



# 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 [全文の要約]                                                                                                                             |
| Author(s)           | 佐藤, 佑樹                                                                                                                                                                |
| Description         | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。<br><a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a> |
| 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             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/55709">https://hdl.handle.net/2115/55709</a>                                                                                     |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                       |
| File Information    | Yuki_Sato_summary.pdf                                                                                                                                                 |



## 学 位 論 文 内 容 の 要 約

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 株のも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．

第 2 章では，非病原性タンパク質 AVR-Pia の局在解析を行った．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。この結果は抵抗性遺伝子 *Pia* と AVR-*Pia* を共発現させたイネプロトプラストが過敏感反応死を起こすことから、AVR-*Pia* がイネ細胞質内で機能するものと考えられるという Okuyama Y. *et al.* (2011) の報告と一致する。ただし、細胞質への移行の観察に関して、他のいもち病菌エフェクターでは有効であった核局在シグナル付加によるイネ核への局在は観察できず、感染組織を高張液に曝すことで原形質分離を引き起こし、細胞質を濃縮することで蛍光強度を担保する方法を採用した。その結果、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。

第3章では、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* の免疫学的検出を行った。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。これは AVR-*Pia* が *Pia* 依存型 HR を誘導する因子である

ことを直接的に示す最初の事例であり、同時に rAVR-Pia の構造的妥当性を示唆するものである。そこで 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。

第 4 章では、Yeast two hybrid 法による AVR-Pia 分子間相互作用の解析を行った。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、一部のレポーター遺伝子発現が認められないことから、相互作用が弱まっていると考えられた。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。

今回観察された興味深い現象として, *Pia* イネへの rAVR-*Pia* 処理による褐変や過酸化水素産生は処理濃度にかかわらず処理部から離れた部位に生じるというものがある. また, 本研究で HR 様の反応を誘導するのに用いた rAVR-*Pia* 量は最少でイネ葉 1 枚に対して 0.5  $\mu\text{g}$ , イネ葉 1 枚 25 mg として 20  $\mu\text{g/g}$  だったのに対し, 感染組織に含まれる可溶性タンパク質における天然 AVR-*Pia* の濃度は 0.48 ppm, イネ葉鞘 1 g 当たりに換算すると約 3.73 ng/g であり, *Pia* イネに HR 様反応を誘導するのに要した rAVR-*Pia* 量よりはるかに少ないというところも興味深い. これらの点から, AVR-*Pia* には既知のいもち病菌由来エフェクターには無いユニークな性質がある可能性がある. 蛍光タンパク質融合 AVR-*Pia* を発現するいもち病菌の感染時の観察において, AVR-*Pia* の蛍光は BIC の他, 被侵入細胞および周辺細胞の細胞壁付近に局在しているが, PWL2 ではそのような現象は見られない. Giraldo ら (2012) は, BIC へ分泌されたエフェクタータンパク質は BIC に関連した複数のタンパク質の機能により速やかにイネ細胞質へ取り込まれるとしているが, 蛍光写真を見る限り, AVR-*Pia::eGFP* の蛍光は被感染イネ細胞を回りこむような形で周囲の細胞の外周に分布していることから, スムーズにイネ細胞質へ取り込まれていないように見える. このことから, BIC から分泌されるエフェクター間には細胞質への移行性に差があり, AVR-*Pia* はこれまでに発見されている他の BIC 経由で分泌されるエフェクタータンパク質よりも細胞外空間に留まりやすい, あるいはイネ細胞内に取り込まれづらいのではないかと推測された. そして, この推測は rAVR-*Pia* 処理による HR 様反応が処理部から離れた場所に生じるという現象と符合する. すなわち, 処理部周辺の細胞では容易に取り込まれなかった rAVR-*Pia* が蒸散流によって細胞外空間を移動し, 一定以上の水分が失われて移動速度が低下した点でようやく取り込まれた結果, 処理部から離れた場所で反応を引き起こしたのではないかと推測できる. AVR-*Pia* が細胞内へ容易に取り込まれないことが, いもち病菌とイネの攻防においてどのような意義を持つのかは推測の域を出ないが, AVR-*Pia* のエフェクターとしての標的や感染に果たす役割などが解明されれば, その答えも明らかになると考えられる.

本研究により, AVR-Pia は他のエフェクターまたは非病原性タンパク質とは異なる分泌後の挙動を示すこと, rAVR-Pia より作成された抗 AVR-Pia 抗体は天然 AVR-Pia を認識可能であり, Western blotting において 18–32 pg (2.4–4.3 fmol)の rAVR-Pia を検出可能であることが明らかになった. この抗体によって組織免疫染色した組織切片を電子顕微鏡観察することが可能となったことで, 今後, より微細な構造中での AVR-Pia の局在, 並びにこれまでの手法では観察が困難だった抵抗性反応誘導時における AVR-Pia の挙動についての解析が促進されると期待される.

植物の免疫システムの根幹である PTI (PAMPs triggered immunity) あるいは ETI (effector triggered immunity) は, 直接侵入あるいは損傷を負った細胞が初期応答の結果, 活性酸素種 (ROS) とサリチル酸 (SA) などのシグナル物質を産生し, 一定レベル以上の ROS と SA の蓄積が正のフィードバックによって互いの産生を促進し, 最終的に過敏反応を起こすことで侵入者もろとも自死し, 組織全体の健全さを保つ (Draper J., 1997). また, SA は周囲の細胞に対して病原菌の侵入を受けたことを伝達し, 防御関連遺伝子の発現誘導や抗菌物質の産生を誘導する (Bari, R. and Jones, J. D., 2009). また, ROS も周囲の細胞に対してシグナル物質として機能し, 細胞壁の強度向上を促す (Bradley *et al.*, 1992; Lamb and Dixon, 1997). 現段階では目に見える反応を誘導するのに必要な rAVR-Pia は膨大であるが, 抵抗反応誘導時の AVR-Pia 挙動が詳細に解明されれば, 例えば rAVR-Pia を動物でいうところのワクチンのように効率的に Pia イネに感作させることで, ETI を人為的に適度な励起状態にし, 常に全体の細胞が十分な抗菌物質を蓄積した状態に保つことで, いもち病菌をレースに関わらず防除できるようにする新薬などに利用できる. タンパク質製剤であれば現行の化学農薬のような毒性および残留性や生分解性などの問題も比較的容易にクリアできるはずである. このように, AVR-Pia に関するより詳細な研究は, 従来とは異なるアプローチのいもち病防除方法を開発する手立てとなるだろう.