

学位論文審査の結果の要旨

氏名	森脇明弘
審査委員	主査 荒瀬 榮 印
	副査 木原 淳一 印
	副査 尾谷 浩 印
	副査 田中 秀平 印
	副査 本田 雄一 印
題目	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 <i>Bipolaris oryzae</i>)
審査結果の要旨 (2, 000字以内)	
<p>本研究は、分子生物学的手法を用いてイネごま葉枯病菌の光調節反応機構を解析したもので、その成果は以下の様に要約される。</p> <p>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</p> <p>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 (restriction enzyme-mediated integration) 法による形質転換を試みた。その結果、作出できた形質転換体数はPEG法に比べREMI法が約20-30倍以上も効率的であり、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。</p> <p>次にREMI法によって作出した3菌株の色素合成欠損変異体におけるpSH75挿入部位近傍の遺伝子解析を行った結果、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 (<i>PKSI</i>) 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<i>PKSI</i>遺伝子機能欠損の原因となることが明らかとなった。</p> <p>続いて本形質転換系を利用した逆遺伝学的解析による遺伝子機能解析への有効性について検討を行った。<i>PKSI</i>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、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の機能解析に有効な方法であることが明らかとなった。</p> <p>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</p> <p>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</p>	

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。ディジェネレイト PCR によって YERK1 型 MAPK である *BMK1* 遺伝子および YSAPK 型 MAPK である *SRM1* 遺伝子の 2 つの MAPK を同定した。これら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、*SRM1* 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*、*SRM1* 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. 青色光受容体遺伝子のクローニングおよび機能解析

イネごま葉枯病菌からクローニングしたアカパンカビ (*Neurospora crassa*) の青色光受容体遺伝子 *WC-1*、*WC-2* のホモログ遺伝子をクローニングした。この両遺伝子から推定されるアミノ酸配列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クロモフォアの結合に関与する LOV ドメインや、タンパク質間相互作用に関わる PAS ドメイン、および転写制御に関わる zinc finger DNA 結合ドメインなどが高度に保存されていた。これらのドメインの存在から *BLR1* および *BLR2* の両タンパク質がアカパンカビの *WC-1* および *WC-2* タンパク質と同様の機能を持つことが示唆された。また、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を形成せず、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* およびメラニン合成転写制御因子 *BMR1* の発現が抑制されたのに対し、*BLR2* 遺伝子サイレンシング株は *PHR1* 遺伝子の発現抑制は確認されたものの、*BMR1* 遺伝子の発現にはほとんど影響を及ぼさなかった。

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、本法を用いることによりイネごま葉枯病菌の MAPK シグナル伝達系関連遺伝子、および青色光受容体遺伝子などをクローニングすると共に、その機能と発現様式を明らかにした。これらの成果は、イネごま葉枯病菌を初めとする植物病原糸状菌の光形態形成機構の解析という植物病理学の重要課題の解明に寄与する新知見であり、博士（農学）の学位を与えるに十分な価値を持つものと判定した。