

*Phytophthora nicotianae* のマスティゴネマ構成タンパク質 14B7の遺伝子解析山田 周平<sup>1</sup>, 有川 幹彦<sup>2</sup>, L. M. BLACKMAN<sup>3</sup>, A. R. HARDHAM<sup>3</sup>, 洲崎 敏伸<sup>1</sup>( <sup>1</sup>神戸大・理・生物, <sup>2</sup>高知大・医・循環制御,  
オーストラリア国立大学・生物科学研究所)Gene analysis of a mastigoneme protein 14B7 in *Phytophthora nicotianae*Shuhei YAMADA<sup>1</sup>, Mikihiko ARIKAWA<sup>2</sup>, Leila M. BLACKMAN<sup>3</sup>,  
Adrienne R. HARDHAM<sup>3</sup> and Toshinobu SUZAKI<sup>1</sup>( <sup>1</sup>Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ., <sup>2</sup>Dept. Physiol., Kochi Med. Sch.,  
<sup>3</sup>Plant Cell Biol. Group, RSBS, The Australian National Univ.)

## SUMMARY

The oomycete plant pathogen *Phytophthora nicotianae* parasitizes the roots of a wide range of plant species. *Phytophthora* releases biflagellate zoospores, which swim chemotactically to new hosts. The zoospores have threadlike projections called tubular mastigonemes on their anterior flagella. To analyse the role of mastigonemes in flagellar motility, we purified 14B7 protein, a constituent of the mastigonemes in *P. nicotianae*, by immunoprecipitation with a monoclonal antibody directed towards 14B7. N-terminal and internal amino acid sequences were obtained by protein sequencing of 14B7. Based on multiple alignment with sequences deduced from homologous genes and ESTs found in other *Phytophthora* species, we designed several degenerate primers and obtained sequence data for a 300-bp DNA fragment of the *P. nicotianae* gene encoding 14B7. This PCR fragment was used to isolate a 14B7-containing BAC clone from a *P. nicotianae* genomic library.

[目的] *Phytophthora* (エキビョウキン属) は不等毛植物門卵菌綱, あるいはクロミスタ界卵菌門に分類される生物である。*Phytophthora* は数多くの植物の根に寄生し, 寄生した植物を枯らしてしまうため, 今なお世界中で甚大な被害をもたらしている。特に *Phytophthora nicotianae* は多種の *Phytophthora* に比

べてより多くの植物に感染する能力を有しているため, 農作物などへの被害も計り知れない。*Phytophthora* は宿主の根に自らの放出した接着物質によって付着し, 寄生しているが, 宿主の栄養が無くなると, 宿主間を移動するために遊走子を放出する。この遊走子は2本の鞭毛を持っており, 前方の

鞭毛にはマスティゴネマと呼ばれる付属枝が配列している。この遊走子は水分を含む土壌中を自由に泳ぐ事ができ、この運動機構こそが *Phytophthora* による植物への感染被害を甚大なものとしている大きな要因である。マスティゴネマはストラメノパイル属に属する多くの生物で観察されているが、その役割、機構はいまだ明らかにされていない。そこで本研究では *Phytophthora* の鞭毛による運動機構の解明、特に鞭毛の推進力発生に関するマスティゴネマの役割を分子レベルで明らかにする事を目的とした。

**[方法]** 本研究では *Phytophthora nicotianae* という種を用い実験を行った。この種においては、すでに14B7マスティゴネマタンパク質に対するモノクローナル抗体が有川らによって作成されている。このモノクローナル抗体を用いて細胞の破砕物を免疫沈降し、14B7タンパク質を精製し、さらにその N-末端の10アミノ酸残基を決定した。加えて、内部配列の23アミノ酸残基を決定し、これらのアミノ酸残基をもとにすでに多くの遺伝子が報告されている *Phytophthora sojae* のゲノムデータベースに BLAST 検索を行った。これらの遺伝子配列に共通性の高かった領域をいくつか選択し、degenerate primer を作成し、*Phytophthora nicotianae* の菌糸状態のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、14B7遺伝子の内部配列の一部を決定した。菌糸細胞からの DNA の抽出には、液体培養後2週間以上経過した株を用いた。さらに、得られた部分配列をプローブとし、*Phytophthora nicotianae* の BAC ライブラリーからのスクリーニングを行い、14B7遺伝子のほぼ全長を決定した。

**[結果と考察]** 作成した14B7モノクローナル抗体は、免疫蛍光顕微鏡観察により、*Phytophthora nicotianae* 遊走子の前鞭毛に存在するマスティゴネマに

存在するタンパク質由来のものである事が確かめられた。このモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った結果、目的とする単一のバンドが得られた。その後、14B7タンパク質の N-末端の10アミノ酸残基を決定し、さらにその内部配列23アミノ酸残基を決定した。そして *Phytophthora nicotianae* 14B7タンパク質の内部配列の23アミノ酸残基をもとに BLAST 検索をかけたところ、2つの *Phytophthora sojae* 遺伝子がこのアミノ酸配列を含んでいることが明らかになった。これら2つの遺伝子をさらに他種の *Phytophthora* についても検索したところ、合計4つの14B7タンパク質のホモログ遺伝子と2つの EST が検出された。これらの配列をアラインメント解析したところ、非常に保存性の高い領域が複数確認されたため、それらの部分を用いて degenerate primer を作成した。ヒットした2つの *Phytophthora sojae* 遺伝子のアミノ酸配列について、さらに NCBI BLAST により検索を行った結果、もっとも高い相同性を持つ遺伝子として、同じストラメノパイル群に属する珪藻、*Thalassiosira weissflogii* の sexually induced protein2 (Sig2) mRNA が検出され、その相同性は30%であった。またこのタンパク質は真核生物細胞外マトリックスタンパク質であるテイネシンの EGF ドメインとも相同性を有しているという報告もなされている。14B7遺伝子の全長を決定するため、*Phytophthora nicotianae* の BAC ライブラリーからのスクリーニングによりクローニングを行っている。今までのところ、約900塩基の解読ができており、少なくとも *P. nicotianae* においてはこの遺伝子が新規の遺伝子であることがわかった。また *P. sojae* のホモログ遺伝子との比較により、14B7遺伝子の推定長は約1200塩基と考えられる。また、BLAST 検索により得られた配列と他の生物の類似遺伝子との相同性を探ったところ、マウスの Tnc 遺伝子 (テイネシン C) が最も高い相同性を示した。