

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻
平成 17 年度博士課程 進学
氏 名 森 拓馬
指導教員名 難波 成任

論文題目 イネいもち病菌のペクチン分解酵素ホモログ *MDG1* と
その孢子発芽に対する影響に関する研究

植物糸状菌病は植物病害数全体の 8 割以上を占める。なかでもイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) はイネの最重要病原体である。イネいもち病菌の孢子がイネに接触すると発芽管を伸長させ、その先端に付着器を形成する。付着器からは貫穿糸が生じ、クチクラ層と細胞壁を貫通することにより植物へ侵入し、さらに植物組織中で増殖することによって感染が成立する。この過程の各器官の形成に関わる遺伝子の発現制御やシグナル伝達機構には未解明な部分が多く、またこれまで明らかにされた知見、研究も付着器形成等の限られたステージに集中している。植物病原糸状菌の植物組織への侵入、植物組織内での増殖（組織内伸展及び栄養獲得）の際には細胞壁分解酵素の関与する例が多く報告されているが、イネいもち病菌でこれらの過程に関与する細胞壁分解酵素は未だ同定されていない。

多くの植物病原糸状菌では植物細胞壁の構成成分であるペクチンを分解する酵素をもち、その中でも特にポリガラクトナーゼ (PG) が病原性に関わる例が多く報告されている。しかしイネいもち病菌のイネへの侵入過程においては物理的圧力の寄与が大きいと考えられていることや、イネ葉細胞壁中のペクチン含量は双子葉植物のそれと比較して低いことから、これまでイネいもち病菌のイネへの病原性においてペクチン分解酵素の寄与は小さいと考えられてきた。しかしイネにおいても胚乳のようにペクチン含量の高い部位が存在する。またイネの全ゲノ

ム解読により，イネゲノムには 4 種類の PG 阻害タンパク質（polygalacturonase-inhibiting protein：PGIP）がコードされていることが明らかになった．PGIP は植物病原菌の分泌する endoPG の働きを阻害し，抵抗性を誘導することが知られており，イネのもつ PGIP の一部は糸状菌の PG の機能を阻害することも示されたことから，イネに対しても PG が病原性因子として関与する可能性が示唆された．

1. イネいもち病菌のペクチン分解酵素の発現解析

本研究では炭素結合触媒酵素データベース CAZy 及び 2005 年に全ゲノム配列が解読されたイネいもち病菌 70-15 株のデータベースを用いて，6 つのペクチン分解酵素（それぞれ 1 つの endoPG，exoPG，ペクチン酸リアーゼ，ペクチンメチルエステラーゼ，2 つのペクチンリアーゼ）を同定した．これら 6 遺伝子は付着器ではほとんど発現していないことが既に報告されている．これら遺伝子の病原性への関与を検証するため，通常の培養液中やペクチンを炭素源とした培地中での栄養菌糸における発現，及び休眠孢子における発現を解析したところ，endoPG ホモログである MGG_08938 がペクチン培地での培養時，及び休眠孢子期に発現していることが示された．さらに exoPG ホモログの MGG_08752 がペクチン培地中で若干発現していることも示された．以上から MGG_08938 と MGG_08752 がペクチン分解に関わっている可能性が示唆された．特に MGG_08938 はペクチン培地中でより多く発現していることに加え，休眠孢子でも発現していたことから植物への侵入や増殖過程だけではなく，別の過程でも何らかの機能をもつと考えられ引き続き解析を行った．

2. endoPG ホモログ MGG_08938 のクローニング

イネいもち病菌 P2-R 株のゲノム DNA より MGG_08938 を PCR 増幅し，クローニングした．また休眠孢子より全 RNA を抽出し，MGG_08938 の mRNA の cDNA を RT-PCR によって増幅し，クローニングした．これらの塩基配列を決定したところ，P2-R 株のもつ MGG_08938 にはゲノムの解読された 70-15 株の MGG_08938 と比較して一塩基の挿入があった．この挿入によって生じたフレームシフトにより 70-15 株では 364 アミノ酸であった MGG_08938 が P2-R 株では 190 アミノ酸になっていた．一般に endoPG は Glycoside hydrolase 28 (GH_28) ファミリードメインを持つが，P2-R 株の MGG_08938 ではこの GH_28 配列が途中で分断されていたため，ポリガラクトナーゼの機能は有さないと推測された．また GH_28 ドメイン内の残された N 末端側の配列においても GH_28 ファミリーの保存配列が認められなかった．

70-15 株, P2-R 株は共に日本産の近縁なイネいもち病菌株である. これら以外の 3 系統の日本産菌株についても MGG_08938 の塩基配列を決定し比較したところ, いずれの場合も対応する部分に P2-R 株と同様の一塩基の挿入が認められ, MGG_08938 におけるフレームシフトは P2-R 株特異的なものではないと示唆された. P2-R 株における 190 アミノ酸の MGG_08938 の配列を用いて BLAST 検索を行ったが, endoPG 以外に相同性の高いタンパク質は検出されなかった. シグナル配列予測を行ったところ, 細胞壁或いは細胞外に局在することが示された.

3. endoPG ホモログ MGG_08938 破壊株の解析

次いで MGG_08938 の機能解析を行うため, P2-R 株を用いて相同組み換えによる MGG_08938 遺伝子破壊株の作出を行った. この遺伝子破壊株をイネに接種したところ, 野生型株と比較してイネの葉, 穂いずれの病原性にも顕著な差がみられなかったため, イネに対する病原性への関与は小さいと考えられた. また栄養菌糸の成長において野生型株との顕著な相違はみられなかったため, 栄養成長への関与も小さいと考えられた. MGG_08938 は休眠孢子期に発現していることが示されたため, 発芽や付着器の形成を誘導する環境下で孢子形成後の形態を詳細に観察した. その結果野生型株では発芽阻害のおこるはずの 1×10^6 個/ml の高密度条件の孢子においても, 破壊株では高い発芽率であることが明らかとなった. 一方発芽阻害が起こらない 3×10^4 個/ml 以下の低密度条件下では野生型株と破壊株との間に発芽率の差は認められなかった. また孢子からの栄養菌糸の発芽率に野生型株と破壊株との間に差はみられなかった. 以上から MGG_08938 は密度依存的に発芽管の形成を抑制していることが示され, この遺伝子を *MDG1* (*Magnaporthe oryzae* density-deependent germination regulator) と命名した.

3. *MDG1* と自己発芽阻害物質の関係

多くの糸状菌の孢子では高密度条件や植物体上以外の環境で発芽阻害の起こることが報告されている. この現象の中には自己発芽阻害物質が関与する例がある. 低密度条件の孢子では発芽阻害物質は拡散すること, もしくは植物体上では発芽阻害物質が植物体表面に親和性のために溶出し, 孢子から消失することによって発芽が誘導されると考えられている. そこで *MDG1* と自己発芽阻害物質の関わりについて検討を行った. まずイネいもち病菌孢子の高密度発芽阻害における自己発芽阻害物質の存在を確認するために, 高密度条件で 6 時間インキュベーションした孢子懸濁液の上清を回収し, この上清中に発芽阻害物質が含まれているかを検証した. 検定に用いる孢子自らが分泌する自己発芽阻害物質の影響を除くために,

発芽阻害の起こらない 3×10^4 個/ml の低密度条件で検定を行った。その結果孢子懸濁液上清による発芽阻害が観察されたため、この中に自己発芽阻害物質が存在することが確認された。一方 *MDG1* 破壊株を用いて同様の試験を行ったところ、この孢子懸濁液上清は野生株孢子の発芽を阻害したことから、*MDG1* 破壊株も発芽阻害物質を生産することが示唆された。これは *MDG1* が発芽阻害物質の受容以降の経路に関わっていることを示唆している。また孢子の発芽阻害には *MDG1* の関与しない経路も存在すること、*MDG1* は自己発芽阻害物質の生産又は分泌に対してフィードバック的に関与していることも示唆された。

以上本研究ではイネいもち病菌のもつ endoPG ホモログ *MDG1* が高密度条件の孢子で発芽管の形成阻害に関わることを示した。これはイネいもち病菌の発芽制御に関わる因子として初めての報告であるとともに、糸状菌の密度依存的な発芽阻害を制御する因子としても初めての報告である。アミノ酸配列の相同性から *MDG1* は endoPG 由来の遺伝子であると考えられる。しかしイネいもち病菌では細胞壁分解酵素の侵入に対する寄与は小さいと考えられており、また胚乳を除く組織内増殖にもペクチン分解酵素の寄与は小さいと考えられる。以上から *MDG1* の機能的束縛は小さいと考えられ、その中で新しい機能、すなわち密度依存的な発芽抑制という機能を獲得したと考えられる。

MDG1 は endoPG 以外に相同なホモログが認められないため、配列からその機能を推定することは難しい。*MDG1* は既知の受容体に特徴的な配列を持たないが細胞外に局在すると推定されたことから、細胞膜外で発芽阻害物質の受容体として、もしくは受容体と協調して働く可能性が考えられる。

イネいもち病菌の孢子発芽過程についてはこれまで分子生物学的解析がほとんど行われていなかった。発芽過程の制御はイネいもち病菌の防除に直結することから、*MDG1* の発芽阻害機構の解明によって新たな農薬や新規防除法の開発につながることを期待される。