの比較 (pH 7)
35 °C (青)、30 °C (赤)、25 °C (緑) で測定した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを重ね合わせて示す。

続いて、温度を 35 °C に固定し、pH 依存性を評価した（図 3.4）。pH 5.0、6.0、7.0 の条件を比較したところ、pH 5.0 および 6.0 では一部のピークに重なりや広がりが残存していたのに対し、pH 7.0 においてはスペクトル全体の分散が最も良好であり、ピーク形状も比較的均一であった。特定のピーク群では、pH 上昇に伴う連続的な化学シフト変化が観測されており、これは残基の電荷状態の変化や、それに起因する局所的な化学環境の変化を反映していると考えられる（Cavanagh et al., 2007）。以上より、EPC3-ND は弱酸性条件よりも中性条件において、より均質な構造集団を形成することが示唆された。

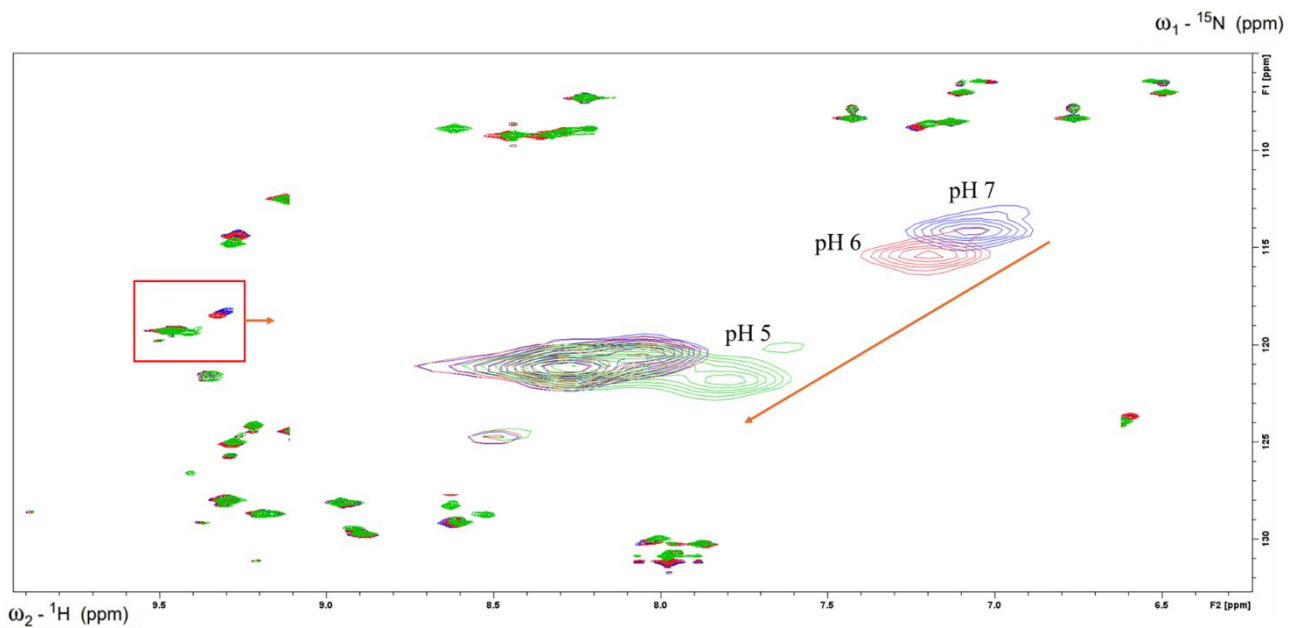


図 3.4. pH 依存的な ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの変化 (35 °C)
35 °C 条件下において、pH 7 (青)、pH 6 (赤)、pH 5 (緑) で測定した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを比較した。

しかしながら、pH 7.0 および 35 °C という条件下においても、依然として一部のピークは弱く、バックグラウンドノイズや微弱な不均一性が残存していた（図 3.5）。そこで、試料の均質性をさらに向上させる目的で、90 °C で 5 min 加熱後、氷上で急冷する処理を導入した。熱処理前後の HSQC スペクトルを比較すると（図 3.6）、処理後にはピーク形状の明瞭化、弱いシグナルの強度増加、およびノイズレベルの低下が認められた。この改善は、熱処理によって一部の不均一な構造集団や誤フォールディング状態が低減された可能性を示唆するものと考えられる（Bax et al., 1993）。ただし、熱処理過程での構造状態については本研究では直接的な検証を行っていないため、その詳細な分子機構については今後の解析が必要である。

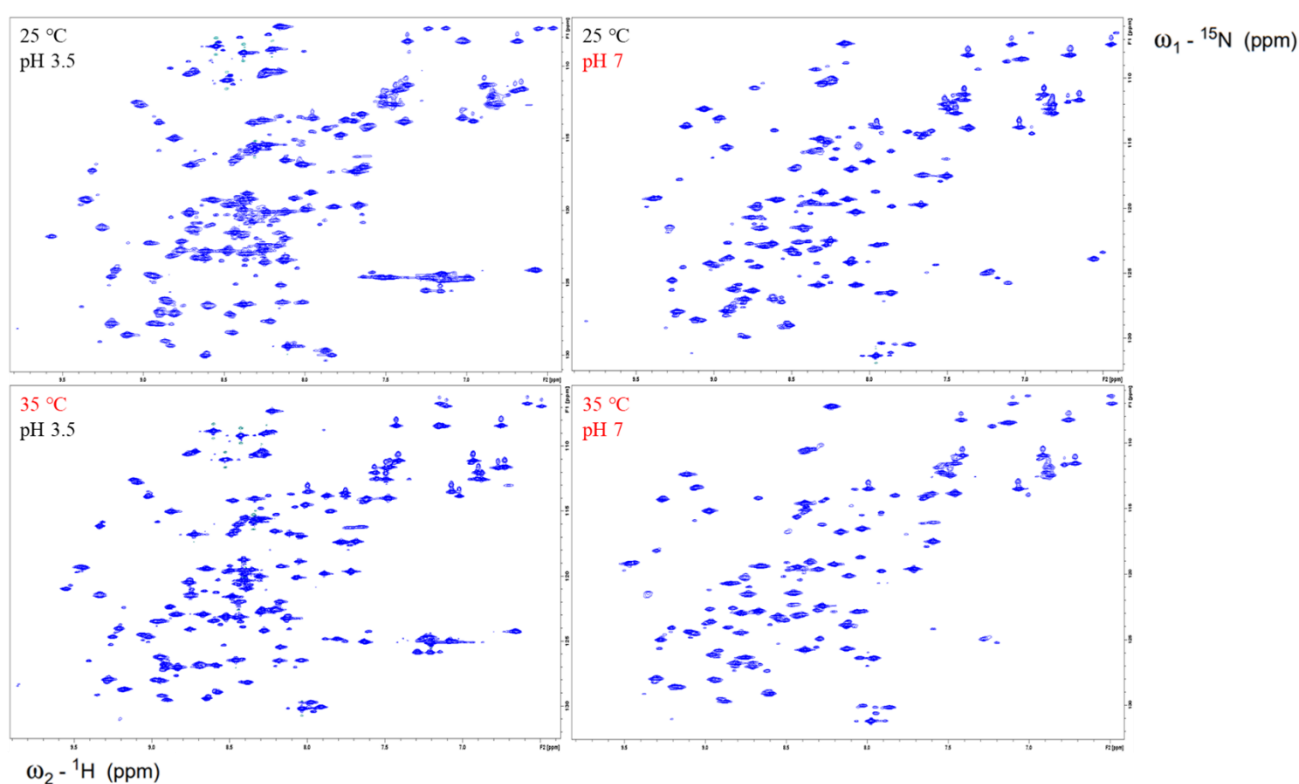


図 3.5. 異なる温度および pH 条件における ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル
25 °C および 35 °C、pH 3.5 および pH 7 条件下で測定した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示す。

以上の結果から、熱処理を施した試料を用いて pH7.0、35 °C で測定すると最も良好な NMR スペクトルが得られることが判明した。この条件下では、ピーク分散、線幅、シグナル強度のいずれにおいてもバランスの取れた改善が認められ、主鎖および側鎖の化学シフト帰属を高精度に進めるために十分なスペクトル品質が得られると判断した。

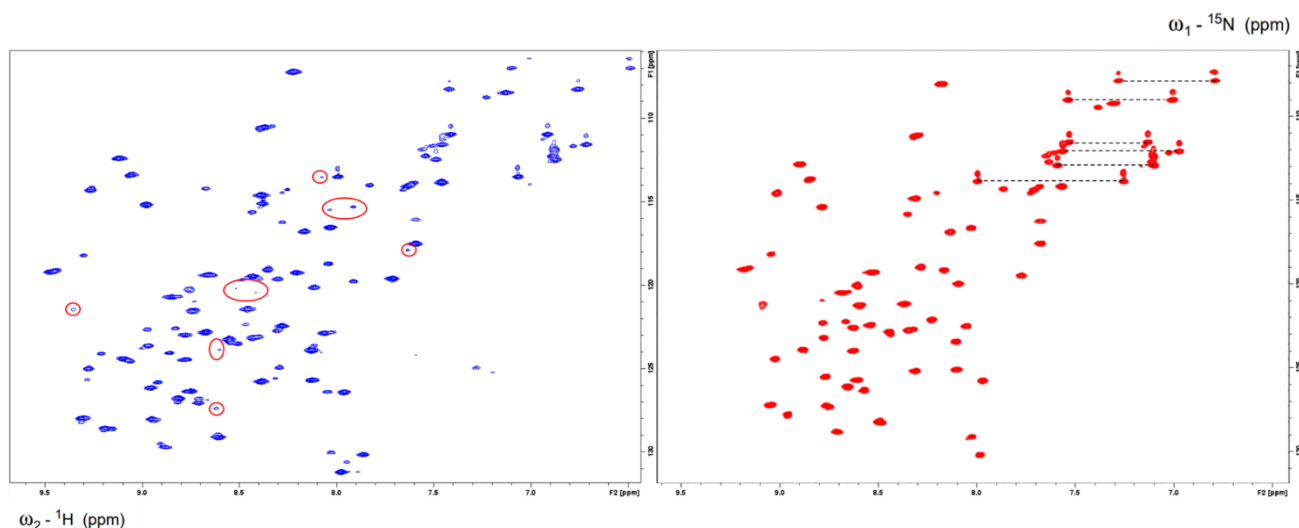


図 3.6. 熱処理前後における ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの比較
35 °C、pH 7 条件下で測定した HSQC スペクトル（左）と、熱処理後に測定したスペクトル（右）を示す。

3.3.2 連鎖帰属の結果

最適化した測定条件下において多次元 NMR 測定を行い、EPC3-ND の化学シフト帰属を実施した。まず取得した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルは良好なピーク分散を示し（図 3.7）、本タンパク質が溶液中で構造的に高い均一性を有することを示唆している。ほぼ全ての残基において単一かつシャープなクロスピークが観測され、主鎖および側鎖の化学シフト帰属を進めるために十分な分解能が得られた（Cavanagh et al., 2007）。

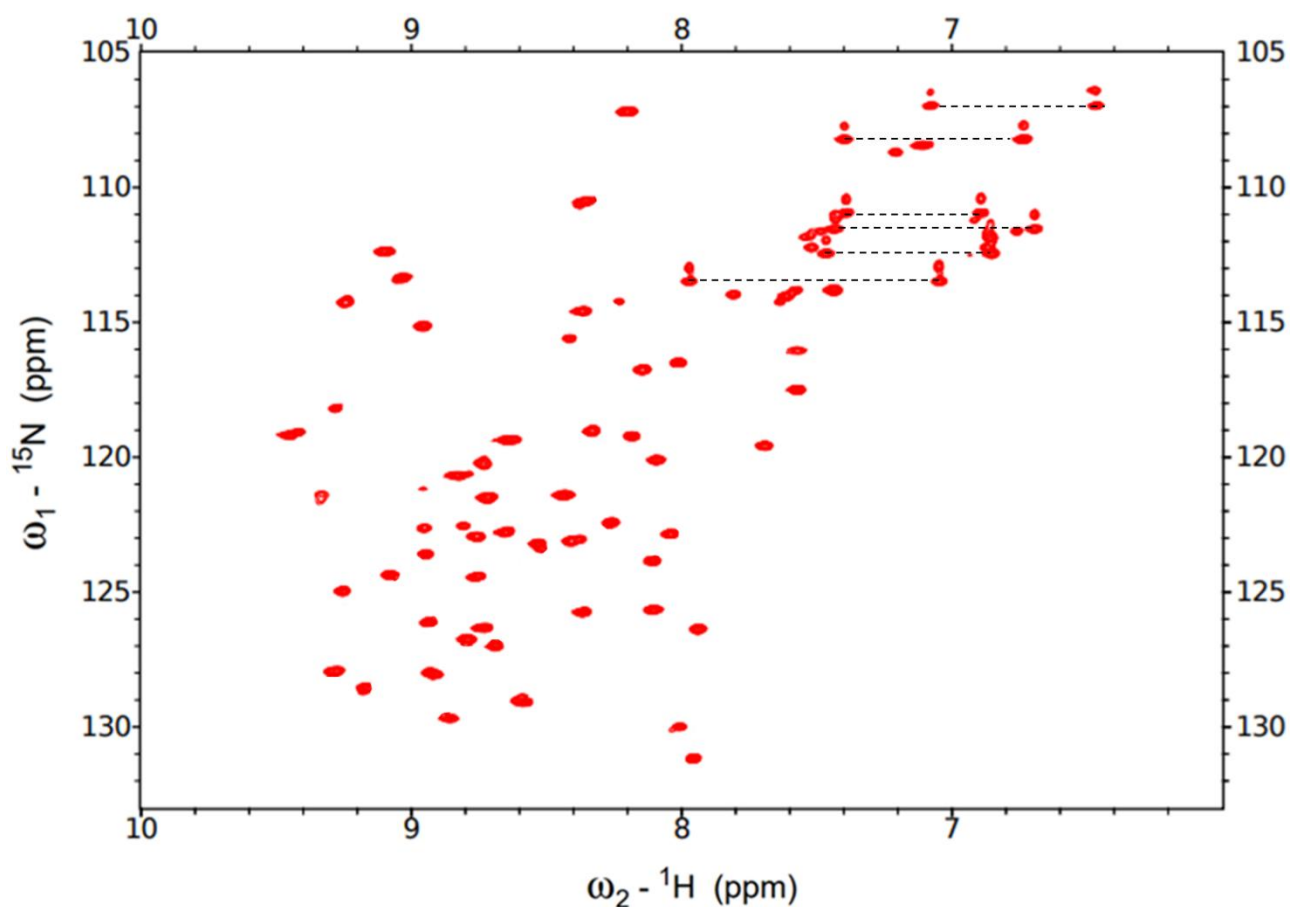


図 3.7. 熱処理後の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル (35 °C、pH 7)
点線は Asn および Gln 側鎖アミドに由来する対応シグナル対を示す。

主鎖の $i/ (i-1)$ の連続性を確立するため、HNCA、HNCACB、CBCA(CO)NH、HNCO および C(CO)NH 実験を組み合わせ解析を行った。HNCA および HNCACB 測定により、各残基 (i) および 1 つ前の残基 ($i-1$) に対応する $^{13}\text{C}\alpha$ 化学シフト情報が得られた。さらに、HNCACB では $^{13}\text{C}\alpha$ および $^{13}\text{C}\beta$ の化学シフト情報が観測された。CBCA(CO)NH、HNCO、C(CO)NH は ($i-1$) 残基由来のシグナルを与える。これらの 3 重共鳴実験で得られる $\text{C}\alpha$ および $\text{C}\beta$ の化学シフト情報を、残基 i と ($i-1$) の対応関係に基づいて比較することにより、隣接するスピン系を明確に連結し、アミノ酸配列に沿った主鎖の連鎖帰属を確立した (図 3.8)。

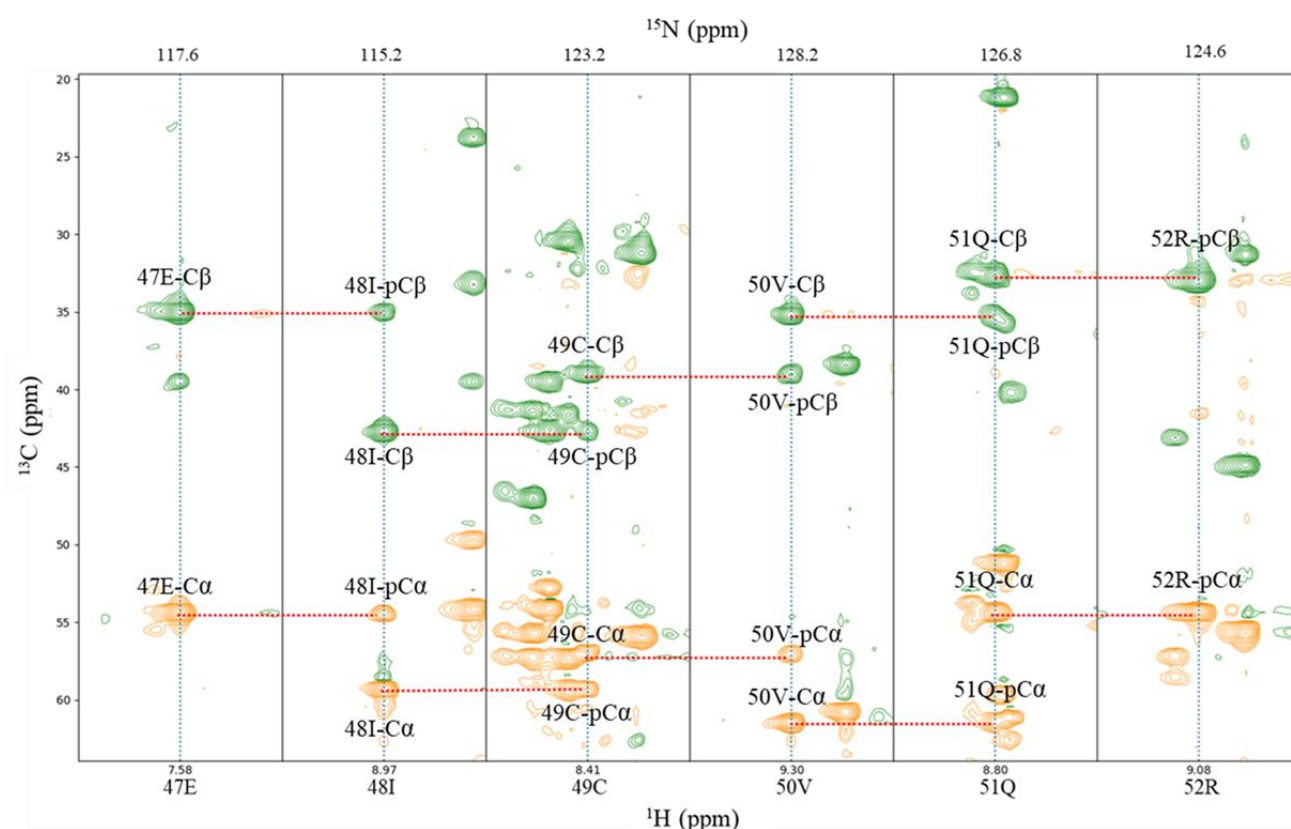


図 3.8. HNCACB スペクトルのストリッププロットの例
連続する残基に対応する C α および C β シグナルを示し (p は前残基 (i-1) に由来するシグナルを示す)、主鎖帰属に用いた解析例を示す。

主鎖帰属の完了後、 ^1H - ^{13}C HSQC、HCCH-TOCSY (spinlock time 22 ms)、H(CCO)NH および C(CO)NH を用いて側鎖の帰属を行った。これらの実験結果を統合することで、ほぼ全ての残基について側鎖の化学シフトを同定することができた。

さらに、立体構造解析に必要な距離制約情報を得るため、 ^{13}C -separated NOESY および ^{15}N -separated NOESY (いずれも mixing time 120 ms) を測定し、中距離および長距離 NOE を多数検出した。これらの NOE は、2 次構造要素間の相互配置や全体構造の決定に有用な距離情報を提供するものである (Wüthrich, 1986)。加えて、 ^{15}N -separated TOCSY (spinlock time 70 ms) を取得し、NH と結合した側鎖プロトンの TOCSY パターンに基づいてアミノ酸タイプの推定を行うことで、帰属結果の妥当性を検証した (Cavanagh et al., 2007)。

以上の NMR データを統合的に解析した結果、EPC3-ND の主鎖および側鎖の化学シフトは高い網羅率で帰属された。具体的には、非プロリン残基に由来する主鎖アミドシグナルの

94%（Pro 残基 4 残基を除く 64 残基）が帰属された（Bax et al., 1993）。なお、本帰属結果の詳細は、同一試料および同一測定条件を用いて独立にまとめた報告において既に公表されている（Xu et al., 2025）、対応する化学シフトデータは BioMagResBank（BMRB, <https://bmrbl.io>）に BMRB accession number 36775 として登録した。図 3.9 に、最終的な主鎖帰属を付与した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示す。

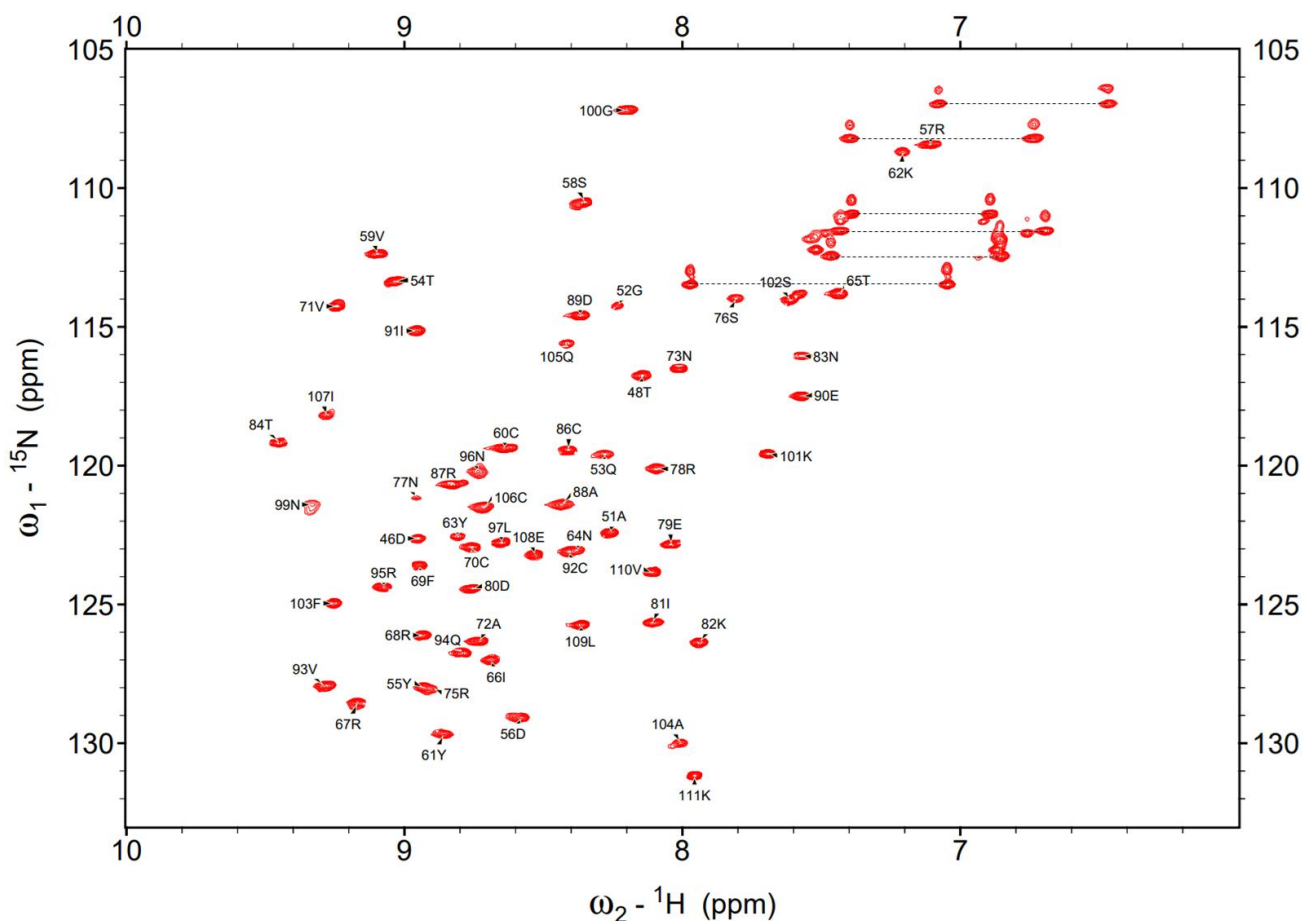


図 3.9. ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル（35 °C、pH 7、thermal treatment）
主鎖アミドシグナルには残基番号を付した。

3.3.3 構造計算の結果

主鎖および側鎖の化学シフト帰属完了後、NOESY スペクトルから抽出した NOE クロスピーク情報をもとに、EPC3-ND の立体構造計算を行った。構造計算には CYANA（version 2.0）を用い、NOE 由来の距離拘束を主要な入力情報として計算を進めた。さらに、TALOS により化学シフトから推定された主鎖 2 面角拘束（ ϕ/ψ ）を導入した（表 3.3）。

加えて、NOE パターンおよび化学シフト情報から示唆される 2 次構造要素に基づき、信頼性の高い領域に対して水素結合距離拘束を慎重に付加した。最終的に、合計 38 本の水素結合距離拘束を構造計算に用いた。また、質量分析により同定された 3 組のジスルフィド結合についても、それぞれに対応する距離拘束を共有結合拘束として組み込んだ。

これらすべての拘束条件を統合して CYANA による計算を行った結果、得られた構造群のうちターゲットファンクション値が最も低い上位 20 個のコンフォメーションを代表的な構造集合として選択した (図 3.10 a)。これら 20 構造は互いに類似したコンフォメーションを示しており、C α 原子に基づく平均 r.m.s.d. (root-mean-square deviation) は 1.926 Å であった (Güntert, 2004)。さらに、得られた構造の主鎖立体化学的妥当性を評価するため、代表構造に基づくラマチャンドランプロット解析を行った (図 3.11)。その結果、主鎖 2 面角 (ϕ/ψ) は主として許容領域に分布しており、顕著な外れ値は認められなかった。これは、得られた構造が主鎖立体化学的に妥当であることを示している (Laskowski et al., 1993)。構造統計の詳細を表 3.4 に示す。

Step	Software
Dihedral angle restraints	TALOS
Structure calculation	CYANA
Structure visualization and superposition	MOLMOL

表 3.3. 構造予測および解析に使用したソフトウェア一覧

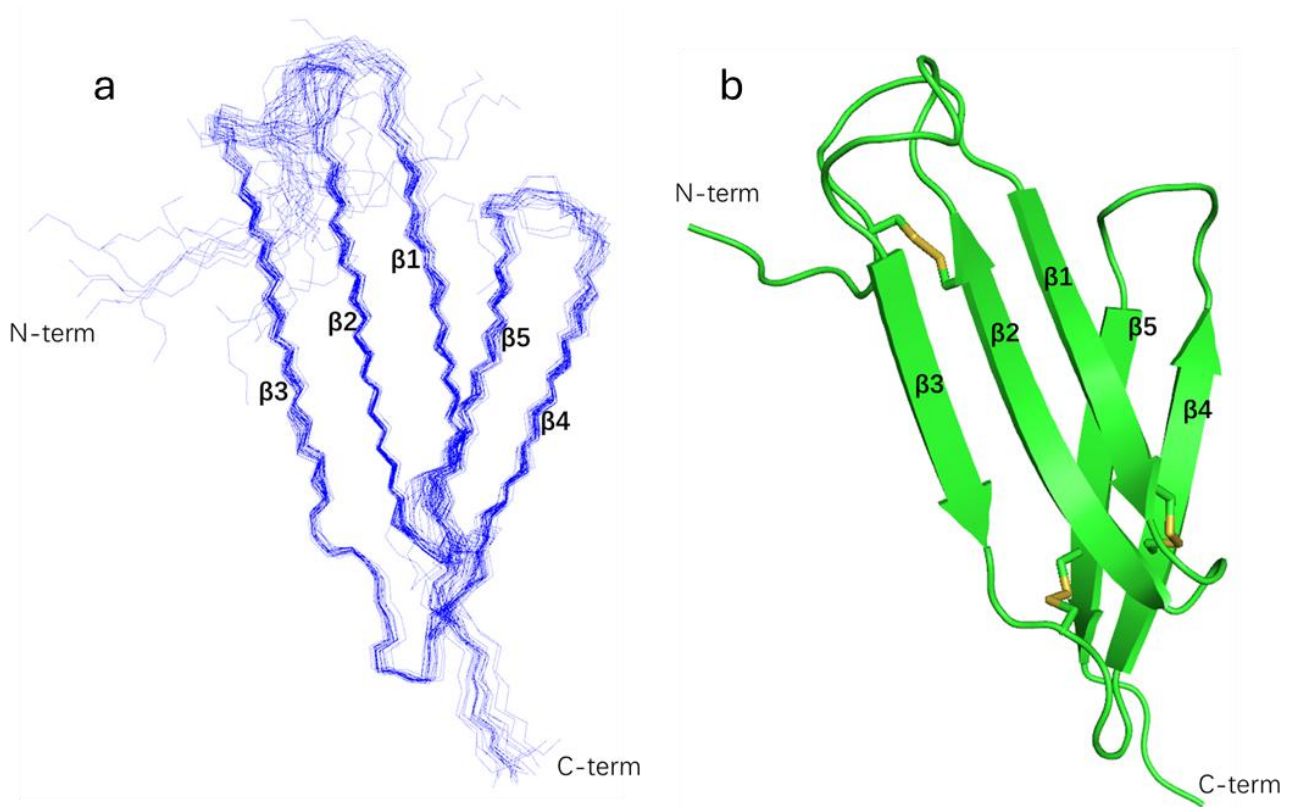


図 3.10. EPC3-ND の立体構造

(a) 最小エネルギー構造 20 個の重ね合わせ。(b) 代表構造のリボン図。βストランド構造を矢印で示す。

Restrains		
NOE distance restraints (total)		1065
intra-residual		372
sequential		248
medium-range		79
long-range		366
Hydrogen bonds	(pair)	38
Dihedral angle	(pair)	79
RMSD from mean structure	(C α)	1.926 Å
Ramachandran statistics (%)		
Most favored regions		83.3 %
Additionally allowed regions		8.3 %
Generously allowed regions		8.3 %
Disallowed regions		0.0 %

表 3.4. 構造計算に用いた拘束条件および構造統計

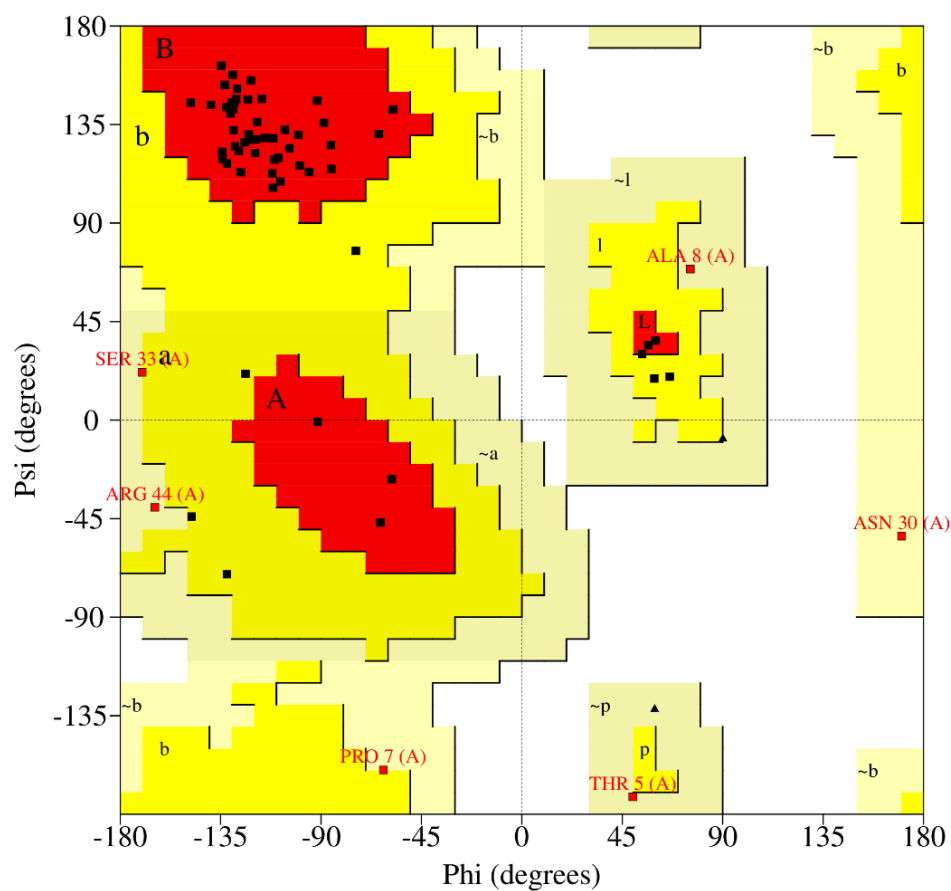


図 3.11. 代表構造のラマチャンドランプロット

最終的に得られた EPC3-ND の立体構造は、5 本の β ストランドから構成されていることが明らかとなった。各 β ストランドは、Tyr 55-Tyr 61 (β 1)、Asn 64-Val 71 (β 2)、Glu 79-Thr 84 (β 3)、Glu 90-Asn 96 (β 4)、Ser 102-Glu 108 (β 5) に対応していた。これらの β ストランドは、2 本および 3 本の β ストランドからなる 2 枚の β シートを形成し、互いに近接して配置されることで、安定した β フォールド構造を形成していた (図 3.10 b)。

また、構造中には 3 組のジスルフィド結合が確認され、それぞれ N 末端の不定形構造領域 (unstructured region) と β 2、 β 1 と β 4、ならびに β 3 直後のループと β 5 の間に形成されていた。これらのジスルフィド結合は、 β シート間を架橋する配置をとっており、EPC3-ND の全体構造の安定化に寄与していると考えられる。

以上の結果から、EPC3-ND は溶液中において、 β シートを主とする明確に定義された構造コアを有することを示された。

3.4 参考文献

- Bax, A., and Grzesiek, S. (1993). Methodological advances in protein NMR. *Accounts of Chemical Research*, 26, 131-138. doi: 10.1021/ar00028a001
- Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J., and Georgiou, G. (1999). Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 13703-8. doi: 10.1073/pnas.96.24.13703
- Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G., Rance, M., et al. (2007). *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*. Academic Press, 2nd edition. doi: 10.1016/B978-0-12-16449-8.X5000-3
- Clore, G. M., and Gronenborn, A. M. (1994). Multidimensional heteronuclear nuclear magnetic resonance of proteins. *Methods in Enzymology*, 239, 349-63. doi: 10.1016/s0076-6879(94)39013-4
- Clore, G. M., Bax, A., Driscoll, P. C., Wingfield, P. T., et al. (1990). Assignment of the side-chain ^1H and ^{13}C resonances of interleukin-1 β using double- and triple-resonance heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 29, 8172-84. doi: 10.1021/bi00487a027
- Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2004). Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chemical Reviews*, 104, 3607-3622. doi: 10.1021/cr030403s
- Fesik, S. W., Zuiderweg, E. R. (1990). Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of isotopically labelled biological macromolecules. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 23, 97-131. doi: 10.1017/s0033583500005515
- Grzesiek, S., and Bax, A. (1992). Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *Journal of Magnetic Resonance*, 96, 432-440. doi: 10.1016/0022-2364(92)90099-S
- Güntert, P. (2004). Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods in Molecular Biology*, 278, 353-78. doi: 10.1385/1-59259-809-9:353

- Havel, T. F., Kuntz, I. D., and Crippen, G. M. (1983). The theory and practice of distance geometry. *Bulletin of Mathematical Biology*, 45, 665-720. doi: 10.1007/BF02460044
- Ikura, M., Kay, L. E., and Bax, A. (1990). A novel approach for sequential assignment of ^1H , ^{13}C , and ^{15}N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin. *Biochemistry*, 29, 4659-67. doi: 10.1021/bi00471a022
- Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 494-500. doi: 10.1016/0958-1669(95)80082-4
- Kay, L. E., Ikura, M., Tschudin, R., and Bax, A. (2011). Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. 1990. *Journal of Magnetic Resonance*, 213, 423-41. doi: 10.1016/j.jmr.2011.09.004
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26, 283-291. doi: 10.1107/S0021889892009944
- Marion, D., Kay, L. E., Sparks, S. W., Torchia, D. A., et al. (1989). Three-dimensional heteronuclear NMR of nitrogen-15 labeled proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 111, 1515-1517. doi: 10.1021/ja00186a066
- Marley, J., Lu, M., and Bracken, C. (2001). A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 20, 71-5. doi: 10.1023/a:1011254402785
- Nilges, M. (1995). Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. *Journal of Molecular Biology*, 245, 645-660. doi: 10.1006/jmbi.1994.0053
- Palmer, A. G. (2004). NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. *Chemical Reviews*, 104, 3623-40. doi: 10.1021/cr030413t
- Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., and Bax, A. (2009). TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *Journal of Biomolecular NMR*, 44, 213-23. doi: 10.1007/s10858-009-9333-z
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. New York: Wiley.
- Xu, Z., Singkaravanit-Ogawa, S., Takano, Y., and Ohki, S. (2025). Identification and NMR-based structural characterization of the functional domain of EPC3, a virulence effector of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1691993. doi: 10.3389/fpls.2025.1691993

第4章 ダイナミクス解析 (NMR 緩和実験)

4.1 緒言

タンパク質の機能発現には、静的な立体構造のみならず、ナノ秒からミリ秒にわたる多様な時間スケールで生じる内部運動が重要な役割を担っていることが、これまでの多くの研究により明らかにされてきた (Frauenfelder et al., 1991; Palmer, 2004; Henzler-Wildaman and Kern, 2007)。このような動的性質は、アミノ酸配列や単一の静的構造情報から直接的に理解することが難しく、特に柔軟性の高い領域では、分子認識や反応機構と密接に関連することが知られている (Wüthrich, 1986; Kay, 1998)。したがって、タンパク質内部の運動性を定量的に評価することは、生物学的機能の理解を深めるうえで重要なアプローチである。

NMR 緩和実験は、タンパク質の内部運動を原子レベルで解析できる有力な手法の 1 つであり、 ^{15}N 縦緩和速度 R_1 、横緩和速度 R_2 、ならびに ^1H - ^{15}N ヘテロ核 NOE (hetNOE) といった緩和パラメータを測定することで、主鎖アミド基のダイナミクスを詳細に評価することが可能である (Kay et al., 1989; Palemer et al., 2001)。 R_2 成分については、分子全体の回転拡散および ps-ns スケールの内部運動に加え、条件によっては μs -ms スケールのコンフォメーション交換の寄与を受ける可能性があることが知られている。

さらに、得られた緩和データをモデルフリー解析などの理論的枠組みに基づいて解析することで、一定の仮定のもとで主鎖アミド基の秩序パラメータ (order parameter, S^2) や化学交換項 (R_{ex}) を推定することができる (Lipari et al., 1982; Mandel et al., 1995)。これにより、静的構造解析のみでは捉えきれない局所的な柔軟性や運動性の分布を明らかにすることが可能となる。

本章では、EPC3-ND における主鎖ダイナミクスの特徴を明らかにすることを目的として NMR 緩和実験を実施し、構造における剛直性および柔軟性の分布を解析した。得られた結果に基づき、分子認識や機能発現に関与する可能性のある動的領域について考察する。

4.2 実験方法

EPC3-ND の主鎖ダイナミクス (backbone dynamics) を解析するため、 ^{15}N 核の緩和実験として縦緩和時間 (T_1)、横緩和時間 (T_2)、および ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ ヘテロ核 NOE 測定を行った。これらの緩和パラメータは、主として ps-ns スケールにおける主鎖アミド基の高速内部運動を反映し、 R_2 については条件によって μs -ms スケールのコンフォメーション交換の影響を受ける可能性がある。そのため、静的構造解析では捉えきれない局所的な柔軟性や

主鎖の運動性を評価するための有用な指標となる。本研究では、前章で明らかにした立体構造情報を補完することを目的として、これらの緩和測定を実施した。

^{15}N 核の緩和実験には、Farrow らにより報告された標準的な ^1H - ^{15}N 相関パルス系列を用いた (Farrow et al., 1994)。 T_1 測定では、遅延時間として 40、80、150、240、300、500、および 700 ms を設定した。一方、 T_2 測定では 25、60、80、120、250、500、および 700 ms の遅延時間を用いた。さらに、主鎖 NH 基の ps-ns スケールの運動性を評価するため、プロトン飽和法に基づく hetNOE 測定を行い、 ^1H 飽和ありおよびなしの 2 種類のスペクトルを取得した。

化学シフト帰属後、各 2 次元スペクトルからのピーク強度を Sparky (Goddard et al., 2008) を用いて抽出し、続いて Mathematica ver. 12.1 (Wolfram Research Inc.) により緩和データのフィッティングを行った。 T_1 および T_2 の値は、以下に示す単一指数減衰モデルに基づいて算出した。

$$I(t) = I_0 \exp(-t / T_{1,2})$$

ここで $I(t)$ は遅延時間 t におけるピーク強度、 I_0 は初期強度を示す。

以上の解析により、EPC3-ND の T_1 、 T_2 、および hetNOE の緩和パラメータを網羅的に取得した。これらのデータは、溶液中における主鎖の局所的な柔軟性および構造的安定性を評価するための重要な動的情報を提供する。

4.3 結果と考察

EPC3-ND の内部ダイナミクスを明らかにするため、 ^{15}N 緩和実験を実施した (図 4.1)。全体として、EPC3-ND は小型で安定に折りたたまれたタンパク質に典型的な緩和プロファイルを示したが、構造要素ごとにダイナミクスの違いが観測された。

まず、図 4.1 a に示す ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ NOE において、 $\beta 1 \sim \beta 5$ に対応する β スtrand 領域では NOE 値が 0.6 を大きく上回っており、これらの 2 次構造領域では主鎖が ps-ns スケールにおいて高い剛直性を有していることが示唆された (Kay et al., 1989; Palmer, 2004)。一方、末端領域および複数のループ領域では NOE 値の低下が観測され、これらの部位においては高速内部運動が存在することが示された。

次に、図 4.1 b に示す R_1 ($=1/T_1$) では、多くの残基が約 2 s^{-1} 前後の値を示しており、良好に折りたたまれたタンパク質として妥当な範囲に収まっていた。その中で、Arg75 の R_1 は他の残基と比較して高い値を示した。 R_1 は主として ps-ns スケールの運動性や分子全体

の回転拡散特性を反映することから、この結果は Arg75 周辺における局所的な運動特性の違いを反映している可能性が考えられる。Arg75 は $\beta 2$ と $\beta 3$ を結ぶ非規則領域に位置しており、その構造的特徴と整合的である。

図 4.1 c に示す R_2 ($= 1/T_2$) では、Lys62、Asn64、Arg75、および Asn99 において顕著に高い値が観測され、合わせて測定誤差も相対的に大きい傾向が認められた。 R_2 は分子全体の回転拡散に加え、 μs - ms スケールのコンフォメーション交換の影響を受ける可能性があることから (Palmer et al., 2001)、これらの残基では化学交換や比較的遅い運動成分が挙動に寄与している可能性が示唆される。加えて、Asn99 近傍に位置する Ser98 のシグナルが HSQC スペクトルにおいて観測されなかったことは、この領域が高い動的性を有していることを支持する結果である。

さらに図 4.1 d に示す R_2/R_1 比を総合的に評価すると、Lys62 と Asn99 において相対的に高い値が認められた。これらの結果は、当該残基において通常とは異なる緩和挙動が生じており、構造交換や運動性の不均一性の影響を受けている可能性を示している (Mandel et al., 1995)。

以上の結果から、EPC3-ND は剛直な β シートコア構造を中心として安定に折りたたまれている一方で、ループ領域、特に Lys62、Arg75、および Asn99 周辺において顕著な運動性を有していることが明らかとなった。このような「安定コア構造と動的な周辺領域」という特徴は、立体構造モデル (図 4.2) とも良好に対応しており、EPC3-ND の機能発現における構造的可塑性に関与している可能性が考えられる。

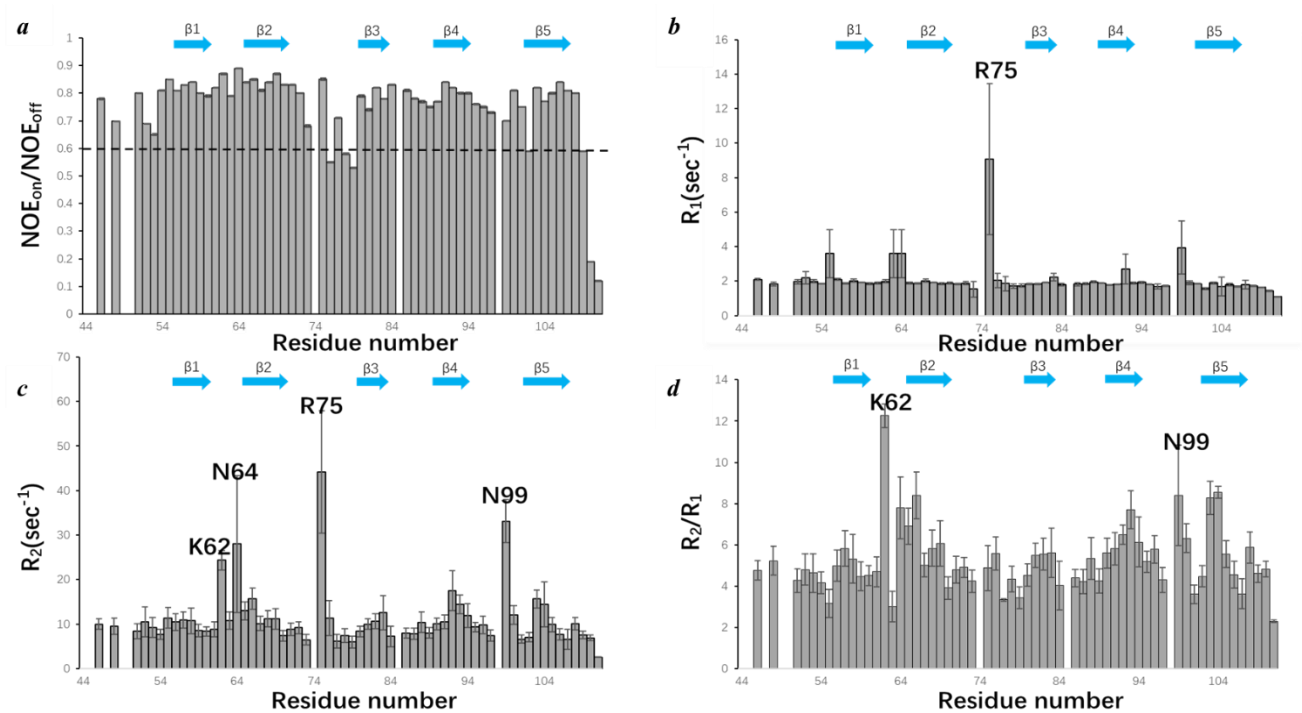


図 4.1. 緩和実験に基づく残基ごとのダイナミクス解析結果

(a) NOE 比、(b) R_1 、(c) R_2 、(d) R_2/R_1 の残基依存性を示す。

β ストランド領域を矢印で示した。

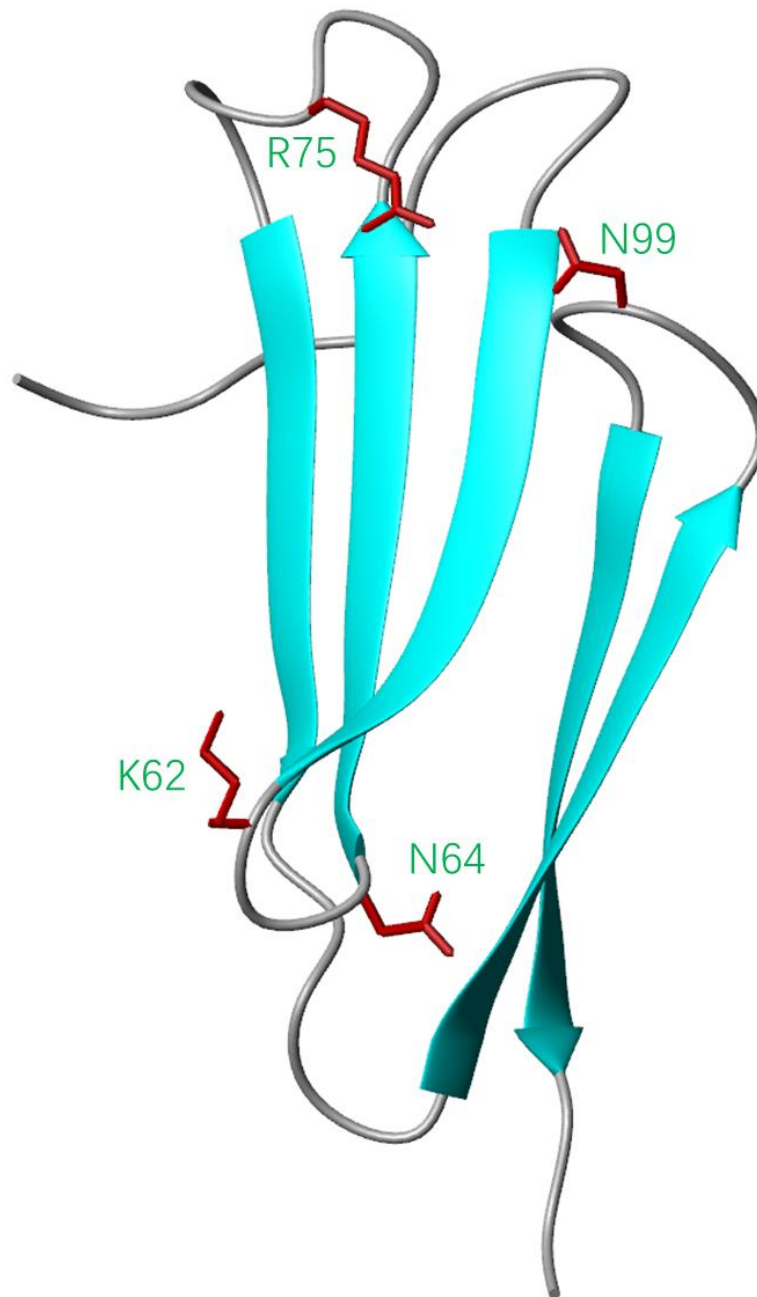


図 4.2. R_1 および R_2 値が高い残基の位置を示した構造モデル
 R_1 または R_2 値が高い残基の側鎖は赤色で示す。

4.4 参考文献

Farrow, N. A., Muhandiram, R., Singer, A. U., Pascal, S. M., et al. (1994). Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation. *Biochemistry*, 33, 5984-6003. doi: 10.1021/bi00185a040

Frauenfelder, H., Sligar, S. G., and Wolynes, P. G. (1991). The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, 254, 1598-603. doi: 10.1126/science.1749933

- Goddard, T. D., and Kneller, D. G. (2008). SPARKY 3. University of California, San Francisco.
- Henzler-Wildman, K., and Kern, D. (2007). Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450, 964-72. doi: 10.1038/nature06522
- Kay, L. E. (1998). Protein dynamics from NMR. *Nature Structural Biology*, 5, 513-7. doi: 10.1138/755
- Kay, L. E., Torchia, D. A., and Bax, A. (1989). Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: Application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 28, 8972-9. doi: 10.1021/bi00449a003
- Lipari, G., and Szabo, A. (1982). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *Journal of the American Chemical Society*, 104, 4546-4559. doi: 10.1021/ja00381a009
- Mandel, A. M., Akke, M., and Palmer, A. G. (1995). Backbone dynamics of *Escherichia coli* ribonuclease HI: correlations with structure and function in an active enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 246, 144-63. doi: 10.1006/jmbi.1994.0073
- Palmer, A. G. (2004). NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. *Chemical Reviews*, 104, 3623-40. doi: 10.1021/cr030413t
- Palmer, A. G., Kroenke, C. D., and Loria, J. P. (2001). Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. *Methods in Enzymology*, 339, 204-38. doi: 10.1016/s0076-6879(01)39315-1
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. New York: Wiley.

第5章 ジスルフィド結合の役割

5.1 緒言

タンパク質の高次構造形成および安定性において、ジスルフィド結合は代表的な共有結合性修飾の1つとして広く知られている。ジスルフィド結合は2個のシステイン残基の酸化反応により形成され、折りたたみ経路の制御、立体構造の安定化、さらには耐熱性や機械的強度の向上に寄与することが、これまでの数多くの研究により明らかにされてきた

(Creighton, 1990)。とくに分泌タンパク質や細胞外環境に存在するタンパク質では、酸化的環境下で形成されるジスルフィド結合が構造維持に重要な役割を果たす例が多く、その喪失は顕著な構造変化や機能低下を引き起こすことが報告されている (Feige et al., 2011)。

ジスルフィド結合がタンパク質の構造安定化に寄与する典型例として、リゾチームやリボヌクレアーゼ A (RNase A) が挙げられる。リゾチームでは複数のジスルフィド結合が立体構造の保持に寄与しており、それらの切断により構造の緩みや酵素活性の低下が生じることが示されている (Blake et al., 1965; Bradshaw et al., 1967; Denton et al., 1991)。また、4組のジスルフィド結合を有する RNase A は代表的なモデルタンパク質であり、ジスルフィド結合が折りたたみ経路や再生過程の制御に関与することを示す古典的研究が数多く報告されている (Anfinsen et al., 1961; Anfinsen, 1973)。これらの研究は、ジスルフィド結合が単なる構造安定化要素にとどまらず、折りたたみ過程そのものに深く関与していることを示している (Creighton, 1997)。

さらに、近年の研究では、膜タンパク質や受容体タンパク質において、ジスルフィド結合がドメイン間の相対配置の固定や局所構造の安定化を通じて、リガンド認識や活性化機構の調節に関与することも報告されている (Hogg, 2003)。このように、ジスルフィド結合はタンパク質の構造的秩序と機能的特性の両面に影響を及ぼす重要な要素であり、その役割を構造学的に検証することは、生化学および構造生物学における重要な課題の1つである。

本章では、以上の背景を踏まえ、EPC3-ND に存在する複数のジスルフィド結合が立体構造および構造安定性に与える影響を検討する。特に、ジスルフィド結合を除去した変異体との比較を通じて、各結合が3次元構造の保持や局所的な構造変化にどのように寄与しているのかを、構造学的観点から明らかにすることを目的とする。

5.2 実験方法

EPC3-ND の立体構造安定性に対する分子内ジスルフィド結合の寄与を評価するため、6 個すべてのシステイン残基をセリンに置換した変異体 (All-S) を作製した。本変異体ではジスルフィド結合が形成されないことから、構造的安定性の低下が想定されるため、野生型とは独立に発現および精製を行い、比較的温和な条件下で試料調製を行った。

All-S を発現させた大腸菌細胞ペレットは、25 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁し、4 °C、6,000 × g、20 min の遠心分離により洗浄した。洗浄後、1 mM PMSF と 2.5 mg/mL リゾチームを含む 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) に再懸濁し、リゾチーム反応を促進するために 37 °C で 1 h インキュベートし、細胞溶解を行った。得られた溶解液について、SDS-PAGE により上清および沈殿の両画分に目的タンパク質が存在することを確認した。

溶解液は 29,000 × g、4 °C、20 min の遠心分離により上清と沈殿に分画した。上清画分には最終濃度 0.5% のポリエチレンイミン (PEI; Polyethylenimine) を添加し、氷上で 30 min 静置することで核酸を沈殿させた。その後、同条件で再遠心を行い、得られた上清を回収した。この画分については、野生型 EPC3-ND と同様に Ni²⁺-NTA アフィニティクロマトグラフィーを用いて精製を行った。

一方、初回遠心で得られた沈殿画分については、8 M 尿素と 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) を含む溶液に再懸濁し、4 °C で一晩振とうすることで可溶化を行った。翌日、29,000 × g、4 °C、20 min の遠心分離により上清を回収し、Ni²⁺-NTA カラムに供した。尿素濃度を 6、4、2、1、および 0 M と段階的に低下させた。その後、イミダゾール濃度勾配により目的タンパク質を溶出した。得られた各溶出画分については SDS-PAGE により精製度および回収量を評価した。

5.3 結果と考察

リゾチーム処理による比較的温和な溶菌法を採用した結果、SDS-PAGE 解析 (図 5.1) において顕著な分解産物は検出されず、All-S 変異体を十分な収量で精製することができた。

一方、精製した All-S について ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定したところ (図 5.2)、野生型 EPC3-ND と比較して化学シフト分散が著しく低下し、観測されるクロスピーク数の減少および線幅の顕著な増大が認められた。これらの特徴は、All-S が溶液中において野生型に見られるような天然様のコンパクトな立体構造を安定に形成していない可能性を強

く示唆しており (Bax et al., 1993)、部分的に構造が乱れた状態や構造的不均一性の高い状態が優勢となっている可能性が考えられる。

さらに、野生型 EPC3-ND においてスペクトル品質の改善に有効であった熱処理条件を All-S に適用した場合でも、HSQC スペクトルのピークの分散や線幅に顕著な改善は認められなかった。この結果は、ジスルフィド結合を欠く EPC3-ND においては、天然様構造へのフォールディングが困難であり、構造的不均一な状態が持続することを示唆している。

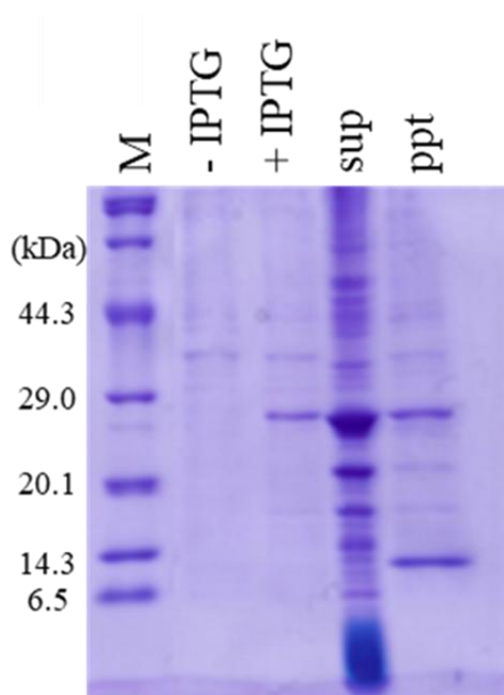


図 5.1. リゾチーム処理後の可溶性画分および不溶性画分の解析

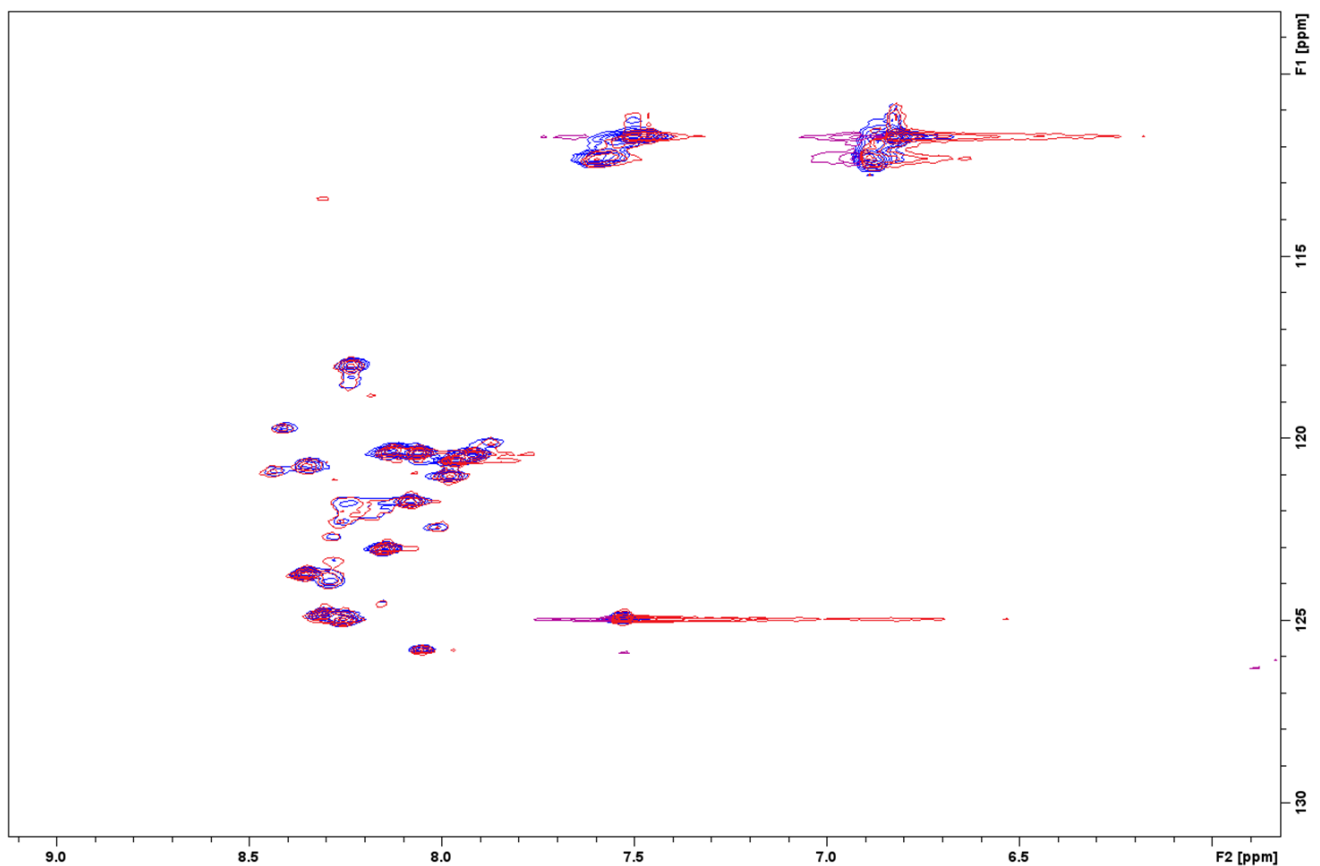


図 5.2. 熱処理前後における ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの比較 (35 °C、pH 7)
熱処理前 (青) および熱処理後 (赤) に測定した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示す。

以上の結果から、EPC3-ND に存在する 3 組のジスルフィド結合は、溶液中における天然様立体構造の形成および維持に重要な役割を果たしていることが示された。第 4 章で示したように、野生型 EPC3-ND では β ストランド領域が高い剛直性を示していたことから、これらのジスルフィド結合は β シート間を架橋することで全体構造のトポロジーを制約し、構造安定化に寄与している可能性が考えられる (Thornton, 1981)。

現時点では EPC3-ND の標的分子は未同定であり、ジスルフィド結合そのものが結合界面を直接形成しているかどうかは不明である。多くの分泌型タンパク質で報告されている構造支持的ジスルフィド結合と同様に、内部骨格として機能している可能性が高い (Hogg, 2003)。

5.4 参考文献

- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181, 223-30. doi: 10.1126/science.181.4096.223
- Anfinsen, C. B., and Haber, E. (1961). Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry*, 236, 1361-3. doi: 10.1016/S0021-9258(18)64177-8
- Bax, A., and Grzesiek, S. (1993). Methodological advances in protein NMR. *Accounts of Chemical Research*, 26, 131-138. doi: 10.1021/ar00028a001
- Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., et al. (1965). Structure of hen egg-white lysozyme: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature*, 206, 757-61. doi: 10.1038/206757a0
- Bradshaw, R. A., Kanarek, L., and Hill, R. L. (1967). The Preparation, Properties, and Reactivation of the Mixed Disulfide Derivative of Egg White Lysozyme and L-Cystine. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 3789-3798. doi: 10.1016/S0021-9258(18)95818-7
- Creighton, T. E. (1990). Protein folding. *Biochemical Journal*, 270, 1-16. doi: 10.1042/bj2700001
- Creighton, T. E. (1997). Protein folding coupled to disulphide bond formation. *Biological Chemistry*, 378, 731-44. doi: 10.1515/bchm.1997.378.7.731
- Denton, M. E., and Scheraga, H. A. (1991). Spectroscopic, immunochemical, and thermodynamic properties of carboxymethyl (Cys⁶, Cys¹²⁷)-hen egg white lysozyme. *Journal of Protein Chemistry*, 10, 213-232. doi: 10.1007/BF01024786
- Feige, M. J., and Hendershot, L. M. (2011). Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*, 23, 167-75. doi: 10.1016/j.ceb.2010.10.012
- Hogg, P. J. (2003). Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 210-214. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00057-4
- Thornton, J. M. (1981). Disulphide bridges in globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, 151, 261-87. doi: 10.1016/0022-2836(81)90515-5
- Wouters, M. A., Lau, K. K., and Hogg, P. J. (2007). Cross-strand disulfides in cell entry proteins: poised to act. *Trends in Biochemical Sciences*, 32, 162-169. doi: 10.1016/j.tibs.2007.02.005

第 6 章 糖結合解析

6.1 緒言

タンパク質の立体構造が明らかになると、その構造的特徴が分子間相互作用や基質認識にどのように関与しているのかを検証することが、次の重要な課題となる。とりわけ、糖鎖や低分子糖との相互作用は、多くの細胞外タンパク質や酵素、受容体において機能発現に関与することが知られており、結合特性の違いが活性や特異性に影響を与える例が数多く報告されている (Varki et al., 2017; Sharon and Lis, 2004)。したがって、立体構造解析によって得られた情報を基に、対象タンパク質が糖と相互作用し得るかどうかを評価することは、その機能的可能性を検討する上で有用である。

一般に糖結合タンパク質では、糖との相互作用に関与する表面領域に疎水性残基および極性残基が適切に配置されており、これらの相補的な相互作用によって結合特異性や親和性が規定され则认为られている (Quioco, 1996; Imberty et al., 2000)。そのため、異なる構造特性をもつ糖分子を比較することで、タンパク質側の相互作用部位の幾何学的特徴や化学的性質を推定することも可能となる。

EPC3 は *Fusarium oxysporum* 由来エフェクター SIX6 のホモログであり、SIX6 に関する先行研究においては、その立体構造的特徴に基づいて糖分子との相互作用の可能性が言及されている (Gawehns et al., 2014)。一方で、これらの報告では糖結合に関する実験的検証は行われておらず、その相互作用の有無や特異性については依然として明らかになっていない。

本研究では、構造解析によって得られた EPC3-ND の立体構造を踏まえ、糖との相互作用の有無を探索的に評価する目的で、マルトース、ラクトース、および D-(+)-セロビオースの 3 種類の 2 糖類を選択した。これらはいずれも 2 糖類であるが、グリコシド結合の型や立体配置、構成単糖が異なっている。具体的には、マルトースは α -1,4 結合を有するグルコース 2 量体、ラクトースは β -1,4 結合を介したガラクトース-グルコースからなる 2 糖、セロビオースは β -1,4 結合で連結したグルコース 2 量体であり、結合様式や水酸基配置に明確な違いが存在する。これらの糖を比較することで、EPC3-ND が特定の糖構造に対して選択性を示すか、あるいは 2 糖類に対して顕著な相互作用を示さないかを検討することができる。

本章では、このような背景のもとで実施した糖結合解析について、使用した 2 糖類の選択理由および測定結果の解釈枠組みを示し、EPC3-ND の構造的特徴と機能的可能性を検討するための基盤を提供する。

6.2 実験方法

EPC3-ND の糖結合能を評価するため、EPC3-ND に対する糖の滴定を ^1H - ^{15}N HSQC でモニターした。本実験では、グリコシド結合様式および構成単糖の異なる 2 糖類としてマルトース、ラクトース、D-(+)-セロビオースの 3 種類を選択した。EPC3-ND が異なる 2 糖構造に対して相互作用を示すかどうかを検討した。

滴定実験には、 ^{15}N 標識 EPC3-ND（最終濃度 0.8 mM、50 mM NaCl、10% D_2O 、pH 7.0）を用い、測定温度は 35 °C とした。各糖は NMR 試料と同一組成のバッファーを用いて高濃度ストック溶液として調製し、同一 NMR 試料管内に段階的に添加した。糖の最終濃度は 10、20、30、40、50、および 80 mM とし、糖とタンパク質のモル比はおよそ 12 : 1 から最大 100 : 1 となるよう設定した（図 6.1）。この濃度範囲は、弱い相互作用や低親和性結合の検出を想定した条件である。

添加ステップごとに試料を十分に混合し、平衡化の後、同一測定条件で ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを取得した。無添加条件および最高糖濃度条件のスペクトルを比較し、各残基シグナルについて化学シフトの変化、ピーク強度の変動、ならびに線幅やピーク形状の変化を指標として、糖添加に伴う影響を評価した。

Sugar binding assay

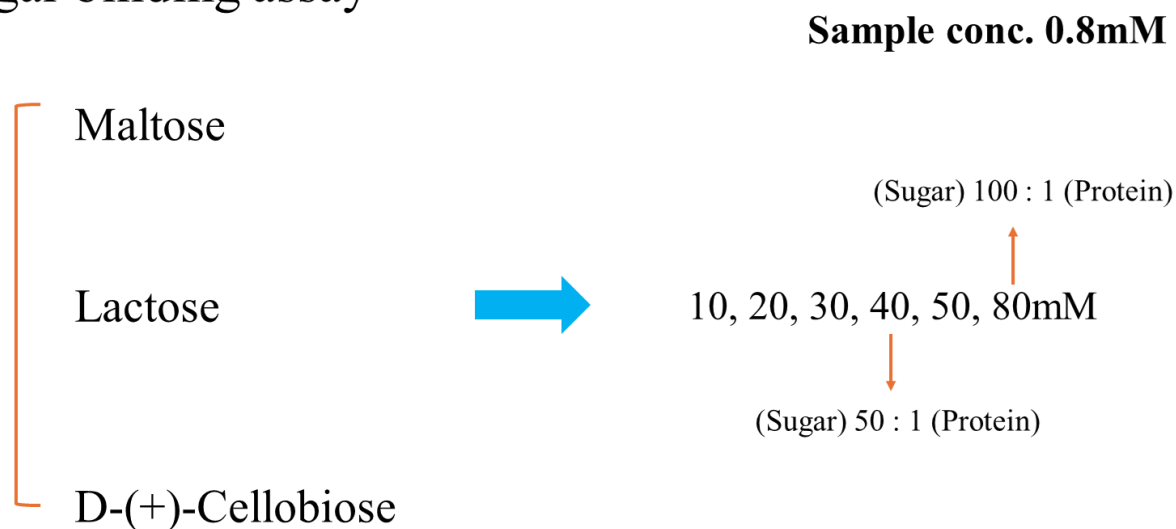


図 6.1. 糖結合能を評価するための実験手順の概略
マルトース、ラクトース、および D-(+)-セロビオース
を用いた滴定条件を模式的に示す。

6.3 結果と考察

3 種類の 2 糖（マルトース、ラクトース、および D-(+)-セロビオース）について ^1H - ^{15}N HSQC に基づく滴定実験を行った結果、いずれの場合においても EPC3-ND の HSQC スペクトルには明確な濃度依存的変化は観測されなかった。糖を最終濃度 80 mM（タンパク質濃度 0.8 mM に対してモル比約 100 : 1）まで添加しても、ほぼ全てのクロスピークは無添加条件と同一の化学シフト位置、線幅、および相対強度を維持しており、残基特異的な化学シフト変化や系統的なピークブロードニングは検出されなかった。また、用いた 2 糖の種類によるスペクトル変化の違いも認められなかった（図 6.2; 6.3; 6.4）。

これらの結果から、本研究で設定した実験条件下においては、EPC3-ND はマルトース、ラクトース、D-(+)-セロビオースとの間に HSQC 滴定によって検出可能な相互作用は認められないことが示された。仮に相互作用が存在するとしても、その親和性は本実験の NMR 滴定の感度範囲内では検出できない程度に弱いものである可能性が考えられる。

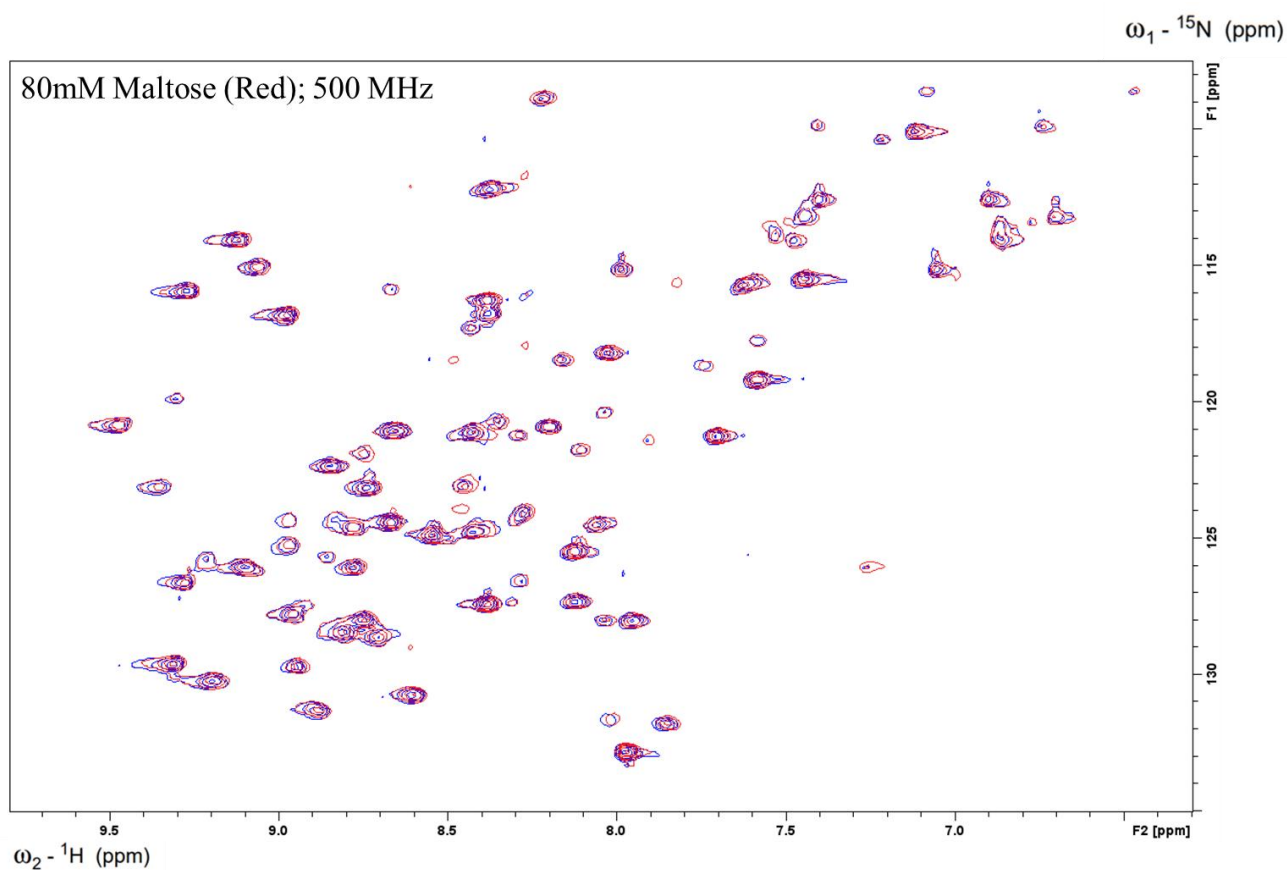


図 6.2. マルトース添加における ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ HSQC スペクトル
無糖条件（青）および 80 mM マルトース添加条件（赤）で測
定した ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ HSQC スペクトルを重ね合わせて示す。

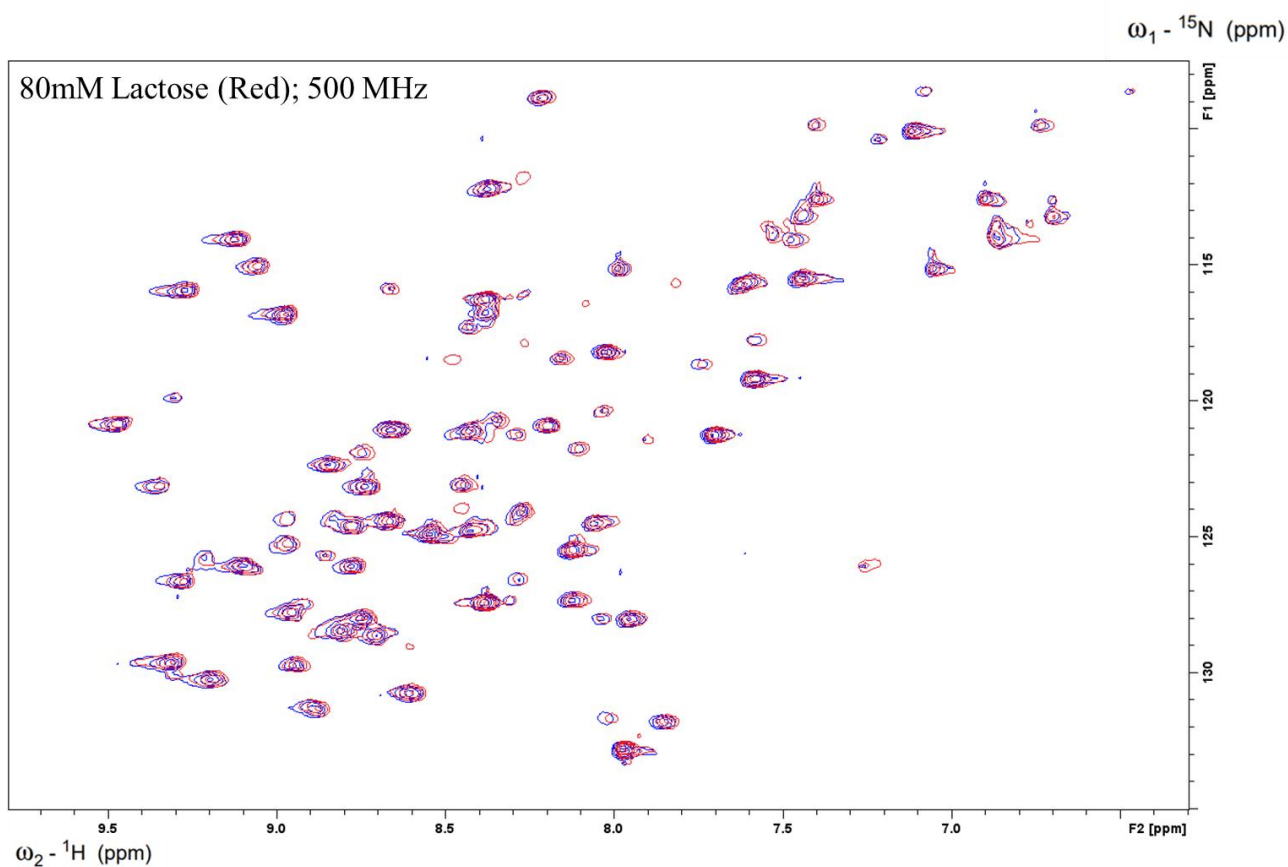


図 6.3. ラクトース添加における ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ HSQC スペクトル
無糖条件（青）および 80 mM ラクトース添加条件（赤）で測
定した ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ HSQC スペクトルを重ね合わせて示す。

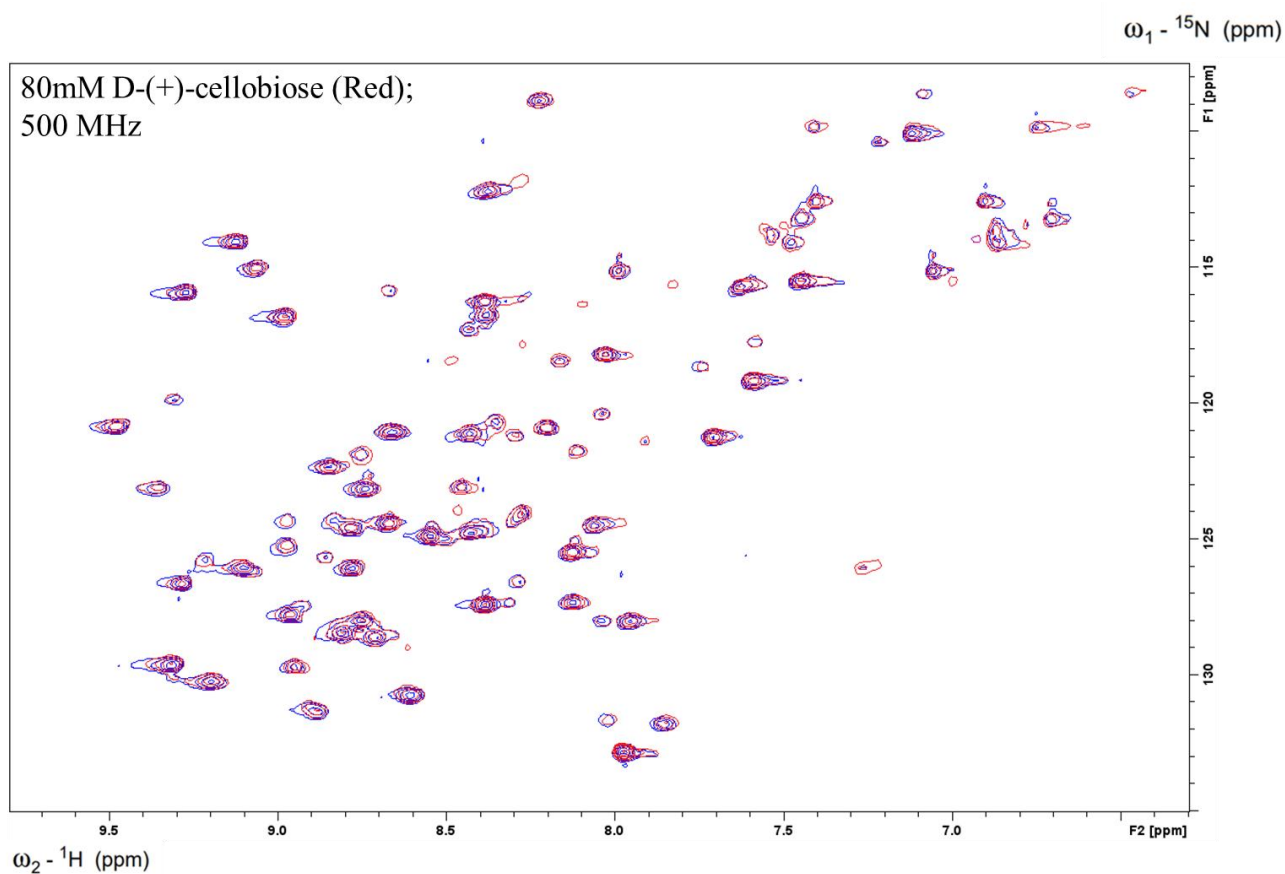


図 6.4. D-(+)-セロビオース添加における ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ HSQC スペクトル
無糖条件（青）および 80 mM D-(+)-セロビオース添加条件（赤）で測定
した ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ HSQC スペクトルを重ね合わせて示す。

さらに、EPC3-ND の立体構造を既知の糖結合タンパク質と比較すると、キチン結合タンパク質 hevein (図 6.5) や節足動物由来抗菌タンパク質 tachycitin (図 6.6) に見られるような、複数の芳香族残基 (Trp や Tyr など) が集積して形成する典型的な糖結合ポケットは認められなかった。これらの糖結合タンパク質では、芳香族残基による疎水性クランプ構造と、その周囲に配置された極性残基や電荷残基との協調的配置によって糖分子が認識されると考えられている。一方、EPC3-ND では同様の芳香族残基の集積は観測されず、静電ポテンシャル分布からも、可溶性糖鎖を受容する明瞭な溝状構造は示唆されない。

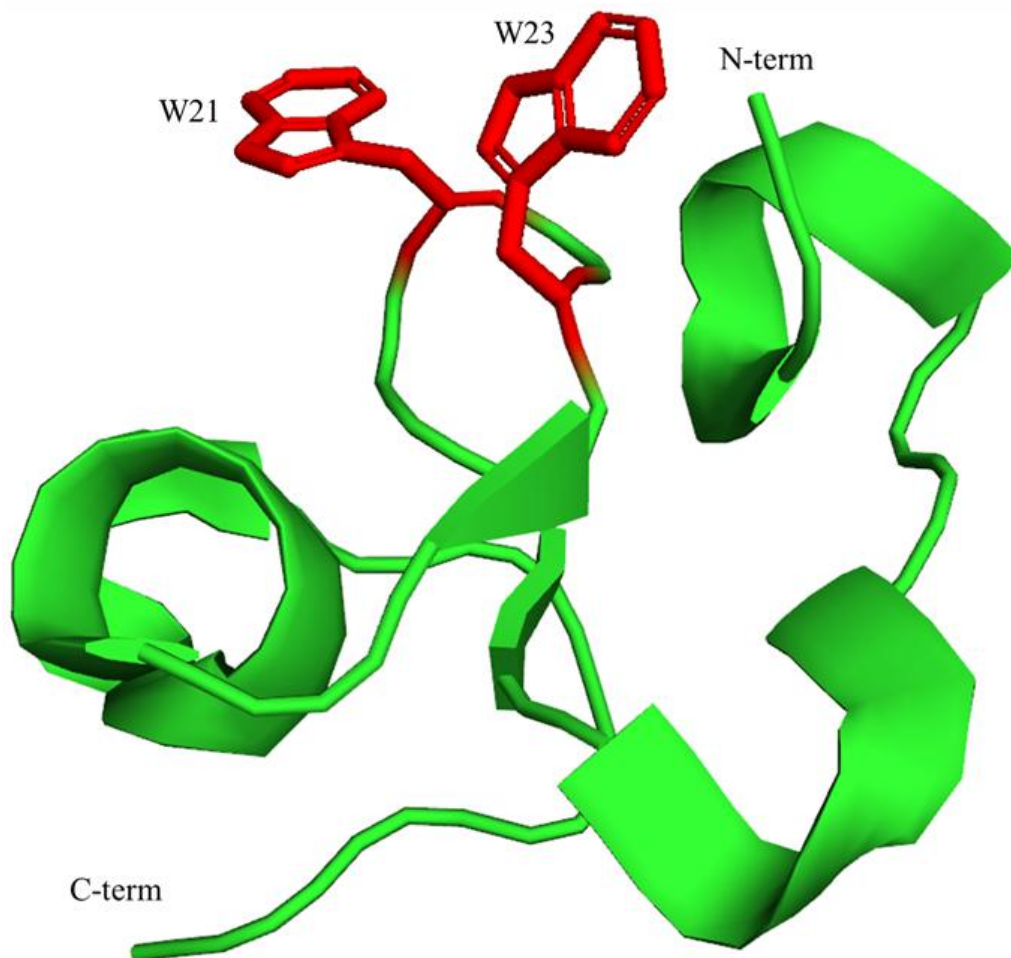


図 6.5. Hevein の立体構造 (PDB ID: 00001q9b)
Hevein の代表構造をリボン表示で示す。芳香族残基 (Trp) を赤色で示した。

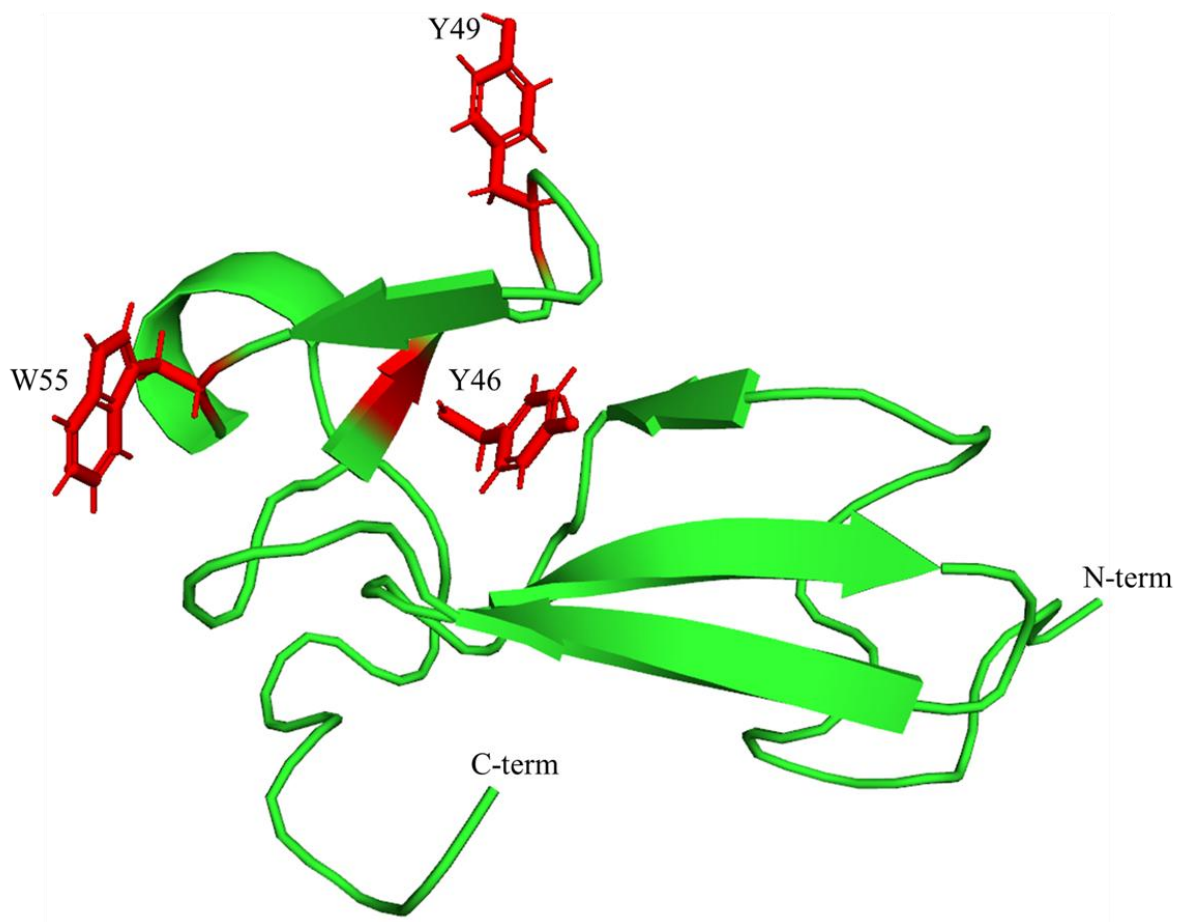


図 6.6. Tachycitin の立体構造 (PDB ID: 00001dqc)
Tachycitin の代表構造をリボン表示で示す。芳香族残基 (Trp; Tyr) を赤色で示した。

以上の NMR 滴定実験および構造比較の結果を総合すると、少なくとも本研究で検討した可溶性 2 糖類に対して、EPC3-ND が直接的かつ特異的な結合能を有することを支持する証拠は得られなかった。したがって、EPC3-ND の生理的相互作用相手は、可溶性糖鎖以外の分子種であると考えられる。

6.4 参考文献

Gawehns, F., O., Houterman, P. M., Ichou, F. A., Michielse, C. B., et al. (2014). The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2-mediated cell death. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 27, 336-48. doi: 10.1094/MPMI-11-13-0330-R

Imberty, A., and Pérez, S. (2000). Structure, conformation, and dynamics of bioactive oligosaccharides: theoretical approaches and experimental validations. *Chemical Reviews*, 100, 4567-4588. doi: 10.1021/cr990343j

Quijcho, F. A. (1996). Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 287-315. doi: 10.1146/annurev.bi.55.070186.001443

Sharon, N., and Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14, 53R-62R. doi: 10.1093/glycob/cwh122

Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., et al. (2017). *Essentials of Glycobiology*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

第 7 章 総括

7.1 各章の研究成果とまとめ

本研究では、*Colletotrichum orbiculare* のエフェクタータンパク質 EPC3 の機能ドメインである EPC3-ND を対象とし、その立体構造、構造安定化機構、および分子認識特性について多角的な解析を行った。

立体構造解析の結果、EPC3-ND は 5 本の β ストランドから構成される安定な β サンドイッチ型フォールドを形成し、3 組のジスルフィド結合によって高度に安定化されていることが明らかとなった。さらに NMR 緩和実験により、 β シートからなるコア領域は一様に高い剛直性を示す一方で、Arg75-Glu79 および Ser98-Asn99 を含むループ領域には顕著な動的柔軟性が存在することが示された。これらの動的ループは、標的分子との相互作用に関与し得る潜在的な機能領域である可能性が考えられ、安定な構造コアと可塑性を備えた表面領域を併せ持つという特徴は、多様な宿主因子を認識する病原菌エフェクターに共通する構造的特徴と整合的である。

構造安定性に関する解析からは、すべてのシステイン残基をセリンに置換した変異体 (All-S) が、野生型に見られる天然様の立体構造を安定に形成できないことが示された。この結果は、EPC3-ND のフォールド形成および構造維持が、3 組のジスルフィド結合に強く依存していることを示しており、これらの共有結合性架橋によって規定される正確な立体構造のトポロジーが、EPC3-ND の機能発現における前提条件となっている可能性を示唆している。

糖結合能の解析では、EPC3-ND の立体構造中に hevein や tachycitin に見られるような芳香族残基の集積からなる典型的な糖結合ポケットは認められず、 ^1H - ^{15}N HSQC に基づく滴定実験においても、マルトース、ラクトース、D-(+)-セロビオースに対する特異的な相互作用は検出されなかった。これらの結果から、少なくとも本研究で検討した可溶性 2 糖類に対して、EPC3-ND が直接的な結合能を有することを支持する証拠は得られなかった。

以上の結果を総合すると、EPC3-ND は「高度に保存された β サンドイッチ型フォールド」、「3 組のジスルフィド結合による強固な構造安定性」、「柔軟性を備えたループ領域」、および「糖鎖非依存的な分子認識様式」という特徴を併せ持つ構造モジュールであると位置づけられる。これらの構造的特性は、EPC3 が宿主内で特定のタンパク質因子と相互作用し、免疫応答の制御に関与するための分子基盤を形成している可能性を示している。

今後は、EPC3 の直接の宿主標的分子を同定し、複合体構造の解析を行うことで、*C. orbiculare* による宿主免疫回避機構およびエフェクタータンパク質の構造・機能進化について、より包括的な理解が進むことが期待される。

7.2 考察

7.2.1 AF2 予測構造と NMR 実験構造の比較

EPC3-ND の構造的特徴を考察するにあたり、まず AF2 により予測された EPC3 全長モデル (図 2.1) と、本研究で NMR により決定した EPC3-ND の実験構造 (図 3.10 b) を比較した。

AF2 全長モデルでは、N 末端側に長い低構造領域 (unstructured region) が予測される一方、C 末端側には明確に折りたたまれた構造ドメインが存在することが示唆された (図 2.1)。また、N 末端の低構造領域と EPC3-CD (EPC3-C domain) の間には、比較的コンパクトな折りたたみ構造を有する領域が認められ、本研究で解析対象とした EPC3-ND は、この独立した構造ドメインに相当すると考えられる。

次に、EPC3-ND に着目すると、AF2 予測モデルにおいても β ストランド主体の折りたたみが示唆され、EPC3-ND が β リッチなフォールドを取るという点では NMR 実験構造と概ね一致した。実際に、AF2 予測モデルと NMR 実験構造を重ね合わせた比較 (図 7.1 c) において、 β シートからなるコア領域は良好に対応していることが確認された。

一方で、ジスルフィド結合によって規定される立体配置や、ループ領域の詳細な配置といった局所構造は、AF2 予測のみからは一意に確定しにくく、本研究の NMR 構造決定によって、EPC3-ND の β サンドイッチ型フォールドとその安定化機構が実験的に明確化された。なお、全残基を含めた $C\alpha$ 原子に基づく r.m.s.d. は $3.235\text{\AA}$ であり、この値は主として柔軟なループおよび末端領域に由来する差異を反映したものである。

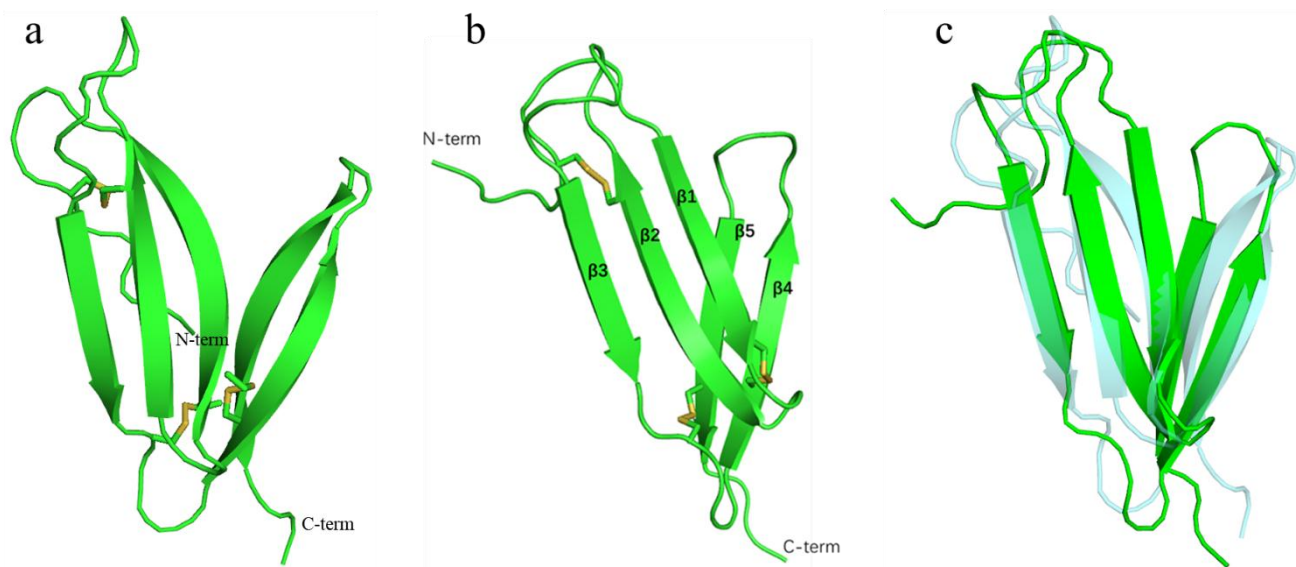


図 7.1. EPC3-ND 予測構造および実験構造の比較

(a) AF2 による予測構造、(b) 本研究で決定した構造、(c) NMR 実験構造 (緑) と AF2 による予測構造 (水色) の重ね合わせを示す。

7.2.2 構造ホモロジー解析

EPC3-ND が既知のエフェクタータンパク質とどの程度構造的に類似しているかを検証するため、DALI (Distance-matrix ALIGNment) サーバーを用いて立体構造ホモロジー検索を行った (Holm et al., 1993)。DALI はアミノ酸配列ではなく、残基間距離行列 (distance matrix) の比較に基づいて構造類似性を評価する手法であり、配列相同性が極めて低い場合でもフォールドレベルでの共通性を検出できる点で広く利用されている。

その結果、EPC3-ND は *Fusarium oxysporum* が分泌する SIX エフェクター群の中でも、特に SIX6 の N 末端ドメイン (SIX6-ND) と最も高い構造類似性を示した (図 7.1)。DALI による Z-score は 3.8 であり、一般に構造類似性が統計的に有意であるとされる目安 ($Z > 2$) を十分に上回っていた。

両者の主鎖 $C\alpha$ 原子に基づく r.m.s.d. は 2.083 Å であり、 β サンドイッチ型フォールドが良好に重ね合わされることが確認された。一方で、DALI により得られた構造ベースの配列アラインメントに基づくアミノ酸配列同一性は約 15~20% 程度にとどまっており、1 次構造レベルでの保存性は低いことが明らかとなった (図 7.1)。このことから、EPC3-ND と SIX6-ND の間には、配列相同性は乏しいものの、3 次元構造は顕著に保存されているという特徴的な関係が存在することが示された。

注目すべき点として、両者の配列比較では、全体のアミノ酸配列同一性が低いにも関わらず、システイン残基の位置が高度に保存されていることが確認された（図 7.1）。この事実は、EPC3-ND および SIX6-ND の立体構造が、個々のアミノ酸配列よりも、ジスルフィド結合によって規定されるトポロジーに強く依存している可能性を示唆している。

実際に、本研究において全システイン残基をセリンに置換した All-S 変異体では、野生型に見られる天然様の立体構造が安定に形成されず、顕著な構造不安定化が観察された。この結果は、EPC3-ND の β サンドイッチ型フォールドの形成および維持が、保存されたジスルフィド結合ネットワークに強く依存していることを直接的に示すものである。

以上の結果から、EPC3-ND は配列レベルでは SIX エフェクター群と低い相同性しか示さない一方で、システイン残基の保存を介して 3 次元構造が維持されていることが明らかとなった。このような「配列多様化と構造保存」の関係は、病原菌エフェクターにおける進化戦略の一端を示すものであり、機能発現に必須な立体構造が、ジスルフィド結合を基盤として厳密に保存されてきた可能性を示唆している。

```

EPC3-N ----- GPDRTCPAGQTYDRSVCYKYNTIRRFVCVANPRSNREDIKNTPCRADEICVQRNLSNGKSFAQCIELVK
SIX4   7t6aA -HTES--ADLHWLNAICTGKSTYTVNCAPAGNKNAGSTHTGTCPAGQDCFQLEQ-DREPDATCSPSN-
SIX6   8ebbB ----TCPAGQKYDRSVCYKADKIRSFVCVANPRSNREKITDTPCQPREICVQRNLSNGKSFAKCIPIVD
SIX1   7t69A ---DLCVTGYRAVSGLCYTRATRKIECNKPSVREDRSVTRACPKGQECTTFNAYHQVTFPVCGPRIE

EPC3-N ----- LLLLLLLLLLEEEEEEEEEELLEEEEEEEELLLLLLLLLLEEEEEEEELLLLLLEEEEEEEELLLLIEEEEEEEELLL
SIX4   7t6aA -HHHH--LLEEEEEEEEEELLEEEEEEEELLLLLLLLLLEEEEEEEELLLLLLEEEEEEEELLEEEEEEEELLL-
SIX6   8ebbB ----LLLLLEEEEEEEEEELLEEEEEEEELLLLLLLLLLEEEEEEEELLLLLLEEEEEEEELLLLIEEEEEEEHHH
SIX1   7t69A ---HHHHLLEEEEEEEEEELLEEEEEEEELLLLLLLLLLEEEEEEEELLLLLLEEEEEEEELLLLEEEEEEEEEE

```

図 7.2. 構造ベースの相同性検索（DALI）による配列および 2 次構造の比較

EPC3-ND と既知構造タンパク質との配列アラインメントおよび 2 次構造要素の比較を示す。

7.2.3 静電表面ポテンシャル解析

EPC3-ND と SIX ファミリーとの機能的関連性を検討するため、EPC3-ND と SIX6-ND の静電表面ポテンシャルの比較解析を行った。一般に病原菌エフェクターでは、保存された立体構造が特徴的な表面電荷分布と結びつき、標的分子の認識様式や結合特異性に影響を与えることが知られている（Sánchez-Vallet et al., 2013）。したがって、両者の静電ポテンシャル分布を比較することは、分子認識機構を推定する上で重要な手掛かりとなる。

本研究で決定した EPC3-ND の NMR 構造および既報の SIX6-ND の結晶構造座標を用いて、表面電荷分布を可視化した（Baker et al., 2001）。その結果、両者はいずれも分子上部に正電荷が集中したパッチを形成しており、この領域において大局的に類似した静電ポテ

ンシャル分布を示した（図 7.3）。この正電荷領域は、SIX6 において相互作用界面の一部として機能する可能性が示唆されている部位と対応しており（Sánchez-Vallet et al., 2013）、EPC3-ND においても同様の分子認識機構が存在する可能性を示唆している。

一方で、分子下部の電荷分布には明瞭な差異が認められた。EPC3-ND では同領域に負電荷が優勢であったのに対し、SIX6-ND では相対的に正電荷が多く分布しており、局所的な表面特性に違いが存在することが明らかとなった。

これらの静電表面特性を、 ^{15}N 緩和実験による内部ダイナミクス解析結果（図 4.1）と照らし合わせると、興味深い対応関係が認められる。すなわち、 β ストランドからなるコア領域は高い異種核 NOE 値を示し、ps-ns スケールにおいて剛直な構造を有している一方で、電荷分布に差異が認められた分子下部および上部の一部ループ領域には、Lys62、Arg75、および Asn99 など、 R_2 や R_2 / R_1 比が高く、 μs -ms スケールの運動性を示す残基が集中していた。

特に Arg75 および Asn99 は、静電表面上で正負電荷の境界付近に位置しており、構造的には柔軟性を有しつつ、表面特性の形成に寄与している可能性が考えられる。これらの結果は、EPC3-ND が保存された剛直な β サンドイッチ型コア構造の上に、電荷特性および動的性質の異なる可塑的な表面領域を備えていることを示している。

以上より、EPC3-ND と SIX6-ND は、静電表面ポテンシャルにおいて大局的な類似性を共有する一方で、動的なループ領域を中心とした局所的な差異を有しており、これらの違いが標的分子の選択性や機能特異性の違いに関与している可能性が示唆される。

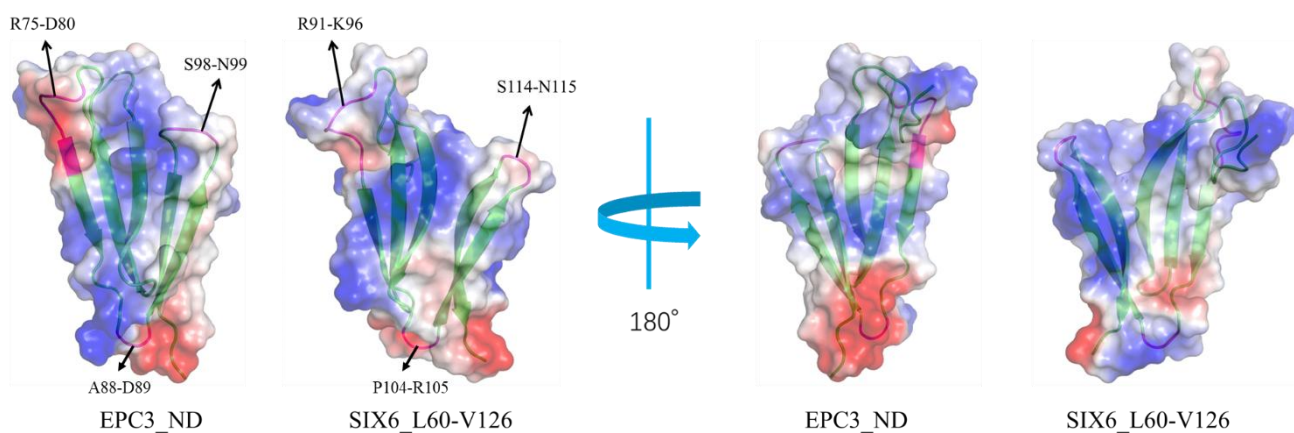


図 7.3. EPC3-ND と SIX6-ND の静電表面電位の比較

赤色は負電荷、青色は正電荷を示す。右図は 180°回転した表示である。

7.3 今後の展望

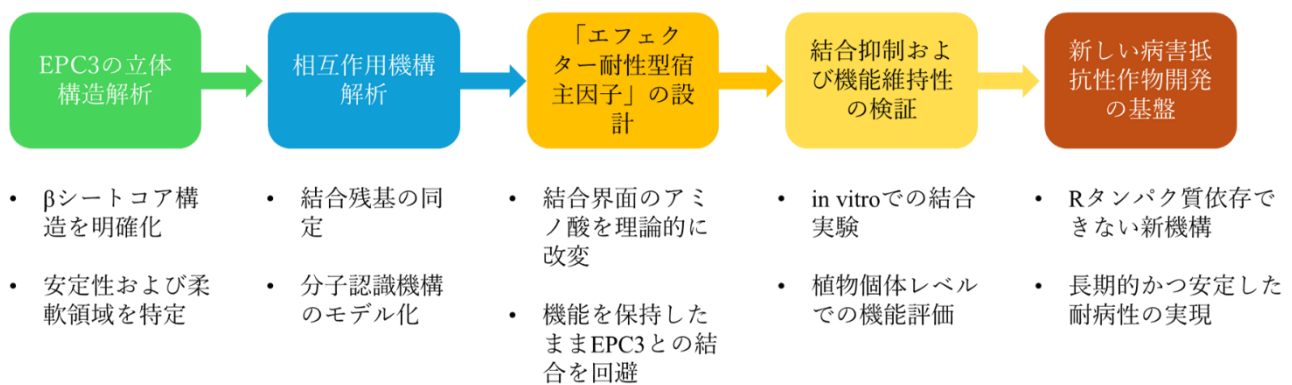
本研究では、EPC3-ND の立体構造および動的特性を詳細に解析し、EPC3 の機能発現を支える構造基盤の一端を明らかにした。しかしながら、EPC3 の作用機構全体を統合的に理解し、得られた知見を病害抵抗性作物の育種へと応用するためには、今後さらに多角的な研究が必要である。

まず、本研究で決定したのは EPC3-ND の構造に限られており、EPC3-CD を含む全長 EPC3 の立体構造や、両ドメイン間の協調的な機能発現や構造変化の有無については未解明である。全長構造が明らかになれば、EPC3 が細胞内でどのように構造安定性を維持し、各ドメインが機能発現にどのように寄与しているのかを、より包括的に理解することが可能になると考えられる。さらに、AF2 により安定な高次構造を形成しないと予測された N 末端領域の機能的役割についても、依然として未解明である。一般に、無秩序領域を含むタンパク質は凝集性や液液相分離に関与する場合があることが示唆されている

(Banani et al., 2017; Boeynaems et al., 2018)。PASTA 2.0 server などの予測手法からも、全長 EPC3 が凝集傾向を示す可能性が示唆されている。これらの点を踏まえ、当該領域が液液相分離等に関与する可能性については、今後の更なる研究が必要である。NMR 緩和実験により示唆された柔軟ループ領域の動的性質は、標的分子との誘導適合的な結合過程に関与している可能性がある。したがって、緩和分散 NMR や水素-重水素交換質量分析 (HDX-MS) (Wales et al., 2006) などを用いた、時間スケールの異なる動的挙動の詳細な解析は、今後の重要な課題である。

次に、EPC3 が結合する宿主側因子の同定は、EPC3 の機能理解を進めるうえで最も重要な研究課題の 1 つである。標的分子が同定されれば、化学シフト摂動解析（Williamson, 2013）や常磁性緩和増強法（PRE; Paramagnetic Relaxation Enhancement）（Clore et al., 2009）に加え、分子ドッキング解析や部位特異的変異体解析を組み合わせることで、結合界面の性質や相互作用様式を高い精度で明らかにすることが可能になると考えられる。また、本研究で明らかとなった柔軟ループ領域や特徴的な表面電荷分布が、相互作用の選択性や結合モードにどのように関与しているかを検証することも、機能解析を深化させるうえで重要である（図 7.4）。

構造情報に基づく「エフェクター耐性型宿主因子」設計と病害抵抗性作物への応用



本研究の成果は、宿主側因子の構造改変による新しい耐病性獲得メカニズムの解明につながり、「構造に基づく作物防御戦略」の確立を目指す

図 7.4. EPC3 の構造解析を基盤とした今後の研究展開の概念図

本研究で得られた EPC3 の構造情報を基に、相互作用機構の解析、エフェクター耐性型宿主因子の設計、および病害抵抗性作物への応用へと展開する研究の流れを示す。

さらに将来的な応用研究として、EPC3 と結合しない「耐性型宿主因子」を構造情報に基づいて理論的に設計するというアプローチが考えられる。結合界面を構成するアミノ酸残基を限定的に改変することで、宿主タンパク質本来の構造および機能を維持しつつ、EPC3 との結合のみを選択的に阻害することは理論的には可能である。ただし、その実証には段階的な検証が必要であり、近年発展している計算科学的手法を活用した結合エネルギー予測や構造安定性評価に基づく合理的な変異設計（Kuhlman et al., 2019）と、NMR 滴定、pull-down、等温滴定型カロリメトリー（ITC）などの生化学的評価、さらには植物細胞レベルでの免疫応答解析を組み合わせた包括的な検証が求められる。

総じて、本研究は EPC3 の構造情報に基づく新しい病害抵抗性獲得戦略の可能性を提示するものである。EPC3 の構造・動力学・分子認識特性に関する知見は、*C. orbiculare* による宿主免疫回避機構の理解に貢献するのみならず、他の病原菌エフェクタータンパク質における構造-機能相関の解明や、構造に基づく作物防御戦略の構築にも広く応用可能である。本研究で示した枠組みは、農業分野における持続的かつ理論的根拠に基づいた病害管理技術の発展に寄与する基盤となることが期待される。

7.4 参考文献

Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., and McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 10037-10041. doi: 10.1073/pnas.181342398

Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., and Rosen, M. K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, 285-298. doi: 10.1038/nrm.2017.7

Boeynaems, S., Alberti, S., Fawzi, N. L., Mittag, T., et al. (2018). Protein phase separation: a new phase in cell biology. *Trends in Cell Biology*, 28, 420-435. doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.004

Clore, G. M., and Iwahara, J. (2009). Theory, practice, and applications of paramagnetic relaxation enhancement for the characterization of transient low-population states of biological macromolecules and their complexes. *Chemical Reviews*, 109, 4108-4139. doi: 10.1021/cr900033p

Holm, L., and Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *Journal of Molecular Biology*, 233, 123-38. doi: 10.1006/jmbi.1993.1489

Kuhlman, B., and Bradley, P. (2019). Advances in protein structure prediction and design. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, 681-697. doi: 10.1038/s41580-019-0163-x

Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., et al. (2013). Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptors for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *Elife*, 2, e00790. doi: 10.7554/eLife.00790

Wales, T. E., and Engen, J. R. (2006). Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrometry Reviews*, 25, 158-70. doi: 10.1002/mas.20064

Williamson, M. P. (2013). Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 73, 1-16. doi: 10.1016/j.pnmrs.2013.02.001

業績

原著論文

Xu, Z., Singkaravanit-Ogawa, S., Takano, Y., and Ohki, S. (2025). Identification and NMR-based structural characterization of the functional domain of EPC3, a virulence effector of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1691993. doi: 10.3389/fpls.2025.1691993

国内学会

Xu, Z., Takano, Y., & Ohki, S. (2023). *NMR structure of EPC3, an effector protein of plant pathogen*. Poster presentation at the 2023 Annual Meeting of the NMR Society of Japan, Yokosuka, Japan.

Xu, Z., Takano, Y., & Ohki, S. (2023). *NMR analysis of EPC3, an effector protein of plant pathogen*. Poster presentation at the 2023 Hokuriku Society Meeting (The Chemical Society of Japan), Kanazawa, Japan.

Xu, Z., Takano, Y., & Ohki, S. (2024). *NMR dynamics of EPC3, an effector protein of plant pathogen*. Poster presentation at the 2024 Annual Meeting of the NMR Society of Japan, Sapporo, Japan.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の基礎から学位論文の作成に至るまで、終始温かいご指導と多大なるご助言を賜りました、北陸先端科学技術大学院大学（JAIST）先端科学技術研究科 大木 進野 教授に、心より深く御礼申し上げます。研究の方向性、解析の視点、さらには学術研究に取り組む姿勢に至るまで、先生から頂いた数々の教えは、今後研究者として歩いていく上での揺るぎない指針となるものと確信しております。未熟な私を粘り強く導いてくださったことに、改めて深く感謝申し上げます。

また、本研究の共同研究において多大なるご支援と有益なご助言を賜りました、京都大学大学院 農学研究科 高野 義孝 教授、およびに 北海道大学 先端生命科学研究院（理学部）尾瀬 農之 教授に、心より感謝申し上げます。試料調製や測定に関する具体的な助言のみならず、解析および考察においても多くの示唆をいただき、本研究を大きく前進させていただきました。ここに深く御礼申し上げます。

さらに、本博士論文の審査に際し、ご多忙の中にもかかわらず貴重なお時間を割いてご尽力いただき、有益なご指摘とご助言を賜りました、芳坂 貴弘 先生、山口 拓実 先生、平塚 祐一 先生の審査委員の先生方、ならびに外部審査委員としてご参加いただきました 城西大学 森田 勇人 先生に、心より厚く御礼申し上げます。先生方から頂いた多くのご指摘は、本論文の完成度を高める上で極めて貴重なものでした。

また、研究の遂行に際し多大なる技術的支援を賜りました、JAIST 技術職員の宮里 朗夫 様、四十万谷 智子 様、Kan Kai 様に深く感謝申し上げます。質量分析をはじめとする各種分析装置の利用に際しての専門的なご助言とご支援により、実験を円滑に進めることができました。皆様のご協力が、本研究の基盤を大きく支えてくださいました。

加えて、日頃より研究活動を共にし、議論や助言を通して支えてくださった JAIST 大木研究室の皆様にも、心より感謝申し上げます。実験や測定に関する協力のみならず、日々の交流や励ましにより、研究生活を実りあるものとして過ごすことができました。

さらに、学会や研究会等において貴重な議論や示唆を与えてくださった多くの先生方、研究者の皆様にも感謝申し上げます。皆様から頂いたご意見は、本研究を発展させる上で大きな糧となりました。

最後に、長きにわたる学生生活を支え、常に励ましてくれた家族および友人に、心より感謝いたします。皆様の支えがあったからこそ、困難な時期を乗り越え、本研究をここまでまとめ上げることができました。この場を借りて、深く御礼申し上げます。

皆様のおかげで、私は充実した博士研究生活を送ることができました。

2026年1月5日 許 喆