

イネいもち病菌の DNA 修復タンパク質解析のための

ネイティブ発現系の構築

応用生物科学専攻 生命分子科学講座 応用分子微生物学研究室 小竹 史仁

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結し, 修復に必要な様々なタンパク質を誘引するという DNA 修復の開始に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失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。MRN 複合体の各相互作用を確認するために, いもち病菌の *MRE11*, *RAD50*, *Nbs1* のホモログである *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。しかし, *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プロモーターを恒常強発現プロモーターに変更し, より確実なタンパク質発現を実現することを目的とした。

2. 方法・結果

Mhm11, *Rhm50*, *Nhm1* を導入したベクタープラスミド pBARSTFLAGmre11comp., pDESTRrad50HA, pBlastrMycnbs1 を鋳型とし, そのプロモーター部分を除く配列を PCR 対象としてプライマーを設計した。インバース PCR により, pBARSTFLAGmre11comp. においてプロモーターを除いたベクターが得られた。他 2 つは非特異的な産物が優先してしまい, プライマー設計を変更しても結果は同様であった。また, TEF プロモーターを, pBARSTFLAGmre11comp. の強発現性代替インサートとなるようプライマーを設計した。PCR によりインサートとしてのプロモーターが得られた。ベクターとインサートをエキソヌクレアーゼ, ポリメラーゼ, リガーゼを用いて Gibson Assembly を行い, 強発現プロモーターを持つプラスミドを作成した。そのプラスミドをエレクトロポレーション法による形質転換で大腸菌へ導入した。しかし, 回復培養後のプレーティングでコロニーが観察されなかった。そのため, ベクターとインサートが正しくアッセムブリしていた際にのみ反応が進むプライマーの組み合わせで PCR を行ったところ, 産物は得られず, また, ベクターとインサートの DNA を電気泳動し確認したところ, 正しい目的物と思われるバンドがあったため, アッセムブリ段階に問題があることが示唆された。現在, 再度アッセムブリ反応を行っている。