

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：10101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2012
 課題番号：24658103
 研究課題名（和文）アフノマイセス遊走子の宿主認識に働くフラボン受容体タンパクの分子進化
 研究課題名（英文）Molecular evolution of *Aphanomyces cochlioides* flavone receptor protein which functions in host recognition of the oomycetes zoospores.
 研究代表者
 橋床 泰之（HASHIDOKO YASUYUKI）
 北海道大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：40281795

研究成果の概要（和文）： cochliophilin A を宿主認識物質として認識する卵菌 *Aphanomyces cochlioides* AC-5 株のフラボノイド受容体を検索し、アフィニティカラムによる可溶化膜タンパク画分からの候補タンパクの捕捉に成功した。この受容体様タンパク質は 32 kDa の β -バレル構造をもつ膜貫通型タンパク質(ACCR1) で、そのアミノ酸配列が voltage-dependent anion channel protein (VDAC) に高い相同性を示した。遊走子に対し、ミトコンドリア特異的蛍光色素である MitoRed と ACCR1 抗体-抗体との二重蛍光染色を試みた結果、このタンパク質は遊走子の細胞膜上のみが存在し、ミトコンドリアには全く局在しないことが実験的に示された。これらを総合して、ACCR1 の分子進化仮説を提唱した。

研究成果の概要（英文）： *Aphanomyces cochlioides* is a phytopathogen that attacks beet and spinach, using their characteristic secondary metabolite 5-hydroxy-6,7-methylenedioxyflavone (cochliophilin A) as host recognition signal compound. We searched receptor protein to cause strong attractant activity of the B-ring non-substituted simple flavone. By using affinity column chromatography of solubilized membrane-binding proteins obtained from *A. cochlioides* zoospores, we successfully purified one candidate of the flavonoid receptor protein. Using a degenerate primer designed from the amino-acid sequence at the N-terminal of this protein, EST region of the target protein was successfully characterized to be a β -barrel-type transmembrane protein of a 32 kDa, and named *Aphanomyces cochliophilin* A receptor protein 1 (ACCR1). From the mRNA library, full length of its cDNA was obtained. Amino acid sequence of ACCR1 had a high homology with voltage-dependent anion channel protein (VDAC), but ACCR1 is missing 70AA from the C-terminus of VDAC. Our immunofluorescence assay for ACCR1 revealed that ACCR1 locates only cytoplasmic membrane but not on mitochondrion. All together, we proposed a hypothesis on molecular evolution of ACCR1 in *Aphanomyces cochlioides*.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生命有機化学

キーワード：フラボン受容体, *Aphanomyces cochlioides*, VDAC, バレル構造

1. 研究開始当初の背景

Aphanomyces cochlioides はハウレンソウ

やテンサイに感染し、根腐れを引き起こす病原性卵菌である。この遊走子は、cochliophilin

Aに代表されるフラボノイドおよびフェルラ酸アミドである *N*-feruloyl-4-*O*-methyldopamine に強く誘引され、誘引後には遊走子が集積塊を形成しながら被のう化し、発芽して侵入・感染に至る。特にフラボンタイプの *cochliophilin A* は宿主根に特徴的成分として含まれ、その誘引活性が極めて強い。これに対しアミドタイプの遊走子誘引化合物は、比較的多くの植物に含まれ、フラボン型誘引物質の 1/1000 程度の誘引性力値しか示さない。両者の違いから、それぞれの受容体と役割が異なっているのではないかと考え、それぞれ高濃度の化合物水溶液中での遊走子の両誘引物質に対する反応性を比較し、遊走子からの分化と感染イベントにおけるこれら 2 種類の遊走子誘引物質の役割についての検討した結果、これらの受容体は独立に機能していることが見出された。

そこで、特にフラボノイド受容体に着目し、これを追跡してきた。我々の研究室では、フラボノイド B 環の 4 位にアジド基を導入し、7 位水酸基をビオチニル化した誘導体を光アフィニティプローブとして、これに結合する可溶化膜タンパク質をペルオキシダーゼ・ラベルしたストレプトアビジンとの特異的結合による検出を試みたが、この方法ではバックグラウンドが高くなり、極めて微量な受容体タンパク質の同定には至らなかった。そこで、精製操作を加えることで、標的タンパク質の検出感度を引き上げることができるアフィニティクロマトグラフィー法を用いた標的タンパク質の捕捉を試みた。テンサイやホウレンソウを宿主とする *Aphanomyces cochlioides* AC-5 株遊走子細胞膜タンパク画分から *chrysin* をリガンドとしたアフィニティカラムによって、その受容体候補タンパクを取得し、そのポリペプチド鎖 (222 アミノ酸残基) の遺伝子全長についてクローニングおよび組み替えタンパクの大量調製に成功した。本研究では、この、15 カ所の β -シート・ドメイン構造をもつ膜結合タンパクのユニークな機能と分子進化を明らかにし、卵菌遊走子における化学分子認識機構の全容を解明する。

最近、PNAS に卵菌の病原性に関わる遺伝子が水平伝播によって獲得されたとの報告がなされ、卵菌において感染に関わる機能的遺伝子がダイナミックに進化していることが示されており、卵菌の宿主認識機構獲得に関してダイナミックな分子進化の証拠が得られることが期待されている。

2. 研究の目的

本研究提案では、B 環無置換のフラボノイドをリガンドに用いたアフィニティカラムクロマトによって、レセプタータンパクの検索を行う。膜タンパク画分から B 環無置換フ

ラボノイド・リガンドに対して高い親和性を示すタンパクを得て、そのタンパクがフラボノイド受容体である証拠を得る。また、これが細胞膜に特異的に存在する直接的な証拠を得ると共に、その外部シグナルがどのように細胞内部へ伝達されるかを解明することを目的としている。

我々が見いだした *A. cochlioides* 遊走子のフラボノイド・リガンド結合タンパクは、そのアミノ酸配列に 15 箇所の逆並行 β -シート・ドメインをもつ、 β -バレル構造の膜結合タンパクであった。このアミノ酸配列 (AA) は明らかに GPCR タンパクとは異なっており、むしろ N-末端側では膜電位依存型アニオンチャンネルタンパク質 (VDAC) に高い相同性を示していた。VDAC は β -バレル構造の筒型タンパクが多く、この、膜を貫通したチャンネルの開閉が遊走子の運動方向性を決める内生シグナル伝達のトリガーになると想定されるため、その確固たる証拠を得ることも、本研究の重要な目的のひとつである。そのチャンネルタンパクがどのようなタンパクと相同性が高く、その分子の祖先が何であったかを突き止めることが可能な諸々の情報を得ている。例えば、*A. cochlioides* 以外のものでは、最も AA 相同性が高いタンパクは *Phytophthora infestans* のアニオンチャンネルであったため、卵菌で特に機能が細分化されたタンパクファミリーであることが示唆されている。また、卵菌で同じフラボノイドを認識する *A. euteiches* や *Phytophthora sojae* の EST ライブラリー (or ゲノムライブラリー) から、類似タンパクの遺伝子が見つかり、多くの状況証拠がフラボノイドへの親和性の高いこの未知の膜チャンネルタンパクがフラボノイド受容体本体であるとの仮説を支持している。フラボノイドを external signal として受容した受容タンパクは細胞膜上で、adenylate cyclase を活性化し、G-protein を経ずに cyclic AMP レベルを上昇させるのではないかと予想しており、本研究は細胞外シグナル分子の受容と内生シグナル伝達機構の理解について新たな原理の発展の可能性をみる。

3. 研究の方法

アフィニティカラムは遊離アミノ基をもった担体に、遊走子誘引性を示す B-環無置換の *chrysin* (5,7-dihydroxyflavone) の 7-OH 位置にスパーサーとして methyl 4-chlorobutyrate を THF/NaH でエーテル結合して調製した 7-*O*-(3-carboxypropanyl)-*chrysin* を脱水縮合させ、アフィニティ担体とした。得られた担体は丁寧に洗い、適当なデタージェントを含む平衡化バッファーバッファーで平衡化した。

適量(4-5 g)の遊走子を調製し、4°C 下、Protease Inhibitor Cocktail を加えた緩衝液に懸濁し、超音波破碎の後、遠心によって上清を回収した。これを10倍量の4 M グアニジン塩酸塩を含む溶解バッファーで攪拌し、続いて100,000 x g, 1 h の超遠心分離で得られた沈澱をグアニジン塩酸塩洗浄済マイクロソーム画分とした。これを2% CHAPS を含む平衡化バッファーに懸濁し、適時振盪後、再度超遠心分離を行い、CHAPS 可溶化タンパク質 (= 膜タンパク画分) を得た。

得られた可溶化タンパク質マイクロソーム画分は、平衡化した担体粒子懸濁液に加え、低温室で一晩緩やかに攪拌した。短時間遠心した後、上清は新たな担体と同様に処理し、再度上清を遠心操作で除いた。それぞれの担体はバッファー洗浄の後、少量の8 M 尿素を含む SDS-PAGE サンプルバッファーに懸濁し、37°C で30分ほど静置し、遠心後、上清を回収した。この上清のほぼ全量を SDS-PAGE 電気泳動に、得られた目的のバンドは、膜転写後、CBB 染色し、膜から切り出した。この試料について N 末端アミノ酸配列分析を行った。

N 末端アミノ酸配列分析によって得られたアミノ酸配列については、*A. cochlioides* のゲノムライブラリーから EST division を対象とした tblastn (Protein query vs. DNA database) 検索を行った。その結果、ヒットする配列内の ORF 塩基数から 32 kDa のサイズに近いものを幾つかリストアップし、ORF の塩基情報をもとに、開始コドンと終止コドンをそれぞれ含んだ forward 側および reverse 側の EcoRI リンカー付きプライマーペアを設計し、*A. cochlioides* 遊走子生成直前菌糸から作成した cDNA ライブラリーをテンプレートとして、これらのプライマーによって特異的に増幅する PCR amplicon を得た。

cDNA ライブラリーは、RNeasy Plant Mini Kit を用いて調製した total RNA を DNase I で 37°C, 25 min 処理し、同キットで再精製した RNA をオリゴ T に続いて終止コドンの相補塩基配列を 5' -末端側に含むランダムプライマーで逆転写したものを調製して得た。

EST 配列から特異的プライマーとしてデザインしたものをを用いて増幅した cDNA 配列をゲルから切り出し、精製後、発現用 pCR® 2.1-TOPO ベクターへ挿入し、この組換えプラスミドを TOP 10F competent cell へ導入した。挿入遺伝子が組み込まれたプラスミドを保有するコロニーを得た。形質転換体のプラスミドの挿入遺伝子の有無およびその塩基配列解析から、目的遺伝子が正しく挿入されていることを確認した。

大腸菌に IPTG を与えて外来遺伝子がコードするタンパクを大量に発現させ、培養開始

5 h 後に培養菌体を回収後に超音波でこれを破碎し、可溶性タンパクを得た。この画分を His-tag 精製用ニッケルカラムにかけ、目的タンパクを得た。

得られた組み替えタンパク質は SDS-PAGE で精製し、ウサギ抗血清の作成に用いた。得られた抗血清の抗体力価の検定には ELISA 法を用いマイクロプレートリーダーで黄色波長の吸光度を測定した。特異性検定にはウェスタンブロット法を用い、試料として抗体作成に用いた抗原タンパク質画分、抗原タンパクを発現した大腸菌菌体、対照としての発現誘導していない大腸菌菌体、さらには *A. cochlioides* AC-5 遊走子そのものを比較した。各タンパク画分をゲル電気泳動後に転写し、得られた PVDF 膜とウサギ抗血清と反応させた後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体とこれを反応させ、基質となる発色試薬で発色させた。

AC-5 遊走子懸濁液を 20%ホルマリンで固定し、緩やかな遠心により固定済み遊走子を回収し、洗浄後、冷アセトンを添加し、氷冷により易透化した。遠心によって回収した固定遊走子は、再度少量の冷アセトンに懸濁し、これを適量スライドグラス上に滴下し、風乾したものを染色用試料とした。ブロッキング液で処理した後、適度に希釈した抗血清を反応させ、二次抗体で染色し、過剰抗血清を洗浄除去後、水系退色防止剤で封入した試料を、一体型卓上蛍光顕微鏡と共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

tblastx により相同性が認められるタンパクは、真核生物、原核生物を問わず clustalW による系統樹解析にかけ、それらの分子系統樹の解析を行い、当該タンパク質の起源がどこにあるかを検討した。

これまでの既報によれば、*A. cochlioides* ではマストパランで遊走子の被のう化が亢進され、被のう胞子発芽も促進される。protein kinase C (PKC) 阻害剤では被のう化が亢進され、また、発芽が強く抑制される。我々が得ている CA 受容体は G タンパク共役型受容体とは明らかに異なるタンパクファミリーに属し、cAMP による PKA 活性化が重要ではないかと考え、アデニレートシクラーゼ (cAMP 生成酵素) 活性化剤と阻害剤をそれぞれ 0.1 mM 濃度で遊走子に与え、その反応をみた。

4. 研究成果

5-hydroxy-6,7-methylenedioxyflavone (cochliophilin A) を宿主認識物質として利用し、この B 環無置換フラボン誘導体に強い誘引性を示す卵菌 *Aphanomyces cochlioides* AC-5 株のフラボノイド受容体を検索し、アフィニティカラムによる可溶性膜タンパク画分からの受容体候補タンパクの精製に成功

した。このタンパクのN末端からの配列から得た縮重プライマーで *A. cochlioides* の当該 EST 配列の特定に成功し、これが 32 kDa の β -バレル構造をもった末貫通型タンパク質 (ACCR1) であることを明らかにした。

その受容体タンパク遺伝子の mRNA を菌体から取得し、調製した cDNA ライブラリーから 3'-末端を含む ACCR1 遺伝子全長を取得することに成功した。mRNA の塩基配列から、この ACCR1 タンパク質のアミノ酸配列は voltage-dependent anion channel protein (VDAC) に高い相同性を示すが、その C-末端側の 70AA ほどを欠いていることが確認された。ACCR1 は、本来ならばミトコンドリアに偏在する VDAC から分子進化によって生じたと推察された。そこでこの ACCR1 に特異的な抗体を作成し、遊走子を抗体染色に供したところ、ACCR1 は遊走子の細胞膜表面だけに特異的に分布していた。遊走子に対し、ミトコンドリア特異的蛍光色素である MitoRed と ACCR1 抗体-抗体との二重蛍光染色を試みた結果、このタンパク質は遊走子の細胞膜上のみ存在し、ミトコンドリアには全く局在しないことが実験的に示された。これらを総合して、ACCR1 の分子進化仮説を提唱した。ACCR1 の N 末端側 20AA は α -ヘリックス構造をもつがタンパク質の膜内での折りたたみに関与せず、フラボンとの緩やかな結合能が認められた。アデニレートシクラーゼ (cAMP 生成酵素) 活性化剤と阻害剤をそれぞれ 0.1 mM 濃度で遊走子に与えたところ、活性化剤では遊走子遊泳密度がほぼ 2 倍に増えたが、阻害剤ではほとんどゼロになった。

以上、本研究では、世界ではじめて卵菌遊走子の誘引に関わる受容体膜タンパク質 ACCR1 をとらえ、この遺伝子全長を明らかにした。また、そのアミノ酸配列全長から、この膜タンパク質が VDAC から分子進化によって機能しているものであることを示した。論文は現在、cAMP に関する部分を含む、重要な研究背景となる研究内容の論文が *Journal of Pesticide Science* に投稿中、また、ACCR1 は執筆を終えて投稿準備中であるが、内容の新規性から、より高いレベルの国際学術誌への投稿を目指している。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋床 泰之 (HASHIDOKO YASUYUKI)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：40281795