

令和元年6月14日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15409

研究課題名(和文) 新規いもち病防除法の標的としての菌体外酸化還元タンパク質の分子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Investigating extracellular redox network in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*

研究代表者

松村 洋寿 (Matsumura, Hirotohi)

秋田大学・理工学研究科・講師

研究者番号：60741824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬物耐性イネいもち病菌の出現が、日本各地の稲作に大きな損害を与えている。本研究では、イネいもち病菌の新規抗菌法を目指し、菌体外セルロース代謝系において重要な働きをする酸化還元タンパク質の解析を行い、2種類のセロピオース脱水素酵素(MoCDH)の生化学的性質に関する基礎的知見が得られた。また、イネいもち病菌のゲノムから、MoCDHの反応に必須となる新規電子伝達パートナータンパク質(Mocyt. b)の遺伝子を探索し、MoCDHとの電子伝達反応を調べたところ、イネいもち病菌において、Mocyt. bがMoCDHと電子伝達ネットワークを構築している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物病原性糸状菌のセルロース分解反応において、未解明なことが多い菌体外酸化還元酵素が構成する分子ネットワークに着目している。セルロース分解における酸化還元酵素の役割を体系的に理解できれば、未だ創薬対象となっていない菌体外代謝系に作用するいもち病新規防除法の開発が期待できる。イネいもち病は日本だけでなく、米食文化国において世界的に深刻な問題となっているため、食料不足が懸念される将来、本研究の成果は効率的な食料供給に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rice blast disease caused by the ascomycete fungus *Magnaporthe oryzae* is a serious and widespread disease of rice. The general fungicides inhibit either intracellular biosynthesis or metabolic pathway, would pose a high risk for development of fungicide resistance. Here, we present investigations of two cellobiose dehydrogenase homologues, MoCDH1 and MoCDH2, and their hypothetical redox partner protein (Mocyt. b) in *M. oryzae* to develop a method to inhibit the function of secreted proteins involved in the extracellular metabolic pathway for control of the fungal rice pathogen. BLAST search using the *M. oryzae* genome database uncovered an existence of Mocyt. b as a hypothetical redox partner gene. The Mocyt. b exhibited an electron transfer reaction with MoCDHs, which suggests that Mocyt. b would be involved in a redox network with MoCDHs in the extracellular metabolic pathway of *M. oryzae*.

研究分野：生物無機化学

キーワード：イネいもち病 セロピオース脱水素酵素 酸化還元酵素 電子伝達反応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

毎年、世界のイネ収穫量の約 10~30%は、病害により損失しているといわれている。子囊菌 *Magnaporthe oryzae* により引き起こされるイネいもち病は、イネの重要病害の一つであり、我が国の稲作に与える被害量は、年間 10 万トン、被害額は年間数百億円にも達している。

病害防除の主な手段としては薬剤による防除法がとられ、MBI-D 剤とストロビルリン系殺菌剤 (QoI) が用いられてきた。イネいもち病菌の感染には、胞子発芽管の先端に形成される付着器のメラニン化が必須であり、MBI-D 剤はイネいもち病菌の菌体内メラニン生合成系の脱水素酵素を標的とした阻害作用を示す防除剤である。一方、ストロビルリン系殺菌剤は、菌体内のミトコンドリアにおける電子伝達系複合体 III タンパク質の Qo 部位に作用する呼吸阻害剤である。これらの薬剤は優れた防除効果を示すことから、全国的に普及し長い間使用されてきた。しかし、近年 MBI-D 剤と QoI 剤に対して、それぞれ耐性を獲得したイネいもち病菌が出現・分布拡大し、全国各地において薬剤耐性イネいもち病菌による損害が深刻化している。そのため、現在、薬剤耐性菌が発生しにくい新規いもち病菌防除法の開発が求められている。

既存の薬剤の多くは、MBI-D 剤や QoI 剤のように菌体内の生合成系やエネルギー生産系のタンパク質を標的としているため、卓越した阻害作用を示すが、その反面、圃場に分布する病原菌の集団から耐性菌を選択する作用も強く、耐性菌問題が発生しやすい。また、過度な薬剤ストレスに対して病原菌が反応し、遺伝子変異が起こすことで、薬剤耐性を獲得しやすいという問題がある。そこで、申請者は、分子標的として菌体外代謝系に関連するタンパク質に着目した。イネいもち病など植物病原性糸状菌の多くは、セルラーゼやヘミセルラーゼなどの糖質加水分解酵素を菌体外に分泌し、セルロースを分解することで、エネルギー源や炭素源として利用し成長する。実際に、イネいもち病菌のセルラーゼ遺伝子を欠損させると、イネへの感染を抑えられることが報告されている。また、近年、糖質加水分解酵素以外にも糸状菌のセルロース分解効率に影響を与える、数種の菌体外酸化還元酵素が報告されている。それらの酸化還元酵素の中でセロピオース脱水素酵素 (CDH) は、結晶性セルロースの酸化的分解へ関与することや、セルロースの分解物であるセロピオースを基質とし、間接的にセルラーゼ反応に関与することから、イネいもち病菌のイネへの感染において、セルラーゼと同様に重要な役割を担うことが予想される。

2. 研究の目的

これまでに、*M. oryzae* ゲノム中に、2 種類の CDH ホモログ (*MoCDH1*、*MoCDH2*) が存在することを発見している。CDH は、補酵素としてフラビンとヘム *b* を、それぞれ有しているフラボヘムタンパク質である。*MoCDH2* は、先行研究の進んでいる木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 CDH (*PcCDH*) と同様にフラビンドメインとヘムドメインのみから構成されていたが、*MoCDH1* はそれらのドメインに加えて、C 末端にセルロース結合モジュール (CBM) 配列を有していた。本研究では、セルロース分解系における、これら 2 種類の CDH ホモログの役割の違いを明らかにすることを目的とした。また、現在議論されている CDH の酵素反応に必須となる電子伝達パートナー候補タンパク質を探索し、セルロース分解系における *MoCDH* を中心とした酸化還元酵素による分子ネットワークに関する基礎的知見の収集を行い、抗イネいもち病薬剤の分子標的としての *MoCDH* の可能性を検討することを目的とした。

具体的には以下の研究を遂行することにした。

(1) 2 種類の CDH ホモログの生化学的性質の比較

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて発現させた *MoCDH1* と *MoCDH2* のリコンビナント体の単一精製を行い、その基質特異性や酵素反応の至適 pH などの生化学的性質の比較と電子伝達反応の比較を行うことで、イネいもち病菌のセルロース代謝系に優性的に関与している CDH ホモログを推定する。

(2) *MoCDH* ホモログの電子伝達パートナー候補タンパク質の探索とタンパク質発現系の構築

BLAST 検索により、*M. oryzae* ゲノムから *MoCDH* の電子伝達パートナー候補タンパク質の探索を行う。候補遺伝子の大腸菌または *P. pastoris* を用いたタンパク質発現系を構築する。精製タンパク質の分光学的性質及び電子伝達反応を検討する。

(3) 電子伝達パートナー候補タンパク質が、2 種類の CDH ホモログの酵素活性に及ぼす影響の検討

MoCDH1 または *MoCDH2* と電子伝達パートナー候補タンパク質間の電子伝達反応を検討する。また、電子伝達パートナー候補タンパク質が、*MoCDH1* と *MoCDH2* の酵素反応に及ぼす影響について検討する。

3. 研究の方法

(1) 2 種類の CDH ホモログの生化学的性質の比較

我々は、これまでにメタノール資化性酵母 *P. pastoris* を用いた *MoCDH1* と *MoCDH2* の発

現系を構築し、小スケール培養での発現確認に成功している。その形質転換体酵母を用いて、*MoCDH1* と *MoCDH2* のリコンビナント体を大量発現させ、単一精製を行った。

CDH の酵素反応及び電子伝達反応には、活性中心となるフラビンとヘム *b* の状態が重要である。そこで、UV-vis 吸収スペクトル測定と共鳴ラマン散乱測定により、2 種の *MoCDH* ホモログの活性中心の比較を行った。また、サイクリックボルタンメトリーによる電気化学的測定により、ヘム *b* の酸化還元電位を測定した。

CDH の酵素反応は、基質を酸化した後、フラビンドメイン-ヘムドメイン間で分子内電子伝達が起こり、その後ヘムドメインから電子伝達パートナーへ分子間電子伝達が起こることが分かっている。この性質を利用し、電子伝達パートナーとしてシトクロム *c* を用いて、その酸化還元状態を経時的にモニターすることで CDH の活性測定を行うことができる。2 種の *MoCDH* ホモログの基質特異性、また酵素反応の至適 pH を比較検討した。

(2) *MoCDH* ホモログの電子伝達パートナー候補タンパク質の探索とタンパク質発現系の構築

クエリー配列に代表的な電子伝達タンパク質であるシトクロムタンパク質またはブルー銅タンパク質のアミノ酸一次配列を用いて、*M. oryzae* ゲノムに対して BLAST 検索を行った。発見した新規シトクロムタンパク質を *MoCDH* ホモログの電子伝達パートナー候補タンパク質と推定し、その遺伝子を大腸菌発現ベクター-pCold I に挿入し、N 末端に His-tag 配列を付加した。また、先行研究により、糸状菌由来のタンパク質の多くは大腸菌発現系より、メタノール資化性酵母 *P. pastoris* 発現系を用いることで、効率的に大量生産できることが分かっている。そこで、この電子伝達パートナー候補タンパク質の生産についても、*P. pastoris* 発現系を用いることとし、酵母用発現ベクター-pPICZ に遺伝子導入し、目的遺伝子の 3' 端に c-Myc-tag 及び His-tag 配列を付加した。12% SDS-PAGE により、目的タンパク質の発現確認を行った。Ni-NTA アフィニティーカラムにより精製を行い、抗 His-tag 抗体と抗 c-Myc-tag 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、精製を確認した。

(4) 電子伝達パートナー候補タンパク質が、2 種類の CDH ホモログの酵素活性に及ぼす影響の検討

Mocyt.b を電子受容体として用いて、*MoCDH1* 及び *MoCDH2* のセロピオース酸化反応を行った。UV-vis 吸収スペクトル測定により、還元体 *Mocyt.b* 由来のスペクトルの増加を確認することで、*MoCDH* と *Mocyt.b* 間の電子伝達反応を評価した。

4. 研究成果

(1) 2 種類の CDH ホモログの生化学的性質の比較

本研究では、まず *MoCDH1* と *MoCDH2* の大量培養を行い、疎水性相互作用カラム及び陰イオン交換カラムを用いて、単一精製を行った。精製したタンパク質溶液は、CDH のヘムドメイン由来の赤色を呈していた。また、12% SDS-PAGE により発現確認を行った結果、*MoCDH1* では約 100 kDa 付近、*MoCDH2* では、約 120 kDa 付近に濃いバンドが、それぞれ確認された。*MoCDH1* と *MoCDH2* のアミノ酸一次配列から予想される分子量は、それぞれ 87 kDa と 84 kDa である。そこで、Endo-H による脱糖鎖処理を行ったところ、SDS-PAGE のバンドの減少が観測された。このことから、この分子量の増加は、N-または O-グリコシド結合による糖鎖修飾のためであることが示唆された。

次に、シトクロム *c* への電子伝達を活性の指標として用いて、*MoCDH* ホモログ間のセロピオースに対する酵素活性について比較検討した。*MoCDH1* は、pH 4.0 において、最も高い酵素活性を示した。それに対して、*MoCDH2* は、pH 7.5 において活性が最も高かった(図 1)。この異なる至適 pH の原因を明らかにするために、分光学的測定により、2 種の *MoCDH* ホモログの活性中心の比較を行った。その結果、*MoCDH* ホモログ間において、フラビンとヘム *b* の状態に大きな違いは見られなかった。2 種の *MoCDH* ホモログのヘム *b* は、*PcCDH* と同様に 6 配位低スピン状態を示していた。また、電気化学的測定により、*MoCDH1* と *MoCDH2* の酸化還元電位を求めたところ、それぞれ +235 mV vs. NHE と +240 mV vs. NHE であり、ほぼ同じ値が得られた。このことから、至適 pH の違いは、ヘム鉄の状態の違いに起因するものではないことが示唆された。*PcCDH* を用いた先行研究により、CDH の反応サイクルの律速段階は、フラビンドメイン-ヘムドメイン間で分子内電子伝達であることが報告されている。そこで、*MoCDH1* と *MoCDH2* のヘムドメイン及びフラビンドメインの pI を、アミノ酸一次配列から求めたところ、*MoCDH1* のヘムドメイン及びフラビンドメインの pI は、それぞれ 4.6 と 8.4 であったのに対して、*MoCDH2* のヘムドメイン及びフラビンドメインの pI は、5.0 と 5.7 であり、大きな違いがみられた。このことから、*MoCDH* ホモログ間における酵素反応の至適 pH の違いは、タンパク質表面電荷の違いが分子内電子伝達に影響を及ぼすためだと考えられる。*MoCDH1* のアミノ酸一次配列には、*MoCDH2* が有していない CBM ホモログ配列が存在していることを考慮すると、*MoCDH1* が優性的にセルロースの代謝に関与している可能性が考えられる。今回得られたこの至適 pH の違いが、イネいもち病菌のセルロース代謝系にどのような影響を与えているか、今後さらに検討を進めていく予定である。

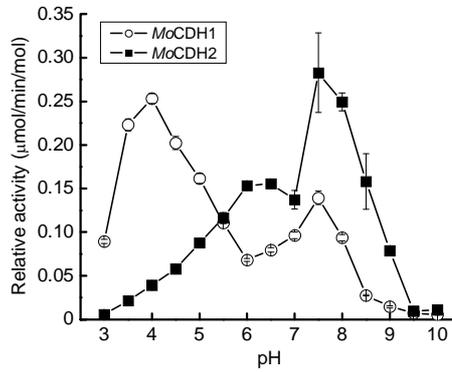


図1 *MoCDH*ホモログのセロビオースに対する酵素活性のpH依存性

(2) *MoCDH* ホモログの電子伝達パートナー候補タンパク質の探索とタンパク質発現系の構築

M. oryzae のゲノムデータベースにおける BLAST 検索によって、*PcCDH* のシトクロムドメインのアミノ酸一次配列と高い相同性示す遺伝子 (*Mocyt. b*) が存在することが明らかとなった。この *Mocyt. b* 遺伝子は全長 406 アミノ酸残基からなり、N 末側に CDH のシトクロムドメイン、C 末側にシトクロム *b*₅₆₁ と相同性の高い配列を有していた。シトクロム類などヘムを有するタンパク質は、電子伝達タンパク質として良く知られている。そこで、*Mocyt. b* を *MoCDH* ホモログの電子伝達パートナー候補タンパク質と推定して、*Mocyt. b* 遺伝子を pCold 1 ベクターに挿入し、大腸菌により発現した。しかし、SDS-PAGE を用いて発現確認を行ったところ、目的タンパク質の分子量 (42 kDa) 付近に、バンドは確認されなかった。そこで、*P. pastoris* を用いた発現系構築を行った。発現ベクターには pPICZ を用いて、3' 端に c-Myc-tag と His-tag 配列を付加させた。発現確認を行ったところ、約 42 kDa にバンドが確認された。また、抗 His-tag 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、目的分子量の位置にバンドの染色が確認できた (図 2a)。発現させたタンパク質溶液は、ヘム由来の赤色を呈していた。Ni-NTA アフィニティーカラムにより、*Mocyt. b* の精製を行い、UV-vis 吸収スペクトル測定を行ったところ、ヘムに特徴的なスペクトルが得られた (図 2b)。

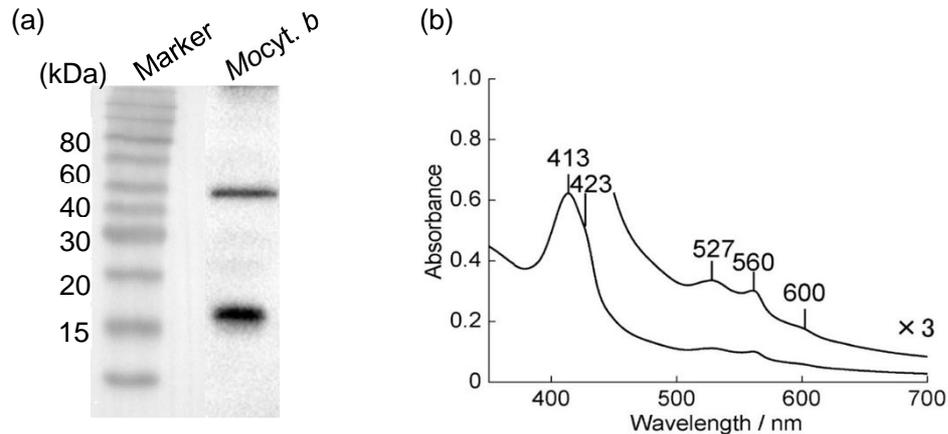


図2 (a) 抗His-tag抗体を用いたウエスタンブロッティングによる *Mocyt. b* の発現確認、(b) *Mocyt. b* のUV-vis吸収スペクトル

(3) 電子伝達パートナー候補タンパク質が、2種類のCDH ホモログの酵素活性に及ぼす影響の検討

セロビオースを基質として用いて、*MoCDH1* または *MoCDH2* による *Mocyt. b* の還元反応を検討したところ、*MoCDH1* または *MoCDH2* を添加すると、還元体 *Mocyt. b* 由来のスペクトル

の増加が確認された(図3)。この結果から、MoCDH ホモログと *Mocyt. b* 間で電子伝達が可能であることが明らかとなった。*Mocyt. b* がイネいもち病菌のセルロース代謝系に参与しており、MoCDH の電子伝達パートナーとして働いている可能性が示唆された。

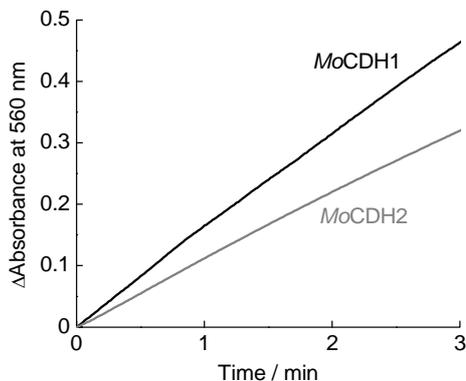


図3 UV-vis吸収測定によるMoCDHホモログによる*Mocyt. b*の還元反応の解析

5. 主な発表論文等

[学会発表](計9件)

本間 陽名、松村 洋寿、鮫島 正浩、五十嵐 圭日子、小川 信明、伊藤 英晃、尾高 雅文、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 由来新規ヘム含有膜タンパク質の抽出方法の検討、2018年度 日本生物工学会北日本支部秋田シンポジウム、秋田大学手形キャンパス、秋田、2018年12月22日

及川 千里、本間 陽名、松村 洋寿、鮫島 正浩、五十嵐 圭日子、小川 信明、尾高 雅文、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 由来2種類のセロピオース脱水素酵素ホモログの酵素活性解析比較、2018年度 日本生物工学会北日本支部秋田シンポジウム、秋田大学手形キャンパス、秋田、2018年12月22日

本間 陽名、及川 千里、松村 洋寿、鮫島 正浩、五十嵐 圭日子、小川 信明、伊藤 英晃、尾高 雅文、Expression and solubilization of novel heme-containing membrane proteins from rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* using the non-ionic surfactant、平成30年度化学系学協会東北大会、秋田大学手形キャンパス、秋田、2018年9月21-22日

及川 千里、本間 陽名、松村 洋寿、鮫島 正浩、五十嵐 圭日子、小川 信明、尾高 雅文、Enzymatic analysis of cellobiose dehydrogenase from rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*、平成30年度化学系学協会東北大会、秋田大学手形キャンパス、秋田、2018年9月21-22日

松村 洋寿、本間 陽名、及川 千里、鮫島 正浩、五十嵐 圭日子、小川 信明、尾高 雅文、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 由来セロピオース脱水素酵素ならびに新規ヘム含有膜タンパク質の発現系構築、第12回バイオ関連化学シンポジウム、大阪大学吹田キャンパス、大阪、2018年9月9-11日

及川 千里、本間 陽名、松村 洋寿、鮫島 正浩、五十嵐 圭日子、小川 信明、尾高 雅文、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 由来セロピオース脱水素酵素の酵素活性解析、酵素工学会研究会第80回講演会、東京工業大学大岡山キャンパス、東京、2018年11月16日

本間 陽名、土居 友梨子、松村 洋寿、鮫島 正浩、五十嵐 圭日子、小川 信明、伊藤 英晃、尾高 雅文、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 由来セロピオース脱水素酵素と新規ヘム含有膜タンパク質の解析、第70回日本生物工学会大会、関西大学千里山キャンパス、大阪、2018年9月5-7日

土居 友梨子、松村 洋寿、五十嵐 圭日子、鮫島 正浩、小川 信明、尾高 雅文、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 由来セロピオース脱水素酵素ホモログの発現系の構築、第44回生体分子化学討論会、秋田カレッジプラザ、秋田、2017年6月23日

本間 陽名、松村 洋寿、五十嵐 圭日子、鮫島 正浩、小川 信明、尾高 雅文、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 由来新規ヘム含有タンパク質の発現系構築、第44回生体分子化学討論会、秋田カレッジプラザ、秋田、2017年6月23日

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.gipc.akita-u.ac.jp/~bioanal-str-chem/>