

tRNA 介在領域の分解能欠損による植物ミトコンドリア病 発生機構

Mechanism of disease caused by deficiency of
degradation of tRNA intron in mitochondria

秋光 和也 (AKIMITSU KAZUYA)

香川大学・農学部・教授



研究の概要

Alternaria alternata の2次代謝物として分泌される宿主特異的毒素は病原性の決定因子であり、特定の植物の特定の品種にのみ毒性を示す。本研究では、カンキツ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 ACR・ACT 毒素生合成遺伝子クラスターの解明を目指す。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：遺伝子、植物、ミトコンドリア、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の中には、菌の分泌する宿主特異的毒素への感受性・抵抗性によって発病の有無が決定される例が知られる。先に我々は、病原菌ゲノムにおける宿主特異的毒素の生合成酵素遺伝子クラスターの部分領域と、宿主ミトコンドリアゲノムに座乗するその毒素のレセプター遺伝子の単離に成功した。

宿主特異的 ACR 毒素の作用機構と毒素レセプター研究で、ACR 毒素がラフレモン等の特定のカンキツ品種にのみ NAD⁺等のミトコンドリア補因子の漏出による TCA 回路の停止や酸化リン酸化の脱共役を誘起し、ACR 毒素に対する感受性はミトコンドリアゲノムにコードされる毒素のレセプター遺伝子 *ACRS* で決定され、毒素への感受性/抵抗性は *ACRSmRNA* へのプロセッシングの有無により決定されることを明らかにした。世界において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 (*Turf13*) と本研究の2例のみである。

2. 研究の目的

本研究では、*ACRSmRNA* プロセッシングに関与する 30kD タンパク (*AmBP30*) のプロモーター解析、本 *AmBP30* タンパクを中心とした mRNA プロセッシング複合体構成タンパクの特定、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宿主特

異的毒素生合成遺伝子クラスターとの比較解析を中心に研究を進め、植物病原菌と宿主植物間における特異性決定機構を解明する。

3. 研究の方法

ACR 毒素感受性・非感受性品種を用いて *AmBP30* 遺伝子プロモーター配列の比較を行い、転写の差を誘起する因子を特定する。

AmBP30 複合体の構成タンパクの特定には、酵母 two hybrid 法・免疫沈降法を用いて、*AmBP30* タンパクと相互反応し、tRNA-Ala の介在領域の修飾に関与する可能性の高い構成タンパクを特定する。

ACR 毒素生合成遺伝子クラスターや ACT 毒素生合成遺伝子クラスターが座乗する染色体のゲノム配列より、各毒素生合成に関与する遺伝子を単離して、各遺伝子の機能を標的遺伝子破壊法・RNA silencing 法を用いて検定する。また *A. alternata* が生産する他の宿主特異的毒素生産菌の毒素生合成遺伝子クラスターが座乗する染色体とも配列比較して、共通領域を解析する。

4. これまでの成果

AmBP30 遺伝子プロモーター解析に関しては、プロモーター配列を ACR 毒素感受性品種と非感受性品種で比較すると、毒素感受性の品種のプロモーターにのみ負の転写制御因子の結合サイトが見られる事が明らかになった。毒素非感受性品種では、*AmBP30* 遺伝子発現が誘導され、翻訳された *AmBP30*

タンパクは他のタンパク群と複合体化して、毒素レセプター遺伝子 *ACRS* を含む tRNA-Ala の介在領域を分解していると推測される。一方、感受性品種では本領域は分解されず、その領域に座乗する *ACRS* 遺伝子が翻訳され、毒素感受化していると考えているため、*AmBP30* 遺伝子が毒素感受性品種で負の転写制御因子で抑制されていることは我々の仮説を支持する結果であり、現在この因子の機能特定を進めている。

これまでの研究成果から、*ACR* 毒素レセプターをコードする *ACRS* 遺伝子は tRNA-Ala の介在領域に座乗し、毒素非感受性品種のミトコンドリアでは、RNA に転写後、tRNA-Ala の 5'エキソンと 3'エキソンが切り出され、不要部分として分解されていると考えられる。しかしながら、毒素感受性ミトコンドリアではこの分解に不備が起こり、その領域に座乗する *ACRS* が翻訳され 4 量体孔形成レセプターが生産されると考えている。

そのため tRNA-Ala の介在領域の分解機構の解明が、本ミトコンドリア病の発生・特異性の決定機構の解明に直結する。本研究では *ACRS* 遺伝子 mRNA に結合する *AmBP30* を中心とした複合体の構成タンパク群を特定するために、*AmBP30* を Bait としてリスボン cDNA を酵母 two hybrid 法で選別し、*AmBP30* と相互反応して RNA 修飾に関与する可能性のある 5 クローンを選別した。これらの cDNA 全長を単離して、再度遺伝子全長を用いた酵母 two hybrid での *AmBP30* と相互反応を確認後、この中で RNA 分解に関与する事が知られている一つのタンパクおよび *AmBP30* の合成部分アミノ酸配列を抗原にしてポリクローナル抗体を作成した。これらの抗体を用いて免疫沈降後、毒素非感受性品種リスボンの精製ミトコンドリア画分からの沈降タンパクを TOF-MS 解析により同定した。その結果、沈降タンパクに含まれていた 3 つのタンパクに着目し、これらのタンパク遺伝子全長を単離し、*AmBP30* との相互反応を再度酵母 two hybrid 法で確認して、2 つのタンパクを *AmBP30* と複合体化するタンパクとして特定した。

これまでの研究で、*ACT* 毒素生合成遺伝子クラスターは約 2Mb、*ACR* 毒素毒素生合成遺伝子クラスターは約 1.5Mb の小型染色体に座乗し、何れの染色体も毒素生産菌のみが保有する事を明らかにしてきた。これらの染色体ゲノムの contig 配列から *ACT* 毒素生産菌にのみ存在する *ACTTS1* (Non-ribosomal peptide synthase:NRPS)、*ACTTS2* (dehydrogenase)、*ACTTS3* (polyketide synthase)、*ACTTS4* (NRPS)、*ACTTS5* (acyl-CoA synthetase)、*ACTTS6* (enoyl-CoA hydratase) と、*ACR* 毒素生産菌にのみ存在する *ACRTS1* (hydroxylase)、*ACRTS2* (polyketide synthase) を明らかにした。何れ

の遺伝子もクラスター中に複数コピー存在するが、標的遺伝子破壊法で機能するコピー数を減らすと毒素生産性が減少し、さらに RNA silencing 法で knock-down 株を作成して遺伝子転写物が検出不可能になると毒素生産も停止することから、これらの遺伝子が毒素生産に直結することを明らかにした。

5. 今後の計画

(1) *AmBP30* 遺伝子プロモーターの負の制御因子を大腸菌発現系で生産し、プロモーターへの結合様式を明らかにする。

(2) *AmBP30* 複合体構成タンパクとして特定した 2 つのタンパクと *AmBP30* との相互反応に必須なアミノ酸の特定と、他の構成タンパクとの関係を明らかにする。

(3) さらなる毒素生合成遺伝子機能の検定により、毒素生合成に必要な遺伝子の全容を確認する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Contribution of peroxisomes to secondary metabolism and pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. Imazaki, A., Tanaka, A., Harimoto, Y., Yamamoto, M., Akimitsu, K., Park, P., and Tsuge, T. *Eukaryotic Cell* 9: 682-694 (2010)

ACTTS3 encoding a polyketide synthase is essential for the biosynthesis of ACT-toxin and pathogenicity in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T.L., Tada, Y., Ichimura, K., and Akimitsu, K. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:406-414 (2010)

Role of the host-selective ACT-toxin synthesis gene *ACTTS2* encoding a n-enoyle-reductase in pathogenicity of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. Ajiro, N., Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T.L., Izumi, Y., Tada, Y., and Akimitsu, K. *Phytopathology* 100:120-126 (2010)

Molecular cloning and characterization of a thaumatin-like protein-encoding cDNA from rough lemon. Kim, B.-G., Fukumoto, T., Tatano, S., Gomi, K., Ohtani, K., Tada, Y. and Akimitsu, K. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74:3-10 (2009)