

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21228001

研究課題名(和文) tRNA介在領域の分解能欠損による植物ミトコンドリア病発生機構

研究課題名(英文) Mechanism of disease caused by deficiency of degradation of tRNA intron in mitochondria

研究代表者

秋光 和也(Akimitsu, Kazuya)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：80263888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 82,200,000円、(間接経費) 24,660,000円

研究成果の概要(和文)：ACR毒素レセプターをコードするACRS遺伝子は、毒素非感受性品種ミトコンドリアではmRNAが分解される。そこで、ACRSmRNAに結合するAmBP30を中心としたACRSmRNA分解複合体の構成タンパク質群の特定に向けて、AmBP30をBaitとしリスボン cDNAを酵母two hybrid法で選抜し、選抜タンパクおよびAmBP30のポリクローナル抗体を作成して、免疫沈降後、TOF-MS解析により同定し、AmBP30複合体タンパク質を特定した。さらに、ACR・ACT毒素合成遺伝子群を標的遺伝子破壊・RNA silencing法で検定し、毒素生産に直結することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ACRS gene encoding ACR-toxin receptor is degraded in mitochondria from the toxin-insensitive citrus cultivars. To identify the component proteins consisting ACRSmRNA degradation protein complex with AmBP30, which is ACRS mRNA-binding protein, yeast two hybrid with AmBP30 as the bait and immuno-precipitation using AmBP30 and Y2H-selected protein antibodies following the precipitated protein analysis by TOF-MS confirmed multiple proteins as the components of ACRSmRNA degradation protein complex. Furthermore, roles of multiple genes in ACR and ACT-toxins biosynthesis were confirmed using target-gene disruption and RNA silencing.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：農学 植物 ミトコンドリア 宿主特異的毒素 植物病理学

1. 研究開始当初の背景

植物と病原糸状菌の相互反応の中には、菌の分泌する宿主特異的毒素への感受性・抵抗性によって発病の有無が決定される例が知られる。先に我々は、病原菌ゲノムにおける宿主特異的毒素の生合成酵素遺伝子クラスターの部分領域と、宿主ミトコンドリアゲノムに座乗するその毒素のレセプター遺伝子の単離に成功した。

宿主特異的 ACR 毒素の作用機構と毒素レセプター研究で、ACR 毒素がラフレモン等の特定のカンキツ品種にのみ NAD⁺等のミトコンドリア補因子の漏出による TCA 回路の停止や酸化的リン酸化の脱共役を誘起し、ACR 毒素に対する感受性はミトコンドリアゲノムにコードされる毒素のレセプター遺伝子 *ACRS* で決定され、毒素への感受性/抵抗性は *ACRS*mRNA へのプロセッシングの有無により決定されることを明らかにした。世界において宿主特異的毒素のレセプター単離の成功例は、テキサス型細胞質雄性不稔トウモロコシの T 毒素レセプター (*Turf13*) と本研究の 2 例のみである。

2. 研究の目的

本研究では、*ACRS*mRNA プロセッシングに關与する 30kD タンパク (*AmBP30*) のプロモーター解析、本 *AmBP30* タンパクを中心とした mRNA プロセッシング複合体構成タンパクの特定、ACR 毒素・ACT 毒素生合成遺伝子クラスターの詳細解析と他の宿主特異的毒素生合成遺伝子クラスターとの比較解析を中心に研究を進め、植物病原菌と宿主植物間における特異性決定機構を解明する。

3. 研究の方法

ACR 毒素感受性・非感受性品種を用いて *AmBP30* 遺伝子プロモーター配列の比較を行い、転写の差を誘起する因子を特定する。

AmBP30 複合体の構成タンパクの特定には、酵母 two hybrid 法・免疫沈降法を用いて、*AmBP30* タンパクと相互反応し、tRNA-Ala の介在領域の修飾に關与する可能性の高い構成タンパクを特定する。

ACR 毒素生合成遺伝子クラスターや ACT 毒素生合成遺伝子クラスターが座乗する染色体のゲノム配列より、各毒素生合成に關与する遺伝子を単離して、各遺伝子の機能を標的遺伝子破壊法・RNA silencing 法を用いて検定する。また *A. alternata* が生産する他の宿主特異的毒素生産菌の毒素生合成遺伝子クラスターが座乗する染色体とも配列比較して、共通領域を解析する。

4. 研究成果

AmBP30 遺伝子プロモーター解析に關しては、プロモーター配列を ACR 毒素感受性品種と非感受性品種で比較すると、毒素感受性の品種のプロモーターにのみ負の転写制御因子の結合サイトが見られる事が明らかになった。毒素非感受性品種では、*AmBP30* 遺伝子発現が誘導され、翻訳された *AmBP30*

タンパクは他のタンパク群と複合体化して、毒素レセプター遺伝子 *ACRS* を含む tRNA-Ala の介在領域を分解していると推測される。一方、感受性品種では本領域は分解されず、その領域に座乗する *ACRS* 遺伝子が翻訳され、毒素感受化していると考えているため、*AmBP30* 遺伝子が毒素感受性品種で負の転写制御因子で抑制されていることは我々の仮説を支持する結果である。

これまでの研究成果から、ACR 毒素レセプターをコードする *ACRS* 遺伝子は tRNA-Ala の介在領域に座乗し、毒素非感受性品種のミトコンドリアでは、RNA に転写後、tRNA-Ala の 5'エキソンと 3'エキソンが切り出され、不要部分として分解されていると考えられる。しかしながら、毒素感受性ミトコンドリアではこの分解に不備が起こり、その領域に座乗する *ACRS* が翻訳され 4 量体孔形成レセプターが生産されると考えている。

そのため tRNA-Ala の介在領域の分解機構の解明が、本ミトコンドリア病の発生・特異性の決定機構の解明に直結する。本研究では *ACRS* 遺伝子 mRNA に結合する *AmBP30* を中心とした複合体の構成タンパク群を特定するために、*AmBP30* を Bait としてリスボン cDNA を酵母 two hybrid 法で選抜し、*AmBP30* と相互反応して RNA 修飾に關与する可能性のある 5 クロオンを選抜した。これらの cDNA 全長を単離して、再度遺伝子全長を用いた酵母 two hybrid での *AmBP30* と相互反応を確認後、この中で RNA 分解に關与する事が知られている一つのタンパクおよび *AmBP30* の合成部分アミノ酸配列を抗原にしてポリクローナル抗体を作成した。これらの抗体を用いて免疫沈降後、毒素非感受性品種リスボンの精製ミトコンドリア画分からの沈降タンパクを TOF-MS 解析により同定した。その結果、沈降タンパクに含まれていた 3 つのタンパクに着目し、これらのタンパク遺伝子全長を単離し、*AmBP30* との相互反応を再度酵母 two hybrid 法で確認して、2 つのタンパクを *AmBP30* と複合体化するタンパクとして特定した。

これまでの研究で、ACT 毒素生合成遺伝子クラスターは約 2Mb、ACR 毒素生合成遺伝子クラスターは約 1.5Mb の小型染色体に座乗し、何れの染色体も毒素生産

菌のみが保有する事を明らかにしてきた。これらの染色体ゲノムの contig 配列から ACT 毒素生産菌にのみ存在する *ACTTS1* (Non-ribosomal peptide synthase:NRPS)、*ACTTS2* (dehydrogenase)、*ACTTS3* (polyketide synthase)、*ACTTS4* (NRPS)、*ACTT5* (acyl-CoA synthetase)、*ACTT6* (enoyl-CoA hydratase)と、ACR 毒素生産菌にのみ存在する *ACRTS1*(hydroxylase)、*ACRTS2* (polyketide synthase)、*ACRTS3* (cyclase/thioesterase)を明らかにした。何れの遺伝子もクラスター中に複数コピー存在するが、標的遺伝子破壊法で機能するコピー数を減らすと毒素生産性が減少し、さらに RNA silencing 法で knock-down 株を作成して遺伝子転写物が検出不可能になると毒素生産も停止することから、これらの遺伝子が毒素生産に直結することを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Alternaria host-selective toxins: Determinant factors of plant disease.: Akimitsu, K., Tsuge, T., Kodama, M., Yamamoto, M., and Otani, H. *J Gen Plant Pathol* 80:109-122 (2014)

A zinc-binding citrus protein metallothionein can act as a plant defense factor by controlling host-selective ACR-toxin production.: Nishimura, S., Tatano, S., Miyamoto, Y., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Tada, Y., Ichimura, K., and Akimitsu, K. *Plant Mol Biol* 81:1-11 (2013)

Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*.: Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M., and Otani, H. *FEMS Microbiology* 37:44-66 (2013)

A polyketide synthase gene, *ACRTS2*, is responsible for biosynthesis of host-selective ACR-toxin in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*.: Izumi, Y., Ohtani, K., Miyamoto, Y., Masunaka, A., Fukumoto, T., Gomi, K., Tada, Y., Ichimura, K., Peever, T.L., and Akimitsu, K. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:1419-1429 (2012)

Role of the pathotype-specific *ACRTS1*

gene encoding a hydroxylase involved in the biosynthesis of host-selective ACR-toxin in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*.: Izumi, Y., Kamei, E., Miyamoto, Y., Ohtani, K., Masunaka, A., Fukumoto, T., Gomi, K., Tada, Y., Ichimura, K., Peever, T.L., and Akimitsu, K. *Phytopathology* 102:741-748 (2012)

Contribution of peroxisomes to secondary metabolism and pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*.:

Imazaki, A., Tanaka, A., Harimoto, Y., Yamamoto, M., Akimitsu, K., Park, P., and Tsuge, T. *Eukaryotic Cell* 9: 682-694 (2010)

ACTTS3 encoding a polyketide synthase is essential for the biosynthesis of ACT-toxin and pathogenicity in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*.:

Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T.L., Tada, Y., Ichimura, K., and Akimitsu, K. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:406-414 (2010)

Role of the host-selective ACT-toxin synthesis gene *ACTTS2* encoding an enoyl-reductase in pathogenicity of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*.: Ajiro, N., Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T.L., Izumi, Y., Tada, Y., and Akimitsu, K. *Phytopathology* 100:120-126 (2010)

Molecular cloning and characterization of a thaumatin-like protein-encoding cDNA from rough lemon.: Kim, B.-G., Fukumoto, T., Tatano, S., Gomi, K., Ohtani, K., Tada, Y. and Akimitsu, K. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74:3-10 (2009)

Function of genes encoding acyl-CoA synthetase and enoyl-CoA hydratase for host-selective ACT-toxin biosynthesis in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*.: Miyamoto, Y., Ishii, Y., Honda, A., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T.L., and Akimitsu, K. *Phytopathology* 99: 369-377 (2009)

〔雑誌論文〕(計13件)

〔学会発表〕(計29件)

〔図書〕(計2件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 秋光 和也
(研究代表者)

研究者番号：80263888

(2)研究分担者 五味 剣二
(研究分担者 平成21-22年)

研究者番号：50511549

(3)連携研究者 多田 安臣
(研究分担者)

研究者番号：40552740