

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:ミトコンドリア病発生制御分子の認識機構の解明

### 2 研究者氏名:秋光 和也

### 3 研究のねらい:

糸状菌の生産する毒素により引き起こされる植物ミトコンドリア病に関する研究を進める。この毒素への感受性は、ミトコンドリアゲノム遺伝子 *ACRS* で決定され、毒素への感受性／抵抗性は *ACRS*mRNA へのプロセッシングの有無により決定される。本研究は、この核ゲノム由来の *ACRS*mRNA プロセッシングに関連する蛋白質の遺伝子単離と制御メカニズムの解明を目指す。また、本毒素により阻害される宿主防御機構と、病原菌において毒素生合成に関与する遺伝子クラスターの単離と解析を進める。

### 4 研究成果:

カンキツに感染する病原性 *Alternaria* 菌の感染機構に関する研究を進めた。特定のカンキツ品種に発病する *Alternaria* 病は、1903 年オーストラリアで最初に報告され、現在では世界各地のカンキツ栽培地帯で重要病害となっている。本病原菌は、当初 *A. citri* と同定されたが、後にタンゼリン・マンダリン等を宿主とする系統とラフレモンを宿主とする系統の異なる宿主範囲を持つ2系統の *A. alternata* により引き起こされ、またそれぞれの系統が異なる宿主特異的毒素を生産することが明らかになった。現在では、これら2系統は *A. alternata* tangerine pathotype と *A. alternata* rough lemon pathotype と呼ばれ、またそれぞれの系統が生成する ACT および ACR 毒素はその化学構造も明らかにされた(図)。

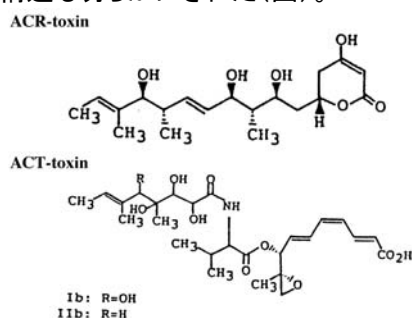


図 ACT・ACR 毒素の化学構造

この宿主特異的毒素の一つである ACR 毒素の第一次作用点は宿主細胞のミトコンドリアにあり、毒素の作用機構は酸化的リン酸化の脱共役と補因子の漏出による TCA 回路の停止である。この毒素に対する宿主カンキツのレセプター遺伝子探索を進め、ドーパミン、グルタミン酸、黄体形成ホルモン等のレセプターの部分領域と高い相同性を示すラフレモンミトコンドリアゲノム遺伝子 *ACRS* を単離した。

*ACRS* 遺伝子を介した宿主特異性決定機構の解析をさらに進展させ、毒素への感受性／抵抗性

は本遺伝子転写物へのプロセッシングの有無により制御されていることも明らかにした。ACR 毒素はラフレモンミトコンドリアにのみ、脱共役と TCA 回路関連補因子のミトコンドリア外部への漏出を誘起する。また、pH 電極と単離ミトコンドリアを用いた解析でも、ACR 毒素処理直後から膜電位の消失がおり、ACR 毒素の作用機構は毒素処理直後に起こるミトコンドリア膜への孔(pore)形成ではないかと推測された。*ACRS* の推定アミノ酸配列から本遺伝子産物の分子量は 6683 と算出されたが、*ACRS* 抗体により、ラフレモンミトコンドリア画分から本遺伝子産物の 2,3,4 量体が検出され、*ACRS* は SDS-PAGE により解離しない SDS 耐性型多量体を形成することが明らかとなった。このような SDS 耐性型の多量体形成蛋白質は、孔形成型の膜貫入レセプター蛋白質に多く、ACR 毒素の作用であるミトコンドリア膜への孔形成による脱共役と TCA 回路の補因子の漏出と合致した。そこで、サブミトコンドリアパーティクルを用いたミトコンドリア膜の孔形成の実測を試みた。サブミトコンドリアパーティクルとは、ミトコンドリア膜に膜蛋白質等を入れたままの状態、リポソームを形成させたものである。このサブミトコンドリアパーティクル形成時に蛍光色素である ANTS とその消光剤である DNTP の複合体を混入して、毒素処理後に孔形成が起きて、ANTS/DNTP が漏出すると DNTP が解離して、ANTS 由来の蛍光が測定できる。本手法により、孔形成の実測を行ったところ、ラフレモンミトコンドリア膜に毒素を処理した場合にのみ、膜に孔形成

がおきて膜内の物質の漏出が認められた。この膜への孔形成は、*ACRS* を発現させた大腸菌膜由来のパーティクルを用いた検定においても認められ、ラフレモンミトコンドリアにおける *ACR* 毒素処理後の孔形成は *ACRS* 発現産物との相互反応の結果誘起されることを明らかにした。

先にも述べたように、*ACR* 毒素への感受性／抵抗性は本遺伝子転写物へのプロセッシングの有無により制御されている。このプロセッシングに関与する因子は核遺伝子支配であり、毒素抵抗性の 2 品種の細胞を融合させ、核とオルガネラの由来が異なるサイブリッドにすると、核因子とオルガネラの不親和により *ACRSmRNA* のプロセッシングが起きずに毒素感受化する。そこでこの核遺伝子由来のプロセッシングに関与する因子の単離に向けて 2 つの研究を進めた。

一つ目の研究は、*ACRS* を発現ベクターにより発現させることにより感受化した大腸菌ゲノムに、毒素抵抗性植物の cDNA ライブラリーを溶原化させ、*ACRS* と cDNA の共発現により毒素感受性が消失した個体を選抜した。毒素感受性が消失した個体の挿入 cDNA を解析したところ、19 bp の cDNA でその配列から *ACRSmRNA* の 3 カ所にアニールする可能性が示された。近年、短鎖の RNA が microRNA として生物的に重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。この 19 bp RNA が *ACRSmRNA* の修飾にどのような役割を持つのかは現時点では明らかではないが、継続してその役割の解明に努めたい。

次に *ACRSmRNA* を StrepTag 法でセファロースに結合させてアフィニティーカラムを作製した。このカラムを用いて、毒素抵抗性カンキツ葉組織磨砕液の可溶性蛋白質画分から分子量約 30kd の *ACRSmRNA* 結合蛋白質を単離した。本手法は、mRNA と 30kd 蛋白質が結合した状態で回収するが、mRNA 結合は 30kd 蛋白質のトリプシンへの耐性を誘導し、アミノ酸内部配列の決定が困難であった。そこで、mRNA を解離させる条件下でトリプシン処理して、6 つのトリプシン処理断片からそれぞれ 3 から 7 残基のアミノ酸配列を決定した。この配列をもとに RT-PCR で本蛋白質遺伝子の内部配列を決定したところ、動物の RNP タイプの RNA 結合蛋白質と配列類似性が認められた。これまで、植物では RNP タイプの RNA 結合蛋白質の研究例は少ないが、葉緑体に局在する同タイプの RNA 結合蛋白質の研究例で、免沈により premature な tRNA が落ちてきた例があった。葉緑体での研究はその後進んでいないが、*ACRS* はミトコンドリアゲノムの tRNA-Ala の介在領域に座乗することから、本 30kd 蛋白質は標的とする *ACRSmRNA* 結合蛋白質であり、本蛋白質を毒素感受性カンキツで発現させ、ミトコンドリアに局在させることにより、*ACRSmRNA* 結合による翻訳阻害を引き起こし、毒素レセプターの欠損による耐性化が期待できると考えている。

*ACR* および *ACT* 両毒素を生産し、タンゼリン及びラフレモンの両植物に対し病原性を示すフロリダ産圃場菌株 BC3-5-1-OS2A を得た。この OS2A 株の染色体をパルスフィールド電気泳動で解析したところ、これまで 10 個の生合成遺伝子を単離して、その機能を解析してきた *ACT* 毒素生合成遺伝子クラスターが 1.05Mb の小型染色体に座乗し、*ACR* 毒素生合成関連遺伝子は 2.0Mb と 1.05Mb 染色体に座乗することが明らかとなった。この *ACR* 毒素生合成関連遺伝子は、*ACR* 毒素生産菌株のみが保有する 1.5 Mb の小型染色体に座乗することを明らかにした。本病原菌 HC1 株のゲノム DNA を用いて BAC ライブラリーを作製して、HC1 株の 1.5 Mb 小型染色体に座乗するゲノム領域から作製した RP10-2 プローブを用いて BAC ライブラリーを選抜し、BAC クローン 3M8 を得た。この BAC クローン 3M8 の挿入ゲノム領域約 100,000 bp の塩基配列決定をショットガン法により試み、総決定配列数 610,740 bp からアッセンブル解析を行い、平均リダンダンシー 5.34 で配列長が数百 bp から 58,600 bp の 16 個の contigs を得た。得られた contigs の配列解析により推定 ORF を導き出し、各種 *Alternaria* 宿主特異的毒素生産・非生産菌ゲノムにおけるそれぞれの ORF 配列の分布検定を行ったところ、その中に rough lemon pathotype のゲノムにのみ特異的に存在する ORF がいくつか存在することが明らかとなった。

さらに、*ACR* 毒素感受性のラフレモンの防御機構を明らかにするために、非病原性 *Alternaria* 属菌 (SH20) を接種して抵抗性を誘導したラフレモン葉から調製した cDNA と、無処理葉から調製した cDNA を用いて subtractive PCR を行い、抵抗性誘導下でより強く発現する遺伝子の探索を試みた。得られた 500 クローンの配列を解析した結果、約 6% のクローンが抵抗性に関連すると既に報告されている遺伝子と相同性を示し、約 10% は病原菌以外のストレス応答性関連遺伝子と相同性を示した。得られた各遺伝子の解析を順次進展させ、10 個の遺伝子の機能解析を完了した。また、*Alternaria* 属菌で宿主特異的毒素を生産しない菌株も用いて、毒素以外の病原性因

子として細胞壁分解酵素の機能を解析した。

#### 5 自己評価:

研究開始時の最大の目標とした ACR 毒素のレセプター遺伝子 mRNA に結合する蛋白質の単離に成功した。このことから研究期間の目標の最低限はクリアーしたと考える。また、ACR 毒素合成に関与する遺伝子クラスターも特定でき、標的遺伝子破壊法を用いた個々の遺伝子の機能解析が順調に進んでいる。さらに、病原菌に対する防御関連遺伝子の単離と、毒素を生産しないタイプの *Alternaria* 属菌の病原性因子として細胞壁分解酵素の機能を解析することができた。これらの成果より、当初の目標以上の進展・成果が得られたと考える。今後これらの成果の論文公表により、より目に見える形で成果を示していく。

#### 6 研究総括の見解:

糸状菌毒素 ACR に対するミトコンドリア遺伝子のコードする受容体ACRSを同定し、そのミトコンドリア膜に穴を開ける機構を明らかにしたこと、核遺伝子でコードされる30KD蛋白質がACRS mRNAに結合して翻訳を阻害することによりACRSの産生を抑え毒素耐性をもたらす機構を解明したこと、は研究の目的を見事に達成した成果として高く評価できる。19bpRNAの関与などまだ解けない謎の解明が楽しみである。植物におけるこのような機構の存在の意義から何か人の疾病克服へのヒントが期待される。

#### 7 主な論文等:

##### 論文:

1. Isshiki, A., Ohtani, K., Kyo, M., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Green fluorescent detection of fungal colonization and endopolygalacturonase gene expression in the interaction of *Alternaria citri* with citrus. *Phytopathology* **93**, 768-773 (2003).
2. Gomi, K., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Epoxide hydrolase: A mRNA induced by a fungal pathogen *Alternaria alternata* on rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush). *Plant Molecular Biology* **53**, 189-199 (2003).
3. Timmer, L.W., Peever, T.L., Dolel, Z. and Akimitsu, K. *Alternaria* diseases of citrus: novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea* **42**, 99-112 (2003).
4. Akimitsu, K., Ohtani, K. and Yamamoto, H. Mitochondrial gene controlling toxin sensitivity and specificity in plant and fungus interaction. *Proceeding of 2003 International Symposium of Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 61-68 (2003).
5. Gomi, K., Yamasaki, Y., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Characterization of a hydroperoxide lyase gene and effect of C6-volatiles on expression of genes of the oxylipin metabolism in Citrus. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1219-1231 (2003).
6. Ohtani, K., Isshiki, A., Katoh, H., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Involvement of carbon catabolite repression on regulation of endopolygalacturonase gene expression in citrus fruit, *Journal of General Plant Pathology* **69**, 120-125 (2003).
7. Akimitsu, K., Peever, T.L. and Timmer, L.W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Molecular Plant Pathology* **4**, 435-446 (2003).
8. Akimitsu, K., Ohtani, K., Masunaka, A., Yamasaki, Y., Katoh, H. and Yamamoto, H. A role of mitochondrial gene controlling specificity in plant disease. *The proceedings of 9<sup>th</sup> US-Japan Science seminar*, 259-269 (2003).
9. Ito, K., Tanaka, T., Hatta, R., Yamamoto, M., Akimitsu, K. and Tsuge, T. Dissection of the host range of the fungal plant pathogen *Alternaria alternata* by modification of the secondary metabolism. *Molecular Microbiology* **52**, 399-411 (2004).
10. 秋光和也、山本弘幸:糸状菌へのカンキツ防御応答機構:植物病の探求、35-40, 植物病の探求出版会(2004).

11. Akimitsu, K., Ohtani, K., Gomi, K., Nalumpang, S., Yamasaki, Y., Masunaka, A., and Yamamoto, H. A role of host-selective toxin for controlling citrus defense systems against *Alternaria* pathogens. *Botanica* **54**, 1-11 (2004).
12. 秋光和也・大谷耕平・五味剣二・増中章・多々納智・小野由希子・佃晋太郎・本田篤・加藤寛・山崎祐未子・山本弘幸:カンキツにおける宿主特異的毒素の認識機構と異物認識反応: 自他識別と応答のバイオフィロントニア、1-12, 日本植物病理学会 (2004).
13. Ohtani, K., Masunaka, A., Yamasaki, Y., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Tailor-made toxin target controlling the specificity of ACR-toxin. In *Biology of Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 4, (Lugtenberg B. et al. Eds). APS Press, 154-157 (2004).
14. Akimitsu, K., Isshiki, A., Ohtani, K., Yamamoto, H., Eshel, D. and Prusky, D. Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**, 271-275 (2004).
15. Masunaka, A., Ohtani, K., Peever, T.L., Timmer, L.W., Tsuge, T., Yamamoto, M., Yamamoto, H., and Akimitsu, K. An isolate of *Alternaria alternata* that is pathogenic to both tangerines and rough lemon and produces two host-selective toxins, ACT- and ACR-toxins. *Phytopathology* **95**, 241-247 (2005).
16. Tsukuda, S., Gomi, K., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* Lush. *Plant Molecular Biology* **59**, in press (2005).

特許: 1 件

相沢慎一、秋光和也、水崎英明、山崎祐未子:モノテルペンを含む細菌性物質分泌阻害剤、及び該阻害剤を用いる保存処理方法:特願 2004-133197(2004).

受賞:

平成16年3月28日 日本植物病理学会論文賞

招待講演: 計5件

- 1) International Congress of Plant Pathology (ICPP): NZ, Christchurch (2003)
- 2) International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions (IS-MPMI): Russia, St. Peterburg (2003)
- 3) US-Japan Scientific Seminar: Shizuoka (2003)
- 4) 岡山県生物科学総合研究所(RIBS)シンポジウム: 岡山(2003)
- 5) NIAS-COE/PROBRAIN/TOKUTEI Joint International Symposium: Tsukuba (2004)