



Title	イネいもち病菌の非病原性タンパク質AVR-Piaの機能に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐藤, 佑樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11383号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55708
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Sato_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博 士 (農学)

氏名 佐 藤 佑 樹

学 位 論 文 題 名

イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の機能に関する研究

いもち病はイネの最重要病害であり、子囊菌に分類されるイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) によって引き起こされる。いもち病防除は主としていもち病抵抗性遺伝子を持つ抵抗性品種と農薬の利用によって行われている。イネのいもち病抵抗性は、遺伝子対遺伝子説に基づき、イネ品種の抵抗性遺伝子に特異的に対応する非病原性遺伝子を持ついもち病菌が感染した場合に発現する。イネのいもち病抵抗性を有効に利用するためには、両遺伝子産物間の相互作用や動態などの分子的機構を解明する必要がある。これまで、80 を超えるイネのいもち病抵抗性遺伝子が報告されており、11 遺伝子が単離されている。一方、いもち病菌の持つ非病原性遺伝子は 25 遺伝子が報告されているが、単離されたものは 9 遺伝子に過ぎず、AVR タンパク質の特徴・機能は十分に解析されていない。そこで本研究では、日本産イネいもち病菌 Ina168 株の持つ非病原性タンパク質 AVR-Pia について、レポータータンパク質を用いた局在解析、組換えタンパク質の調製とそれを用いた免疫学的研究手法の開発、Yeast two hybrid 法による相互作用の解析を通じて、非病原性タンパク質の機能の解析を行った。

1. 非病原性タンパク質 AVR-Pia の局在解析

非病原性タンパク質 AVR-Pia は 85 アミノ酸からなり、N 末端の 19 アミノ酸は推定分泌シグナルと推定されている。AVR-Pia がいもち病菌から分泌されていることを確かめるため、eGFP を C 末端に融合した機能型 AVR-Pia (AVR-Pia::eGFP)を発現する形質転換いもち病菌を作出し、イネ葉鞘裏面接種 (Koga H. *et al.*, 2004) によって感染時の様子を観察した。その結果、AVR-Pia::eGFP の蛍光は既報の非病原性タンパク質 PWL2 と共に、侵入菌糸の BIC (biotrophic interfacial complex, Khang CH. *et al.*, 2010) に局在した。また、感染組織を高張液に曝して原形質分離を起こすことで細胞質を濃縮したところ、イネ原形質膜の輪郭に沿って蛍光が観察されたことから、AVR-Pia::eGFPはBICを通じて菌体外へ分泌され、その後イネの細胞質に取り込まれていることが示唆された。

2. 大腸菌による組換え AVR-Pia の調製といもち病菌由来の AVR-Pia の免疫学的検出

微量な AVR タンパク質の定量や局在を解析するためには、AVR タンパク質に特異的な抗体を用いた免疫学的手法が求められる。抗体を作成するためには一定量の抗原タンパク質が必要であるが、いもち病菌はイネ感染時にのみ AVR-Pia を発現するため、大量調製は困難だった。そこで大腸菌による組換え AVR-Pia タンパク質 (rAVR-Pia) の大量調製を行った。rAVR-Pia は大腸菌内で封入体を形成したが、変性ーリフォールディング処理とゲルろ過によ

り、可溶体化と精製が可能になった。rAVR-Pia の構造的妥当性を評価するため、イネ葉に rAVR-Pia 溶液を処理し、抵抗性遺伝子 *Pia* を持つイネにおいて特異的な抵抗反応が見られるかを観察した。圧迫によってイネ葉表面の組織を破壊し、そこに rAVR-Pia 溶液を処理することで明確に *Pia* イネの褐変反応を誘導することに成功した。この褐変反応はイネの抵抗性反応時に見られる過酸化水素の蓄積と *OsPR1a* 遺伝子の発現を伴うことから、rAVR-Pia は *Pia* に認識される構造を保持していることが示唆された。rAVR-Pia をウサギに免疫し、抗 AVR-Pia ポリクローナル抗体 (AVR-Pia 抗体) を取得した。この抗体がいもち病菌由来の天然 AVR-Pia と抗原抗体反応できるかを確認するため、いもち病菌 Ina168 株を葉鞘裏面接種したイネ葉鞘からタンパク質を抽出し、Western blotting に供したところ、天然 AVR-Pia を検出することに成功した。得られたバンドの面積と濃さから感染中にいもち病菌によって分泌される天然 AVR-Pia の感染イネ組織由来総タンパク質に対する濃度は 0.48 ppm と推定され、いもち病菌由来非病原性タンパク質の定量に初めて成功した。

3. Yeast two hybrid 法による AVR-Pia 分子間相互作用の解析

AVR-Pia はイネ抵抗性遺伝子 *Pia* に対応する非病原性タンパク質であり、*Pia* タンパク質との直接的な相互作用があると期待された。タンパク質間相互作用について解析するため Yeast two hybrid 法による解析系を構築した。sp-AVR-Pia (シグナル配列を含む AVR-Pia)、AVR-Pia (シグナル配列を含まない AVR-Pia)、RGA4、RGA5 (共に *Pia* の機能に必要なタンパク質, Okuyama *et al.*, 2011) のうち 2 タンパク質を発現する酵母を作成し、全ての組み合わせにおける相互作用を解析したところ、期待された *Pia* タンパク質 RGA4、RGA5 と sp-AVR-Pia および AVR-Pia 間での相互作用は検出されなかった。一方、AVR-Pia とそれ自身との強い相互作用が検出され、分泌された AVR-Pia が多量体化する可能性が示唆された。AVR-Pia のアミノ酸配列のうち、2 箇所のシステインをグリシンに置き換えて同解析を行ったところ、相互作用が弱まることが分かった。このアミノ酸置換型 AVR-Pia を発現する遺伝子組換えいもち病菌を作出し、*Pia* イネへの接種試験を行ったところ、アミノ酸置換型 AVR-Pia は非病原性タンパク質としての機能を喪失していた。これは、AVR-Pia の多量体化と非病原性タンパク質としての機能に関係があるということを示唆した。

以上の結果から、AVR-Pia はイネ感染時に BIC から分泌されイネ細胞質へ移行していること、rAVR-Pia が *Pia* イネに抵抗性反応を誘導する活性を持ち、それを元に作成した抗体によっていもち病菌由来の天然 AVR-Pia を検出可能であること、AVR-Pia が多量体化する可能性を示し、また多量体化と非病原性タンパク質としての機能の間の関係を明らかにした。本研究成果は、いもち病菌の非病原性タンパク質を大腸菌によって発現・精製し、それを元に得られた抗体によって天然非病原性タンパク質を検出・定量した初めての例である。さらにその局在や機能についても明らかにした。従来の手法では観察困難だった、抵抗性反応誘導時のより詳細な AVR-Pia の動態や AVR/R タンパク質相互作用機構の解明など、今後のいもち病研究に対して大きく貢献できると考えられる。