

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

氏 名	XU, Zhe
学 位 の 種 類	博士（マテリアルサイエンス）
学 位 記 番 号	博材第 632 号
学 位 授 与 年 月 日	令和 8 年 3 月 25 日
論 文 題 目	植物病原菌 <i>Colletotrichum orbiculare</i> 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
論 文 審 査 委 員	大木 進野 北陸先端科学技術大学院大学 教授 芳坂 貴弘 同 教授 山口 拓実 同 准教授 平塚 祐一 同 准教授 森田 勇人 城西大学 教授

論文の内容の要旨

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

論文審査の結果の要旨

本論文の内容は、植物病原菌が分泌するエフェクターの1つである EPC3 (Effector Protein for Cucurbit Infection 3) の立体構造および分子内部の運動性を NMR で解析し、さらに、分子構造を安定させる要因ならびに糖鎖との結合を検証したものである。*Colletotrichum orbiculare* はウリ科植物に炭疽病を引き起こす病原菌で、感染を成立させるために数百種類のエフェクターと呼ばれる分泌タンパク質を駆使していることが知られている。これらエフェクターの中でも感染に必須である EPC3 が本論文の研究対象である。

本研究では、まず、AF (AlphaFold) を用いて EPC3 のドメイン構造を予測した。共同研究者の植物を使った実験によって、N 末端ドメインに相当するフラグメント (EPC3-ND) が全長 EPC3 とほぼ同等の活性を持つことが判明した。そこで、本論文では機能部位に相当する EPC3-ND を研究対象とした。大腸菌に遺伝子操作を施して EPC3-ND の発現系を構築し、精製方法を確立した後、非標識、安定同位体標識試料を調製した。さまざまな温度、pH、塩濃度で CD スペクトルと ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し、測定条件の最適化を試みた。この過程で、加熱処理することによって均一の立体構造をとる試料が調製できることを見出した。

最適な条件下で一連の多核種多次元 NMR の測定を行い、定法に則って NMR スペクトルを解析した。収集した距離と角度の制限情報を基に、EPC3-ND の立体構造を算出した。この結果、EPC3-ND の 2 次構造は 5 本の β ストランドから成り、3 次構造はこれらのストランドが 2 本と 3 本の組となって 2 枚の逆平行 β シートを形成し、それら 2 枚が斜めに向き合ってパックされていることが判明した。立体構造のホモロジー検索によって、EPC3-ND は *Fusarium oxysporum* が分泌する SIX6 の N 末端ドメインと相同性が高いことが明らかになった。さらに、EPC3-ND の NMR 緩和時間解析によって、 β ストランドをつなぐループに位置する幾つかの残基が大きな運動性を持つことを見出した。詳しく比べると、EPC3-ND の運動性の大きな残基は SIX6 の対応する部位の残基とはアミノ酸タイプの相同性が低く、これらの部分は 2 つの分子で表面電化分布も異なっていた。この比較結果は、エフェクターの分子進化を考察するうえで興味深い。以上に加えて、変異体の作製により分子内の 3 組のジスルフィド結合が立体構造形成に必要不可欠であることや、EPC3-ND が糖鎖の結合能力を持たない可能性が高いことを実験的に明示した。

以上の一連の成果が今後の EPC3 の標的分子探索と作用機序研究において大きな助けとなることは、疑いの余地がない。エフェクターの分子構造や作用機序が詳しく調べられている例は多くないため、本論文は当該分野全体に対しても新たな学術的知見を提供していると言える。よって、博士 (マテリアルサイエンス) の学位論文として十分価値があるものと認めた。