

イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の クローニング及び *in planta* 発現解析

学位論文内容の要旨

本論文は、全7章からなる総頁数177ページの和文論文である。論文には図41、表61、引用文献101が含まれ、別に参考論文2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、子嚢菌に分類されるイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) によって引き起こされる。いもち病防除は主としていもち病抵抗性遺伝子を持つ抵抗性品種と農薬の利用によって行われているが、圃場に導入した抵抗性品種の罹病化は、依然として阻止すべき重要課題として残されている。本菌の宿主特異性は、遺伝子対遺伝子説に基づき、宿主の保有する抵抗性遺伝子とそれに特異的に対応する病原菌の非病原性遺伝子により決定されている。これまでに、40以上のイネいもち病菌の非病原性遺伝子が発見されているが、クローニングに至った非病原性遺伝子は7遺伝子と少ない。そこで本研究では、日本産イネいもち病菌 Ina168 株から、イネ品種愛知旭の持つイネいもち病抵抗性遺伝子 *Pia* に対応した非病原性遺伝子 *AVR-Pia* のクローニングを行い、突然変異機構、および宿主植物内 (*in planta*) での発現・機能の解明を目指した。

1. 非病原性遺伝子 *AVR-Pia* のクローニング

AVR-Pia 遺伝子を含むと考えられる、Ina168 株由来コスミドクローン 46F3 から、本遺伝子のクローニングを行った。46F3 の細分化を行い、これを *AVR-Pia* 欠損変異株 (Ina168m95-1) に導入し、相補試験を行ったところ、最終的に *AVR-Pia* 遺伝子は 255 bp の ORF (open reading frame) であることが分かった。本遺伝子のコードする予測アミノ酸配列のうち N 末端側 19 アミノ酸が分泌に関わるシグナル配列であると予測され、成熟 *AVR-Pia* タンパクは 66 アミノ酸、予想分子量 7,382.33 の低分子量タンパクとして細胞外へ分泌され機能していることが示唆された。また、Ina168 株は *AVR-Pia* 遺伝子を 3 コピー、同一染色体上に保有する一方、Ina168m95-1 株には *AVR-Pia* 遺伝子が存在せず、全てのコピーを失う欠損変異が起こったと考えられた。さらに、圃場分離株では抵抗性遺伝子 *Pia* に非病原性を示すいもち病菌株においてのみ 1~2 コピー存在し、さらにイネ以外を宿主とするいもち病菌にもそのホモログが存在することが分かった。

2. 非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の *in planta* 発現解析

AVR-Pia 遺伝子の発現を確認するために、液体培養した Ina168 株の菌体及び Ina168 株を感染させたイネ葉身から RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行った。その結果、液体培養時では発現は確認できなかったが、いもち病菌感染イネ葉身では発現が確認され、*AVR-Pia* 遺伝子はイネ感染時特異的に発現する遺伝子であることが明らかとなった。さらに、本遺伝子の転写領域を明らかにした。

次に遺伝子発現時期について qRT-PCR (quantitative RT-PCR) により解析した。遺伝子発現は菌株・イネ品種の組合せに関係なく 18 ~ 24 hpi (hours post inoculation, 接種後経過時間) の間に転写開始され、その後、親和性の組合せでは少なくとも 60 hpi まで発現することが分かった。一方で、非親和性の組合せでは 30 hpi から発現量が低下し、36 hpi には発現が確認できなくなった。後者については、*AVR-Pia* 遺伝子によって *Pia* 抵抗性遺伝子による過敏感反応が誘導されたため、いもち病菌が死滅したのが原因と考えられた。

最後に、*AVR-Pia* タンパクの発現部位を、非切断葉鞘裏面接種法を用いて解析した。その際、*AVR-Pia* 遺伝子、スパーサー配列、eGFP (enhanced green fluorescent protein) レポーター遺伝子を連結した融合遺伝子を固有プロモーターにより発現させた。蛍光顕微鏡観察の結果、*AVR-Pia* 遺伝子は、イネ感染後 18 ~ 24 時間後から転写され、そのタンパクは侵入菌糸において BIC (biotrophic interfacial complex) 部位に局在後、宿主細胞へ分泌されているものと示唆された。

以上の結果から、*AVR-Pia* はトランスポゾンなどの反復配列に富む領域に存在し、欠失変異を受けること、またイネ感染時特異的に転写され、そのタンパクは宿主細胞中に分泌されていることが示唆された。本研究成果は、日本産菌株から初めて非病原性遺伝子をクローニングした例であり、さらにその突然変異、遺伝子の発現及びそのタンパクの局在について明らかにした。抵抗性崩壊のメカニズムの解明などの、今後のいもち病研究に対して大きく貢献できると考えられる。よって審査員一同は、三木慎介が博士(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。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	曾根輝雄
副査	教授	浅野行藏
副査	教授	上田一郎
副査	客員教授	今井亮三
副査	特任准教授	田中みち子

学位論文題名

イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の クローニング及び *in planta* 発現解析

本論文は、全7章からなる総頁数177ページの和文論文である。論文には図41、表61、引用文献101が含まれ、別に参考論文2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、子嚢菌に分類されるイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) によって引き起こされる。いもち病防除は主としていもち病抵抗性遺伝子を持つ抵抗性品種と農薬の利用によって行われているが、圃場に導入した抵抗性品種の罹病化は、依然として阻止すべき重要課題として残されている。本菌の宿主特異性は、遺伝子対遺伝子説に基づき、宿主の保有する抵抗性遺伝子とそれに特異的に対応する病原菌の非病原性遺伝子により決定されている。これまでに、40以上のイネいもち病菌の非病原性遺伝子が発見されているが、クローニングに至った非病原性遺伝子は7遺伝子と少ない。非病原性遺伝子の変異機構や、またそれらに共通する特徴・機能を解析するには、数多くの非病原性遺伝子をクローニングする必要がある。

そこで本研究では、日本産イネいもち病菌 Ina168 株から、イネ品種愛知旭の持つイネいもち病抵抗性遺伝子 *Pia* に対応した非病原性遺伝子 *AVR-Pia* のクローニングを行い、突然変異機構、および宿主植物内 (*in planta*) での発現・機能の解明を目指した。

1. 非病原性遺伝子 *AVR-Pia* のクローニング

AVR-Pia 遺伝子を含むと考えられる、Ina168 株由来コスミドクローン 46F3 から、本遺伝子のクローニングを行った。46F3 は 38.6 kb のインサートを持ち、その中には多数のトランスポゾンなどの反復配列が存在していた。そこで、これらを除けるように領域を I から VI の 6 つに分け、各領域を PCR を用いて増幅し、クローニングした。*AVR-Pia* 欠損変異株 (Ina168m95-1) に導入し、相補試験を行ったところ、領域 V だけが抵抗性遺伝子 *Pia* に対する非病原性を相補した。本領域をさらに細分化し、遺伝子存在位置を絞ったところ、*AVR-Pia* 遺伝子は 702 bp の領

域 (領域 Vq) に存在することが明らかとなった。その領域に対して 1 塩基挿入変異を導入し、非病原性相補実験を行った結果、*AVR-Pia* 遺伝子は 255 bp の ORF (open reading frame) であることが分かった。本遺伝子はバクテリアが持つ cytochrome c family protein の 1 部の配列と弱い相同性 (33%) を持ち、予測アミノ酸配列のうち N 末端側 19 アミノ酸が分泌に関わるシグナル配列であると予測された。従って、成熟 *AVR-Pia* タンパクは 66 アミノ酸、予想分子量 7,382.33 と推定され、低分子量タンパクとして細胞外へ分泌され機能している可能性が高いことが示唆された。また、サザン解析の結果、Ina168 株は *AVR-Pia* 遺伝子を 3 コピー保有しており、これらは全て同一染色体上に位置していた一方、Ina168m95-1 株には *AVR-Pia* 遺伝子が存在せず、全てのコピーを失う欠損変異が起こったと考えられた。さらに、圃場分離株では抵抗性遺伝子 *Pia* に非病原性を示すいもち病菌株においてのみ 1~2 コピー存在し、さらにイネ以外を宿主とするいもち病菌にもそのホモログが存在することが分かった。

2. 非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の *in planta* 発現解析

AVR-Pia 遺伝子の発現を確認するために、液体培養した Ina168 株の菌体及び Ina168 株を感染させたイネ葉身から RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行った。その結果、液体培養時では発現は確認できなかったが、いもち病菌感染イネ葉身では発現が確認され、*AVR-Pia* 遺伝子はイネ感染時特異的に発現する遺伝子であることが明らかとなった。さらに、本遺伝子の転写領域は、イントロンを含まず遺伝子上流-115~-84 の塩基から始まり、終止コドンの 63~88 塩基下流に亘っていることが RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により判明した。

次に遺伝子発現時期について qRT-PCR (quantitative RT-PCR) により解析した。遺伝子発現は菌株・イネ異品種の組合せに関係なく 18~24 hpi (hours post inoculation, 接種後経過時間) の間に転写開始され、その後、親和性の組合せでは少なくとも 60 hpi まで発現することが分かった。一方で、非親和性の組合せでは 30 hpi から発現量が低下し、36 hpi には発現が確認できなくなった。後者については、*AVR-Pia* 遺伝子によって *Pia* 抵抗性遺伝子による過敏感反応が誘導されたため、30 hpi 以降いもち病菌が死滅したのが原因と考えられた。

最後に、*AVR-Pia* タンパクの発現部位を、非切断葉鞘裏面接種法 (Koga H. *et al.*, 2004) を用いて解析した。その際、*AVR-Pia* 遺伝子、スパーサー配列、eGFP (enhanced green fluorescent protein) レポーター遺伝子を連結した融合遺伝子を固有プロモーターにより発現させた。形質転換体の胞子は、発芽し付着器を形成した後、27 hpi には付着器から葉鞘細胞へ侵入、初期侵入菌糸を形成し、その後 30 hpi には球状菌糸を形成した。その後、48 hpi には隣接の第 2 細胞、60 hpi には第 3 細胞へと繊維状侵入菌糸を伸ばしていた。eGFP 融合タンパクは、27 hpi において初期侵入菌糸の先端に局在したが、30 hpi には球状菌糸の BIC (biotrophic interfacial complex) 部位に局在した。同様の現象が 60~64 hpi において、第 3 感染細胞の繊維状侵入菌糸の先端及び球状菌糸の BIC で観察された。以上から、*AVR-Pia* 遺伝子は、イネ感染後 18~24 時間後から転写され、侵入菌糸において BIC に局在後、宿主細胞へ分泌されているものと予想された。

以上の結果から、非病原性遺伝子 *AVR-Pia* はトランスポゾンなどの反復配列に富む領域に存在し、欠失変異を受けること、またイネ感染時特異的に転写され、そのタンパクは宿主細胞中に分泌されていることが示唆された。

本研究成果は、日本産菌株から初めて非病原性遺伝子をクローニングした例であり、さらにそ

の突然変異，遺伝子の発現及びそのタンパクの局在について明らかにした．抵抗性崩壊のメカニズムの解明などの，今後のいもち病研究に対して大きく貢献できると考えられる．よって審査員一同は，三木慎介が博士（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．