

アグロバクテリウム法による
アズキ落葉病菌形質転換系の確立、および
その病原性解析への利用

学位論文内容の要旨

アズキ落葉病は *Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola* により引き起こされる土壌伝染性病害で、北海道のアズキ生産における大きな障害のひとつとなっている。罹病アズキは維管束褐変と萎凋を呈し、種子の品質・収量共に低下する。本菌は病徴発現に関与するとされる植物毒素グレガチンを産出するが、病原性との関連は明らかではない。また、その他の病原性関連因子についても不明である。そこで本研究は、グレガチンの発病への関与も含めアズキ落葉病菌の病原性機構を分子生物学的に解析することを目的として行った。

1. アズキ落葉病菌のアグロバクテリウム法による形質転換系の確立

多数の挿入変異株を得るためには効率の良い遺伝子導入系が必要である。本研究では、直接分生胞子に遺伝子導入が可能なアグロバクテリウム法によるハイグロマイシン耐性遺伝子の導入を試みた。まず、形質転換効率向上のため、形質転換時培養条件の検討を行った。*Agrobacterium tumefaciens* の前培養におけるアセトシリンゴン (T-DNA の宿主ゲノムへの挿入に必要な遺伝子群を活性化する物質、以下 AS) は形質転換効率に影響せず、*P. gregata* と *A. tumefaciens* の共培養時の AS の存在が大きく影響することが示された。培養時間、温度、AS 濃度をそれぞれ 48 時間、20°C、200 μM とすると、分生子 10⁶ 個あたり約 80 の形質転換株が得られた。また、分子生物学的解析のために望ましい T-DNA がゲノムに 1 ヶ所挿入されたシングルコピー株の収率を上げるためには、共培養時の AS 濃度を高めることが必要であった。

2. 病原性およびグレガチン生産能変異株の選抜

形質転換株 900 株から 1 株の病原性喪失株 (AT187)、2 株の病原性低下株 (AT234, AT302) を選抜した。AT187 と AT302 はシングルコピー株、AT234 は T-DNA が 2 箇所挿入されており、これら 3 株はグレガチン生産能を有していた。一方、野生株と比べ病原性に変化がなかった 108 株からは 3 株のグレガチン非生産変異株を選抜した (AT8, AT31, AT43)。AT8 と AT43 はシングルコピー

株、AT31 は T-DNA が 2 箇所挿入されていた。これらの結果から、グレガチンの病原性への関与は低いと考えられた。上記 6 変異株の胞子発芽率、胞子形成量、コロニー直径を調べたところ、胞子発芽率、形成量は 6 変異株とも野生株と差がみられなかったが、コロニー直径は AT302 のみ野生株と比べ有意に小さかった。

AT43、AT187、AT302 株の T-DNA 隣接ゲノム配列を解読したところ、AT302 のレフトボーダー隣接配列は各種糸状菌の発現遺伝子配列断片と高い相同性を示した。他の配列には既知配列と有意な相同性は見出されなかった。

3. 病原性低下株 AT302 からの translationally controlled tumor protein (TCTP) をコードする遺伝子 *TPG1* のクローニング

AT302 のレフトボーダー隣接配列をプローブとした cDNA ライブラリーのスクリーニングから、507bp の ORF を含むクローンを得た。推定アミノ酸配列は各種生物の TCTP と高い相同性を示し、本遺伝子を *TPG1* と名づけた。AT302 レフトボーダー隣接配列と cDNA クローンの配列を比較すると、T-DNA は 5 番目と 6 番目のアミノ酸残基の間に存在するイントロンに挿入されたと推定された。しかし、ライトボーダー隣接配列には残りの 5 アミノ酸残基をコードする領域は見出されなかった。そこで *TPG1* の全体像を明らかにするため、レフトボーダー隣接配列にプライマーを設計し、TAIL-PCR により *TPG1* の 5' 側を増幅した (約 1000bp, 以下 LJ 配列)。その結果、残りのコード領域が見出され、*TPG1* は 5 個のエクソン (15, 112, 138, 160, 82bp) が 4 個のイントロン (181, 87, 50, 57bp) で分割された遺伝子であることが明らかとなった。なお、LJ 配列の 5 塩基目から 150 塩基目までの逆相補配列が、ライトボーダー隣接配列の 1 塩基目から 146 塩基目と一致し、さらに、それ以降の配列は全く別の配列であったことから、染色体 DNA の再配列が起きたことが示唆された。

サザン解析により *TPG1* はシングルコピーの遺伝子であることが明らかになった。RT-PCR を行ったところ、AT302 において *TPG1* の転写は認められなかった。そこで、*TPG1* と病原性の関連を調べるため、*TPG1* の破壊株の作出をアグロバクテリウム法により試みた。しかし、480 株を PCR によりスクリーニングしたが破壊株は得られなかった。

ショウジョウバエにおいて TCTP のノックダウンにより細胞数の減少や細胞の小型化が起こること、また、出芽酵母の TCTP 変異体はベノミル感受性が高まることが報告されている。AT302 は野生株と比べて生育が有意に遅く、ベノミル感受性も高かった。本研究において AT302 の表現型が T-DNA の *TPG1* への挿入によるものなのか確証が得られなかったものの、TCTP 変異体と AT302 の特徴はよく一致した。

ショウジョウバエにおいて TCTP は、細胞の成長に関与する低分子量 G タンパク質の Rheb (Ras homologue enriched in brain) に対し G アニンヌクレオチド交換因子活性をもち、これを正に制御する。*Aspergillus fumigatus* の Rheb 変異体

は病原力が低下することから、*P. gregata* においても TCTP の G タンパク質調節機構が保存されているとすれば、AT302 において Rheb の活性が低く抑えられることにより病原性の低下が起きている可能性が考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 近 藤 則 夫
副 査 教 授 幸 田 泰 則
副 査 講 師 藤 野 介 延
副 査 助 教 秋 野 聖 之

学 位 論 文 題 名

アグロバクテリウム法による アズキ落葉病菌形質転換系の確立、および その病原性解析への利用

本論文は図 27, 表 5 を含み, 8 章からなる総頁数 132 の論文であり, 別に参考論文 1 編が添えられている。

アズキ落葉病は *Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola* により引き起こされる土壌伝染性病害で, 北海道のアズキ生産における大きな障害のひとつとなっている。アズキ落葉病菌の病原性関連因子のひとつとして, 本菌が生産する毒素グレガチンの重要性がこれまで示唆されてきた。本研究は, グレガチンの関与も含め病原性関連因子の機能を明らかにするために, 病原性低下株および喪失株を作出するアズキ落葉病菌の形質転換法について検討し, 得られた病原性低下株および喪失株の分子生物学的および生理学的解析を行ったものである。

1. アズキ落葉病菌のアグロバクテリウム法による形質転換系の確立

効率の良い遺伝子導入系を確立するため, 分生胞子に直接遺伝子導入が可能なアグロバクテリウム法によるマーカー遺伝子(ハイグロマイシン耐性遺伝子)の導入を試みた。まず, 形質転換時の培養条件の検討を行い, T-DNA の宿主ゲノムへの挿入に必要な遺伝子群を活性化するアセトシリンゴンの添加は, *Agrobacterium tumefaciens* の前培養においては形質転換効率に影響せず, アズキ落葉病菌とアグロバクテリウム菌の共培養時におけるアセトシリンゴンの存在が大きく影響することが示された。培養時間, 温度, アセトシリンゴン濃度をそれぞれ 48 時間, 20°C, 200 μM とすると, 分生子 10⁶ 個あたり約 80 の形質転換株が得られた。また, 解析のために望ましい T-DNA がゲノムに 1 ヶ所挿入されたシングルコピー株の収率を上げるためには, 共培養時のアセトシリンゴン濃度をさらに高めることが必要であった。以上のような条件を設定することで, アズキ落葉病菌の効率の良い形質転換系が確立された。

2. 病原性およびグレガチン生産能変異株の選抜

形質転換株 900 株から 1 株の病原性喪失株 (AT187), 2 株の病原性低下株 (AT234, AT302) を選抜した。AT187 と AT302 はシングルコピー株, AT234 は T-DNA が 2 箇所に挿入されており, また, これら 3 株のグレガチン生産能力は失われていなかった。一方, 野生株と比べ病原性に変化が認められなかった形質転換株 108 株からは 3 株のグレガチン非生産変異株が選抜された (AT8, AT31, AT43)。なお, AT8 と AT43 はシングルコピー株, AT31 は T-DNA が 2 箇所に挿入されていた。これらの結果から, グレガチンの直接的な病原性発現への関与は低いと考えられた。また, 上記 6 変異株の孢子発芽率, 孢子形成量は全変異株とも野生株との間に差は認められず, 寒天培地上でのコロニー直径は AT302 のみ野生株と比べ僅かに小さかったものの, 生育に及ぼす影響は大きくはなかった。

病原性が変異した AT43, AT187, AT302 株の挿入された T-DNA 隣接ゲノム配列解読の結果, AT302 のレフトボーダー隣接配列が各種糸状菌の発現遺伝子配列断片と高い相同性を示した。一方, AT43 および AT187 の配列に相同な既知配列は見出されなかった。

3. 病原性低下株 AT302 からの translationally controlled tumor protein (TCTP) をコードする遺伝子 *TPG1* のクローニング

レフトボーダー隣接配列に各種糸状菌の発現遺伝子配列断片と高い相同性を示した AT302 の cDNA ライブラリーのスクリーニングから, 507bp のオープンリーディングフレームを含むクローンを得た。推定アミノ酸配列は各種生物の TCTP と高い相同性を示し, 本遺伝子を *TPG1* と名づけた。*TPG1* は 5 個のエクソンが 4 個のイントロンで分割されたシングルコピーの遺伝子である。また, AT302 において *TPG1* の転写は認められず, この遺伝子は機能していないことが明らかとなった。

TPG1 と病原性の関連を証明するため, アグロバクテリウム法により *TPG1* の破壊株の作出を試みたが破壊株は得られなかった。ただ, AT302 が野生株と比べて生育が有意に遅く, ベノミル感受性も高いという特徴は, ショウジョウバエにおいて TCTP のノックダウンにより細胞数の減少や細胞の小型化が起こること, 出芽酵母の TCTP 変異体ではベノミル感受性が高まることなど, 既報の TCTP 変異体の特徴とよく一致した。

以上の成果は, アズキ落葉病菌の形質転換体作出法を確立することによって本病原菌の病原性関連遺伝子群の機能解析を可能にしたものであり, 植物病原糸状菌の病原性発現関連因子の解明に示唆を与えるもので学術上高く評価できる。よって 審査員一同は, 田中創一が博士 (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。