

学 位 論 文 題 名

いもち病菌の日本菌系における遺伝子解析系の確立

および病原性レース変異機構解析への応用

学位論文内容の要旨

いもち病はイネの全ての栽培地域に見られる最重要病害である。いもち病はその病原子のう菌いもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) がイネに寄生することによって起こり、特に穂首に発生した場合には白穂となり、著しい減収をもたらす。本病害の防除の為に、いもち病抵抗性のイネの育種が試みられ、効果が見られているが、それは恒久的なものではなく、新たな病原性を獲得した病原菌により、しばしば抵抗性の崩壊が報告されている。いもち病菌のイネ品種に対する宿主特異性は、病原性レースで表されており、この病原菌における病原性の獲得は新レースの出現として表現できる。その原因として病原性レースの変異が挙げられているが、その変異の発生機構についてはほとんど解明されていない。

その解明のために、日本のいもち病菌は研究材料として適している。まず、日本のいもち病菌病原性レース判別体系はイネのいもち病抵抗性遺伝子に対応しており、イネのいもち病抵抗性に関する研究の蓄積がある。この体系に即した研究を行うことにより、その研究の蓄積を活用することができる。さらに、日本では圃場における抵抗性遺伝子の導入及びその崩壊が報告されており、圃場での抵抗性の崩壊に直接関連した研究材料である。また日本は地理的に隔離された農業環境にあり、いもち病菌が独自の進化をたどったことが期待できるからである。

そこで、本論文では日本のいもち病菌を用いた病原性レース変異機構の解明の為に遺伝子解析系の確立を試みた。内容の要約は以下の通りである。

1. いもち病菌の交配実験系の確立

Florの遺伝子対遺伝子説によると、病原性レースは、非病原性遺伝子によって支配されている。その様な産物が未知の遺伝子の解析には、交配実験系が不可欠である。当研究室保存の日本産イネいもち病菌の中から雌性機能のあるイネいもち病菌Guy11と交配可能である菌株を検索した。その結果、Ina168との交配 (cross2107) で、36株の交配後代を得ることができた。次にこの交配を使ってカスガマイシン耐性遺伝子をモデルとした遺伝解析を行ったところ、カスガマイシン耐性はcross2107で1:1に分離し、1つの遺伝子*ksr-1*によって支配されていることがわかった。Bulked Segregant Analysisにより得た2つの*ksr-1*に密接に連鎖したRAPDマーカーOPA-11, OPG-06の解析の結果、RFLPマーカーの分離比から、この交配が地図作成には不适当であることが示された。cross2107交配後代2107-33のGuy11への戻し交配cross5307からは、65株の後代が得

られ、遺伝子解析に相当であったので、*ksr-1*の遺伝子地図を作成した。*ksr-1*は、OPG-06, OPA-11からそれぞれ8.1, 23.8センチモルガンの距離であった。これにより、日本判別菌系の1つであるIna168を使って、稔性は低いが遺伝子解析可能な交配系が得られたことが示された。

2. いもち病菌圃場分離株の解析

DNAフィンガープリント解析とパルスフィールドゲル電気泳動法により、日本産イネいもち病菌圃場分離株の特徴付けを行った。まず菌株Ina72のゲノムDNAライブラリーからプローブpMG6015を得た。このプローブはMGR586とは別の反復配列を含んでいた。7種の日本判別菌系（1960年以前に分離）と17株の圃場分離株（1980年以降に分離）をpMG6015とMGR586をDNAフィンガープリント解析のプローブとして解析した。UPGMA法により作成した系統樹のブートストラップ解析により、2種のプローブによるDNAフィンガープリントに基づく系統樹が、いもち病菌系統の判定に相当であった。解析の結果、すべての菌株は5種のclonal lineage (JBLA-INA, JBLA-K04, JBLB-K33, JBLB-HK1, JBLC-P2B) に分けられた。ことに、JBLA-K04には、すべての圃場分離株が属しており、1960年から1980年にかけて、clonal lineageの単純化および、clonal lineage内での病原性レースの多様化が起こったことが示唆された。これといもち病抵抗性イネ品種の導入・抵抗性の崩壊との関係に興味をもたれる。

パルスフィールドゲル電気泳動による核型解析により、いもち病菌の核型がclonal lineage内でも多様であり、レースの菌株ごとに共通性があることが示された。これにより、clonal lineage内でのレース分化に、染色体長の変化（再編成）が関与している可能性が示された。

3. RFLPプローブpMG6015の塩基配列解析

pMG6015と同様の配列を持つクローンを、イネいもち病菌Ina72の λ EMBL3ライブラリーよりスクリーニングし、解析したところ、この反復配列の中心的配列であると思われる0.7 kbの反復配列が発見され、MGSR1とした。MGSR1の塩基配列を決定したところ、RNAポリメラーゼIIIプロモーターを持つレトロポゾンの特徴を示した。また、パルスフィールドゲルのサザンブロット解析により、MGSR1は全ての染色体上に存在していることが示された。これらレトロポゾン等の転移因子は、レース変異の原因であるいもち病菌の遺伝子の不安定性あるいは易変異性、ゲノムの多様性に関与していることが期待される。

4. イネいもち病菌Ina168の染色体長変異の解析

イネいもち病菌Ina168の保存菌株中に、染色体長変異株を発見した。パルスフィールドゲル電気泳動による解析において、変異株は親株よりも1本多い7本のバンドからなる核型を示した。親株の核型を α 、変異株の核型を α' とし、変異株に現れた新たな約5Mbの長さの染色体を ν 染色体とした。この変異はDNAフィンガープリントのパターンや品種特異的病原性、交配能に影響を与えなかった。一連の単孢子分離実験により、この変異が1回の単孢子分離において12.5%の高頻度で $\alpha \rightarrow \alpha'$ の方向にしか起こらないことが示された。サザンブロット及び2次元ゲル電気泳動解析により、 ν 染色体は核型 α のバンドIIIbの一部が欠失することにより生じたことが示唆された。また、rDNAがこの染色体再編成に関与している可能性が示された。いもち病菌において、このような染色体長変異が直接観察されたのは初めてであり、いもち病菌の染色体再編成の機構の解明への応用に期待がもたれる。

以上の結果は、日本産イネいもち病菌の遺伝子解析系を確立したのみならず、その

病原性レース変異機構解明への応用の指針を与えている。今回確立された実験系により多くの新たな知見が得られ、いもち病菌の遺伝子変異機構にもとづく新たな防除法の確立に寄与することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 内 藤 哲

副 査 教 授 上 田 一 郎

学 位 論 文 題 名

いもち病菌の日本菌系における遺伝子解析系の確立 および病原性レース変異機構解析への応用

本論文は和文122頁，図33，表24，引用文献64，緒論，和文および英文総括からなり，ほかに参考論文17編が付されている。

いもち病は子のう菌いもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) がイネに寄生することによって起こるイネの最重要病害である。本病害の防除の為に，いもち病抵抗性のイネの育種が試みられ，効果が見られているが，新たな病原性を獲得した病原菌による抵抗性の崩壊が問題となっている。いもち病菌のイネ品種に対する宿主特異性は，病原性レースで表されており，この病原菌における病原性の獲得は新レースの出現として表現できるが，その原因の病原性レースの変異の発生機構についてはほとんど解明されていない。

その様な背景の中で，本研究は日本のいもち病菌を用いた病原性レース変異機構の解明の為に遺伝子解析系の確立を試みたものである。

第1章，緒論ではいもち病菌遺伝子の研究史，研究目的について述べられている。

第2章，いもち病菌の交配実験系の確立について述べられ，下記の内容が含まれている。

1. 当研究室保存の日本産イネいもち病菌の中から交配可能である菌株を検索し，2つの交配cross2107及びcross5307を得た。
2. 上記の交配を使ってカスガマイシン耐性遺伝子をモデルとした遺伝解析を行い，カスガマイシン耐性遺伝子 *ksr-1* を定めた。
3. RAPDマーカーOPA-11，OPG-06及びRFLPマーカーの解析より，*ksr-1*の遺伝子地図を作成し，この交配の有用性を示した。

第3章，いもち病菌圃場分離株の解析では，DNAフィンガープリント解析とパルスフィールドゲル電気泳動法による解析について述べられ，下記の内容が含まれている。

1. 菌株Ina72のゲノムDNAライブラリーからプローブpMG6015を得た。
2. 7種の日本判別菌系と17株の圃場分離株をpMG6015とMGR586をDNAフィンガープリント解析のプローブとして解析し，pMG6015が有用であること，5種のclonal lineage (JBLA-INA, JBLA-K04, JBLB-K33, JBLB-HK1, JBLC-P2B) の存在を示した。さらに，1960年から1980年にかけて，clonal lineageの単純化および，clonal lineage内

での病原性レースの多様化が起こったことを明らかにした。

3. パルスフィールドゲル電気泳動による核型解析により、いもち病菌の核型がclonal lineage内でも多様であり、レースの菌株ごとに共通性があることを示した。

第4章、RFLPプローブpMG6015の塩基配列解析では、MGSR1というトランスポゾン様因子の発見について述べられ、下記の内容が含まれている。

1. pMG6015と同様の配列を持つλEMBL3ライブラリーのクローンを解析し、この反復配列の中心的反復配列であるMGSR1が発見された。

2. MGSR1の塩基配列を決定したところレトロポゾンの特徴を示した。また、MGSR1は全ての染色体上に存在していることが示された。

第5章、イネいもち病菌Ina168の染色体長変異の解析では、染色体長変異の基本的な特徴について述べられており、下記の内容が含まれている。

1. イネいもち病菌Ina168の保存菌株中に、染色体長変異株を発見し、親株の核型を α 、変異株の核型を α' とし、変異株に現れた新たな約5Mbの長さの染色体を v 染色体とした。

2. 一連の単孢子分離実験により、この変異が1回の単孢子分離において12.5%の高頻度で $\alpha \rightarrow \alpha'$ の方向にしか起こらないことが示された。

3. サザンブロット及び2次元ゲル電気泳動解析により、 v 染色体は核型 α のバンドIIIbの一部が欠失することにより生じたこと、及びrDNAがこの染色体再編成に関与している可能性が示された。

以上の結果は、日本産イネいもち病菌の遺伝子解析系を確立したのみならず、その病原性レース変異機構解明への応用の指針を与えている。今回確立された実験系により多くの新たな知見が得られ、いもち病菌の遺伝子変異機構にもとづく新たな防除法の確立に寄与することが期待される。

よって、審査員一同は別に行った最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者 曾根 輝雄 は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。