

氏 名(本籍)	さ さ き あつ こ 佐 々 木 厚 子
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 5 6 8 号
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科農学専攻 (博士課程)
学位論文題目	植物病原糸状菌 <i>Rhizoctonia solani</i> の保持するプラス ミドにコードされた新規タンパク質に関する解析
論文審査委員	(主 査) 教 授 羽 柴 輝 良 教 授 亀 谷 壽 昭 教 授 江 原 淑 夫

論文内容要旨

*Rhizoctonia solani*は多犯性の植物病原糸状菌であり、難防除土壌病害の1つである。本菌は菌糸融合の有無により種内類別が行われており、現在は第10群までが知られている。これら菌糸融合群 (AG) のうち、AG1からAG6までは、各群ごとに大きさと配列の異なるプラスミドを保持しており、プラスミドを保持する菌株からは自身のプラスミドをプローブとした場合のみ、ハイブリダイズするRNAが検出されている。プラスミドの構造については、AG2-2の保持するpRS224とAG4の保持するpRS64に関して解析が進められているが、これらは両者とも両末端が1本鎖ヘアピンループ構造でつながった、線状2本鎖DNAで、2本鎖部分にORFを保持している。どちらのプラスミドの場合も、検出された相同RNAがORF領域を含んで転写されていることから、これらORFが菌体内で発現している可能性が示唆されている。これまでに糸状菌で見いだされた線状プラスミドは、ほとんどが自身の複製に機能すると考えられる酵素をコードしているが、本菌で見いだされたORFは既知のタンパク質とは相同性を示さない。また*R. solani*の場合、各AGごとに特有の大きさと配列のプラスミドを保持していることから、両者の関連を考察する上でも、プラスミドにコードされたタンパク質について解析を行うことは重要であると思われる。そこで、本研究ではプラスミドで見いだされたORFに対する抗体を作製し、相同性のあるタンパク質について解析を行った。

(1) pRS64にコードされたタンパク質 (RS64) と相同性のあるタンパク質

pRS64は-1、-2、-3の3種のプラスミドから成り、それぞれ2本鎖領域は高いホモロジーを示す。これまで糸状菌で報告されているユニバーサルコドンと、ミトコンドリアコドンに従って、また、開始コドンを一般的なATGと原核生物などで報告のあるGTGの2つを用いてORFの検索を行ったところ、転写RNAとオーバーラップし、pRS64内で高い相同性を示す68アミノ酸

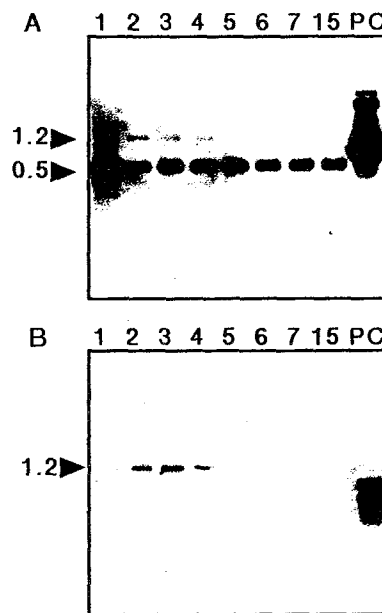


Fig. 1. Northern analysis of the total RNAs extracted from AG4 isolates

(A) R101 isolate (containing pRS64-1)

(B) 1271 isolate (no plasmids)

Total RNA was electrophoresed 1.5% agarose gel under denaturated condition, and blotted to membrane. The probe used in this analysis was a cloned fragment (BE-3) containing ORF region of pRS64. The lane numbers indicate days after inoculation. PC indicates BE-3 probe. Hybridized RNA (0.5 and 1.2 kb) are indicated with arrows.

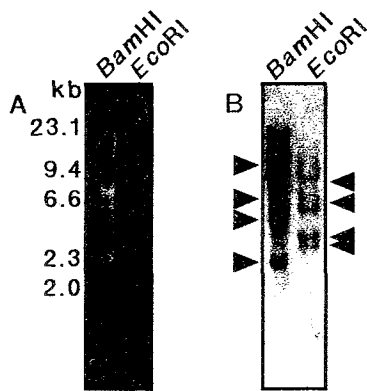


Fig. 2. Detection of a nuclear sequence.
 (A) Gel-electrophoretic analysis of restriction enzyme digests of nuclear DNA from isolate 1271.
 (B) Result of hybridization of Southern transfer strip from (A) with cloned pRS64 DNA probes, X-8 and X-11. Nuclear DNA was digested with *Bam*HI and *Eco*RI. Molecular weight markers are indicated on the left. Hybridized signals are indicated with arrows.

ープとし、ノザン解析を試みた。0.5kbの相同RNAはプラスミドを保持した菌株からのみ検出された(Fig. 1)。一方、供試した4菌株から大きさ約1.2kbの相同RNAが検出された。また1271菌株に対して、プラスミドpRS64-1と-2の2本鎖領域をプローブとしてサザン解析を試みたところ、相同領域はゲノム中に存在している可能性が示唆された (Fig. 2)。これらのことから、ポリクローナル抗体によってAG4から検出された12kDaの相同タンパク質は、ゲノム中に存在するプラスミド

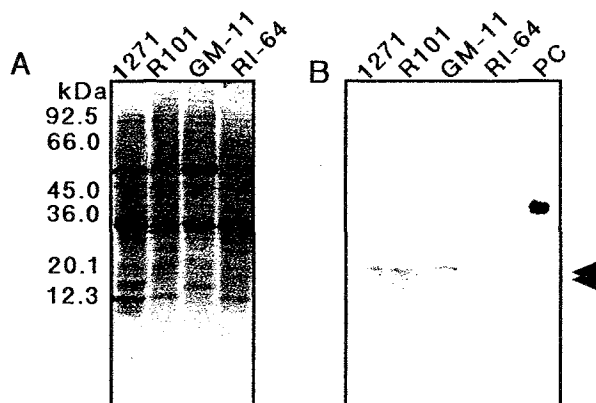


Fig. 3. Immunodetection of the homologous protein to RS64 from total proteins of AG4 isolates.
 (A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE containing total fungal proteins of AG4.
 (B) Western analysis of a gel identical to that (A). Total proteins were electrophoresed in 18% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Blot was probed using monoclonal antibody raised against RS64. Upper lanes indicate the fungal isolates. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous proteins about 12kDa are indicated with arrows.

からなるORFが1つ存在していたため、これをRS64とし、菌体内での発現を検討した。

RS64に対するポリクローナル抗体を作製して、1271 (プラスミドを保持しない)、R101 (pRS64-1を保持)、GM-11(pRS64-2を保持)、RI-64 (pRS64-1、-2、-3を保持) の4菌株から相同タンパク質の検出を行った結果、供試した4菌株全てから大きさ約12kDaのタンパク質が検出された。これらの菌株を供試してRS64のコード領域をプロ

ORFと相同性のある領域から転写翻訳された産物であると考えられた。検出された相同タンパク質とRS64の相同性を検討するため、RS64に対するモノクローナル抗体を作製して菌体からの検出を試みた。モノクローナル抗体はGSTとの融合タンパク質を用いて作製し、N末側にエピトープの存在が示唆された。12kDaの相同タンパク質は得られたモノクローナル抗体とも同様に反応した (Fig. 3)。このことから検出された相同タンパク質はRS64と相同性を有していると判断された。

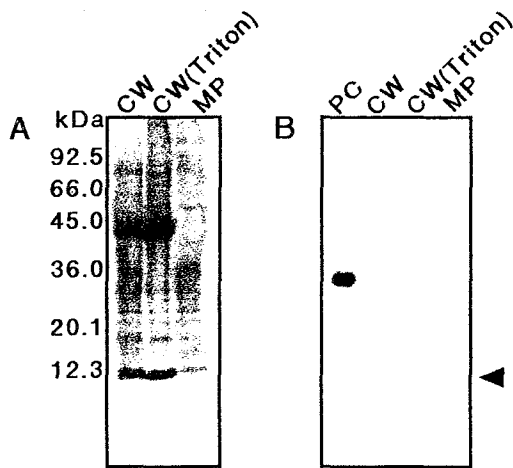


Fig. 4. Immunodetection of the homologous protein to RS64 from cell wall fraction.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.
 (B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane CW, crude cell wall fraction; lane CW (Triton), solubilized membranes from CW fraction by treatment with 2% Triton X-100; and lane MP, membrane proteins solubilized from CW. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 12kDa is indicated with arrow.

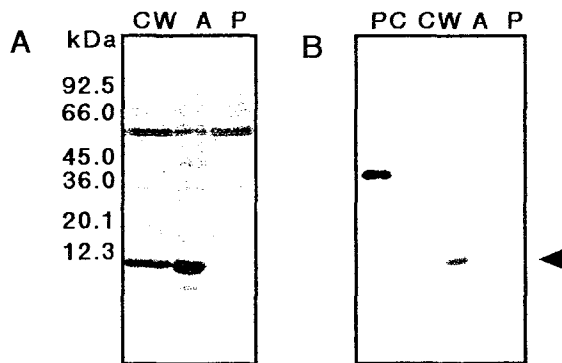


Fig. 5. Acidic extraction of homologous protein to RS64 from cell wall fraction .

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.
 (B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed on SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane CW, cell wall fraction; lane A, extracted proteins from CW fraction by treatment with 0.5M HCl; lane P, proteins in CW after treatment with HCl. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 12kDa is indicated with arrow.

相同タンパク質の細胞内所在について検討したところ、本タンパク質は細胞内の不溶性画分に存在しており、低張バッファーに懸濁、遠心を繰り返し、細胞質画分を洗い流しても失われず、2% Triton X-100で処理をしても可溶化できなかったことから (Fig. 4)、細胞壁画分に存在していると考えられた。

検出された相同タンパク質についてさらに解析を行うため、可溶化法を検討した結果、0.5M HClで選択的に可溶化することが可能で

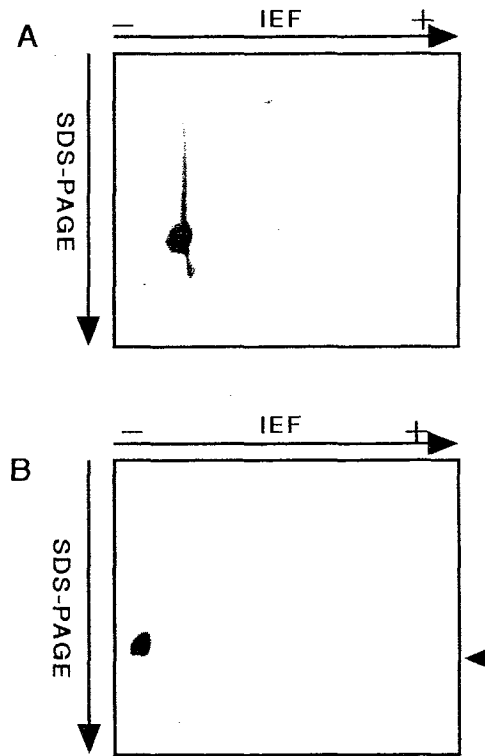


Fig. 6. Purification of the homologous protein to RS64 by 2D-PAGE.

(A) Coomassie blue-stained 2D-PAGE gel.
 (B) Western analysis of a gel identical to that (A). The extracted protein from CW fraction by treatment with 0.5N HCl were loaded onto an isoelectric focusing tube gel. After electrofocusing, the tube gel was mounted onto SDS-PAGE gel, electrophoresed and transferred to PVDF membrane for Western analysis. The homologous protein about 12kDa is indicated with arrow.

あった (Fig. 5)。また本方法によって抽出した相同タンパク質をschiff染色し、糖鎖修飾について検討したところ、糖鎖の修飾は受けていないと思われた。抽出した相同タンパク質の2D-PAGEによる単離を試みた結果、pI 11付近に単一スポットとして分離された (Fig. 6)。このスポットを切り出し、アミノ酸シーケンスに供したところ、N末端は何らかの修飾を受けているために明確なピークが得られなかった。C末端側からは4つのアミノ酸配列を読み取ることができた。さらに、単離したスポットをProtease kによって

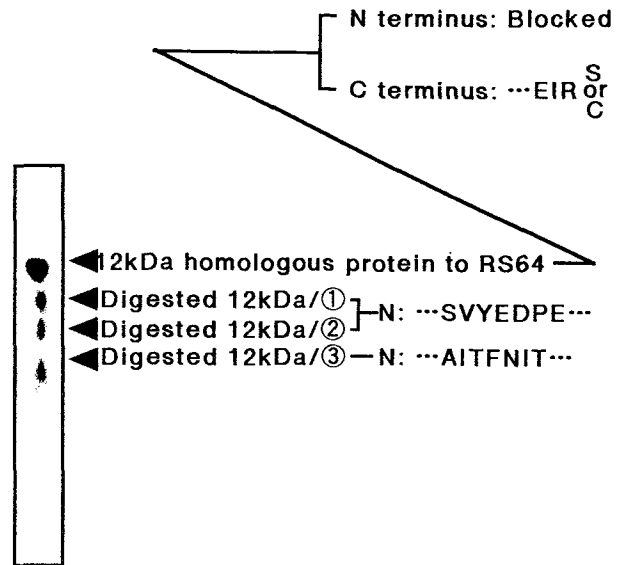


Fig. 7. Peptide mapping of 12kDa homologous protein to RS64 and amino acid sequences. Twelve kDa homologous protein was separated by 2D-PAGE and digested with protease K in stacking gel of tricine SDS-PAGE. After electrophoresis, the gel was transferred to PVDF membrane and stained with Coomassie blue.

部分消化し、内部配列の解析を試みた。相同タンパク質はProtease K処理によって大きく3つのスポットに分解されたが、このうち最も小さいものはさらに3つに分解されていた (Fig. 7)。これら3つのスポット (digested 12kDa/①、②、③) のN末端のアミノ酸配列を決定した結果、digested 12kDa/①、②はまったく同じアミノ酸配列を示した。読み取られた配列中にはRS64と相同な配列は含まれていなかった。FASTAにより既知のタンパク質とのホモロジーサーチを行ったところ、両者ともprofilinと高い相同性を示した。BLAST searchでは相同性のあるものは見いだされなかった。

(2) pRS224にコードされたタンパク質 (RS224) と相同性のあるタンパク質

pRS224は-1、-2、-3の3種のプラスミドから成る。これまで内部配列の解析はpRS224-1に関して行われている。AG4の場合と同様にORFの検索をおこなったところ、複数のORFが予想された。pRS224についてはプラスミドを保持する菌株から7.4kbと4.7kbの相同RNAが検出されており、ほぼ全てのORFについて発現の可能性が考えられた。そこで本研究では、最長の888アミノ酸から成るORFをRS224として、その発現について検討した。

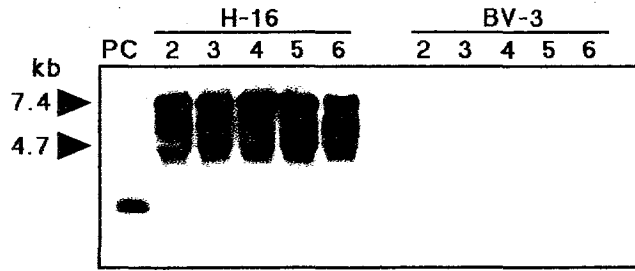


Fig. 8. Northern analysis of the total RNAs extracted from H-16 and BV-3 isolates.

Total RNA from the isolate was electrophoresed and blotted to membrane. The probe used in this analysis was the cloned RS224-b fragment. Lane numbers indicate days after inoculation. Upper lanes indicate the fungal isolates. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates RS224-b probe. Position of the 7.4 and 4.7kb are indicated with arrows.

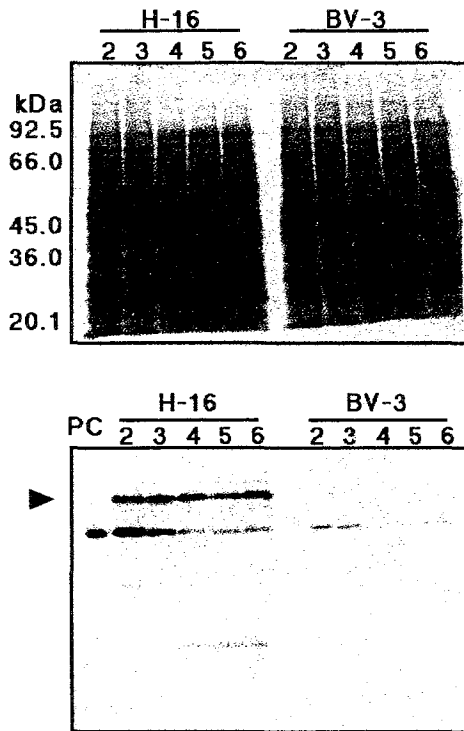


Fig. 9. Immunodetection of the homologous protein to RS224 from total proteins extracted H-16 and BV-3 isolates.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE containing total fungal proteins.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Total proteins were electrophoresed in 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Blot was probed using antiserum raised against RS224-b. Upper lanes indicate the fungal isolates. Lane numbers indicate days after inoculation. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 90kDa is indicated with arrow.

AG2-2に属するH-16 (pRS224-1、2、3を保持) とBV-3(プラスミドを保持しない) の2菌株を供試して、RS224の中央領域の配列をプローブとして転写RNAの経時的変化について検討を行ったところ、サンプリングを行った全期間を通じて、H-16菌株から7.4kbと4.7kbの相同RNAが検出された (Fig. 8)。大腸菌でRS224の発現を試みたが、完全長の発現は困難だったため、ORFを約800bp

ずつ3等分して、N末端側からRS224-a、-b、-cとして発現を試みた。RS224-b、-c部分のタンパク質を発現させ、抽出、精製後、マウスに免疫して両者に対する抗体を得た。抗体力価は抗RS224-bの方が高かった。抗RS224-b抗体を用いてH-16、BV-3両菌体からのタンパク質の検出を試みた結果、大きさ約66kDaと90kDaのタンパク質が検出された (Fig.

9)。66kDaのタンパク質は両菌株に存在したが、90kDaのタンパク質はプラスミドを保持したH-16菌株からのみ検出されたことから、このタンパク質をRS224の相同タンパク質とし、その後の解析を行った。

検出された相同タンパク質の細胞内所在について検討した結果、本タンパク質

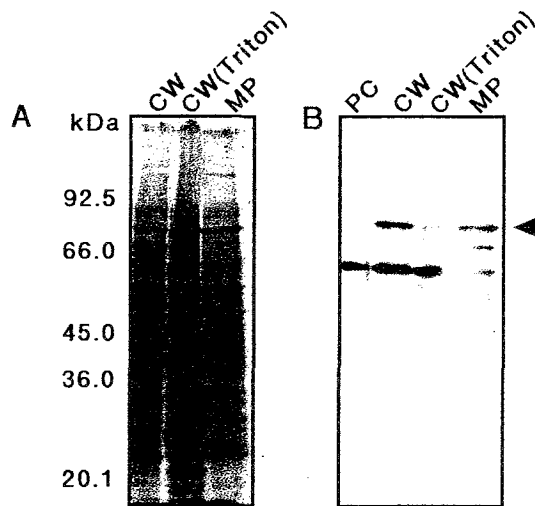


Fig. 10. Immunodetection of homologous protein to RS224 from cell wall fraction.
 (A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.
 (B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane CW, crude cell wall fraction; lane CW (Triton), solubilized membranes from CW fraction by treating 2% Triton X-100; and lane MP, membrane proteins solubilized from CW. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 90kDa is indicated with arrow.

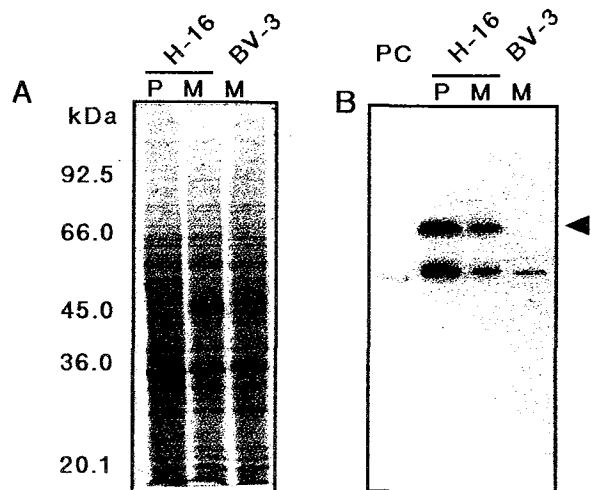


Fig. 11. Immunodetection of homologous protein to RS224 from mitochondrial fraction.
 (A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.
 (B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane P, fraction of cell wall and microorganella from H-16 isolate; lane M, mitochondrial fraction. Upper lanes indicate fungal isolate. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 90kDa is indicated with arrow.

は不溶性画分に存在した。不溶性画分を、低張バッファーで洗浄することによって相同タンパク質は失われてしまい、2% Triton X-100によって可溶化することから (Fig. 10)、相同タンパク質は細胞内小器官に含まれていると考えられた。pRS64はその所在がミトコンドリア内在性であることから、pRS224も同様にミトコンドリア内在性である可能性が考えられたため、ショ糖密度勾配で精製したミトコンドリア画分に関して検討したところ、H-16菌株では約90kDaの相同タンパク質が検出されたが、BV-3菌株には存在しなかった (Fig. 11)。

(3) まとめ

本研究では *R. solani* の保持するプラスミドの機能について解析を行うため、AG4とAG2-2に属する菌株を供試して、プラスミドにコードされたタンパク質と相同性のあるタンパク質について検討した。AG4から検出されたタンパク質はプラスミドから翻訳されたものではなく、ゲノム上の相同配列から翻訳されている可能性が示唆された。AG2-2で検出された相同タンパク質は所在や分子量

から、プラスミド上のORFの翻訳産物と考えられた。本研究で供試した2つの菌糸融合群に関して、相同タンパク質の由来が両者で異っていたことから、他のAGに関しても、プラスミドにコードされたタンパク質の発現とゲノム上に存在するプラスミドとの相同配列について検討を行うことで、プラスミドを保持することにより*R. solani*が受ける影響について解明されるものと期待される。

論文審査結果要旨

Rhizoctonia solani は多犯性の植物病原糸状菌であり、恒常的に土壌に存在し、条件的寄生生活をおこなうことや、耐久体の寿命が長いことから難防除土壌病害の 1 つとされる。本菌は菌糸融合群 (Anastomosis Group: AG) によって類別され、日本ではこれまでに AG 10 までが知られている。AG 1 から AG 6 までは各群ごとに特有の配列と大きさのプラスミドを保持しており、転写物と思われる相同 RNA が検出されている。本研究ではこれらプラスミドの機能について明らかにするために、AG 4 と AG 2-2 のプラスミド、pRS64 と pRS224 がコードした新規タンパク質 (RS64, RS224) の菌体内での発現と、その所在について検討した。

AG 4 では、プラスミドの有無に関わらず、RS64 のコード領域と相同な 1.2kb の RNA が見出された。プラスミドを保持しない菌株のゲノム上にプラスミドと相同な配列が見出された。RS64-1 に対するモノクローナル抗体によって、プラスミドの有無に関わらず約 12kDa の相同タンパク質が見出された。相同タンパク質は細胞壁に存在し、糖鎖の修飾は受けておらず、等電点は pI11 付近と推定された。アミノ酸シーケンス解析によって、C 末端の 4 アミノ酸配列と内部の 7 アミノ酸配列が得られたが、RS64 と相同な配列は見いだせなかった。

AG 2-2 ではプラスミドを保持した菌株からのみ RS224 のコード領域を含む 7.4kb と 4.7kb の相同 RNA が見出された。RS224 を 3 等分して、GST との融合タンパク質として発現させ、マウスに免役しポリクローナル抗体を作製した。プラスミドを保持する菌株からのみ大きさ約 90kDa の相同タンパク質が検出され、細胞内小器官に所在している可能性が示唆された。

RS64 と RS224 の相同タンパク質は発現形式、所在が異なっていた。本実験で見出された相同タンパク質の生物学的活性に関して更に検討することによって、*R. solani* の表現型に与えるプラスミドの影響について明らかになるものと期待される。

以上の結果は植物病原糸状菌の生理的、遺伝学的解析に有効な解析であり、また本菌の類別、あるいは遺伝学的背景を考察する上でも意義が大きいと思われ、博士 (農学) の学位を授与するに値すると判断した。