

ジャガイモ疫病菌の交配型特異的遺伝子転写物 および形質転換系に関する基礎的研究

学位論文内容の要旨

ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) は卵菌類に属する土壌伝染性の病原菌であり、ジャガイモやトマトに重大な病害を引き起こす。ジャガイモ疫病菌はヘテロタリクスの菌であり、有性生殖器官である卵胞子の形成に異なる 2 つの交配型 (親和性型) を必要とする。交配型の機構についてはほとんど明らかになってはおらず、これを解明することは本菌の生態や生活環あるいは糸状菌における形態形成を理解する上で重要である。本研究では、cDNA-RDA 法 (cDNA-Representational Difference Analysis) で得られた *P. infestans* の A2 菌株で特異的に転写される遺伝子の cDNA クローンの性質を調べるために、これらクローンをプローブとしてノーザン、サザンブロット解析を行った。この cDNA クローンは交配時に特異的に転写活性が高まる遺伝子の cDNA を cDNA-RDA 法で分離する際に得られた副産物である。また土壌や罹病植物の組織内のモニタリングだけでなく、卵胞子形成機構や遺伝形式の研究に利用することを目的として、非常に困難とされている *P. infestans* の形質転換系の確立を試みた。

P. infestans の mRNA から cDNA-RDA をへて分離されたクローンからサブトラクション cDNA ライブラリーを作製し、そこから選抜した 54 のクローンからさらに A2 特異的に転写が認められた 4 つの遺伝子の cDNA クローンについて検討した。cDNA クローン cET53、59、105、110 をプローブとして用いた日本の 6 菌株 (A1: E009, IB008s, DN122s; A2: TB201, OB996, F956) に対するノーザンブロット解析では、A2 全菌株で転写のシグナルが認められた。一方、全ての A1 菌株で転写は認められなかった。また、cET59、105、110 をプローブとして用いたサザンブロット解析では、多数のシグナルが認められ、そのシグナルパターンは交配型、菌株間で大きな違いは認められなかった。このことから、これらの遺伝子は *P. infestans* の A1、A2 両者に同様に存在するが、転写の段階で何らかの制御を受けており、A2 でのみ転写されている可能性が考えられた。cET53 でのサザンブロット解析では、A1 あるいは A2 それぞれに特異的なシグナルが確認された。日本菌株を含めた 8 菌株 (A1: HK2, CHA-2, TW15-2, IND4-1; A2: T605, CHK-1, K4, 550) に対する同じプローブを用いたノーザンブロット解析でも A2 菌株で転写が認められた。例外として、cET59、105、110 をプローブとしたノーザンブロット解析では、A1 菌株の

CHK-1 にもシグナルが認められた。また、A2 の 550 のシグナルは他の A2 菌株に比べて弱かった。cET59、105、110 をプローブとしたサザンブロット解析では、日本菌株の場合と同様に、多数のシグナルが認められ、そのシグナルパターンは交配型、菌株間で大きな違いは認められなかった。cET53 では CHK-1 と CHA-2 が同様のバンドを示し、550 のシグナルパターンは他の菌株とは異なるものであった。ヘテロタリックの *Phytophthora* 属菌、*P. palmivora*、*P. nicotianae*、*P. capsici* の A1、A2 交配型菌株に対して同じプローブを用いたノーザンブロット解析では、A1、A2 両交配型で転写のシグナルが認められず、比較のために供試した *P. infestans* の A2 交配型の菌株でのみシグナルが認められた。以上の結果より、これらの遺伝子は、*P. infestans* の A2 でのみ転写されている可能性が考えられた。いくつかの A1 菌株と A2 菌株の組み合わせで対峙培養を行い、卵胞子 (有性生殖器官) 形成の能力を調べた。A2 を 550 とした時、供試した全ての A1 菌株との組み合わせで卵胞子形成が認められなかった。この菌株は 1993 年の時点では卵胞子を形成していた菌株であり、その後卵胞子 (有性生殖器官) を形成、あるいは形成を誘導する能力が欠失 (あるいは著しく低下) している可能性が示唆された。cET クローンのシーケンスデータを基に検索プログラム FASTA を使用して、塩基配列のホモロジーを GENBANK データベースから検索した。cET53 は *P. parasitica* var. *nicotianae* のエリシターのタンパク質をコードする mRNA の 236 bp にわたって高い相同性を示した (E=0)。また、cET59 は *Lytechinus variegatus* (ウニ) の β カテニン遺伝子をコードする mRNA の 94 bp にわたって相同性を示した (E=0.087)。cET105、110 はそれぞれ *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) のゲノム DNA ライブラリーのクローンに相同性を示した (それぞれ E=0.0094、0.046)。しかし、RDA によって得られる cDNA は *Sau3AI* によって完全分解されているためサイズが小さく、完全長クローンの分離、シーケンスが必要と思われた。

形質転換実験においては、*P. infestans* の A2 菌株 E954 の菌糸由来のプロトプラストや遊走子に対して直接導入法の一つであるエレクトロポレーションを用いて GUS 遺伝子やハイグロマイシン耐性遺伝子の導入を試みたが、形質転換体は得られなかった。高電圧パルスの印加によるプロトプラストや遊走子の死滅が認められた。一方、遊走子のう発芽菌糸由来のプロトプラストを用いた 3 回のリポフェクション (正電荷のリン脂質による形質転換法) の実験でネオマイシン耐性遺伝子の導入を試みたところ、一次選抜では 40 株が得られたが、2 次選抜では 5 株のみ得られた。35 株は染色体に外来遺伝子が組み込まれない、一過性の発現をしていたものと考えられた。2 次選抜で得られた 5 株では PCR により目的の遺伝子 (ネオマイシン耐性遺伝子) が *P. infestans* の細胞内に存在することが確認された。また、サザンブロット解析により外来遺伝子は染色体 DNA にシングル、あるいはタンデムコピーで組み込まれたことが認められた。また、ノーザンブロット解析によりネオマイシン耐性遺伝子遺伝子の転写を確認した。染色体に導入されたプラスミド数と転写量の間に相関は認められなかった。形質転換体は、菌糸伸長、遊走子のう形成数、卵胞子の形成数に野性株との差は認められなかった。野性株は

geneticin を 10 μ g/ml 添加した培地でほとんど菌糸伸長は認められなかったが、形質転換体は 50 μ g/ml の濃度でもほとんど影響されなかった。形質転換体は野性株同様ジャガイモ塊茎スライスに対する病原性が認められた。*P. infestans* の形質転換の成功により、感染植物体内における本菌の存在のモニタリングや、交配後代における遺伝形質のマーカーとしての利用等が可能になった。形質転換法をさらに改良し、形質転換効率を向上させることが今後の課題である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 越 明

副 査 教 授 小 林 喜 六

副 査 助 教 授 近 藤 則 夫

学 位 論 文 題 名

ジャガイモ疫病菌の交配型特異的遺伝子転写物 および形質転換系に関する基礎的研究

本論文は和文で記され、図 32、表 4、図版 2 を含む総頁数 141 からなり、7 章で構成されている。

ジャガイモやトマトに重大な病害を引き起こす、ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) はヘテロタリックの菌であり、有性生殖器官である卵胞子の形成に異なる 2 つの交配型 (親和性型) を必要とする。本研究では、*P. infestans* の A2 菌株に特異的に転写が認められる遺伝子の cDNA クローンの性質を調べることを目的とし、ノーザン、サザンブロット解析を行った。また土壌や罹病植物の組織内のモニタリング・卵胞子形成機構や遺伝形式の研究に利用することを目的として、非常に困難とされている *P. infestans* の形質転換系の確立を試みた。

cDNA-RDA 法によって得られた A2 に特異的に転写が認められた 4 つの遺伝子の cDNA クローンについて検討した。cDNA クローン cET53、59、105、110 をプローブとして用いた日本の 6 菌株に対するノーザンブロット解析では、用いた全ての A2 菌株で転写のシグナルが認められた。一方、全ての A1 菌株では転写は認められなかった。また、cET59、105、110 をプローブとして用いたサザンブロット解析では、多数のシグナルが認められ、そのシグナルパターンは交配型、菌株間で大きな違いは認められなかった。このことから、これらの遺伝子は *P. infestans* の A1、A2 両者に同様に存在するが、転写の段階で何らかの制御を受けており、A2 でのみ転写されている可能性が考えられた。cET53 でのサザンブロット解析では、A1 と A2 菌株間で明らかに異なるシグナルが確認された。日本菌株を含めた外国の 8 菌株に対する同じプローブを用いたノーザンブロット解析でも A2 菌株に転写が認められた。例外として、cET59、105、110 をプローブとしたノーザンブロット解析で、A1 の 1 菌株にもシグナルが認められた。cET59、105、110 をプローブとしたサザンブロット解析では、日本菌株での場合と同様に、多数のシグナルが認められ、そのシグナルパターンは交配型、菌株間で大きな違いは認めら

れなかった。cET53 では 菌株間で異なるシグナルパターンが認められた。ヘテロタリックの *Phytophthora* 属菌、*P. palmivora*、*P. nicotianae*、*P. capsici* の A1、A2 菌株に対するノーザンブロット解析では、A1、A2 両者で転写のシグナルが認められなかった。以上の結果より、これらの遺伝子は、*P. infestans* の A2 でのみ転写されている可能性が考えられた。これらのクローンのシーケンスデータを GENBANK データベースで検索した結果、cET53 は *P. parasitica* var. *nicotianae* の糖タンパクエリシターをコードする遺伝子の一部と高い相同性を示した (E=0)。また cET59 は *Lytechinus variegatus* (ウニ) の β カテニン遺伝子の一部と相同性を示した (E=0.087)。しかし、さらに有意性のあるデータを得るには完全長クローンのシーケンスが必要と思われた。

形質転換実験においては、*P. infestans* A2 菌株 E954 の遊走子のう発芽菌糸由来のプロトプラストを用い、リポフェクションによってネオマイシン耐性遺伝子を持つベクターを導入し、5 つの形質転換体を得られた。これらの染色体 DNA に目的の遺伝子が組み込まれていることが、PCR・サザンブロット解析により確認された。また、ノーザンブロット解析により目的遺伝子の転写が確認された。染色体に導入されたプラスミド数と目的遺伝子の転写量の間に相関は認められなかった。これらの形質転換体は、菌糸伸長、遊走子のうの形成数、卵胞子の形成数に野性株との差は認められなかった。野性株は geneticin を 10 μ g/ml 添加した培地ではほとんど菌糸伸長は認められなかったが、形質転換体は 50 μ g/ml の濃度でもほとんど影響されなかった。形質転換体は野性株同様ジャガイモ塊茎スライスに対する病原性をもつことが認められた。*P. infestans* の形質転換の成功により、感染植物体内における本菌の存在のモニタリングや、交配後代における遺伝形質のマーカーとしての利用等が可能になった。形質転換法をさらに改良し、形質転換効率を向上させることが今後の課題である。

以上の結果は、学術上、応用上貢献するところ大きく、高く評価される。よって審査員一同は、藤井直哉が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。