

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06055

研究課題名(和文) 菌体外酸化還元酵素を分子ターゲットとするイネいもち病菌に対する新規抗菌法の開発

研究課題名(英文) Expression and characterization of cellobiose dehydrogenases from the ascomycete fungus, *Magnaporthe oryzae* for management of the rice blast disease

研究代表者

松村 洋寿 (Matsumura, Hirotoishi)

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：菌体外タンパク質を創薬標的とするいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* の新規抗菌法の開発を目指している。本研究では、セロビオース脱水素酵素(CDH)に着目し、*M. oryzae* のゲノムデータベース検索により、2種類のCDHホモログ(MoCDH1、MoCDH2)を発見した。各遺伝子をクローニング後、酵母タンパク質発現系により大量生産を行った。セロビオースに対する酵素活性を比較したところ、MoCDH2がMoCDH1より高い活性を示した。MoCDH2のアミノ酸一次配列にのみ、セルロース結合ドメイン配列が存在していることから、MoCDH2が優性的にセルロース代謝に関与する可能性が示唆された。

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 have overexpressed and investigated two cellobiose dehydrogenase (CDH) homologues in *M. oryzae* to development a method to inhibit secreted proteins involved in the extracellular metabolic pathway for control of the fungal rice pathogen. Plant disease fungi produce and secrete hydrolases as well as oxidoreductases such as CDH to degrade the plant cell wall and to utilize cellulose as the nutrient carbon.

BLAST search using the *M. oryzae* genome database uncovered the existence of two CDH homologous gene, MGG\_13809 (MoCDH1) and MGG\_11036 (MoCDH2). The two CDH homologues were expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. MoCDH2 shows higher cellobiose dehydrogenase activity than MoCDH1.

研究分野：生物無機化学

キーワード：いもち病菌 セロビオース脱水素酵素 生物無機化学 構造生物学 フラボヘムタンパク質

## 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。イネいもち病は、子囊菌 *Magnaporthe oryzae* により引き起こされるイネに最も被害をもたらす病害の一つであり、イネいもち病が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。

イネいもち病の防除には、MBI-D 剤とストロビルリン系殺菌剤 (QoI) が主に用いられてきた。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。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。

従来の薬剤の多くは、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。しかし、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考えられる。以上の背景から、薬剤耐性を引き起こし難いイネいもち病菌の新規防除法の開発が求められている。

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成長する。近年、このセルロース代謝系の分泌タンパク質群において、加水分解酵素に加えて酸化還元酵素の役割が注目されている。特に、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の関与や、セルラーゼの生成物阻害の解除などにより、セルロース代謝を促進させることが明らかになってきている。これらの菌体外代謝系に関連するタンパク質を分子標的とする創薬に関する研究例はなく、実現できれば低薬剤ストレスの新規抗菌法の開発が期待できると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、イネいもち病菌の CDH (MoCDH) ホモログに着目し、MoCDH ホモログ遺伝子のクローニング並びに大量発現系を構築を行った。そして、生化学的性質

を解析することによって、薬剤分子標的としての 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) *M. oryzae* のゲノムにおける CDH ホモログ遺伝子の探索

2005 年に *M. oryzae* のゲノムが解読されているので、最も先行研究の多い担子菌 *P. chrysosporium* 由来 CDH (PcCDH) のアミノ酸一次配列を用いて、Blast 検索を行い、*M. oryzae* に CDH ホモログ遺伝子が存在するか検討する。PcCDH は、フラビンドメインとヘムドメインがヒンジで繋がれた構造からなるフラボヘムタンパク質である。

(2) MoCDH ホモログ遺伝子のメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* 発現系の構築

先行研究により、CDH 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わかっている。そこで、MoCDH の生産についても、*P. pastoris* 発現系を用いることにする。

(3) MoCDH ホモログの生化学的性質のキャラクタリゼーション

MoCDH ホモログの精製を行い、生化学的性質、特に基質特異性や酵素活性をもとめ、PcCDH と比較検討することで、MoCDH ホモログの *M. oryzae* における生化学的役割について考察する。

### 3. 研究の方法

(1) *M. oryzae* のゲノムにおける CDH ホモログ遺伝子の探索

クエリー配列に PcCDH のアミノ酸一次配列 773 残基を用いて、tblastn による相同性検索を行った。また、得られた相同性の高い遺伝子配列 MGG\_13809 と MGG\_11036 を用いて、タンパク質ドメイン解析を行った。

(2) MoCDH ホモログ遺伝子のメタノール資化性酵母 *P. pastoris* 発現系の構築

pPICZ ベクターに 2 種類の MoCDH ホモログ遺伝子 MGG\_13809 と MGG\_11036 をそれぞれ導入した発現ベクターを構築し、エレクトロポレーション法により、メタノール資化性酵母 KM71H を形質転換した。30 °C で 24 時間培養後、メタノールを 1.25 % (w/v) となるように添加し、26.5 °C で 72 時間発現誘導を行った。12% SDS-PAGE により目的タンパク質の発現確認を行った。

(3) MoCDH ホモログの生化学的性質のキャラクタリゼーション

CDH は活性中心にフラビンとヘム *b* の補酵素をそれぞれ有しているため、分光学的手法により解析することができる。UV-vis スペクトル測定とラマン分光測定により、2 種の MoCDH ホモログの活性中心の比較を行った。

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

からレドックス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、レドックス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。精製した *Mo*CDH ホモログ MGG\_13809 と MGG\_11036 をそれぞれ用いて、セロピオースに対する酸化反応活性を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) *M. oryzae* のゲノムにおける CDH ホモログ遺伝子の探索

*M. oryzae* のゲノムデータベースにおける tblastn 検索によって、*Pc*CDH のアミノ酸一次配列と高い相同性示す 2 つの遺伝子、MGG\_13809 (*Pc*CDH に対する相同性 35%) と MGG\_11036 (*Pc*CDH に対する相同性 34%) が存在することが明らかとなった (図 1)。MGG\_13809 は全長 815 アミノ酸残基からなり、*Pc*CDH と同様に N 末側にフラビンドメインと C 末側にヘムドメインホモログ配列を有していた。一方、MGG\_11036 は全長 841 アミノ酸残基からなり、フラビンドメインとヘムドメインホモログ配列に加えて、C 末側にセルロース結合ドメイン (CBM) ホモログ配列を有していることが明らかとなった。

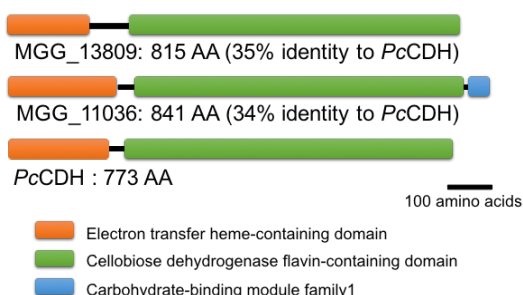


図1 *Mo*CDHホモログ (MGG\_13809とMGG\_11036) と *Pc*CDHのドメイン構造比較

(2) *Mo*CDH ホモログ遺伝子のメタノール酸化性酵母 *P. pastoris* 発現系の構築

*P. pastoris* 発現系により、MGG\_13809 と MGG\_11036 を大量発現させ、12% SDS-PAGE により発現確認を行った。その結果、MGG\_13809 では約 100 kDa 付近、MGG\_11036 では、約 120 kDa 付近に濃いバンドがそれぞれ確認された。MGG\_13809 と MGG\_11036 のアミノ酸一次配列から予想される分子量は、それぞれ 84 kDa、87 kDa である。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が MGG\_13809 と MGG\_11036 に起こっているためであると考えられる。

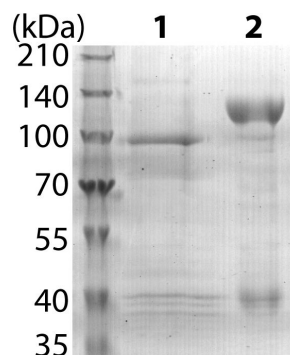


図2 *Mo*CDHホモログの12% SDS-PAGE による発現確認  
1: MGG\_13809, 2: MGG\_11036

(3) *Mo*CDH ホモログの生化学的性質のキャラクタリゼーション

分光測定により、2 種の *Mo*CDH ホモログの活性中心の比較を行ったところ、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 *Mo*CDHホモログのヘム *b* は、*Pc*CDH と同様に 6 配位低スピン状態を示していた。

次に、*Mo*CDH ホモログの酵素活性について比較を行った。*Pc*CDH を用いた先行研究から、CDH の天然の基質はゼララーゼによるセルロース分解物であるセロピオースだと考えられているが、CDH はセロピオース以外の 2 糖やオリゴ糖にも高い活性を示すことが知られている。シトクロム *c* への電子伝達を活性の指標として用いて、セロピオースに対する酸化活性を比較したところ、MGG\_11036 が MGG\_13809 より高い活性を示した (図 3)。MGG\_11036 のアミノ酸一次配列には、MGG\_13809 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、MGG\_11036 が優性的にセルロースの代謝に関与している可能性が示唆された。

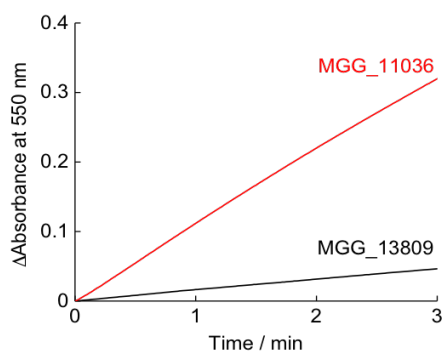


図3 *Mo*CDHホモログ (MGG\_13809とMGG\_11036) のセロピオースに対する酵素活性の比較

#### 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2件）

1. 松村 洋寿、武田 康太、中村 暢文、吉田 誠、五十嵐 圭日子、鮫島 正浩、真核生物における新規ピロロキノリンキノン依存性糖質酸化酵素の発見、酵素工学会、酵素工学ニュース、査読有、Vol. 75、2016、pp. 24-30
2. Takeda, K., Matsumura, H., Ishida, T., Yoshida, M., Igarashi, K., Samejima, M., Ohno, H., Nakamura, N., Dependent electron transfer reaction and direct bioelectrocatalysis of the quinohemoprotein pyranose dehydrogenase, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, Vol. 477, 2016, pp. 369-373, DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.06.096

〔学会発表〕（計5件）

1. 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)
2. 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)
3. 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, イネいもち病菌由来セロピオース脱水素酵素ホモログの発現系の構築, 酵素工学会第76回講演会(東京大学, 東京, 2016年10月7日)
4. 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, いもち病菌由来新規ヘム含有膜タンパク質の発見, 酵素工学会第76回講演会(東京大学, 東京, 2016年10月7日)
5. 松村 洋寿・土居 友梨子・本間 陽名・五十嵐 圭日子・鮫島 正浩・尾高雅文・小川 信明, イネいもち病菌の抗菌法開発を目指したセロピオース脱水素酵素ヘムドメイン含有プロテインの発現, 第76回分析化学討論会(岐阜薬科大学・岐阜大学, 岐阜, 2016年5月29日)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gipc.akita-u.ac.jp/~bioanal-str-chem/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松村 洋寿 (MATSUMURA, HIROTOSHI)

秋田大学・理工学研究科・講師

研究者番号：60741824

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし