

令和元年6月13日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26252015

研究課題名(和文) 疫病菌交配ホルモンの受容体探索とシグナル伝達の解析

研究課題名(英文) Search for the Phytophthora mating hormone receptors and signal transduction analysis

研究代表者

小鹿 一 (Ojika, Makoto)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：50152492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 25,300,000円

研究成果の概要(和文)：作物に感染して甚大な被害を与えることで知られる疫病菌は、交配ホルモンを使って有性生殖を行う。この生物現象の分子基盤の確立に向けて、ホルモンの受容体と生合成酵素の同定を目指した。蛍光プローブ等を用いた生化学的アプローチは、タンパク質の不安定性または低発現量により成功しなかった。そこで、次世代シーケンサーを用いたRNA-Seqを用いたトランスクリプトーム解析により受容体および生合成遺伝子を探索した結果、候補遺伝子をそれぞれ数個に絞込むことができた。遺伝子ノックダウンなどの実験により受容体、生合成酵素の特定を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疫病菌(Phytophthora属糸状菌)は、様々な作物に感染して甚大な被害を与えることで知られる。特にジャガイモ疫病菌はアイルランドジャガイモ飢饉を引き起こした歴史をもつ。この植物病原菌は有性生殖を行うことで耐久性(グローバルな拡散性)と遺伝的多様性を獲得した有性胞子を作るので、疫病菌有性生殖の分子基盤の確立は、微生物有性生殖メカニズムの解明という学術的な意義に加え、疫病菌繁殖制御に繋がる重要課題である。

研究成果の概要(英文)：The plant pathogens of the genus *Phytophthora*, which are known to infect important crops and cause enormous damage, use mating hormones to perform sexual reproduction. With the aim of establishing the molecular basis of this biological phenomenon, we aimed to identify hormone receptors and biosynthetic enzymes. Biochemical approaches using fluorescent probes, etc. have not been successful due to the instability or low expression of proteins. Therefore, searching for receptors and biosynthetic genes by transcriptome analysis using RNA-Seq have performed, resulting in the finding several candidate genes. Experiments such as gene knockdown are in progress to identify the receptors and biosynthetic enzymes.

研究分野：生物有機化学、天然物化学

キーワード：疫病菌 Phytophthora 交配ホルモン 受容体 生合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 疫病菌の交配ホルモンとその重要性

疫病菌は *Phytophthora* 属の糸状菌で、世界3大植物病原菌の1つに数えられる。特に、ジャガイモ疫病菌 *P. infestans* により1840年代に発生した「アイルランド飢饉」では約100万人の餓死者が出し、現在でもジャガイモ疫病による損害は世界で年間数十億ドルにのぼる。疫病菌は、異なる交配型(A1型とA2型)が出会うと有性生殖を行い耐久性の有性孢子「卵孢子」を形成する(図1)。その際、交配ホルモン(A1型の分泌する 1、A2型の分泌する 2)を別の交配型が感知する。疫病菌にとって有性生殖は、交配による急速な悪化や耐久性有性孢子による地球規模の拡散の戦略であり、その分子機構解明は長期的な疫病菌制御にとって重要な鍵となる。

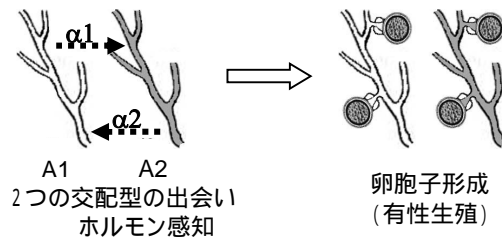


図1. 疫病菌交配ホルモン 1, 2の働き

(2) 交配ホルモンに関する従来成果

研究代表者らは2005年、長年の懸案であった疫病菌交配ホルモンの1つ 1の同定に初めて成功した。2011年にはA2交配型から 2の同定にも成功し、同時に、 2がフィトールからA2交配型により生合成され、 1がA1交配型により 2から生合成されるという生合成ルートを解明した。さらに、両ホルモンの構造活性相関を解析した。約70株の疫病菌を使ってホルモンに対する応答・ホルモンの生産性を調べることによる種を超えた普遍性の検証を達成した。以上の成果により、疫病菌の交配ホルモンを化学的側面からほぼ解明したといえる。しかし、「疫病菌有性生殖の分子基盤の全容解明」を目指す本研究課題を完了するには、ホルモンの生合成機構、受容体の同定とその下流にあるシグナル伝達機構の解明などケミカルバイオロジック的側面の課題解決が求められた。

2. 研究の目的

(1) 交配ホルモンの生合成機構の解明

ホルモンの生合成ルート「フィトール 2 1」に基づき、 2合成酵素、 1合成酵素存在を想定し、これら酵素の同定を行う。ホルモンの骨格はフィトールと同一なので、シトクロームP450など酸化修飾酵素に的を絞って探索する。

(2) 交配ホルモン受容体の同定

交配ホルモンは分子の8割以上が同じ構造であるにもかかわらず、ナノモルレベルで相手交配型に対してのみ有性生殖誘導活性を示すという高い交配型特異性を示すので、各ホルモン受容体が存在するはずである。そこで、ホルモンの右端を足掛かりに受容体探索プローブを設計・合成し、受容体タンパク質の精製を試みる。次いで遺伝子破壊実験等により受容体としての機能を立証する。

3. 研究の方法

(1) 生化学的解析

疫病菌保存株からホルモンを高生産する株を選択し、菌体から粗タンパク質を抽出し、前駆体である phytol や 2を添加してそれぞれ 2や 1への変換をLC/MSで解析する。活性が見られたらタンパク質の精製と同定を行う。受容体については、ホルモンに高い感受性を示す株(有性孢子を多く形成する株)を選択し、粗タンパク質からホルモン蛍光プローブやアフィニティービーズ等を用いて特異的結合タンパク質を検出する。質量分析法とデータベース解析によりタンパク質を帰属し、受容体として有力な候補タンパク質について遺伝子破壊実験などで受容体を特定する。

(2) 遺伝子発現解析

タンパク質の不安定性や発現量の低さから生化学的解析が困難な場合は、RNA-Seqなどトランスクリプトーム解析を行い、候補遺伝子を絞り込んだら異種発現、遺伝子破壊実験等により生合成酵素、受容体を特定する。

4. 研究成果

(1) 生化学的解析

疫病菌交配ホルモン 1受容体の探索について、蛍光プローブ、アフィニティー精製用ビーズ、光親和性プローブ(図2)を合成して受容体の探索を試みた。しかし、 1受容体をもつA2交配型だけでなく受容体をもたないと思われるA1交配型も非特異的に検出された。この結果は受容体タンパク質の発現量が極めて低い、または不安定なためと考えられた。一方、交配ホルモン生合成酵素の特定については、 2生合成酵素をもつA2交配型からタンパク質を粗抽出したが *in vitro*での 2生成は検出できなかった。次いで、phytolを直接 1まで高効率

で変換する株を用いて実験を行ったが、**1**の生成は検出できなかった。一方、粗タンパク液に**2**を添加すると極微量ではあるが**1**の生成を確認できたものの、酵素活性が低くその精製には至らなかった。生菌ではホルモンへの変換ができるのに僅かでもすりつぶし操作を行っただけで失活したことから、生合成酵素が極端に不安定であることが示唆された。以上の結果、ホルモン受容体および生合成酵素どちらも生化学的アプローチを断念し、転写レベルで発現を調べる戦略に変更した。

一方、**1**のホルモン活性が**2**により阻害される、すなわち**2**は**1**のアンタゴニストであることを偶然発見し、構造活性相関を調べるとともに、**2**も**1**と同等の強さで**1**受容体に認識されるというモデルを提唱した。このことは**2**プローブを用いて**1**受容体を効果的に探索できることを示唆する。

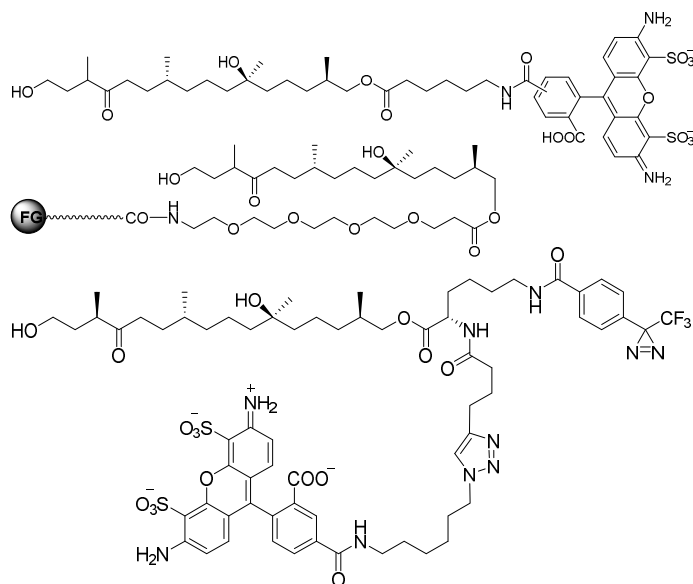


図2. 疫病菌交配ホルモン **1**の受容体探索プローブ

(2) 遺伝子解析

2種の疫病菌 *Phytophthora nicotianae*, *P. capsici*の2種6菌

株について、ホルモン応答性（受容体探索用実験）およびホルモン生産性（生合成酵素探索用実験）を調べ、発現解析に適した菌株を選抜した。これら菌株から total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq を行った。発現差解析によりホルモン感受性の高いサンプルで発現量が数倍高い遺伝子を探索した結果、数百の受容体候補遺伝子がヒットした。そこで、ホルモンの脂溶性から受容体のタイプが核内受容体（転写因子）であると仮定してさらに絞り込んだ結果、受容体候補を数個に絞り込むことができた。一方、ホルモンを多量に分泌する株、ホルモンを産生しない株で発現差解析を行い数百の生合成候補遺伝子がヒットした。ホルモンとその前駆体（phytol）の構造比較から生合成酵素はシトクローム P450（CYP）の可能性が高いので、ホモロジー検索で候補遺伝子をさらに絞り込み、有望な候補遺伝子を数個に絞り込んだ。リアルタイム PCR、遺伝子ノックダウン、候補遺伝子異種発現などの実験により受容体、生合成酵素の特定を進めている。

< 引用文献 >

- Qi, J.; Asano, T.; Jinno, M.; Matsui, K.; Atsumi, K.; Sakagami, Y.; Ojika, M. Characterization of a *Phytophthora* Mating Hormone, *Science*, 309, 1828 (2005).
- Ojika, M.; Molli, S. D.; Kanazawa, H.; Yajima, A.; Toda, K.; Nukada, T.; Mao, H.; Murata, R.; Asano, T.; Qi, J.; Sakagami, S. The second *Phytophthora* mating hormone defines interspecies biosynthetic crosstalk, *Nat. Chem. Biol.* 7, 591-593 (2011).
- Molli, S. D.; Qi, J.; Yajima, A.; Shikai, K.; Imaoka, T.; Nukada, T.; Yabuta, G.; Ojika, M. Structure-activity relationship of hormones, the mating factors of phytopathogen *Phytophthora*, *Bioorg. Med. Chem.* 20, 681-686 (2012).
- Zhang, Li; Yajima, Arata; Ojika, Makoto, The *Phytophthora* mating hormone **2** is an antagonist of the counterhormone **1**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80(6), 1062-1065 (2016).
- Tomohiko Tomura, Shylaja D. Molli, Ryo Murata, and Makoto Ojika, Universality of the *Phytophthora* mating hormones and diversity of their production profile, *Sci. Rep.* 7, 5007/1-5007/12 (2017).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Zhang, H.; Farooq, U.; Cheng, L. H.; Ye, Y.; Wang, Y. C.; Kawagishi, H.; Ojika, M.; Qi, J. H. Specific inhibitors of sporangium formation of *Phytophthora capsici* from *Kalimeris indica*, *Chem. Nat. Comp.* 査読有, 54, 567-569 (2018). doi.10.1007/s10600-018-2409-9.

Tomura, T.; Molli, S. D.; Murata, R.; Ojika, M. Universality of the *Phytophthora* mating hormones and diversity of their production profile, *Sci. Rep.* 査読有, 7, 5007/1-5007/12 (2017)

doi: 10.1038/s41598-017-05380-3

Zhang, L.; Yajima, A.; Ojika, M. The *Phytophthora* mating hormone 2 is an antagonist of the counterhormone 1, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 80, 1062-1065 (2016). doi: 10.1080/09168451.2016.1146071

Dong, L.; Zhu, X.; Cui, H.; Ojika, M.; Wang, R.; Liu, H., Establishment of the straightforward electro-transformation system for *Phytophthora infestans* and its comparison with the improved PEG/CaCl₂ transformation, *J. Microbiol. Methods*, 査読有, 112, 83-86 (2015). doi: 10.1016/j.mimet.2015.03.013

〔学会発表〕(計14件)

Ojika, M. 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 10th International Congress on Biodiversity (ISCNP30 & ICOB10), 2018.

小鹿 二、疫病菌と宿主植物をつなぐ活性分子(シンポジウム「アグリケミカルバイオロジー：生命をつなぐ活性分子とその応用」)。日本農芸化学 2018 年度大会、2018.

小鹿 二、疫病菌交配ホルモンの生産プロファイルの多様性、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017.

小鹿 二、植物疫病菌交配ホルモン 1 の生合成酵素の探索、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.

小鹿 二、疫病菌交配ホルモン 2 は対ホルモン 1 のアンタゴニストである、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.

小鹿 二、植物疫病菌の交配ホルモン感受性の多様性、日本農芸化学会中部支部第 177 回例会、2016.

小鹿 二、疫病菌交配ホルモンの産生を左右する因子、第 58 回天然有機化合物討論会、2016.

小鹿 二、植物疫病菌交配ホルモンの受容体および生合成酵素の探索、第 57 回天然有機化合物討論会、2015.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 矢島 新

ローマ字氏名： YAJIMA Arata

所属研究機関名： 東京農業大学

部局名： 応用生物科学部

職名： 准教授

研究者番号(8桁)： 30328546

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。