

(別紙様式第3号) (Format No. 3)

学 位 論 文 要 旨
SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

氏名 Name: 森脇 明弘

題目 Title: イネごま葉枯病菌の形質転換系の確立と光形態形成関連遺伝子の解析
(Molecular analysis of photomorphogenesis-related genes by transformation system
in *Bipolaris oryzae*)

イネの代表的な植物病原糸状菌であるイネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) の伝搬体である胞子形成はNUV光と青色光の拮抗的な光調節反応 (マイコクローム系) により制御されていることが知られている。本研究では、イネごま葉枯病菌を用いてこれらの光調節反応の分子基盤を明らかにするための分子生物学的手法を用いた基礎解析を行った。

1. 形質転換系の確立と逆遺伝学的手法による遺伝子機能解析

植物病原糸状菌においては *Magnaporthe grisea*, *Alternaria alternata* および *Colletotrichum lagenarium* など薬剤耐性遺伝子を有する形質転換ベクターを選択マーカーとして用いる形質転換系が確立されている。しかしながら、イネごま葉枯病菌を用いた形質転換系は確立されていない。そこで遺伝子機能の解析と、その応用をめざして、イネごま葉枯病菌の形質転換系の確立を試みた。

まず、プロトプラストの作成に効率的な酵素の組み合わせを検討した結果、多くの糸状菌において効果的にプロトプラストを作成できる Novozyme234 はほとんど効果がなく、イネごま葉枯病菌においては Kitalase および Driselase の両酵素が効果的であった。最終的に Kitalase と Driselase に Cellulase を加えた酵素系が一番多くのプロトプラストを形成できた。

次に、このプロトプラストを用いて従来用いられてきた PEG (polyethylene glycol) 法に加え、効率的な形質転換体作出法として考案された REMI 法 (Restriction Enzyme-Mediated Integration) による形質転換を試みた。その結果、5 μ g の形質転換ベクター pSH75、 1×10^7 のプロトプラストを用いて作出する形質転換体数は PEG 法に比べ REMI 法が約 20-30 倍以上も効率的であり、制限酵素の種類で異なるものの 1 処理あたり 8-57 菌株の形質転換体を得ることができた。さらに、REMI 法により作出された菌株のほとんどにおいて、pSH75 のゲノム DNA への挿入が 1 コピーでかつランダムであった。これらの結果から、REMI 法がイネごま葉枯病菌においても有用性の高い形質転換法であると考えられた。

次に REMI 法によって作出した 1200 菌株の形質転換体から 3 菌株の色素合成欠損変異体を選抜し、これらの菌株における pSH75 挿入部位近傍の遺伝子解析を行った。その結果、これら 3 菌株ともに破壊部位は異なるものの糸状菌の黒色色素である 1,8-DHNメラニン合成の初期反応に関与するポリケチド合成酵素遺伝子 (*PKSI*) 内およびその上流領域にベクターの挿入が起こっており、これが *PKSI* 遺伝子機能欠損の原因となることが明らかとなった。

続いて本形質転換系を利用した逆遺伝学的手法による遺伝子機能解析への有効性について

て検討を行った。*PKSI*遺伝子を標的遺伝子に用い、遺伝子の相同組み換えを利用した相同置換法による遺伝子ノックアウト、およびdsRNAを介した転写後遺伝子抑制機構を利用したRNAサイレンシング法を用いた遺伝子ノックダウンを試みた結果、両方法ともに効率的に形質転換体の作成に成功し、これらのほとんどが黒色色素メラニンの蓄積の認められないアルビノ株であった。これらのことから、相同置換法およびRNAサイレンシング法がイネごま葉枯病菌においてもその遺伝子機能に利用可能な有効な方法であることが明らかとなった。

2. イネごま葉枯病菌のMAPキナーゼシグナル伝達系の機能解析

細胞外から核への情報伝達を担う重要な細胞内シグナルシステムのひとつであるMAPKカスケードに着目し、メラニン合成や孢子形成などの発現を制御する光シグナルがこのMAPKカスケードを通過する可能性を推定し、イネごま葉枯病菌のMAPK遺伝子のクローニングおよび相同置換法を用いた遺伝子機能解析を行った。既知の菌類MAPKのアミノ酸配列をもとに作成したディジェネレイトプライマーを用いたディジェネレイトPCRによってイネごま葉枯病菌からMAPK遺伝子のクローニングを試みた結果、YERK1型 (Yeast Extracellular Signal-regulated Kinases) MAPKである*BMK1*遺伝子およびYSAPK (Yeast Stress Activated Protein Kinase) 型MAPKである*SRMI*遺伝子の2つのサブファミリーに分類されるMAPKを同定した。これらの遺伝子破壊株の解析から、*BMK1*遺伝子は孢子形成、菌糸生育および宿主植物上における病原性に重要な遺伝子であり、*SRMI*遺伝子は浸透圧およびUVストレス条件下における環境応答に関与していることが示唆された。しかしながら、これらの両遺伝子破壊株ではNUV光照射によって特異的に発現量の増加するメラニン合成遺伝子群の光による発現制御に影響を及ぼさなかったことから、*BMK1*、*SRMI*の2つの遺伝子が関与するMAPK経路は光シグナルの伝達には直接的に関与しないものと結論した。

3. 青色光受容体様遺伝子のクローニングおよび機能解析

本研究室でクローニングされたアカパンカビ*N. crassa*などで知られる青色光受容体遺伝子*WC-1*、*WC-2*のホモログ遺伝子*BLR1*、*BLR2*のドメイン検索を行った結果、光受容体の機能を果たす上で重要であるドメインLOVや*WC-1*、*WC-2*などのように複合体を形成する分子にとって重要なドメインPASおよび転写制御に関わるzinc fingerなどにおいては高度に保存されていた。特に*BLR1*タンパク質が保持していると考えられたLOVドメインに関しては*WC-1*ホモログだけでなく、発色団FADを結合するその他の光受容体*Neurospora VVD*、*Arabidopsis phot1*、*phy3*なども相同が見られ、本領域の存在からも*BLR1*タンパク質が発色団を結合し光受容体として働く機能を備えていることが示唆された。相同置換法およびRNAサイレンシング法を用いた*BLR1*および*BLR2*遺伝子の機能解析の結果、*BLR1*遺伝子破壊株および*BLR2*遺伝子サイレンシング株は孢子が形成できず、気中菌糸の形成も不安定であった。一方、*BLR1*遺伝子破壊株において光回復酵素遺伝子*PHR1*の発現が抑制をされたのに対し、*BLR2*遺伝子サイレンシング株は*PHR1*にはほとんど影響を及ぼさなかった。

このように本研究では、イネごま葉枯病菌の遺伝子機能解析を行うための基盤となる形質転換系を確立した。そして本法を用いることでイネごま葉枯病菌のMAPKシグナル伝達系、および青色光受容体様遺伝子などいくつかの遺伝子の機能解析を行い、断片的ではあるが本菌の光形態形成における分子基盤の解明に向けたいくつかの知見が得られた。