

Studies on the Retrotransposons of the Rice Blast Fungus

(イネいもち病菌のレトロトランスポゾンに関する研究)

学位論文内容の要旨

1. Introduction

One of the most serious and recurrent problems affecting rice production worldwide is the rice blast disease, the most destructive disease of the rice crop. It is estimated to starve about 60 million people worldwide due to annual crop loss caused by the filamentous ascomycete fungus, *Magnaporthe oryzae* (Couch). Control of this pathogen mainly relies on the use of resistant rice cultivars carrying major resistance (*R*) genes that interact with *M. grisea* avirulence (*AVR*) genes following a gene-for-gene relationship. It is believed that the loss-of-function mutations of the avirulence genes are the main reasons for the emergence of new pathotypes of the fungus and some reports confirm that in some pathotypes, gains of virulence to formerly resistant rice cultivars were due to integration events among some transposable elements (TEs) and transposon-associated point mutation in their avirulence genes. *M. oryzae* has been reported to contain a variety of these elements, including some that are not yet described in detail. In this study, characterization of *RETRO5*, *RETRO6*, and *RETRO7* retrotransposons of the rice blast fungus was attempted due to the lack of available data on these elements.

2. Characterization of *RETRO6* and *RETRO7*

Polymerase (*pol*) amino acid sequences of the elements reveals that *RETRO6*, and *RETRO7* are Ty3/gypsy-like elements. Copies of these elements were found to be dispersed within the genome of *Magnaporthe spp.* isolates infecting rice and other monocot plants. During infection process, the pathogens come in contact with DNA damaging agents from the host plant as a result of hypersensitive reaction and free radicals from the pathogen produced by cellular differentiation. Reports have demonstrated that TEs also contribute to genomic

rearrangements that occur in the pathogen as a result to exposure to various stress conditions. The effect of stresses on these retrotransposons was investigated through Northern and real time-PCR analyses by using methyl viologen (MV), methyl methane-sulfonate (MMS), and heat shock (HS) as stress treatments in liquid culture medium. Southern analyses were also done to determine insertion pattern changes of the elements as affected by the stress treatments. Transcriptions of *RETRO6* and *RETRO7* were highly induced by methyl viologen (MV) among single-conidium isolates after the treatments, but no new insertions were detected, indicating that the high expressions of these elements after MV treatment were not directly related to the insertion of new copies and that suppression mechanisms might be actively involved.

3. Characterization of *RETRO5*

Sequence analysis revealed that *RETRO5* is the first Ty1/copia-like element in *M. oryzae*. In addition, long terminal repeat (LTR) regions of the element are more than twice longer than the LTRs of *RETRO6* and *RETRO7* and have sequence similarity to ribosomal DNA (rDNA) intergenic spacer (IGS). An attempt to sequence the flanking region of a full-length insert of *RETRO5*, reveals a tandem structure of the element similar to rDNA repeat units. *RETRO5* transcription was induced by MMS treatment and its insertion pattern was changed by the stress treatment. Southern analyses using DNA recombinational repair gene mutants, Ina168 $\Delta khm80$ and $\Delta rhm51$, showed more insertions in the untreated isolates of these mutants compared to untreated wild type Ina 168 strain, suggesting that these genes might be involved in suppressing *RETRO5* insertion. A reporter gene for *RETRO5* expression, in which an eGFP gene was fused to 3' end of *RETRO5* LTR was constructed and introduced into strain Ina 168. Fluorescent microscopy revealed induced fluorescence on vegetative hyphal tips after MMS treatment, suggesting that *RETRO5* LTR is a functional promoter.

4. Conclusion

This study revealed the variation of the structure and activity of retrotransposons in the rice blast fungus. Especially on *RETRO5*, this is the first report of tandem-repeated structure of retrotransposons, and of relationships between DNA recombinational repair and retrotransposon. These findings should help finding ways to control the transposon insertion in the rice blast fungus and contribute to the disease prevention in the future.

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 蔵
副 査	教 授	上 田 一 郎
副 査	客員教授	鎌 形 洋 一
副 査	特任准教授	田 中 みち子

学 位 論 文 題 名

Studies on the Retrotransposons of the Rice Blast Fungus

(イネいもち病菌のレトロトランスポゾンに関する研究)

本論文は、英文 109 頁、図 30、表 11、5 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

イネ栽培における、世界的に重要な問題の 1 つがイネの最重要病害の一つであるイネいもち病である。子のう菌類であるイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* の感染によるこの病害によって世界中で 6 千万人が餓死するだけの量の被害があると言われている。本病害の防除は、主として対応する非病原性遺伝子を持ついもち病菌に対して抵抗性を示す真性抵抗性遺伝子を持ついもち病抵抗性イネ品種を利用することによる。病原菌の非病原性遺伝子の変異が新しい病原性を示す菌の出現の要因とされており、そのような変異にイネいもち病菌ゲノム中の転移因子 (transposable elements; TEs) が関与する例が実際に報告されている。イネいもち病菌ゲノム中には詳細の不明なものも含めて様々な転移因子が存在することが知られている。本研究の目的は、これまで詳細が解析されていなかったイネいもち病菌のレトロトランスポゾン、RETRO5, RETRO6, RETRO7 についての特徴を明らかにすることである。

2. RETRO6及びRETRO7の特徴付け

RETRO6とRETRO7の *Pol* (polymerase) 遺伝子のコードするアミノ酸配列の解析から、これらは Ty3/gypsy-like elements であることがわかった。サザン解析の結果、これらの因子はイネ及びその他のイネ科植物を宿主とするいもち病菌のゲノム中に保存されていることがわかった。イネいもち病菌はイネへの感染時にイネからの抗菌物質などのストレスにさらされる。そこで、そのようなストレスの処理でRETRO6及びRETRO7の転写が増大するかを調べた。液体培養した Ina168 株の

菌体をmethyl methane-sulfonate (MMS), methyl viologen (MV), 熱ショック (heat shock; HS)で処理し、RNAを抽出しノザン解析および定量RT-PCR解析を行った。その結果、MV処理によりRETRO6 および RETRO7の転写が顕著に増大することが示された。また、MVで処理した菌体をオートミール寒天培地に接種し、孢子形成させたのち単孢子分離した菌株からDNAを抽出し、サザン解析によりRETRO6及びRETRO7の挿入パターンの変化を調べた。その結果、挿入パターンの変化は観察されなかった。以上のことから、RETRO6およびRETRO7は細胞内で酸化ストレスを与えるMV処理でその転写が活性化するが、その活性化はRETRO6およびRETRO7の新たなコピーの増大には直接関係せず、新コピーの挿入を抑制する機構が存在することが示唆された。

3. RETRO5の特徴付け

配列の特徴から、RETRO5はいもち病菌に於ける最初のTy1/copia-like elementであることがわかった。さらに、RETRO5のLTR (long terminal repeat)はRETRO6あるいはRETRO7の2倍以上の長さがあり、rDNAのIGS (intergenic spacer)と相同性があることがわかった。RETRO5のゲノム上における存在状態を解析すると、rDNAのようなタンデム構造を取っていることがわかった。このような構造をもつレトロトランスポゾンには他に例がない。RETRO5の転写は、MMS処理により顕著に増大することがノザン解析で示された。また同処理後の菌体を接種源として形成させた分生子由来の菌株では、RETRO5の挿入パターンに変化が見られた。この挿入パターンの変化はIna168株のDNA組換え修復遺伝子の破壊株 ($\Delta rhm51$: 相同組換え欠損株 及び $\Delta khm80$: 非相同末端再結合欠損株) ではMMS処理を行わない菌体でも多くのパターン変化が見られ、これらの遺伝子がRETRO5の新コピーの挿入の抑制に機能している可能性を示唆した。RETRO5のLTRにeGFP遺伝子を融合したレポーター遺伝子を導入したIna168株を液体培養し、MMSにより処理したところ、栄養菌糸の先端部分で強いeGFP蛍光が観察され、RETRO5のLTR配列がプロモーターとして機能しており、菌糸の先端部分でRETRO5の転写が強く誘導されていることが示唆された。

本研究はいもち病菌におけるレトロトランスポゾンの構造と活性の多様性を明らかにした。特にRETRO5においては、初めてのタンデム構造をもつレトロトランスポゾンであること、またDNA組換え修復とレトロトランスポゾンの関係を示したいもち病菌における最初の例である。本研究の成果は、いもち病菌のレトロトランスポゾンの新規の挿入を制御することにつながり、ひいてはいもち病の防除に役立つ可能性がある。よって審査員一同は、Sanchez, Edmundo Jr. Lonjas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。