

イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の 分子間相互作用の解析

生命分子化学講座 応用菌学専門分野
佐藤 佑樹

(背景と目的) イネいもち病はイネの最重要病害の一つであり、毎年世界 85 カ国で約 6 千万人分に相当するコメが失われていると推定されている。イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* がイネに感染する際、エフェクターと呼ばれるタンパク質を分泌し、イネの持つ基本的な防御機構を攪乱し、感染を有利にしていると考えられている。しかし、エフェクターの一部には、イネの防御機構に捕捉され抵抗性反応を惹起するものが知られており、それをコードする遺伝子を非病原性遺伝子 (Avirulence gene) と呼ばれている。イネいもち病菌の非病原性遺伝子とイネの抵抗性遺伝子の型が一致した場合、イネいもち病菌はイネへの感染に失敗するが、両者がタンパク質としてどのように相互作用し、抵抗性反応が起こっているかは明らかにされていない。そこで、本研究では、*Magnaporthe oryzae* Ina168 株由来の非病原性遺伝子 AVR-Pia と、*Oryza sativa* 由来の抵抗性遺伝子 Pia に着目した。Pia の抵抗性反応には NBS-LRR モチーフを持つ二つの遺伝子、RGA4, RGA5 の二つが必要であることが明らかになっている。そこで、AVR-Pia と Pia 間の相互作用を Yeast Two Hybrid 法を用いて解析した。

(方法・結果) Matchmaker Gold Two Hybrid System (Clontech) を用いて、非病原性遺伝子 AVR-Pia, 抵抗性遺伝子 Pia (RGA4, RGA5) 間の相互作用を解析した。また、AVR-Pia アミノ酸配列に含まれる二つのシステイン残基の片方、ないしは両方をグリシンに置換する点変異を導入し、相互作用に与える影響を調べた。その結果、推定シグナル領域を除いた AVR-Pia 同士での相互作用が検出されたが、Pia (RGA4, RGA5) との相互作用は検出されなかった。システイン残基をグリシンに置換した AVR-Pia は、一置換・二置換ともに野生型よりも相対的に相互作用が弱くなることが分かった。

さらに、アミノ酸置換型 AVR-Pia が非病原性タンパク質として機能しているかを調べるため、点変異を入れた AVR-Pia をイネいもち病菌に形質転換し、病原性試験を行った。その結果、アミノ酸置換型 AVR-Pia を発現するイネいもち病菌は、本来感染できない Pia を持つイネに対して病原性を示したことから、アミノ酸置換により非病原性タンパク質としての機能を喪失したことが分かった。このことから、AVR-Pia 同士の相互作用強度が非病原性タンパク質としての機能に関与していることが示唆された。

また、葉鞘裏面接種したイネ葉鞘から抽出した全タンパクを、抗 AVR-Pia 抗体を用いて免疫沈降し、ウェスタンブロッティングによって AVR-Pia を検出することで、イネ感染時の AVR-Pia 分子量を推定した。その結果、イネ感染時における AVR-Pia の分子量が、アミノ酸配列から推定されるシグナルペプチドを除いた AVR-Pia と一致することが確かめられた。

(考察・結論) 以上のことから、非病原性タンパク質 AVR-Pia はイネ感染時、イネいもち病菌から分泌され、シグナルペプチドから切り離された状態で多量体化し、それがイネ Pia による抵抗性反応の誘導に関与している可能性が示唆された。