

# DNA 組換え修復タンパク質 MRN 複合体に着目したイネいもち病防除法の開発

共生基盤学専攻 生物共生科学講座 応用菌学 中山 航

## 1. 背景, 目的

イネいもち病はイネの最重要病害であり, その防除には農薬や抵抗性品種などが使用されている。しかし, これらはいもち病菌の突然変異により無力化される。突然変異菌の発生のメカニズムの一つに DNA 修復時の相同組み換えがある。そこで, 本実験では DNA 修復時の相同組み換えに関わる MRN 複合体という MRE11, RAD50, Nbs1 の 3 つのタンパク質の複合体に注目した。MRN 複合体は DNA 二重鎖切断個所に集まり, 修復に必要な様々なタンパク質を誘引するという DNA 修復の開始の重要な役割を担っている。これまでに, イネいもち病菌において, MRN 複合体のうちどれか一つでも失った欠変異株はイネへの病原力を失うこと, 熱処理したタマネギの表皮には侵入できるが, 生きたイネの葉には侵入できないことが分かっている。本実験では, MRN 複合体の各欠変異株がイネの葉に侵入できない理由の解明と, MRN 複合体形成の阻害によるいもち病菌のイネへの感染防御が可能であるとの考えに基づき, MRN タンパク質の相互作用阻害物質のポジティブスクリーニング系の構築を行った。

## 2. 方法, 結果, 考察

プラスチック表面上に形成させた Ina86-137 株, いもち病菌の *MRE11*, *RAD50*, *Nbs1* のホモログである *Mhm11*, *Rhm50*, *Nhm1* の各欠損変異株である  $\Delta$ *Mhm11* 株,  $\Delta$ *Rhm50* 株,  $\Delta$ *Nhm1* 株の付着器に 40% の PEG-4000 を用いて 3.5MPa の外圧をかけ, 全付着器に対する崩壊した付着器の割合を計測した。Ina86-137 株では付着器の崩壊率は 13%であったのに対し,  $\Delta$ *mhm11* 株,  $\Delta$ *rhm50* 株,  $\Delta$ *nhm1* 株ではそれぞれ 47%, 48%, 49%であり, いずれも野生株よりも高い崩壊率を示した。熱処理をし, 細胞壁が弱くなったイネの葉には侵入できることが観察され, MRN 複合体欠損株が生きたイネ葉に侵入できない理由は, 付着器内の膨圧が低下していることが考えられた。

MRN 複合体の各相互作用を確認するために, 共免疫沈降法と yeast two hybrid 法を用いた。*Mhm11*, *Rhm50*, *Nhm1* にそれぞれ異なるタグを付け, 共免疫沈降を行ったところ, バンドが確認されたことから, *Mhm11* と *Rhm50*, *Mhm11* と *Nhm1* の相互作用が予想されたが, 非特異バンドや目的バンドが薄かったために yeast two hybrid 法を用いて, 再度相互作用の確認を行った。その結果, *Mhm11* と *Rhm50*, *Mhm11* と *Nhm1* が相互作用していることが示唆された。

レポーター遺伝子として *CAN1* 遺伝子を形質転換した酵母による yeast two hybrid 法を用いたタンパク質相互作用阻害剤のスクリーニング系を構築した。*CAN1* 遺伝子はアルギニンパーミアーゼをコードしており, これを発現する酵母は培地中のアルギニンを体内に取り込むが, アルギニンの代わりにカナバニンを入れた最少培地では, 相互作用を阻害する事で酵母が生育するポジティブスクリーニングに用いることが出来る。*Mhm11*, *Rhm50*, *Nhm1* を融合タンパク質として発現させ, 相互作用阻害物質のスクリーニングを行った。すなわち, カナバニン入りの培地に  $10^5$  cell/ml の濃度で酵母を混釈し, ペーパーディスクに放線菌の二次代謝産物を染み込ませ, 酵母の生育が確認される物質を探索した。現在までに, 1,613 株の二次代謝産物をスクリーニングに用いて, 2 株の二次代謝産物において酵母の生育が見られた。