イネいもち病菌の DNA 組換え修復遺伝子 *Rhm54* 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、子う菌類のいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 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、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「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解析成果から、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ると考えられる。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与する *RAD52* 遺伝子群のコードするタンパクが行っていることが知られている。これまでにいもち病菌における *RAD54* ホモログである *Rhm54* がクローニングされ、さらに *Rhm54* の転写が様々なストレスにより上昇することが明らかにされている。

いもち病菌は圃場において様々な物理的、化学的ストレスに曝されており、これらがいもち病菌の組換え修復を誘導している可能性がある。そしてこの組換え修復により生じる遺伝子の欠失や染色体再編成がいもち病菌における遺伝的多様性や病原性の多様化に寄与していると推測される。しかし、これらの関連性についての研究はほとんどなされていない。

そこで本研究では、いもち病菌における相同組換えの役割について明らかにするため、*Rhm54* 遺伝子破壊株を作成し、その表現型の解析を行った。さらに、経時的に *Rhm54* の発現変化をモニターするため、GFP をレポーターたんぱく質として、*Rhm54* の発現レベルの定量及び *in vivo* での発現について観察した。

1. *Rhm54* 遺伝子破壊株の作成とその表現型の解析

いもち病菌における *Rhm54* の機能を調べるため、*Rhm54* 遺伝子破壊ベクターを構築し、欠損株を作成した。*Rhm54* を破壊するためのベクターは Abeら (2006) によって開発された pDESTR システムを利用して構築した。このシステムに基づいて、まずゲノム DNA を制限酵素処理し、セルフライゲーションを行った。この産物を鋳型にしてインバース PCR を行った。

この産物をエントリーベクター pENTR/D-TOPO ベクターに TOPO クローニングし、pENTR-Rhm54 を得た。このベクターを pDEST へ導入し、Rhm54 破壊用ベクターを構築した。このベクターをいもち病菌株 Ina168 及び Ina86-137 に形質転換し、得られた形質転換体の中から、目的とする Rhm54 を破壊された株を PCR 及びサザンハイブリダイゼーションを用いて同定した。Δ*rh*m54 株の表現型について解析を行った結果、これらの株では生育に遅滞が見られ、この生育速度の違いは DNA 損傷試薬や細胞ストレス因子の存在下でより大きくなることが示された。また Ina168 株において Δ*rh*m54 株で分生子形成能が低下していた。分生子の MMS に対する感受性は Δ*rh*m54 株で増加し、DNA 修復系に阻害があることが示された。一方、アデニンの生合成に関与する遺伝子 *AdeA* をターゲットとして相同組換え効率を測定したが、コントロールでの組換え効率が低かったため、Rhm54 の破壊による組換え効率の変化を評価することは困難であった。しかし、Δ*R*hm54 株においても相同組換え能が残存していることが示され、完全に相同組換え経路が阻害されているわけではないことが示された。

イネに対する接種試験の結果、Δ*rh*m54 株でコントロール菌株と比べ病斑のサイズや数は大きく低下しており、病原性の低下が示された。分生子の付着器形成率と付着器の浸透圧耐性を調べた結果、Δ*rh*m54 株では付着器の形成率が低下し、さらに浸透圧に対する感受性が増加していることが示された。Δ*rh*m54 株において見られたイネに対する病原性の低下は、感染の過程で重要な付着器の形成及び付着器の成熟の両段階が阻害された結果と推察された。

2. GFP レポーターを利用した Rhm54 の *in vivo* 発現解析

Rhm54 の発現を解析するため、Rhm54 プロモーター領域を上流に持つ GFP 発現ベクターを構築した。Rhm54 の上流に潜在的なタンパク質コード領域が Rhm54 の転写の方向と逆方向に存在していたため、その領域の直前から Rhm54 遺伝子の開始コドン直前までを Rhm54 のプロモーター部位とした。プロモーターの下流に EGFP 遺伝子、さらに形質転換体の選択マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を持つベクターを構築し、このベクターを持つ形質転換体を Ina168 株および Ina86-137 株を用いて作成した。この株に熱ショックを与えると GFP の量が Ina168 株で 3 倍、Ina86-137 株で 3.2 倍増加することが示され、ノザン解析の結果と一致した。これにより GFP の発現が Rhm54 プロモーターの活性を示しており、レポーターとして機能していることが示唆された。続いて、いもち病菌とイネとの相互作用時の Rhm54 の発現変化を観察するため、形質転換体をプラスチック板上で付着器形成させ、感染サイクルに伴ういもち病菌の形態変化における Rhm54 の発現をモニターした。その結果、分生子、発芽管、付着器の全てにおいて GFP 蛍光が観察された。また、いもち病菌に対し親和性であるイネ品種、新 2 号に対する接種試験では、イネ細胞中のいもち病菌侵入菌糸においても GFP が観察され、イネへの感染行動時においても恒常的に Rhm54 が発現していることが示された。

以上の結果から、イネいもち病菌において Rhm54 は常に発現し、栄養成長、病原性など生活環を通して機能していることが示唆された。このことはいもち病菌が常に DNA に損傷を受けており、その損傷を修復しつつ増殖を続けていることを意味している。DNA 相同組換えがイネいもち病菌中に多数報告されているトランスポゾン等の反復配列間で起これば、遺伝子

の欠失や転座の原因となる。本研究は、DNA 相同組換え修復と病原性の関連を初めて明らかにしたものであり、今後のいもち病菌研究の新たな視点を示すものである。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	會根輝雄
副査	教授	浅野行蔵
副査	教授	今井亮三
副査	准教授	田中みち子
副査	助教	吹谷智

学位論文題名

イネいもち病菌の DNA 組換え修復遺伝子 *Rhm54* の解析

本論文は、全 8 章からなる総頁数 90 ページの和文論文である。論文には図 27, 表 1, 引用文献 33 が含まれ、別に参考論文 1 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 oryzae* 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抵抗性の崩壊である。抵抗性の崩壊は、いもち病菌の宿主範囲が広がるような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「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には非病原性遺伝子の点変異に加えて、トランスポゾンの挿入や非病原性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。さらにいもち病菌の染色体長多型も上記のレース変異に何らかの影響を与えていると考えられる。これらの現象に関わる生体内での DNA 鎖の組換えは、組換え修復に関与する酵母 *RAD52* 遺伝子群のコードするタンパクが行っていることが知られている。

そこで本研究では、いもち病菌における DNA 相同組換えの役割について明らかにするため、*RAD52* 遺伝子群に属する *RAD54* 遺伝子のいもち病菌ホモログ *Rhm54* 遺伝子破壊株を作成し、その表現型の解析を行った。さらに、経時的に *Rhm54* の発現変化をモニターするため、GFP をレポーターたんぱく質として、*Rhm54* の発現レベルの定量及び *in vivo* での発現について観察した。

まず、いもち病菌における *Rhm54* の機能を調べるため、*Rhm54* 遺伝子破壊ベクターを構築し、欠損株を作成した。*Rhm54* を破壊するためのベクター pDEST-Rhm54 をいもち病菌株 Ina168 及び Ina86-137 に形質転換によって導入し、目的とする *Rhm54* を破壊された株を PCR 及びサザンハイブリダイゼーションを用いて同定した。 $\Delta rhm54$ 株の表現型について解析を行った結果、これらの株では生育に遅滞が見られ、この生育速度の違いは DNA 損傷試薬や細

胞ストレス因子の存在下でより大きくなることが示された。また Ina168 株において $\Delta rhm54$ 株で分生子形成能が低下していた。分生子の MMS に対する感受性は $\Delta rhm54$ 株で増加し、DNA 修復系に阻害があることが示された。一方、アデニンの生合成に関与する遺伝子 *AdeA* をターゲットとして相同組換え効率を測定したところ、 $\Delta Rhm54$ 株においても相同組換え能が残存していることが示され、完全に相同組換え経路が阻害されているわけではないことが示された。イネに対する接種試験の結果、 $\Delta rhm54$ 株でコントロール菌株と比べ病班のサイズや数は大きく低下しており、病原性の低下が示された。分生子の付着器形成率と付着器の浸透圧耐性を調べた結果、 $\Delta rhm54$ 株では付着器の形成率が低下し、さらに浸透圧に対する感受性が増加していることが示された。 $\Delta rhm54$ 株において見られたイネに対する病原性の低下は、感染の過程で重要な付着器の形成及び付着器の成熟の両段階が阻害された結果と推察された。

続いて、*Rhm54* の発現を解析するため、*Rhm54* プロモーター領域を上流に持つ GFP 発現ベクターを構築した。*Rhm54* プロモーターの下流に EGFP 遺伝子、さらに形質転換体の選択マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を持つベクターを構築し、このベクターを持つ形質転換体を Ina168 株および Ina86-137 株を用いて作成した。この株に熱ショックを与えると GFP の量が Ina168 株で 3 倍、Ina86-137 株で 3.2 倍増加することが示され、ノザン解析の結果と一致した。これにより GFP の発現が *Rhm54* プロモーターの活性を示しており、レポーターとして機能していることが示唆された。続いて、いもち病菌とイネとの相互作用時の *Rhm54* の発現変化を観察するため、形質転換体をプラスチック板上で付着器形成させ、感染サイクルに伴ういもち病菌の形態変化における *Rhm54* の発現をモニターした。その結果、分生子、発芽管、付着器の全てにおいて GFP 蛍光が観察された。また、いもち病菌に対し親和性であるイネ品種、新 2 号に対する接種試験では、イネ細胞中のいもち病菌侵入菌糸においても GFP が観察され、イネへの感染行動時においても恒常的に *Rhm54* が発現していることが示された。

以上の結果から、イネいもち病菌において *Rhm54* は常に発現し、栄養成長、病原性など生活環を通して機能していることが示唆された。このことはいもち病菌が常に DNA に損傷を受けており、その損傷を修復しつつ増殖を続けていることを意味している。DNA 相同組換えがイネいもち病菌中に多数報告されているトランスポゾン等の反復配列間で起これば、遺伝子の欠失や転座の原因となる。本研究は、DNA 相同組換え修復と病原性の関連を初めて明らかにしたものであり、今後のいもち病菌研究の新たな視点を示すものである。よって審査員一同は、工藤亮子が博士（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。