

学 位 論 文 題 名

日本産イネいもち病菌における
宿主特異性変異に関連した DNA 領域の解析

学位論文内容の要旨

イネの最重要病害の 1 つイネいもち病は、子のう菌類に分類されるいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) によって引き起こされる。本菌の特徴である宿主特異性 (host specificity) は、本菌の非病原性遺伝子 (avirulence gene) と、イネのいもち病抵抗性遺伝子 (resistance gene) と相互作用することにより、イネの抵抗性反応が誘導され、決定されるが、詳細な抵抗性反応誘導機構は十分には解明されていない。また、これまで、いもち病抵抗性遺伝子を持つイネが育種・導入されてきたが、数年で抵抗性の崩壊が起き、それらに感染できる菌の出現が大きな問題となっている。この現象は、非病原性遺伝子の変異が原因となっていると考えられているが、詳細に解析された非病原性遺伝子が極めて少ないため、その変異機構の解析も十分に行われていない。このように、いもち病の恒久的な防除のためには、非病原性遺伝子を中心とした、本菌とイネの相互作用機構の理解が重要と考えられる。

本研究では、いもち病菌の宿主特異性の解析を目的として、日本産イネいもち病菌 Ina168 株を用いて非病原性遺伝子のクローニングを行った。Ina168 株は、日本産判別菌系の 1 つであり、日本産レース判別標準イネ品種の抵抗性遺伝子と 1:1 で対応する非病原性遺伝子を持つということから、非病原性遺伝子と抵抗性遺伝子の直接的な相互関係を解析することが可能であるという特徴がある。また、日本産菌株であることから、研究成果の本邦圃場への迅速な還元が期待できる。

1. 日本産イネいもち病菌宿主特性変異株変異 DNA 領域の解析

RAPD 法により、日本産いもち病菌 Ina168 株のイネ品種愛知旭に対する宿主特異性変異株 Ina168 m95-1 株の変異領域の同定を行い、変異株特異的に欠失している単一コピーの DNA 断片 PM01 を得た。Ina168 株と外国産高稈性株 Guy11 株を祖先とするクロス 5307 交配後代における、愛知旭への宿主特異性の分離を調べたところ、非病原性と病原性の比は 1:1 となり、宿主特異性が 1 遺伝子支配であることが示唆された。また、サザン解析によりクロス 5307 交配後代における PM01 の分離と、非病原性遺伝子座の分離の連鎖を解析した結果、調べた 21 株において完全に連鎖しており、PM01 を含む領域に愛知旭に対する非病原性遺伝子が存在する確率が非常に高いと考えた。PM01 の周辺領域約 10 kb の解析を行い、宿主特異性変異株において PM01 を含む約 6.5 kb の領域が欠失していることを示唆する結果を得た。この領域には 1746 bp

の ORF が存在しており、新規タンパク質をコードする遺伝子と考えられた。その周辺には反復配列が存在しており、新規 DNA 型トランスポゾン様配列も存在し、この配列を *Occan* と命名した。また、既知の遺伝子の一部が反復配列と混在したモザイク領域も存在し、トランスポゾンや反復配列の関わるゲノムの再編成がこの領域の欠失に関与している可能性が示唆された。

欠失領域は反復配列に囲まれていたため、実際には更に広い領域が欠失しているという可能性を考え、Inal68 のコスミドライブラリーから、PM01 断片を含む 3 つのコスミドクローンを得た。これら 3 クローンを宿主特異性変異株に形質転換したところ、コスミドクローン 46F3 で形質転換体 8 株のうち、3 株で宿主特異性の相補が見られた。よって、このクローンに愛知旭に対する非病原性遺伝子 *AVR-pia* が存在すると考えた。インサートの全塩基配列を決定したところ、既知のトランスポゾンがクラスターを形成していた。また、既知の非病原性遺伝子のプロモーター領域に存在する反復配列も存在した。これらのことから、この領域は組換え等の起点となりうる反復配列の多い不安定な構造を示し、非病原性遺伝子の欠失に関与している可能性が示唆された。反復配列の他に、糸状菌や放線菌の α -L-arabinofuranosidase 遺伝子とホモロジーを示す配列が存在した。EST 解析の結果、イネの細胞壁を単一炭素原とした条件化で、 α -L-arabinofuranosidase 遺伝子ホモログは発現していたが、1746 bp の ORF は発現していなかった。このことから、更なる遺伝子の絞込みが必要ではあるものの、 α -L-arabinofuranosidase 遺伝子ホモログが非病原性遺伝子である可能性が考えられた。

本研究は Mutant-aided cloning 法により、これまで用いられてきた Map-based cloning 法の特殊な外国産菌株を用いなければならないという欠点を克服し、更に、病原性レース判別イネ品種の育成に用いられた日本産菌株いもち病菌から、病原性レース判別イネ品種の抵抗性遺伝子に 1:1 で対応した非病原性遺伝子を取得したという 2 つの画期的な成果が得られた。

2. いもち病菌新規 DNA 型トランスポゾン *Occan* の解析

宿主特異性変異株特異的に欠失した PM01 断片に隣接した領域から見つかった新規トランスポゾン *Occan* の詳細な特徴づけを行った。*Occan* は 2259 bp の ORF、63 bp の推定イントロンを含んでいた。77 bp の末端逆方向反復配列に隣接して TA の標的配列が存在した。ORF は既知の糸状菌のトランスポゾンファミリーである *Fot1* ファミリーとアミノ酸レベルで相同性を示したが、核酸レベルでは相同性を示さなかった。構造的な特徴から、*Occan* が *Fot1* ファミリーに属すると考えた。標的配列の周辺領域の塩基配列は、AT リッチな領域であった。逆方向反復配列の完全な一致や、標的領域が AT リッチであることは、これまでに報告されている *Fot1* ファミリーのいもち病菌 DNA 型トランスポゾン *Pot2*、*Pot3* と一致した。しかし、逆方向反復配列内に、これまで *Fot1* ファミリーで見られた同方向反復配列はなく、代わりにパリンδροーム配列が存在した。窒素飢餓培地で培養した Inal68 株と Guy11 株より抽出した mRNA を用いて RT-PCR を行った結果、*Occan* の窒素飢餓条件下での発現と、イントロンの存在が確認された。他の *Fot1* ファミリーのトランスポゼースとアミノ酸配列を比較したところ、*Occan* のトランスポゼースの内部と C 末端に、他の *Fot1* ファミリーには存在しないエクストラドメインが存在し、既知のトランスポゼースから遺伝的に最も遠く、新たなサブファミリーを形成している可能性が考えられた。*Occan* はいもち病菌の中では *Pot3* と同様、イネを宿主とするいもち病菌ゲノム中に

多く存在し、他の宿主の菌では少ないという宿主特異的保存が見られた。また、Ina168 の全ての染色体に存在した。

Occan は PM01 断片に隣接した DNA 領域から発見されたことから、宿主特異性変異への関与の可能性が考えられた。同時に *Occan* はその特徴から、転移活性を有していると考えられ、トランスポゾンタギングの材料としての可能性もあり興味深い知見である。

以上のように、本研究で得られた非病原性遺伝子とそれを取り巻くトランスポゾンの知見は、遺伝学的に新規なものであり、さらに、いもち病の防除に応用可能な、重要なものであるといえる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 教 授 内 藤 哲

学 位 論 文 題 名

日本産イネいもち病菌における 宿主特異性変異に関連した DNA 領域の解析

本論文は 7 章からなり、図 61、表 71、引用文献 86 を含む総頁数 176 の和文論文である。別に参考論文 2 編が付されている。

いもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) はイネの最重要病害いもち病の原因菌である。本菌の特徴である宿主特異性は、本菌の非病原性遺伝子に誘導され、決定されるが、詳細な抵抗性反応誘導機構は十分には解明されていない。また、非病原性遺伝子の変異によって起きるいもち病菌の宿主特異性変異が大きな問題となっている。

本研究では、いもち病菌の宿主特異性の解析を目的とし、日本産レース判別標準イネ品種の抵抗性遺伝子と 1:1 で対応する非病原性遺伝子を持つ日本産イネいもち病菌株を用いて非病原性遺伝子のクローニングを行った。また、いもち病菌の宿主特異性変異に関与すると考えられているトランスポゾンの本研究で発見された新規因子 *Occan* の詳細な解析を行った。

1. 日本産イネいもち病菌宿主特性変異株変異 DNA 領域の解析

RAPD 法により、日本産いもち病菌 Ina168 株のイネ品種愛知旭に対する宿主特異性変異株の変異領域の同定を行い、変異株特異的に欠失している単一コピーの DNA 断片 PM01 を得た。Ina168 株と外国産高稔性株 Guy11 株を祖先とするクロス 5307 交配後代における、愛知旭への宿主特異性の分離を調べたところ、非病原性と病原性の比は 1:1 となり、宿主特異性が 1 遺伝子支配であることが示唆された。また、サザン解析によりクロス 5307 交配後代における PM01 の分離と、非病原性遺伝子座の分離の連鎖を解析した結果、調べた 21 株において完全に連鎖しており、PM01 を含む領域に愛知旭に対する非病原性遺伝子が存在することが示唆された。PM01 の周辺領域 10 kb の解析を行った結果、新規 DNA 型トランスポゾンが発見され、この配列を *Occan* と命名した。

Ina168 のコスミドライブラリーから、PM01 断片を含む 3 つのコスミドクローンを得た。これらを宿主特異性変異株に形質転換したところ、コスミドクローン 46F3 の形質転換体 8 株のうち、3

株で宿主特異性の相補が見られた。よって、このクローンに愛知旭に対する非病原性遺伝子が存在すると考えた。インサート 38 kb の全塩基配列を決定したところ、既知のトランスポゾンと反復配列がクラスターを形成していた。よって、この領域は組換え等の起点となる反復配列の多い不安定な構造を示し、非病原性遺伝子の欠失に関与している可能性が示唆された。また、糸状菌や放線菌の α -L-arabinofuranosidase 遺伝子とホモロジーを示す配列が存在した。EST 解析の結果、イネの細胞壁により、 α -L-arabinofuranosidase 遺伝子ホモログの発現が誘導されていた。このことから、 α -L-arabinofuranosidase 遺伝子ホモログが非病原性遺伝子である可能性が考えられた。

2. いもち病菌新規 DNA 型トランスポゾン *Occan* の解析

宿主特異性変異株特異的に欠失した断片に隣接した領域から見つかった新規トランスポゾン *Occan* の詳細な特徴づけを行った。*Occan* は 2259 bp の ORF、63 bp の推定イントロンを含んでいた。77 bp の末端逆方向反復配列に隣接して TA の標的配列が存在した。ORF は既知の糸状菌のトランスポゾンファミリーである *Fot1* ファミリーとアミノ酸レベルで相同性を示したが、核酸レベルでは相同性を示さなかった。構造的な特徴とトランスポゼースの相同性から、*Occan* が *Fot1* ファミリーに属すると考えた。しかし、末端逆方向反復配列内に、*Fot1* ファミリーで見られる同方向反復配列はなく、代わりにパリンドロームが存在した。RT-PCR により、窒素飢餓条件下での発現と、イントロンの存在が確認された。他の *Fot1* ファミリーのトランスポゼースと比較したところ、*Occan* トランスポゼースの内部と C 末端に、他の *Fot1* ファミリーには存在しないエクストラドメインが存在し、既知のトランスポゼースから遺伝的に最も遠く、新たなサブファミリーを形成している可能性が考えられた。*Occan* は *Pot3* と同様、宿主特異的に保存されていた。*Occan* は PM01 断片に隣接した DNA 領域から発見されたことから、宿主特異性変異への関与の可能性が考えられた。同時に *Occan* はその特徴から、転移活性を有していると考えられ、トランスポゾンタギングの材料としての可能性もあり興味深い知見である。

以上のように、本研究で得られた非病原性遺伝子とそれを取り巻くトランスポゾンの知見は、遺伝学的に新規なものであり、さらに、いもち病の防除に応用可能な、重要なものであるといえる。

よって、審査員一同は、鬼頭 英樹が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。