

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：34316

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15845

研究課題名(和文)植物病原糸状菌のメラニン合成を制御する細胞内銅イオン輸送機構の解明

研究課題名(英文) Analysis for melanin biosynthesis regulated by copper transport mechanism in phytopathogenic fungi

研究代表者

原田 賢 (HARATA, KEN)

龍谷大学・農学部・実験助手

研究者番号：40795184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原糸状菌であるウリ類炭疽病菌においてメラニン合成は宿主植物への侵入に必要である。メラニン合成の最終ステップである1,8-ジヒドロキシナフタレンを酸化しメラニン色素を生成する銅結合酵素ラッカーゼは、その活性に銅イオンの供給が必要不可欠である。しかし、どのようにして細胞内の銅イオンをラッカーゼへと輸送するのは未解明である。本研究では、ウリ類炭疽病菌における銅イオン輸送経路Colct1-CoCcc2が、ラッカーゼ活性を制御することによりメラニン合成に関与することを見出した。また、イネいもち病菌においても同機構は保存されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病原糸状菌である炭疽病菌といもち病菌のメラニン合成を阻害する農薬は数多く開発されており、農業現場で基幹剤として使用されている。本研究で見出した知見は新規メラニン合成阻害剤のターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Melanin biosynthesis is required for the penetration into host plants in a phytopathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*. Laccase participates in oxidation of 1,8-dihydroxynaphthalene in the final step of melanin biosynthesis and copper ions is essential for driving its activity. However, the molecular mechanisms underlying copper ions transport to the laccase remain unclear. Here, we found that a copper transporter pathway consisting lct1 and Ccc2 is involved in melanin biosynthesis by regulating laccase activity in *C. orbiculare*. Moreover, this mechanism is also conserved in a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*.

研究分野：植物保護科学

キーワード：植物病原糸状菌 メラニン合成 病原性 農薬

1. 研究開始当初の背景

多種の作物に感染する炭疽病菌と世界七大病害の一つであるイネいもち病菌は付着器と呼ばれる濃褐色を呈するドーム状の構造体の感染器官を形成する。本器官の色素の生合成は宿主侵入の可否を決める重要な要因であり、その制御機構を分子レベルで理解することは新規防除剤の開発に繋がる。これまでに4種のメラニン生合成酵素が同定されており、適切なメラニン生合成を行うには、これらの酵素活性を制御する必要がある。

予備的な研究結果から、殺菌剤フェリムゾン耐性を示すウリ類炭疽病菌の変異株のコロニーは、メラニン色が薄くなる傾向を見出していた。この発見から、フェリムゾン耐性株の変異遺伝子として同定された銅イオン輸送因子はメラニン生合成と関係性があるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内銅イオン輸送因子の機能解析を行い、植物病原糸状菌のメラニン生合成酵素ラッカーゼの活性を制御する細胞内の銅イオン輸送機構を解明する。

3. 研究の方法

ウリ類炭疽病菌における銅イオン輸送因子の遺伝子破壊株や銅結合部位の点変異株を作出し、顕微鏡よりメラニン色素が沈着する付着器や剛毛について観察することで、遺伝学的、細胞学的な観点から銅イオン輸送因子によるメラニン生合成への関与を調べた。また、作出した変異株のラッカーゼ活性を測定することで、銅イオン輸送とラッカーゼの関係性について検討した。さらに、ICP発光分光分析装置を用いた銅蓄積量測定により、細胞内の銅の恒常性への影響について調べた。そして、銅イオン輸送因子によるメラニン生合成制御は植物病原糸状菌に広く保存されるのか、イネいもち病菌において機能解析した。

4. 研究成果

1) Colct1の金属結合MXCXXCモチーフは付着器のメラニン化に関与する

ウリ類炭疽病菌の銅イオン輸送因子Colct1はメラニン生合成に関与するのか、*coict1*破壊株を作出し、顕微鏡を用いて付着器と剛毛におけるメラニン色を観察した結果、*coict1*破壊株では薄いメラニン色を呈した(図1)。また、*mCherry-ColICT1*形質転換体を用いて、Colct1の細胞内局在を調べた結果、メラニン色が付き始めた細胞にて顕著なmCherry蛍光を確認し、Colct1はメラニン生合成に関与することが示唆された。メラニン生合成の最終過程に関わるラッカーゼの活性には銅イオンが必要であり、*coict1*破壊株の培養液を用いてラッカーゼ活性を解析した結果、同破壊株のラッカーゼ活性は顕著に低下した(図2)。このことから、Colct1はラッカーゼの活性に必要なことが示された。

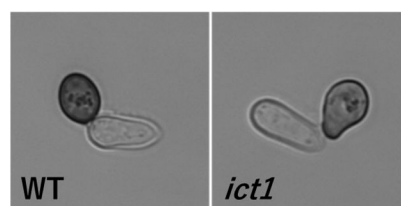


図1 *coict1*株における付着器のメラニン色

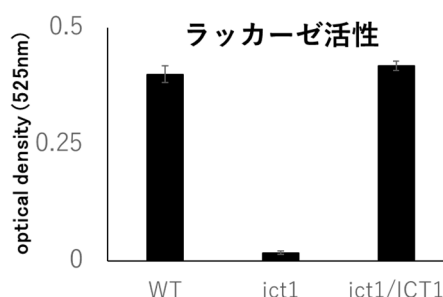


図2 *coict1*株におけるラッカーゼ活性

Colct1 は金属結合モチーフ(MXCXXC)を保存している。本モチーフを構成するアミノ酸メチオニン、セリンとシステインをアラニンに置換し、1アミノ酸変異をさせたアラニンスキニング株を作出した。メチオニンとシステインをアラニンに置換したアラニンスキニング株は、付着器のメラニン生合成能が低下し、Colct1 の金属結合モチーフを構成するメチオニンとシステインはメラニン生合成に関与することを見出した。

2) Colct 1 は細胞内銅イオンの恒常性に関与する

ICP 発光分光分析装置を用いて *coict1* 破壊株の栄養菌系における銅の含有量を測定した。無処理区、硫酸銅処理区、フェリムゾン処理区にて *coict1* 破壊株の銅の含有量は野生株と同程度であったが、フェリムゾンと硫酸銅処理区では *coict1* 破壊株の銅の含有量は野生株の約2倍増加した。このことから、Colct 1 は細胞内銅イオンの恒常性に関与することが示唆された。

3) 銅イオン輸送 P 型 ATPase CoCcc2 はメラニン生合成に関与する

出芽酵母における *Ict 1* のホモログ *Atx 1* は銅シャペロンである *Ccc2* に銅イオンを受け渡すことから、ウリ類炭疽病菌における銅イオン輸送 P 型 ATPase である *CoCCC2* の破壊株を作出した。*cocccc2* 破壊株の付着器のメラニン色は薄く、*CoCCC2* はメラニン生合成に関与することが示唆された。また、*cocccc2* 破壊株の病斑形成能は顕著に低下した。

4) いもち病菌における *Ict 1* と *Ccc2* もメラニン生合成に関与する

いもち病菌における *Ict1* と *Ccc2* の破壊株を作出し、付着器のメラニン色を観察した。両破壊株の付着器のメラニン生合成能は野生株と比較し、低下した(図3)。このことから、いもち病菌のメラニン生合成機構にも炭疽病菌と同様の機構が働くことが示唆された。

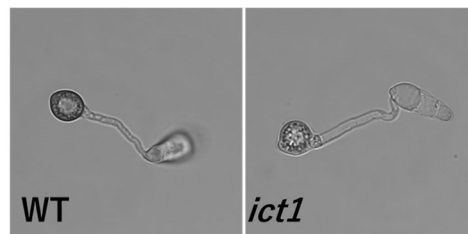


図3 *moict1*株における付着器のメラニン色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Harata Ken, Daimon Hiroyuki, Okuno Tetsuro	4. 巻 23
2. 論文標題 Trade-Off Relation between Fungicide Sensitivity and Melanin Biosynthesis in Plant Pathogenic Fungi	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101660 ~ 101660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101660	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Harata Ken, Shinonaga Hayato, Nishiyama Yuudai, Okuno Tetsuro	4. 巻 154
2. 論文標題 CoGRIM19 is required for invasive hyphal growth of Colletotrichum orbiculare inside epidermal cells of cucumber cotyledons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 104847 ~ 104847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micpath.2021.104847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠永隼, 西山雄大, 原田賢, 奥野哲郎
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌の病原性関連遺伝子GRIM-19の機能解析
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------