

植物病原性卵菌 *Aphanomyces cochlioides* の形態変化時発現遺伝子動態解析

応用生命科学専攻 生命分子化学講座 生態化学生物学 佐藤 優樹

1. はじめに

Aphanomyces cochlioides はハウレンソウやテンサイに感染する植物病原性卵菌であり、菌糸状の栄養体は冠水などにより遊泳能を持つ遊走子を形成する。遊走子は宿主特異的シグナル物質に誘引され、宿主根表面で被嚢化後発芽し感染が成立する。また、遊走子は振動などの非宿主特異的刺激によっても被嚢化するが、その場合発芽には至らず遊走子が再生される。遊走子の被嚢化および発芽は感染において必須の過程であるが、*Aphanomyces* 属卵菌の形態変化分子機構に関する知見は限られており不明な点が多い。そこで本研究では、遊走子細胞分化機構を明らかにすることを目的とし、被嚢胞子発芽または遊走子再生時に特異的に発現変動する遺伝子の同定及び解析を行った。

2. 方法

A. cochlioides Cell MAFF 305845 株 (AC Cell) を用いて、遊走子懸濁液を調製し、発芽処理として clarified V8 野菜ジュース (終濃度 0~12%), 遊走子再生処理としてニコチンアミド (NA) 溶液 (終濃度 0~10 μ M) を添加した。各処理を施した菌体から RNA を抽出し、アダプター配列を付加したオリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成した。ディファレンシャルディスプレイ (DD) 解析により検出された発現変動遺伝子の塩基配列決定を行い、リアルタイム PCR による定量解析を行った。特に発現変動が顕著であった遺伝子に関しては 5' -RACE 法による完全長 cDNA 配列決定を行い、タンパク質発現用ベクター pCold, 宿主大腸菌 BL21 を用いて組み換えタンパク質を大量調製した。また、二次元電気泳動により組み換えタンパク質の等電点および分子量を解析した。

3. 結果と考察

10% V8 処理直後に全ての遊走子が被嚢化し、80 分後の発芽率は約 9 割に達した。また、6 μ M NA 処理直後に、同様に全ての遊走子が被嚢化したが発芽は見られず、180 分後から遊走子再生が確認され、300 分後の再生率は約 7 割に達した。DD 解析の結果、V8 処理 80 分後に発現量が上昇する遺伝子、*V8-AC1100* および *V8-AC750*, NA 処理 150 分後に発現量が上昇する遺伝子、*NA-AC850* が検出された。発現定量 PCR 解析の結果、*V8-AC1100* および *V8-AC750* の発現量は、V8 処理直後の約 60 倍および約 3 倍に上昇していた。*V8-AC1100* について 5' -RACE 法を用いた 5' 末端配列解析を行い、開始および停止コドンを含む 1096 bp の cDNA 配列を決定した。この配列を用いて大腸菌でのタンパク質 *V8-AC1100* の可溶性発現に成功した。また、その等電点 (*pI* 4.6) および分子量 (45 kDa) は cDNA 完全長配列から予想された値と一致していた。得られた塩基配列からタンパク質の機能を予測したところ、*V8-AC1100* はタンパク質フォールディングシャペロン機能を有する FKBP ドメインを保持しており、核に局在することが考えられた。核局在型 FKBP タンパク質は、遺伝子発現に関与することが報告されているため、*V8-AC1100* は被嚢胞子発芽時の遺伝子発現制御に関与する可能性が示唆された。

4. 終わりに

本研究で同定した *V8-AC1100* は、被嚢胞子発芽時分子機構に重要な遺伝子であることが示唆された。これまでに卵菌類の発芽に関わる FKBP タンパク質についての報告例はないことから、この機能を解析することにより、*A. cochlioides* の新規感染防除法開発に貢献することが期待される。