HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博 士 (農学)　　氏名 佐 藤　佑 樹

審査担当者　主 査　准教授　曾根 輝雄
副 査　教 授　浅野 行蔵
副 査　客員教授　今井 亮三
副 査　准教授　尾瀬 農之(大学院薬学研究院)

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

本論文は和文 167 ページ, 図 33, 表 22, 8 章からなり、参考論文 2 編が付されている.

いもち病はイネの最重要病害であり, 子嚢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の発現には, いもち病菌のもつ非病原性遺伝子が重要な役割を果たしており, その産物である非病原性タンパク質の機能解明はイネの抵抗性を持続的に利用するために重要である. 本研究は, 日本産イネいもち病菌 Ina168 株のもつ非病原性タンパク質 AVR-Pia の機能の解析を行ったものである.

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 AVR-Pia を発現するいもち病菌を作出し, イネ葉鞘感染時の様子を観察した. その結果, eGFP の蛍光は侵入菌糸の BIC (biotrophic interfacial complex) に局在した. また AVR-Pia が菌体外へ分泌され, その後イネの細胞質に取り込まれていることも示唆された.

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－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 溶液を抵抗性遺伝子 *Pia* を持つイネ葉表面の圧迫部に処理することで, 明確にイネ葉に過酸化水素の蓄積と

OsPR1a 遺伝子の発現を伴う褐変反応を誘導することに成功し，rAVR-Pia はいもち病菌由来の AVR-Pia と同等の構造を保持していることが示唆された．抗 rAVR-Pia 抗体を取得し, いもち病菌 Ina168 株を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，Yeast two hybrid 法により解析したところ, Pia タンパク質 RGA4, RGA5 と AVR-Pia 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. また，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換すると，AVR-Pia 同士の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おり, AVR-Pia の多量体化と非病原性タンパク質としての機能の関連性を示唆した.

以上，本論文は, 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成果である.

よって、審査員一同は，佐藤佑樹氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた.