

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 深田 純司

全世界人口の約半数もの人々にとって主要な作物であるイネに対し、最も甚大な被害を与える病原菌であるイネいもち病菌のイネへの感染行動は、分生胞子の発芽管から分化した附着器を経由して侵入するという典型的な様式をとる。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附着器形成時および侵入菌糸形成時に定め、各段階で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* の孢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附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、これらの配列を基に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。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 種であった。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。その結果、いずれの遺伝子欠損株でも感染器官形成能の低下は見られず、イネ (*Oryza sativa* L. *japonica* 品種: コシヒカリ) での病徴において野生株との差違が見られなかった。従って、各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。一方、*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 EC_{50} 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. nidurans* の *StuA* (*stunted*) 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、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、その前後の配列を基に遺伝子破壊ベクターを構築した。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、野生株と比べて孢子や付着器の形態および孢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、固形培地上で菌糸伸長速度が遅延しており、気中菌糸が少なく、孢子形成数が著しく減少していた。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、MstA はイネいもち病菌における菌糸生長、孢子形成、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。本研究の成果は学術上・応用上の価値もきわめて高く、イネいもち病菌のみならず他の植物病原糸状菌の感染器官形成の関連因子を探索する際においても今後非常に役立つ知見であり、高く評価される。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めるものである。