

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻

平成14年度博士課程単位取得

氏名 深田 純司

指導教員名 難波 成任

論文題目 イネいもち病菌の病原性に関わる遺伝子の構造と機能に関する研究

イネは全世界人口の約半数もの人々にとって主要な作物であり、イネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* はそのイネに対して最も甚大な被害を与える病原菌である。また、いもち病菌はイネ科植物における宿主範囲も広く、植物-病原菌間の相互作用を解析する上でそのモデル系ともなっている。いもち病菌の植物への感染行動は、葉面上で感染する数多くの病原菌における典型的な様式をとる。すなわち、葉上に付着した胞子が発芽し、付着器を形成して葉面に接着した後、付着器のメラニン化とその内部液の膨圧の上昇によって、侵入菌糸が突出・分化してイネ表皮を機械的に突き破り、イネ体内に侵入する。このように、イネいもち病菌の病原性には、胞子形成以降に見られる感染器官の形成が大きく関与する。そこで本研究では、イネいもち病菌における病原性の発現を付着器形成時および侵入菌糸形成時に定め、各段階において特異的に発現する遺伝子を、主として Differential display 法により探索・分離し、各遺伝子全長の構造を解析した後、遺伝子破壊実験によってその機能を解析した。一方、最近、イネいもち病菌の全ゲノムシーケンスが公開され、その情報に基づいて特定の遺伝子を単離することが可能になったため、本研究では *Aspergillus nidrans* の胞子形成に関与することが知られている転写因子遺伝子 *STUA* のホモログ遺伝子をイネいもち病菌より単離して、その構造と病原性に果たす機能について解析した。得られた成果の概要は、以下の通りである。

1. Differential display (DD) 法による病原性に関与する遺伝子の探索

イネいもち病菌における病原性の発現を付着器形成以降侵入菌糸形成までの過程に定め、その段階で特異的に発現する遺伝子を、主として RT-PCR をベースとした DD 法によって探索した。得られた 3 種類の特異的 cDNA 断片をクローニン

グして部分シーケンスを決定し、さらにこれらをプローブとしてイネいもち病菌のゲノミックライブラリーから対応する各全長遺伝子を単離した後、それらの構造を解析した。こうして得られた遺伝子は、機能不明な遺伝子 9418511 と 6789 および MFS (Major Facilitator Superfamily) transporter 様タンパク質遺伝子 *MFS1* の 3 種である。次いで、各遺伝子について遺伝子破壊によってその欠損株を作製し、各遺伝子の病原性に関わる機能について解析した。

(1) 9418511 遺伝子および 6789 遺伝子

両遺伝子の全塩基配列から予想されるアミノ酸配列からは、相同性の高い既知のタンパク質が見いだされなかったため、各遺伝子産物の機能は不明であった。また、両遺伝子欠損株は、ともに、孢子発芽率、付着器形成率、イネ(*Oryza sativa* L. *japonica* 品種:コシヒカリ)での病徴のいずれにおいても野生株との差違が見られなかった。従って、両遺伝子は少なくとも病原性には関連しないことが判明した。

(2) *MFS1* 遺伝子

MFS transporter 様タンパク質遺伝子 *MFS1* について、(1)と同様に欠損株を作成して付着器形成率の測定や接種試験を行ったが、野生株との差違は認められなかった。一方、MFS transporter は菌の薬剤耐性に関与している可能性があるため、*MFS1* 欠損株について、カンプトセシン、シクロヘキシミド、DMI 剤など全 14 種類の薬剤に対する薬剤感受性試験を行ったが、野生株と全く同じ EC₅₀ 値を示し、*MFS1* は本菌の薬剤耐性にも関与していないことが明らかにされた。

2. 新規転写因子遺伝子 *MSTUA* の単離とその病原性に関わる機能の解析

APSES (*Asm-1*, *Phd1*, *StuA*, *Efg1*, *Sok2*) タンパク群は、DNA 結合ドメインの 1 つである basic Helix-Loop-Helix (bHLH) 構造をもつ転写因子であり、真核微生物の形態形成に関与していることが知られている。例えば、*A. nidulans* の *StuA* (stated) は分生子形成過程で通常見られるメトレとフィアライドの形成に、*Neurospora crassa* の *Asm-1* (ascospore maturation) は子嚢殻形成にそれぞれ関与している。また、*Candida albicans* の *Efg1* (enhanced fungal growth) は cAMP-dependent protein kinase (Tpk2) の制御下で偽菌糸形成に関与している。一方、イネいもち病菌は分生子形成過程ではメトレ、フィアライドを形成しないが、cAMP-dependent protein kinase (CpkA) が感染器官の形態形成に関与していることが知られている。この CpkA は付着器形成や植物細胞内での菌糸生長には関与しないものの、付着器内のグリセロールの蓄積および付着器からの侵入菌糸の形成に関与している。

そこで、イネいもち病菌の感染器官の形態形成における *StuA* ホモログの機能を解析することを目的として、まず、イネいもち病菌のゲノムデータベースから *A. nidulans* の *STUA* 遺伝子とのホモログ遺伝子 *MSTUA* を見だし、この全長遺伝子クローンをイネいもち病菌のゲノム DNA ライブラリーから PCR によって増幅・単離した。*MSTUA* 遺伝子はゲノム中に 1 コピーだけ存在しており、その構造は、シグナルペプチドをコードしておらず、5' 端側に上述の bHLH ドメインをコードし、71 および 58 ヌクレオチドの 2 つのイントロンを含む全長 1986 ヌクレオチドの ORF から成っていた。*A. nidulans* の *StuA* とはアミノ酸レベルで 50% の相同性が認められた。次いで、相同組み換えにより *MSTUA* 欠損株を 2 株作出し、その形質を解析した。その結果、*MSTUA* 欠損株では、野生株と比べて胞子や付着器の形態および胞子発芽率には差違が認められず、また、タマネギ表皮細胞での侵入菌糸形成能にも差違はなかったが、固形培地上での菌叢の状態が異なっていた。すなわち、菌糸伸長速度が遅延しており、気中菌糸が少なく、胞子形成数が著しく減少していた。さらに、plastic cover slip 上での付着器形成の開始に若干の遅延が見られ、付着器形成後では発芽管の blanching 率が上昇していた。病原性試験では、噴霧接種ならびにパンチ接種の両方において *MSTUA* 欠損株では病徴が殆ど見られず、イネに対する病原性が極端に低下していることが示された。また、*MSTUA* 欠損株の交配試験では、雄性を示す子嚢殻は形成されたもののその形成数は著しく減少しており、形成速度も著しく遅延していた。一方、雌性を示す子嚢殻はまったく形成されず、雌性が完全に失われていることが認められた。以上の結果から、*Mstua* はイネいもち病菌における菌糸生長、胞子形成、交配性に関与するとともに、イネへの病原性にも深く関わっていることが示された。

以上、本研究では、イネいもち病菌の病原性に関わる遺伝子を探索し、その構造と機能を明らかにすることを目的として、感染器官特異的に発現している遺伝子を DD 法によって探索する方法と、他の菌類で器官形成に関与していることが知られている遺伝子のホモログをイネいもち病菌のゲノム DNA ライブラリーから探索する方法とを用いて解析した。その結果、前者では該当する遺伝子は得られなかったが、後者によってイネいもち病菌の病原性に関わる重要な新規遺伝子 *MSTUA* を同定・単離することに成功した。今後、この *MSTUA* について、そのイネいもち病菌の情報伝達系における位置づけを解明することで、病原性発現のメカニズムに関するさらに広範な知見が得られるものと期待される。