

2023 年度  
創発的研究支援事業 年次報告書

研究担当者	田中茂幸
研究機関名	摂南大学
所属部署名	農学部
役職名	講師
研究課題名	植物病原菌エフェクタータンパク質輸送機構の分子基盤
研究実施期間	2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日

### 研究成果の概要

植物病原菌であるトウモロコシ黒穂病菌は細胞外小胞を分泌し、その内部には多様なタンパク質や RNA が含まれている。これらの分子は植物細胞に送り込まれ、細胞の機能変化を引き起こすことで寄生が確立すると考えられる。本研究課題では、これらの分子が植物細胞に取り込まれる際、細胞外小胞膜と植物細胞膜との融合を介しているという仮説をもとに、この融合に関わることが期待される細胞外小胞膜上のタンパク質 ILP1 と相互作用する植物タンパク質の同定を試みている。

1 年次では、HA タグを付加した ILP1 を発現する菌株を作出し、感染葉から ILP1 を bait として植物タンパク質の共免疫沈降を行った。免疫沈降物についてプロテオーム解析を行い、候補となる植物タンパク質を探索した。膜融合を媒介するという仮説から、植物タンパク質としては細胞膜上に局在する膜タンパク質の存在を期待していたが、これに合致する候補は得られなかった。可能性として、タンパク質間相互作用が一過性であることや、結合強度の弱さなどが考えられた。

この点を克服するため、次に、改変ビオチンリガーゼである TurboID を利用した近接標識法を行った。ILP1 の N 末端側（細胞外小胞の外側に露出した領域）に TurboID を付加したタンパク質を発現する菌株を作出し、この感染葉からビオチン化されたタンパク質を、ストレプトアビジンビーズを用いて回収した。ビオチン化タンパク質が回収されていることは、Streptavidin-HRP を用いたウェスタンブロットにより確認した。ビオチン化タンパク質についてプロテオーム解析を行い、候補タンパク質を探索した。しかし、細胞膜上に局在する膜タンパク質は得られなかった。

感染葉を用いた実験では、ILP1 のタンパク質量自体が相互作用タンパク質を得るには不十分な可能性も考えられる。次年度では、植物細胞で ILP1 を一過的に大量発現させることで十分量を確保し、この細胞から相互作用タンパク質を得る実験系を作り、解析を試みたい。