

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年9月3日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26252007

研究課題名(和文) 植物ミトコンドリア病を制御するtRNA介在領域分解タンパク質複合体

研究課題名(英文) tRNA intron-degrading protein complex regulating plant mitochondrial disease

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) 30,700,000円

研究成果の概要(和文)：ACR毒素レセプター遺伝子ACRSのmRNAプロセッシングを担うAmBP30複合タンパク質群の構成タンパク質候補13個から、ミトコンドリアに局在する7個を明らかにし、ACRSmRNAに結合するAmBP30タンパク質は毒素非感受性品種ミトコンドリアにのみ局在することを明確にした。ACR毒素生合成遺伝子群解析では、ACRTS1、ACRTS2、ACRTS3、ACRTS4を明らかにして機能を解析した。ACT毒素生合成遺伝子群解析では、ACTT1抗体等による免沈実験で、生合成酵素複合体の全貌を明らかにし、既知の毒素生合成酵素9個の全てと、新規7個の生合成酵素候補を検出して遺伝子を単離した。

研究成果の概要(英文)：Seven proteins located in mitochondria were selected from 13 candidate proteins from AmBP30 protein complex responsible for mRNA processing of ACR-toxin receptor gene ACRS. AmBP30 protein which binds to ACRS mRNA, was localized in mitochondria only from ACR-toxin insensitive citrus cultivars. ACRTS1, ACRTS2, ACRTS3, and ACRTS4 were isolated as cluster genes for ACT-toxin biosynthesis enzymes and their functions were analyzed. Immunoprecipitation using anti-ACTT1 antibodies identified all 9 enzymes which had been known to have a responsibility for ACT-toxin biosynthesis, as well as additional new 7 candidate enzymes and their genes for the toxin biosynthesis.

研究分野：農学

キーワード：宿主特異的毒素

1. 研究開始当初の背景

植物と病原糸状菌の相互反応には、宿主特異的毒素への感受性・非感受性で発病の有無が決定される例がある。本研究は、農学・植物病理学分野の重要課題である「宿主特異性のメカニズム解明」に向けた研究である。宿主特異的 ACR 毒素・ACT 毒素の生合成遺伝子クラスターのゲノム部分領域と、宿主ミトコンドリアゲノムの tRNA-Ala の介在領域に座乗する ACR 毒素レセプター遺伝子の単離に成功した。世界で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 (Turfl3) と本研究の 2 例のみである。

興味深いことに、ACR 毒素感受性は本遺伝子の存在・不在では決定されていなかった。毒素非感受性カンキツミトコンドリアでは、本遺伝子の転写物がプロセッシングを受けて分解され、毒素感受性ラフレモンでのみ本遺伝子が翻訳され、その翻訳タンパク質が毒素レセプターになっていた。

ACT 毒素生合成遺伝子は約 2Mb の小型染色体に遺伝子クラスター化し、ACR 毒素は約 1.5Mb の小型染色体に生合成遺伝子クラスターが座乗することを明らかにしてきた。これらのクラスターに座乗する遺伝子のさらなる解析が望まれていた。

2. 研究の目的

この宿主ミトコンドリアゲノムの tRNA-Ala の介在領域に座乗する ACR 毒素レセプター遺伝子転写物の修飾による特異性決定機構と、リガンドである毒素の生合成遺伝子クラスターの全解明を目指した。動・微生物・植物を問わず、ミトコンドリア遺伝子転写物の修飾で発病の有無が決定される世界最初の研究例であり、植物ミトコンドリア病発症機構に関する画期的な新知見を提供する。具体的には、AmBP30 タンパク質を中心とした ACRSmRNA 分解複合体構成タンパク質の特定とそれらの機能の解明、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毒素のクラスターとの比較解析を進め、本植物ミトコンドリア病の発生・宿主特異性決定のメカニズムの解明を、宿主・病原菌の両サイドから試みた。これらの知見は、これまで全く未知であった tRNA-Ala の介在領域分解機構の解明への大きな第一歩となり、ACRS 遺伝子 mRNA の分解の有無が病害発生の第一因子となるという、極めて独創性に富んだ事象のメカニズムの解明となる。毒素レセプターをコードする遺伝子 mRNA を修飾する植物ミトコンドリア複合タンパク質の特定と、感受性・非感受性品種間での詳細比較、さらに発病の主要因である宿主特異的毒素の生合成遺伝子の特定と生合成遺伝子クラスター研究の進展により、植物ミトコンドリア病発生機構が宿主側と菌側の双方から解明される。

3. 研究の方法

ACRSmRNA 分解タンパク質複合体の構成タンパク質を特定し、ACR 毒素感受性品種・非感受性品種間の差異を検定する。その為に、酵母 two hybrid 法と AmBP30 抗体による免疫沈降法で選抜したタンパク質の抗体を作成し、これらの抗体を用いた免沈で新たに複合体構成タンパク質を選抜し、構成タンパク質間の相互作用を網羅的に検定する。免沈・酵母 two hybrid 法で相互作用を確認後、特定された複合体構成タンパク質群について、毒素感受性・非感受性品種間の差異を検定する。さらに、毒素生合成遺伝子クラスター中のターゲット遺伝子機能を、標的遺伝子破壊・RNA silencing 法で、毒素生産性における役割を解析する。

4. 研究成果

宿主特異的 ACR 毒素レセプターをコードするミトコンドリアゲノム遺伝子 ACRS の mRNA は、非感受性品種ではプロセッシングを受けて分解される。このような RNA プロセッシング等の RNA が修飾は、多くのタンパク質から構成される複合体により引き起こされる。

本 ACR 毒素レセプター遺伝子 ACRS の mRNA プロセッシングに関しても、Blue-native PAGE を用いた ACRSmRNA に結合する AmBP30 の抗体による Western blotting で、分子量約 500-800kDa の巨大タンパク質シグナルが検出できたため、タンパク出複合体化していると判断し、AmBP30 タンパク質複合体と命名した。そこで本研究では、本 ACR 毒素レセプター遺伝子 ACRS の mRNA プロセッシングを担う AmBP30 複合体タンパク質の構成タンパク質群の特定を試み、免沈・酵母 two hybrid 法等で相互作用を確認後、特定された候補タンパク質 13 個の中から、ミトコンドリアに局在する 7 個のタンパク質を特定し、ACRSmRNA に結合する AmBP30 を加えた少なくとも 8 個から構成されることを明らかにした (図 1)。さらに、これらの候補タンパク質の中から、ACRSmRNA に結合する AmBP30 タンパク質の機能を検定し、本タンパク質は毒素非感受性品種のミトコンドリアにのみ局在することを明確にし、また Blue-native PAGE を用いた Western blotting でも、本複合体は毒素非感受性品種のミトコンドリアにのみ局在することを明確にした。

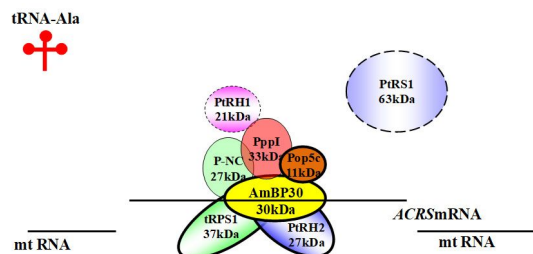


図 1 AmBP30 タンパク質複合体タンパク質群

ACR 毒素生合成遺伝子群解析では、*ACRTS1*、*ACRTS2*、*ACRTS3*、*ACRTS4* 遺伝子を明らかにして機能を解析した。*ACRTS1*、*ACRTS2*、*ACRTS3* 遺伝子に関しては、標的遺伝子破壊法および RNA silencing 法で、毒素生産性における役割の検証を完了して、いずれも毒素生産には不可欠で、毒素生産と病原性の必須因子である事を明らかにした。これらの遺伝子がコードする酵素の機能と毒素の化学構造から考察して、3 遺伝子がコードする酵素で毒素生産は完結すると想定された (図 2)。

そこで、解析が完了した *ACRTS1*、*ACRTS2*、*ACRTS3* 遺伝子を同時に ACR 毒素非生産型の *A. alternata* に挿入・発現させて、毒素を生産するかかの検証を進めたが、ACR 毒素様の化合物は生産されたが、完全な毒素構造物は生産されなかった。そこで、さらなる生合成酵素が必要であると考え、まだ未知である生合成遺伝子をドラフトゲノム解析結果から探索した。その結果、多くの糸状菌のポリケチド合成酵素のザイオエステラーゼ機能ドメインと高い相同性を示し、ACR 毒素生産菌のみが保有する *ACRTS4* 遺伝子の存在を明らかにした (図 2)。現在、この *ACRTS4* 遺伝子の標的遺伝子破壊法および RNA silencing 法を用いた検定が進展中である。

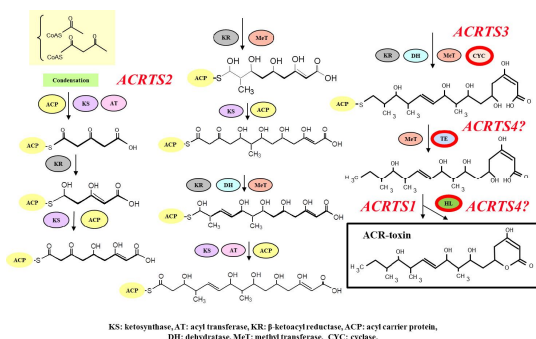


図 2 ACR 毒素推定生合成経路と酵素群 (既存の *ACRTS1*、*2* に加えて、*ACRTS3* の毒素生産における機能を標的遺伝子破壊法および RNA silencing 法を用いた検定で明らかにし、さらに *ACRTS4* を生合成酵素候補として同定した)

ACT 毒素生合成遺伝子群解析では、2016 年までに、10 個のクラスター遺伝子群を同定し、遺伝子破壊法およびサイレンシング法により、ACT 毒素生合成と毒素生産菌の病原性に必須の因子であることを明らかにしてきた。しかしながら、ACT 毒素の化学構造から推定して、ACT 毒素生合成にはまだいくつかの酵素が必要であると考えられた。そこで、ACT 毒素生産菌からさらなる毒素生合成酵素の同定に向けて、タンパク質解析による酵素同定を試みた。具体的には、ACT 毒素構造のデカトリエン酸構造の合成を担う酵素である ACTT 1 の推定アミノ酸配列をもとに、anti-ACTT1 抗体を作製し、共免疫沈降及び TOF-MS 解析を行った。その結果、ターゲット

の ACTT1 と共沈してくるタンパク質群の同定に成功し、ACT 毒素生合成酵素複合体は、効率よく毒素を生産するために、各酵素が複合体化している可能性が示され、その構成タンパク質群の全貌を明らかにすることができた。

これまでに明らかにしてきた 10 個のクラスター遺伝子群の中から、遺伝子制御因子をコードする *ACTTR* 遺伝子を除く、既存の 9 個の ACT 毒素生合成遺伝子がコードする酵素群に加えて、今回用いた方法で、新規の生合成酵素候補 7 個を検出して、それぞれの候補酵素の遺伝子を単離した (図 3)。

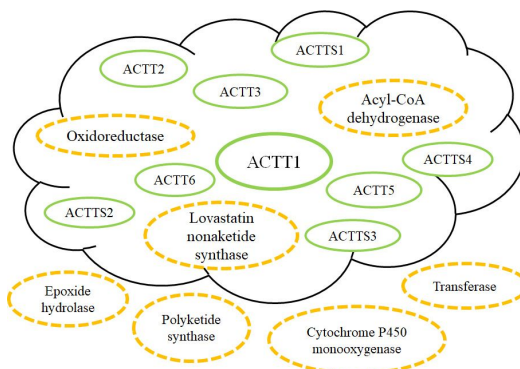


図 ACT 毒素生合成酵素群は複合体化していた (ドラフトゲノム解析で明らかにしてきた図中緑の枠の酵素群に加えて、共免疫沈降及び TOF-MS 解析で新たに明らかにした 7 個の酵素は黄色の破線枠で示した)

さらに、新規に単離した ACR・ACT 毒素生合成遺伝子は、いずれも毒素生産菌の特定の小型染色体に座乗し、クラスター化していることを明らかにした。また興味深いことに、ACT 毒素生合成遺伝子群解析で、共免疫沈降及び TOF-MS 解析にて明らかにした新規の 7 個の酵素のうち、oxidoreductase, acyl-CoA dehydrogenase, lovastatin nonaketide synthase をコードする遺伝子群 (図 3) は、ACT 毒素同様にデカトリエン酸構造を保有する AK 毒素生産菌および AF 毒素生産菌のゲノムにも座乗しており、いずれの場合もそれぞれの毒素生産菌にのみ存在する小型染色体に座乗し、クラスター化していることが明らかになった。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

Akimitsu, K., Ohtani, K., Shimagami, T., (...), Ichimura, K., Gomi, K. Citrus as a molecular contact point for co-evolution of *Alternaria* pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 95:93-96 (2016). 査読あり

Akimitsu, K., Tsuge, T., Kodama, M., Yamamoto, M., Otani, H. *Alternaria* host-selective toxins: Determinant factors of

plant disease. Journal of General Plant Pathology 80(2), pp. 109-122 (2014). 査読あり

[学会発表](計 28 件)

島上卓也・大谷耕平・小川実可子・(...)・望月 進・市村和也・五味剣二・秋光和也 宿主特異的 ACR 毒素の非感受性に関わる AmBP30 複合体構成タンパク質候補群間の相互作用解析、日本植物病理学会報, 83, 177, (2017) .

田中佐和・勝本真衣・(...)・柘植尚志・山本幹博・市村和也・五味剣二・秋光和也 *Alternaria alternata* タンゼリン系統が生産する宿主特異的 ACT 毒素の生合成経路における ACTT1 の役割、日本植物病理学会報, 83, 177, (2017) .

松岡秀・二階堂佐紀・和泉悠理子・(...)・児玉基一郎・市村和也・五味剣二・秋光和也 ACR 毒素生合成遺伝子クラスターの機能評価に向けた解析、日本植物病理学会報, 83, 50, (2017) .

6 . 研究組織

(1)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