

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：24201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18655

研究課題名(和文)全ゲノム手法から見えてきた新規殺菌剤作用点「タンパク質プレニル化機構」の解析

研究課題名(英文) Analysis of the novel mode of action of fungicide "protein prenylation" that has been indicated by whole genome analysis

研究代表者

泉津 弘佑 (Izumitsu, Kosuke)

滋賀県立大学・環境科学部・助教

研究者番号：20579263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究で、抗菌性化合物トルニファニドの耐性遺伝子の候補としてゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ遺伝子(GGT1)を見出した。本研究でトウモロコシごま葉枯病菌の野生株に耐性株由来のC406Y変異型GGT1遺伝子を導入した結果、強い耐性化が認められた。次に、タンパク質プレニル化機構がトルニファニドの作用点であるか否かを検証した。野生株のGGT1遺伝子の破壊を試みた結果、破壊株は作出できず生存に必須の機能をもっていることが示唆された。さらにゲラニルゲラニル化修飾を受けると予測されるRH01の局在を調べた結果、トルニファニド処理によって、正常な局在化が阻害されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, it was suggested that tolnifanide resistance gene encodes geranylgeranyl transferase (GGT1). In this study, we introduced the mutated GGT1 gene (C406Y) into the wild-type strain of *Bipolaris maydis*. The transformants expressing mutated GGT1 showed highly resistance to tolnifanide. We attempted gene knockout of GGT1 but no gene-disrupted strain was obtained, suggesting that GGT1 is essential gene in *B. maydis*. As a result of examining the localization of RH01, predicted to undergo geranylgeranylation modification, it was suggested that tolnifanide may inhibit localization of RH01.

研究分野：菌類分子遺伝学、植物病理学、農薬科学

キーワード：殺菌剤 プレニル化 ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

殺菌剤の全く新規の作用機構を同定することは、現在の科学技術を用いても極めて難しい。そこで我々は全ゲノム解析手法を用いた作用点（および耐性点）同定手法を考案した。この手法ではまず、(1)人為的に目的の殺菌剤の耐性株を複数作出する。次に、(2)全ゲノム解析手法によりこれらの耐性遺伝子を同定する。これら耐性遺伝子群の中には作用点にあたる遺伝子も含まれていると考えられるため、(3)耐性遺伝子群の中から作用点を同定する。

これまでに、作用点未解明の抗菌性化合物トルニファンド (tolnifanide, TF991) を研究モデルとして、この全ゲノム解析手法を用いた解析をすすめてきた。トルニファンドは既存の多くの殺菌剤とは異なり、トウモロコシごま葉枯病菌の孢子発芽をほとんど阻害せず、発芽後数時間の菌糸先端に特徴的なこんぼう状の肥大と強いメラニン化および破裂を引き起こし、菌糸の生育をストップさせる。これまでの研究でトルニファンド耐性株を人為的に作出し、全ゲノム解析を行った結果、トルニファンド耐性遺伝子の有力候補としてゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ遺伝子 (*GGT1*) を見出した。

ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼはタンパク質プレニル化機構の中心的因子である。このため、トルニファンドの作用機構はタンパク質プレニル化機構の攪乱である可能性が示唆された。これまでに既存の殺菌剤の作用機構として、タンパク質プレニル化機構は知られていない。このことから、新規の殺菌剤開発のターゲットにもなり得ると考えられる。

しかし、植物病原菌類においてタンパク質プレニル化機構やプレニル化修飾を受けるタンパク質群に関する研究例は非常に少ない。そこで本研究では、トルニファンドの作用機構、耐性化機構およびタンパク質プレニル化機構の解析をすすめることにした。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究ではまず、先行研究において示唆されていたゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ遺伝子 *GGT1* が、トルニファンドに対する耐性遺伝子であることを分子遺伝学的に実証することを最初の目的とした。

(2) 次に、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼおよびタンパク質プレニル化機構がトルニファンドの作用点であるか否かの検証を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 薬剤耐性株由来の C406Y 変異型 *GGT1* 遺伝子を野生株に導入することにより、トルニファンドへの薬剤耐性化が引き起こされるか否かを検証する。

(2) トウモロコシごま葉枯病菌・野生株の *GGT1* 遺伝子の破壊試験を試みることで、*GGT1* 遺伝子に不全が起こった場合に細胞にどのような影響が起こるかを検証する。

(3) トウモロコシごま葉枯病菌の保有するタンパク質群の中でゲラニルゲラニル化修飾を受けるタンパク質がいくつあるのかを調査する。

(4) ゲラニルゲラニル化修飾を受けると予測される RH01 に着目し、緑色蛍光タンパク質 GFP を融合した遺伝子発現する GFP-RH01 菌株を作出し、トルニファンド処理によって局在性に変化が現れるかを検証する。

## 4. 研究成果

(1) まず、トウモロコシごま葉枯病菌の野生株に薬剤耐性株由来の C406Y 変異型 *GGT1* 遺伝子を導入した菌株を作出した。この C406Y 変異型遺伝子導入株をトルニファンド含有培地に接種した結果、トルニファンドに対するほぼ完全な耐性を示した。野生株にトルニファンドを処理した際に見られるような、菌糸先端のこん棒状肥大や強いメラニン化、破裂なども全く認められなかった。

このことから、*GGT1* 遺伝子は少なくともトルニファンドに対する耐性点であることが実証された。

このトルニファンド耐性株は、研究室で保有する既知の作用機構を持つ殺菌剤に対しては全て感受性であり、多剤耐性菌とは考えられなかった。

以上の結果から、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼおよびタンパク質プレニル化機構はトルニファンドの作用点に近いものではないかと仮説を立て、以下の研究をすすめた。

(2) もしもトルニファンドがゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ *GGT1* の機能阻害剤として働いているのであれば、*GGT1* は生存に必須の機能を果たしていると考えられる。しかし、植物病原菌類において *GGT1* の機能解析例はほとんどない。そこで、トウモロコシごま葉枯病菌の *GGT1* 遺伝子をターゲットに遺伝子破壊を試みた。しかし、複数回の遺伝子破壊試験を行っても完全な遺伝子破壊株は得られなかった。このことから、*GGT1* 遺伝子は生存に必須の遺伝子であることが強く示唆された。この結果は、*GGT1* がトルニファンドのターゲットであるという仮説と矛盾しない。

一方、この実験において *GGT1* 遺伝子の完全な破壊株は得られなかったものの、“遺伝子破壊された核”と“破壊されなかった核”が混在するヘテロカリオン株を取得することができた。興味深いことにこのヘテロカリオン株は著しい生育不全を示し、菌糸の先端

に強いメラニン化を伴うこんぼう状の肥大が認められた。この表現型は、野生株にトルニファニドを作用させた様子と酷似していた。これらの結果から、トルニファニドの作用点が GGT1 そのものである可能性が強く示唆された。

(3) トルニファニドがゲラニルゲラニルトランスフェラーゼの阻害剤として機能しているのであれば、ゲラニルゲラニル化修飾を受けるタンパク質群の局在に大きな変化が認められるはずである。しかし、植物病原菌類において、ゲラニルゲラニル化修飾を受けるタンパク質群についての知見は非常に少ない。そこで、トウモロコシごま葉枯病菌 C4 株のゲノム配列を対象に、自作の per1 スクリプトを用いてゲラニルゲラニル化修飾を受けると予測されるタンパク質をコードする遺伝子群を探索した。その結果、6 種すべての RHO 型 GTPase (*RHO1*, *RHO2*, *RHO3*, *RHO4*, *CDC42*, *RAC1*) と 2 種の RAS 型 GTPase を含む計 10 種の遺伝子を同定した。

トルニファニドは、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼをかく乱することにより、これら 10 種の遺伝子がコードするタンパク質に影響を与えているのではないかと仮説を立てた。

(4) 上記の仮説を検証するために、緑色蛍光タンパク質 GFP と RHO 型 GTPase である *RHO1* の融合遺伝子を発現させるベクターを構築し、トウモロコシごま葉枯病菌の野生株に導入した。

通常の培養条件下において、GFP-*RHO1* はトウモロコシごま葉枯病菌の細胞のなかでも特にセプタム（隔壁）に強く局在していた。そこで、野生株にトルニファニドを処理し、GFP-*RHO1* の局在の変化を検証した。その結果、トルニファニド作用時には GFP-*RHO1* のセプタムへの局在はほとんど認められなかった。さらに、トルニファニドの作用時にはセプタムの形成数そのものが著しく減少することも明らかとなった。以上の結果から、トルニファニドは少なくとも *RHO1* のセプタムへの局在を阻害していることが示唆された。今後は、他の 9 種のゲラニルゲラニル化修飾を受けるタンパク質についても検証する必要があると考えられる。

(5) 本研究により、抗菌性化合物トルニファニドの耐性点としてタンパク質プレニル化機構の中心的因子であるゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ GGT1 を同定した。さらに、このゲラニルゲラニルトランスフェラーゼと下流のプレニル化修飾を受けるタンパク質群がトルニファニドの作用点である可能性も強く示唆された。

本研究以前に、タンパク質プレニル化機構は殺菌剤の作用機構として知られていなかった。このことから、新規の殺菌剤開発のタ

ーゲットとなり得るものと注目される。

また、本研究は新しい全ゲノム解析手法を用いることで、未解明の殺菌剤作用機構を同定する研究手法を構築しようという狙いもあった。これについても、研究モデルとして用いたトルニファニドに関しては一定の成果をあげることが出来たと言える。

現在、トルニファニドが毒性を発揮しない植物病原菌（ウリ類炭疽病菌や灰色かび病菌）の *GGT1* 遺伝子を、トウモロコシごま葉枯病菌・野生株由来の *GGT1* 遺伝子と置換する実験をすすめている。これにより、非感受性の植物病原菌がトルニファニド感受性となれば、*GGT1* がドラッグターゲットであることがさらに強く示唆されると考えられる。

また、トウモロコシごま葉枯病菌の *GGT1* タンパク質を精製することで、トルニファニドがゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ活性に影響を与えているかを実証していく予定である。

## 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 2 件)

重吉沙衣, 入江俊一, 鈴木一実, 宮川 恒, 田中千尋, 泉津弘佑, 全ゲノム解析による抗真菌性化合物 Tolnifanide 耐性遺伝子の同定, 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス

松原佳耶, 吉田裕史, 泉津弘佑, 宮川 恒, 田中千尋, 抗真菌性化合物 Tolnifanide の選択毒性には GGTase-I の Cys221 が関与する, 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス

〔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

泉津 弘佑 (IZUMITSU, Kosuke)  
滋賀県立大学・環境科学部・助教  
研究者番号：20579263

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )