

博士（農 学） エレガド エヴェリン バンズエラ

学 位 論 文 題 名

Analyses of Recombinational Repair Genes
in the Rice Blast Fungus

（イネいもち病菌の組換え修復遺伝子の解析）

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

いもち病はイネの最重要病害であり、その病原菌は、子のう菌類のいもち病菌 *Magnaporthe grisea* である。いもち病菌はイネ品種への感染範囲に従って「病原性レース」に分類されている。いもち病防除における最重要課題は圃場に導入した抵抗性品種に感染可能な病原菌が出現するいわゆる「抵抗性の崩壊」である。抵抗性の崩壊はこれまでの研究から、いもち病菌の宿主範囲が広がるような変異、いわゆる「病原性レース変異」が生ずることによると考えられている。いもち病菌の宿主特異性はいわゆる「遺伝子対遺伝子説」に従うことが知られており、病原性レースの変異は非病原性遺伝子の変異ととらえることができる。これまでの非病原性遺伝子のクローニングおよび解析の例はきわめて少ないが、それらの研究成果から、病原性レースの変異には点変異に加えて、トランスポゾンの挿入や遺伝子そのものの欠失が関わっていることが知られている。さらにいもち病菌は染色体構造が菌株毎に高度に多様化しており、高頻度の染色体再編成が起こっていることも、上記のレース変異に何らかの影響を与えていていることも考えられる。転移因子の転移や、遺伝子の欠失、染色体再編成はDNA鎖の組換えを伴う現象である。

生体内でのDNA鎖の組換えは組換え修復に関するRAD52遺伝子群のコードするタンパクが行っていることが出芽酵母の解析から知られている。そこで、本研究はいもち病菌におけるRAD52遺伝子群ホモログのクローニングを行い、いもち病菌におけるその機能について解析を行うことを目的として行った。

1. いもち病菌の組換え修復遺伝子のクローニング

まず、いもち病菌 Ina168 株のゲノムDNAから、Degenerate PCR により酵母 RAD52, RAD54 ホモログの断片の増幅を行った。RAD52, RAD54 はともに相同組換えに関する遺伝子である。増幅されたDNA断片を用いて、Ina168 コスマドゲノムライブラリーから得られた全長を含むクローンおよび RT-PCR によってえられた cDNA クローンの塩基配列解析を行った。RAD52 ホモログは *Rhm52* (Rad homolog *Magnaporthe*) と名付けられ、全長 1867 bp, 2つのイントロンを含み、575 アミノ酸をコードしていた。RAD54 ホモログは *Rhm54* と名付けられ、全長 2484 bp, 1つのイントロンを含み、804 アミノ酸をコードしていた。相同性解析の結果、これらのタンパク質はアカパンカビ (*Neurospora crassa*) のホモログと最も高い相同性を持ち、RHM52 は MUS11 と 42%, RHM54 は MUS25 と 84% 相同であった。サザン解析、あるいは公開されているいもち病菌のゲノム解析データとの相同性からこれらの遺伝子はゲノム中に 1 コピー存在することがわかった。

2. 組換え修復遺伝子 *Rhm52, 54* の機能解析

Rhm52, Rhm54 の機能を調べるために、最も高い相同性を示したアカパンカビ (*N. crassa*) のホモログの変異を相補できるか試みた。*Rhm52, 54* の全長を含むコスミドクローン、遺伝子領域を Gateway システムにより糸状菌形質転換用ベクター pCSN43-DEST にクローニングしたものを用いて、それぞれアカパンカビ *mus-11, mus-25* 変異株に形質転換により導入した。形質転換株は変異株の MMS (メチルメタンスルホン酸、放射線模倣変異原) 感受性を相補され、いもち病菌ホモログは機能する遺伝子であることが証明された。

これらの組換え修復遺伝子は MMS や UV などの変異原によるストレスによる転写誘導があることが知られている。またいもち病菌では活性酸素ストレスを与えるメチルヴァイオロゲン (Methyl Viologen) や熱ストレスによりレトロトランスポゾンの転写が増大することが知られている。そこでいもち病菌において、これらのストレスにより組換え修復遺伝子の転写の増大があるかをノザン解析により調べた。いもち病菌 *Ina168* 株分生子を液体培地で発芽させ、MMS (0.1%), UV (100, 200 J/m²), メチルヴァイオロゲン (0.1, 10 mM), 热ショック (42°C) をそれぞれ与え、RNA を抽出した。*Rhm52, Rhm54* の cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行ったところ、それぞれのストレスで転写の誘導が確認された。MMS, UV による転写の増大からいもち病菌においてもこれまでに酵母やアカパンカビで知られているものと同様の転写誘導機構があることが示された。両遺伝子ともメチルヴァイオロゲンと熱ショックで特に顕著に転写誘導が起こった。メチルヴァイオロゲンは活性酸素ストレスを細胞に与える。活性酸素ストレスは DNA 鎖の切断を引き起こし、組換え修復系を活性化させることが知られている。熱ショックは活性酸素ストレスと同様の作用があることが知られている。いもち病菌は感染時に宿主から活性酸素ストレスを受けることが知られており、いもち病菌が感染時に遺伝子の組換えを行っている可能性が示唆された。

いもち病菌の *Rhm52, 54* の欠失変異株の作成を試みた。それぞれの遺伝子の内部に外側に向かって増幅するプライマーを作成し、制限酵素で切断したゲノム DNA 断片の自己環化物からインバース PCR による増幅を行い、その増幅断片を Gateway システムにより糸状菌遺伝子破壊用ベクター pDESTR にクローニングした。こうして作成された破壊用プラスミド DNA をゲノム DNA の切断に使用した制限酵素で切断し、いもち病菌株を形質転換することで、2重相同組換えにより欠失変異株を作成した。作成した変異株の MMS, UV への感受性は解析中である。

3. 組換え修復遺伝子を誘導するストレスによるいもち病菌のゲノムの変化

活性酸素ストレスと熱ストレスにより、組換え修復遺伝子の転写誘導が起こることから、これらのストレスによりいもち病菌ゲノムに変化が起こるかどうかを調べた。各ストレスを与えた菌体を分生子形成させ、そこから単胞子分離した菌株よりゲノム DNA を抽出して MGR586 (DNA 型トランスポゾン *Pot3* を含む), pING2 (レトロトランスポゾン *Inago2* を含む) をプローブとしたサザン解析を行った。その結果、MGR586 のハイブリダイゼーションのパターンに変化は見られなかったが、pING2 をプローブとした場合には活性酸素ストレス、熱ストレスとともにバンドの欠失、あるいは増加が見られ、ゲノム DNA に変化が生じていることが示された。これらのストレスにより、変異が導入される可能性が示唆された。

以上、本研究はいもち病菌から組換え修復に関与する遺伝子群を初めてクローニングし、それらが宿主感染時に転写誘導される可能性を明らかにした。いもち病菌の病原性レース変異機構に関して、組換え修復遺伝子からの考察を行った例は今までになく、今後、その他のホモログや、GFP レーポーターなどの解析が必要であるが、「レース変異の抑制」というこれまでにない新たな防除法の確立につながる重要なものである。

学位論文審査の要旨

主査 教授 浅野行蔵
副査 教授 上田一郎
副査 教授 内藤 哲
副査 講師 曾根輝雄

学位論文題名

Analyses of Recombinational Repair Genes in the Rice Blast Fungus

(イネいもち病菌の組換え修復遺伝子の解析)

本論文は英文 133 ページ、図 49、表 24、8 章から成り、参考論文 6 編が添えられている。

いもち病はイネの最重要病害であり、その病原菌は、子のう菌類のいもち病菌 *Magnaporthe grisea* である。いもち病防除における最重要課題は圃場に導入した抵抗性品種に感染可能な病原菌が出現するいわゆる「抵抗性の崩壊」である。抵抗性の崩壊はこれまでの研究から、「病原性レース変異」が生ずることによると考えられている。いもち病菌の宿主特異性はいわゆる「遺伝子対遺伝子説」に従うことが知られており、病原性レースの変異は非病原性遺伝子の変異ととらえることができる。これまでの研究成果から、病原性レースの変異には点変異に加えて、トランスポゾンの挿入や遺伝子そのものの欠失が関わっていることが知られている。転移因子の転移や、遺伝子の欠失、染色体再編成は DNA 鎮の組換えを伴う現象である。

生体内での DNA 鎮の組換えは組換え修復に関する *RAD52* 遺伝子群のコードするタンパクが行っていることが出芽酵母の解析から知られている。そこで、本研究ではいもち病菌における *RAD52* 遺伝子群ホモログのクローニングを行い、いもち病菌におけるその機能について解析した。

1. いもち病菌の組換え修復遺伝子のクローニング

まず、いもち病菌 Ina168 株のゲノム DNA から、Degenerate PCR により酵母 *RAD52*, *RAD54* ホモログの断片の増幅を行った。*RAD52*, *RAD54* はともに相同組換えに関する遺伝子である。増幅された DNA 断片を用いて、Ina168 コスミドゲノムライブラリーから得られた全長を含むクローンおよび RT-PCR によってえられた cDNA クローンの塩基配列解析を行った。相同性解析の結果、これらのタンパク質はアカパンカビ (*Neurospora crassa*) のホモログと最も高い相同性を持ち、ゲノム中に 1 コピー存在することがわかった。

2. 組換え修復遺伝子 *Rhm52, 54* の機能解析

Rhm52, Rhm54 の機能を調べるために、最も高い相同意を示したアカパンカビ (*N. crassa*) のホモログの変異を相補できるか試みた。*Rhm52, 54* の全長を含むコスミドクローン、遺伝子領域を Gateway システムにより糸状菌形質転換用ベクター pCSN43-DEST にクローニングしたものを用いて、それぞれアカパンカビ *mus-11, mus-25* 変異株に形質転換により導入した。形質転換株は変異株の MMS (メチルメタンスルホン酸、放射線模倣変異源) 感受性を相補され、いもち病菌ホモログは機能する遺伝子であることが証明された。

そこでいもち病菌において、ストレスにより組換え修復遺伝子の転写の増大があるかをノザン解析により調べた。いもち病菌 *Ina168* 株分生子を液体培地中で発芽させ、MMS (0.1%), UV (100, 200 J/m²), メチルヴァイオロゲン (0.1, 10 mM), 熱ショック (42°C) をそれぞれ与え、RNA を抽出した。*Rhm52, Rhm54* の cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行ったところ、それぞれのストレスで転写の誘導が確認された。両遺伝子ともメチルヴァイオロゲンと熱ショックで特に顕著に転写誘導が起こった。メチルヴァイオロゲンは活性酸素ストレスを細胞に与える。いもち病菌は感染時に宿主から活性酸素ストレスを受けることが知られており、いもち病菌が感染時に遺伝子の組換えを行っている可能性が示唆された。

3. 組換え修復遺伝子を誘導するストレスによるいもち病菌のゲノムの変化

活性酸素ストレスと熱ストレスによりいもち病菌ゲノムに変化が起こるかどうかを調べた。各ストレスを与えた菌体を分生子形成させ、そこから単胞子分離した菌株よりゲノム DNA を抽出して MGR586 (DNA 型トランスポゾン *Pot3* を含む), pING2 (レトロトランスポゾン *Inago2* を含む) をプローブとしたサザン解析を行った。その結果、MGR586 のハイブリダイゼーションのパターンに変化は見られなかったが、pING2 をプローブとした場合には活性酸素ストレス、熱ストレスとともにバンドの欠失、あるいは増加が見られ、ゲノム DNA に変化が生じていることが示された。これらのストレスにより、変異が導入される可能性が示唆された。

以上、本研究はいもち病菌から組換え修復に関する遺伝子群を初めてクローニングし、それらが宿主感染時に転写誘導される可能性を明らかにした。いもち病菌の病原性レース変異機構に関して、組換え修復遺伝子からの考察を行った例は今までになく、今後、「レース変異の抑制」というこれまでにない新たな防除法の確立につながる重要なものである。

よって審査員一同は、Elegado, Evelyn Banzuela 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。