

# ジャガイモ疫病菌の新 A1 遺伝子型および 交配時活性化型遺伝子 *mplI* に関する研究

## 学位論文内容の要旨

ジャガイモ疫病は植物病原菌 *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary によって引き起こされる病害であり、世界共通の重大な問題になっている。1980年代以降 *P. infestans* の遺伝子型の分布に世界的な変化が起こっており、日本においても同様であることが知られていた。

### 1. 日本における優占遺伝子型の解析

本研究ではまず日本における遺伝子型である US-1・JP-1・Japanese A1-A およびA1-Bの遺伝的形質を比較した。交配型、アイソザイム遺伝子型、ミトコンドリアDNAハプロタイプ、RG57プローブを用いた全DNAのRFLPフィンガープリントおよびAFLP多型について検討したところ、各遺伝子型間で特徴的な多型が認められた。RFLPフィンガープリントおよびAFLPではA1-BのシグナルのほとんどはA1-AとJP-1の両方あるいはそのどちらかに存在しており、A1-Bのみにユニークなものは存在しなかった。これらの結果、A1-BがA1-AとJP-1の交配の結果生じた可能性が示された。

### 2. Japanese A1-A の分布

次に1996年に中国河北省と甘粛省で採集した*P. infestans* 菌株の前述の形質を1997~2000年に採集した日本菌株と比較した。中国菌株は4つの遺伝子型に分けられ、そのうちの一つは日本の優占遺伝子型の一つであるA1-Aと完全に一致した。これまでの各地からの報告と照合した結果、A1-Aと完全に一致する菌がヨーロッパからロシア、シベリアにかけて広く分布していることがわかった。またそれらの分離年から、A1-Aの起源がヨーロッパである可能性が示された。A1-Aはその分布の広さと優占度から、かつて全世界的に分布していた遺伝子型、US-1に比肩する重要性を持つようになる可能性があると考えられた。

### 3. 遺伝子型を判定するためのDNAマーカーの作成

続いて、圃場で発生した *P. infestans* の遺伝子型をRFLPフィンガープリントに代って迅速に判定するためのDNAマーカーを作成することを試みた。OPG-6プライマーを用いたRAPDによって、日本に存在した遺伝子型のうちのUS-1・JP-1・Japanese A1-Bで特異的な増幅産物を得ることができた。特異的増幅産物 N650 fragment a をクローニングし、塩基配列を決定した。この配列を元に新たなプライマー BD1・BD2 を設計し、PCR を行なった。その結果 US-1 が530bp、JP-1 が580bp の1本の、そして A1-B では 530bp と 580bp の2本の増幅産物を生じた。増幅産物の特異性は菌

株間差ではなく、遺伝子型の違いに基づいていると考えられた。この N650 マーカーは日本に存在する US-1・JP-1・A1-B を識別することができたため、圃場分離株の迅速な遺伝子型判別およびこれらを用いた生態実験などの目的に有用であると考えられた。

#### 4. 交配時における遺伝子発現の変化

日本で *P. infestans* の交配が起こっていた可能性が指摘されたことから、交配時における遺伝子発現の変化について検討した。*P. infestans* において交配時に転写量が増加する mRNA のクローン cET58 を、サブトラクション法の一つである cDNA-RDA (representational difference analysis) 法によって分離した。cET58 をプローブとして、交配培養菌体 cDNA ライブラリから cET58L2 クローンを分離した。配列分析によって、cET58L2 は 1043bp のサイズであり、連続的な 786bp のオープンリーディングフレームを持っていることが示された。その推定アミノ酸配列は類似度 43.6%、Evalue  $5 \times 10^{-33}$  で *Fusarium solani* f.sp. *pisi* のペクチン酸リアーゼ D に類似しており、他のペクチン酸リアーゼにも類似していることが認められた。このクローンが由来する遺伝子を *mpl1* と命名し、そのタンパク質コード領域から新たにプローブ p58L を作成した。ノーザン解析の結果、*mpl1* 遺伝子の転写は交配後 5 日目に最高に達し、その後一定のレベルで推移することがわかった。サザン解析の結果、*mpl1* はゲノム中に少なくとも 10 コピーの類似する配列を持っており、これがマルチコピー遺伝子である可能性が示された。これらの結果から *mpl1* は *P. infestans* の交配時に転写量が増加するペクチン酸リアーゼをコードしている遺伝子であると考えられた。この酵素は植物病害の進展時に病原菌が植物体のペクチン酸を分解する上で重要なものであると考えられていることから、この遺伝子が *P. infestans* の病原性に影響している可能性が示唆された。さらに *mpl1* 遺伝子のゲノム DNA クローン ES8 は *mpl1* のタンパク質コード領域の一部を含んでおり、その上流域に TATA box と思われる部分が存在していた。しかし ES8 は cET58L2 とは完全に一致しない部分があることから、*mpl1* のマルチコピーの一つである可能性があると考えられた。

#### 5. *P. infestans* の形質転換

続いて遺伝子研究の方法として重要な遺伝子導入実験を行なうための条件設定として、*P. infestans* の形質転換法について検討した。A1 交配型菌株 98A8 から、リポフェクション法によってハイグロマイシン耐性遺伝子 *hpt* および  $\beta$ -glucuronidase 遺伝子 *gusA* を導入した形質転換株 A8g3 を得た。プロトプラストには菌糸細胞由来のものを用い、細胞壁分解酵素を既報のものから改変した結果、プロトプラスト生成数を増加させることができた。形質転換株 A8g3 は GUS 発色反応により細胞質が明確に青色に発色し、顕微鏡下で単細胞を容易に識別することができた。この形質転換株を用いて A1 および A2 交配型菌株の交配培養における有性生殖器官が由来する菌株の特定を試みた。その結果 A8g3 および TB201 (A2 交配型菌株) の交配培養では有性生殖器官の一方が発色したものだけでなく、蔵精器および蔵卵器で発色が認められたものが 31.7%、蔵精器および蔵卵器のいずれでも発色が認められなかったものが 54.5% あるという結果が得られた。単独培養では卵胞子を形成しない菌株でも、相手方の交配型菌株が存在するときには自家交配を起し単独で卵胞子を形成することが明らかとなった。

本研究の結果、日本における *P. infestans* の遺伝子型構成が明らかとなった。主要な遺伝子型は外国からの移入とそれに続く国内での交配によって生じた可能性が示されたと共に、それらの一

部の迅速な判別方法が開発された。さらにこの菌の交配時にペクチン酸リナーゼ類似遺伝子が活性化されることを初めて示したことに続き、*P. infestans* の遺伝子機能の解明に必須とされる遺伝子導入法を改良した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 藤 繁 男  
副 査 教 授 幸 田 泰 則  
副 査 教 授 上 田 一 郎  
副 査 助 教 授 近 藤 則 夫

## 学位論文題名

### ジャガイモ疫病菌の新 A1 遺伝子型および 交配時活性化型遺伝子 *mplI* に関する研究

本論文は図 32、表 9、147 頁からなる和文であり別に参考論文 3 編が付されている。ジャガイモ疫病は植物病原菌 *Phytophthora infestans* (Montaagne) de Bary によって引き起こされる病害であり、世界共通の重大な問題になっている。1980 年以降 *P. infestans* の分布に世界的な変化が起こっていることが知られていた。

#### 1. 日本における優占遺伝子型の解析

本研究ではまず日本における遺伝子型である US-1・JP-1・Japanese A1-A および A1-B の遺伝的形質を比較した。交配型、アイソザイム遺伝子型、ミトコンドリア DNA ハプロタイプ、RG57 プロブを用いた全 DNA の RFLP フィンガープリントおよび AFLP 多型について検討したところ、各遺伝子型間で特徴的な多型が認められた。RFLP フィンガープリントおよび AFLP の結果、A1-B が日本国内で A1-A と JP-1 の交配の結果生じた可能性が示された。

#### 2. Japanese A1-A の分布

次に 1996 年に中国河北省と甘肅省で採集した *P. infestans* 菌株の前述の形質を 1997～2000 年に採集した日本菌株と比較したところ、そのうちの一つは日本の優占遺伝子型の一つである A1-A と完全に一致した。さらに世界各地からの報告と照合した結果、A1-A と完全に一致する菌がヨーロッパからロシア、シベリアにかけて広く分布していることがわかった。A1-A はその分布の広さと優占度から、かつて全世界的に分布していた遺伝子型、US-1 に比肩する重要性を持つようになる可能性があると考えられた。

#### 3. 遺伝子型を判定するための DNA マーカーの作成

続いて、圃場で発生した *P. infestans* の遺伝子型を迅速に判定するための DNA マーカ

一を作成することを試みた。RAPDによる遺伝子型特異的増幅産物をクローニングして塩基配列を決定し、新たなプライマー BD1・BD2 を設計して PCR を行なった。その結果 US-1 が 530bp、JP-1 が 580bp の 1 本の、そして A1-B では 530bp と 580bp の 2 本の増幅産物を生じた。この N650 マーカーは日本に存在する US-1・JP-1・A1-B を識別することができたため、圃場分離株の迅速な遺伝子型判別に有用であると考えられた。

#### 4. 交配時における遺伝子発現の変化

*P. infestans* における交配時における遺伝子発現の変化について検討した。*P. infestans* において交配時に転写量が増加する mRNA のクローン cET58 を、cDNA-RDA (representational difference analysis) 法によって分離した。cET58 をプローブとして、cDNA ライブラリから新たに cET58L2 クローンを分離した。その推定アミノ酸配列は *Fusarium solani* f. sp. *pisi* のペクチン酸リアーゼ D に類似していた。このクローンが由来する遺伝子を *mpl1* と命名した。*mpl1* 遺伝子の転写は交配後 5 日目に最高に達し、その後一定のレベルで推移することがわかった。さらに *mpl1* 遺伝子のゲノム DNA クローン ES8 は *mpl1* のタンパク質コード領域の一部と TATA box と思われる部分が存在していた。ペクチン酸リアーゼは植物体のペクチン酸を分解する上で重要なものであると考えられていることから、交配時に *P. infestans* の病原性が影響を受ける可能性が示された。

#### 5. *P. infestans* の形質転換

続いて遺伝子導入実験を行なうための条件設定として、*P. infestans* の形質転換法について検討した。A1 交配型菌株 98A8 からリポフェクション法によってハイグロマイシン耐性遺伝子 *hpt* および  $\beta$ -glucuronidase 遺伝子 *gus A* を導入して得た形質転換株 A8g3 は GUS 発色反応により細胞質が明確に青色に発色した。この形質転換株を用いて A1 および A2 交配型菌株の交配培養における有性生殖器官が由来する菌株の特定を試みたところ、単独培養では卵胞子を形成しない菌株でも、相手方の交配型菌株が存在するときには自家交配を起こし単独で卵胞子を形成することが明らかとなった。

本研究の結果、日本における *P. infestans* の遺伝子型構成が明らかとなった。主要な遺伝子型は外国からの移入とそれに続く国内での交配によって生じた可能性が示されたと共に、それらの一部の迅速な判別方法が開発された。さらにこの菌の交配時にペクチン酸リアーゼ類似遺伝子が活性化されることを初めて示したことに続き、*P. infestans* の遺伝子機能の解明に必須とされる遺伝子導入法を改良した。よって審査員一同は、秋野聖之が博士（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。