Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-09

# いもち病菌に存在する転移因子の活性制御に関する研究

池田，健一

(Degree)
博士（農学）
(Date of Degree)
2001-09-30
(Date of Publication)
2007-08-09
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2404
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002404

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

博士論文

# いもち病菌に存在する転移因子の活性制御に関する研究

**Studies on the mechanisms regulating transposable elements in *Magnaporthe grisea***

池田健一

**Ken-ichi Ikeda**

神戸大学大学院自然科学研究科

平成 13 年（2001 年）8 月

# 目次

*第１章　緒　論* . . . . . 1

*第２章　いもち病菌における各種転移因子の分布様式* . . . . . 9

1. 緒　言 ..... 9
2. 材料と方法 ..... 11
3. 結　果 ..... 13
4. 考　察 ..... 16

*第３章　MAGGY の転移活性化メカニズムの解析　— 特に転写活性化条件の検討* . . . . . 28

1. 緒　言 ..... 28
2. 材料と方法 ..... 30
3. 結　果 ..... 35
4. 考　察 ..... 40

*第４章　MAGGY におけるメチル化の及ぼす影響について* . . . . . 58

1. 緒　言 ..... 58
2. 材料と方法 ..... 60
3. 結　果 ..... 62
4. 考　察 ..... 64

*第５章　いもち病菌における RIP (repeat-induced point mutation)機構の存在の証明といもち病菌における有性世代* . . . . . 74

1. 緒　言 ..... 74
2. 材料と方法 ..... 76
3. 結　果 ..... 78
4. 考　察 ..... 82

*第６章　総合考察* . . . . . 100

*摘要* . . . . . 104

*謝　辞* . . . . . 106

*引用文献* . . . . . 107

# 第１章　緒　論

現在地球上には無限に近い数の生命体が活動している。灼熱の砂漠地帯から厳寒の北極、さらに深海や熱水など過酷な環境下においても生命体は存在している。これらはすべて原始の地球において誕生した些細な生命体から進化を遂げたものと考えられており、度重なる環境の急激な変動等でほとんどの生物が死に絶えながらも生き残った生物が繁栄を繰り返し、今日でもその生物の多様性は広がり続けている。

何故、生物はそのような多様性を作り出そうとしていくのか、その仕組みはどのような機構であるのか、生命体が持つ崇高なからくりを解き明かそうと、多くの研究者が挑戦を続けている。Barbara McClintock (1984)は、彼女が提案したゲノムストレス仮説において、生物はあるストレス環境にさらされると、自身の持つ転移因子を用いてゲノムの再構成を引き起こし、ストレス環境に適応できるような代謝形質の個体を生み出すように働く可能性を示唆した。

しかし、その当時は転移因子という言葉は概念上のものであり、その実体を掴むことはできなかった。転移因子とはゲノム内に存在している遺伝子領域で、自律的あるいは非自律的に異なる領域へ転移することを特徴とする。転移因子が転移に伴って引き起こす遺伝的多様性のメカニズムとして幾つかのプロセスが考えられている。第１に構造遺伝子に直接転移因子が挿入されることによる遺伝子の破壊、第２に相同な転移因子同士を介した相同組換え、第３に転移因子自身がコードしているプロモーター配列によって新たに転移した周辺遺伝子における発現パターンの変化、第４に転移因子と共に構造遺伝子の一部が転移し、新たな融合タンパク質が作られるなどのプロセスが考えられている (Fig. 1-1) (Kidwell and Lisch 1997; Gray 2000; Bennetzen 2000)。

多様な表現型を示す例として、アサガオの花弁やトウモロコシの穀粒の不規則な色素模様などが挙げられる。これらは色素合成遺伝子の発現パターンなどが変化したことによるものであるが、この遺伝子領域に転移因子が挿入されていることが証明された (Iida et al 1999,Walbot 2000)。トウモロコシに存在するトランスポゾン MuDR は紫外線照射を受けることによって活性

化することが示されており（Walbot 1999)、色素が変化することによって、紫外線の吸収効率が上がり、細胞に対する紫外線の悪影響を軽減させることが考えられた。これは McClintock が提唱した仮説が実証されたと言える。これにより転移因子が遺伝的多様性を生み出す重要な要因であるという認識が広まった。

植物病理学においても、生物の多様性ということは避けて通れない問題である。それは作物育種上、人々は数多くの品種を作り出し、それを侵すような新たな病原菌が出現してきた歴史が物語っている。植物体に感染する病原体が出現した機構は、いろいろな仮説が考えられ、結論が得られていない。しかし、病原体は共通して植物体が持ち合わせているさまざまな抵抗性反応に打ち勝ったという特徴を持つ。植物体はリグニン化・コルク化などによる物理的な障壁、ポリフェノール系などの抗菌作用のある化学物質などの静的抵抗性とよばれる機構で病原菌の侵入を防いでいる。また、病原体の侵入に伴い、細胞死の誘導・ファイトアレキシンの合成・PR（pathogenecis related)タンパク質の合成などにより積極的に病原体の侵入に対抗する動的抵抗性が引き起こされる（Mayama et al 1981; Benhamou 1996; Baker et al 1997; Martin 1999; Maleck and Dietrich 1999)。このような動的な抵抗性が誘導されることは、植物体が病原体を認識するメカニズムを持っていると考えられる。植物体は多種多様な抵抗性遺伝子（R-gene)を持つことによって多くの病原体の侵入に備えている（Ronald 1998)。一方、病原体は植物体へ感染を成立させるために、さまざまな武器（病原性因子）を持ち合わせており、それが病原体固有の情報となっている（Laugé and De Wit 1998)。病原体固有の情報は植物体が認識するために有効な情報であり、植物体の抵抗性を開始させる因子としてエリシターと呼ばれている。

この抵抗性遺伝子とエリシターとの特異的認識が抵抗性反応に重要であり Flor（1947)が遺伝子対遺伝子説として提唱してから、抵抗性遺伝子・エリシターに関する研究が植物病理学研究の中枢となっている分野である。この遺伝子対遺伝子説ではある病原体を認識するためにはある特定の抵抗性遺伝子が必要である。病原体側はエリシター物質の特徴を変化させることによって抵抗性反応をキャンセルさせることができる（Joosten et al 1997)。一方、抵抗性遺伝子は新たな情報をもとに変化した病原体を認識する可能性を

秘めている（Parniske et al 1997; Ellis et al 1999)。このような現象が自然界で行われていることを証明するのは難しいが、現在複雑なレース-品種間特異的寄生性を示している病原菌はそれらの相互作用の結果成立したと考えられている。

我々の研究室で扱っているいもち病菌（*Magnaporthe grisea*; anamorph, *Pyricularia grisea* or *Pyricularia oryzae*)はイネ科植物を中心に多くの植物に寄生性を示すことが報告されているが、それぞれの菌株は限られた植物にしか寄生できない。例えばイネに病原性を示すイネ菌株はイネ以外の植物に感染できず、アワに病原性を示すアワ菌株はアワ以外の植物に感染できない（Fig. 1-2）(Ou 1985; Rossman et al 1990; Kato et al 2000)。このような宿主特異的な寄生性は、いもち病菌が宿主植物との厳密な相互作用を続けてきた結果、成立した関係であると考えられる。さらにイネいもち病菌は複雑なレース-品種間特異的寄生性を示す。すなわち、イネ菌であってもある特定のイネ品種にのみ病原性を示し、それ以外の品種に対しては非病原性を示す。

イネを育種していく上で、いもち病菌に対して抵抗性の品種を導入すると数年の後に病原性を示す菌株が出現する例が報告されている。これを抵抗性品種の崩壊と呼んでいるが、この仕組みについてはまだ充分に解明されていない（Tapiero 1994; Peng et al 1998)。考えられる原因として、抵抗性品種を導入したことによってこれまでに存在していたさまざまなタイプの病原菌のポピュレーションバランスが変化して、病原性を示す菌株の菌群密度が上昇した可能性、あるいは圃場において突然変異が繰り返され、新しく抵抗性品種を打破する菌株が出現した可能性などが考えられる。Don et al. (1999)は日本各地で発生したイネいもち病菌を収集し、そのレースコードと遺伝的系統関係を明らかにしたが、レースコードと遺伝的系統関係には関連性は認められなかった。このことはそれぞれのレースが日本各地で独立して生じていることを意味し、後者の可能性を強く示唆する結果である。植物の抵抗性反応が病原菌のエリシターで決定されるならば、これをコードしている遺伝子の変化によって新しい病原菌が出現することも大いに考えられる。

筆者は、この病原性の多様化に転移因子が関与している可能性に着目した。実際、これまでにエリシターをコードしている非病原力遺伝子に転移因子が

挿入され、エリシターとして機能しなくなったことによって、新たなレースが出現した報告がなされている（Kearney et al 1988; Orbach et al 2000; Kang et al 2001)。

以上より、いもち病菌の病原性の多様性を理解していく上で、いもち病菌に存在している転移因子の活性化メカニズムや転移因子自身の動向について調査を行うことは非常に重要であると考える。そこで、本研究ではいもち病菌における様々なタイプの転移因子の分布状況や転移因子の活性化条件などを調査した。

一方で、転移因子が新たに転移する行き先は特定の塩基配列をターゲットとするものからランダムであるものまでさまざまである（Kim et al 1998)。この転移によって有益な形質が獲得されるばかりでなく、そのほとんどは宿主細胞にとって有害に働く場合が多い（Charlesworth et al 1994)。宿主細胞は無秩序な転移を許容することはできず、通常は何らかの機構によって転移活性を抑制し、制御していると考えられる。これらの機構は宿主細胞のゲノムを外来の遺伝子から守るための防御機構と捉えることができる。近年、遺伝子導入を行った個体における導入遺伝子のサイレンシング現象とトランスポゾンの不活性化現象が類似していることが明らかとなりつつある(Table 1-1)（Kumpatla et al 1998; Cogoni and Macino 2000)。これら機構は糸状菌・植物・動物などに広く保存された機構として注目されている。このゲノム防御機構は大きく分けて２つの段階で効果を上げている。

一つは転写の段階で作用するものであり、対象となる遺伝子領域のメチル化により、転写の開始に必要なプロモーター配列に転写因子が結合しにくくなったり、転写が途中で停止したりすることが原因と考えられる。この機構を TGS; transcriptional gene silencing と呼んでいる（Vaucheret and Fagard 2001)。宿主細胞は対象となる遺伝子領域を反復性のある配列など何らかの特徴によって認識し、メチル化させる能力を持っている。また遺伝子へのメチル化はそれをターゲットとして結合するメチル化結合タンパク質と複合体を形成し、クロマチン構造の大きな変化をもたらす（Leonhardt and Cardoso 2000)。このクロマチン構造の変化は周辺領域の遺伝子の発現パターンへも影響を及ぼし、転移因子の抑制機構だけではなく、多様性を生む要因の一つとも考えられる。ほ乳類における多様な抗体産出はイムノグロブリ

ンの可変領域の組み換え（V(D)J recombination）によるもので、この遺伝子領域のメチル化が関与していることが示されている（Hernandez-Munain et al 1999)。

もう一つの機構は、転写が完了した際に、その RNA 産物を宿主細胞が積極的に分解してしまうものである。これを PTGS; post transcriptional gene silencing と呼んでいる（Cogoni and Macino 2000)。対象となる遺伝子領域から転写された RNA と相補的な RNA が合成され、2 本鎖 RNA 状態になったところが標識となり、効率的に分解される。この 2 本鎖 RNA は非常に短いものでも十分にその機能を果たし、植物ではこれまでに、23 塩基の 2 本鎖 RNA 断片によって対象となる遺伝子を抑制することに成功している（Thomas et al 2001)。

また、これら 2 つの抑制機構とは別に、糸状菌では有性世代を経る際に高頻度の C:G から T:A への塩基置換を引き起こす RIP; repeat-induced point mutation という現象が知られている（Selker et al 1987)。この現象は一部の糸状菌でのみ確認されたものであり、この機構の普遍性やこの機構によってもたらされる変異の生物学的位置付けは明らかではない。

以上のように転移因子を制御するために宿主細胞はさまざまな機構を発達させており、転移因子の活性化とのバランスによって生物の多様性がもたらされる可能性がある。本研究では転移因子の活性化と併せて、いもち病菌に存在する転移因子に対する宿主細胞の抑制機構についても検討を行った。

**Table 1-1** Known mechanisms of gene silencing

| Mechanism | fungus | plant | animal |
|---|---|---|---|
| RNA degradation | Quelling (*Neurospora crassa*) | PTGS; post transcriptional gene silencing (*Arabidopsis thaliana*) | RNAi; RNA interference (*C. elegans, D. melanogaster*) |
| Methylation (Inhibition of transcription by methylation or chromatin remodelling) | MIP; methylation induced premeiotically (*Ascobolus immersus, Coprinus cinereus*) | TGS; transcriptional gene silencing (*Arabidopsis thaliana, Volvox carteri*) | TGS (Mouse) |
| C:G to T:A nucleotide transitions | RIP; repeat induced point mutation (*Neurospora crassa, Podospora anserina*) | - | - |

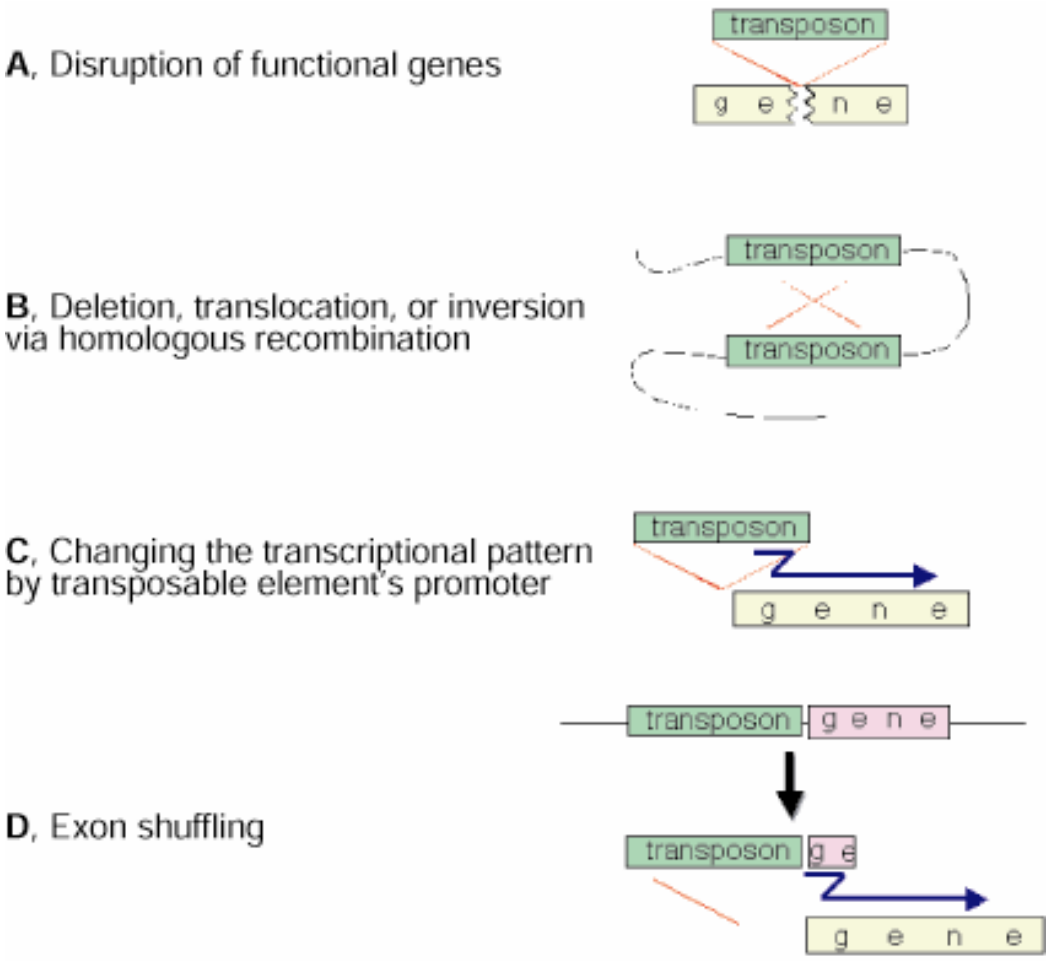



**Fig. 1-1** Effects of transposable elements in the host genome

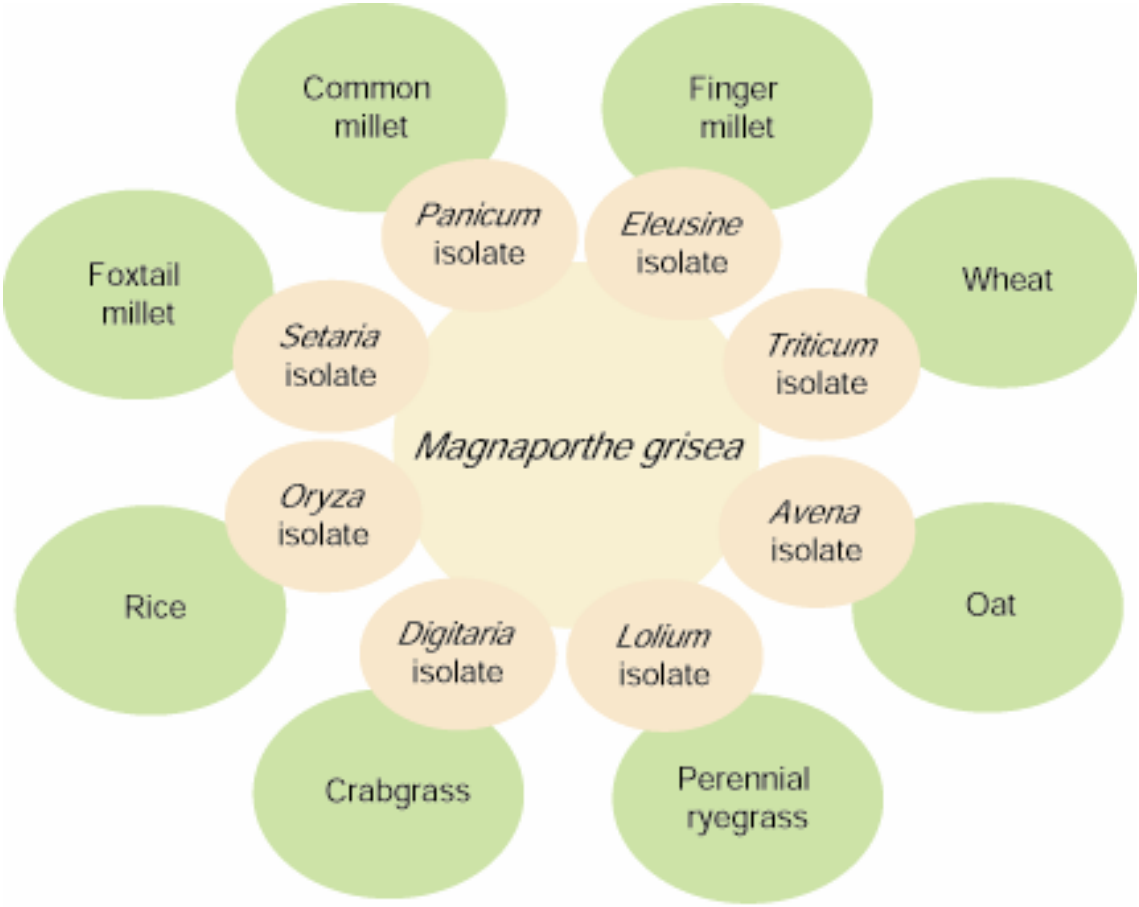



**Fig. 1-2** Species specific parasitism in *Magnaporthe grisea*

# 第２章　いもち病菌における各種転移因子の分布様式

## 1. 緒　言

転移因子はその遺伝子構造から幾つかのグループに分かれている（Table 2-1）(Kempken and Kück 1998)。RNA を中間体として転移するタイプはクラスＩに分類され（Kempken and Kück 1998)、この中で両端に同方向反復配列(LTR; long terminal repeat)を含んだものを LTR 型レトロトランスポゾン、LTR を含まない因子を Non-LTR 型レトロトランスポゾンとグループ分けし、Non-LTR 型レトロトランスポゾンの中でも自律的に転移するものを LINE (long interspersed nuclear element)、自律的に転移しないものを SINE (short interspersed nuclear element)と呼んでいる。自律的に転移するグループは RNA を鋳型として相補 DNA を合成する逆転写酵素をコードしている。LTR レトロトランスポゾンは遺伝子構造的にレトロウイルスと類似しており、その由来について興味が持たれている（Xiong and Eickbush 1990)。LTR レトロトランスポゾンは逆転写酵素の他に RNaseH やインテグラーゼなどをコードしているが、それぞれコードしているドメインの配置によって *gypsy* 型と *copia* 型に分かれる（Flavell 1992; Springer and Britten 1993)。植物にはこのどちらのタイプも存在するが糸状菌では *gypsy* 型がほとんどである。

また DNA 鎖のままカット・ペーストされて転移するタイプはクラス II に分類される（Finnegan 1989)。自律的に転移するものはトランスポゼースをコードしておりこれらを DNA 型トランスポゾンと呼んでいる。一方、自律的に転移しないタイプとして MITE (miniature inverted repeat transposable element)が報告されている（Wessler et al 1995)。

これら転移因子の起源についての仮説の一つとして、利己的な遺伝子要素として誕生し、新たな生物にまで侵入・拡散していったことが考えられている。*Drosophila melanogaster* において存在が報告された DNA 型トランスポゾンの *P* 因子は *D. melanogaster* の中でも保有しているものと保有していないものに分けられ、20 世紀に入ってから近縁種の *D. willistoni* から獲得されたものと考えられている（Daniels et al 1990)。また、宿主内に取り込まれた転移因子はそれぞれが転移を繰り返し、時間の経過によってその挿入部位は個体間で違いが出てくる。このことは、転移因子を用いて、フィン

ガープリント解析を行うことによって、個体群構造のより詳細な解析が可能となることを示している。

いもち病菌にも *gypsy* 型の LTR レトロトランスポゾンである MAGGY (Farman et al 1996a; Shull and Hamer 1996), *grasshopper* (Dobinson et al 1993)、LINE である MGR583 (Hamer et al 1989; Valent and Chumley 1991)、SINE である MgSINE (Kachroo et al 1995)、また DNA 型トランスポゾンとして MGR586 (Pot3) (Hamer et al 1989), Pot2 (Kachroo et al 1994)などがこれまでに報告されている (Table 2-1)。これら転移因子が病原性を異にする菌株間においてどのように分布しているのか、またそのコピー数はどれくらいなのか、興味が持たれた。これまでに、Hamer らや Leong らのグループが転移因子の分布様式について調査しているが、統一した見解は出ていない。例えば、Hamer らは、MGR583 はイネ菌においてのみ多コピーで存在すると報告したのに対し (Hamer et al 1989)、Leong らはその他の菌群にも多コピー存在することを指摘した (Kachroo et al 1997)。これらは病原菌の位置付けとして、農業上重要なイネ菌を中心としたために、その他のいもち病菌を詳しく検討しておらず、病原性や菌株同士の遺伝的近縁関係について考慮されていないのが原因と考えられた。

本研究室の草場らは、さまざまな植物から分離されたいもち病菌を rDNA の塩基配列・RFLP 多型などの情報をもとに分類し、系統樹を作製した (Kusaba et al 1999)。この結果、それぞれの植物から分離された菌株はクラスターを形成しており、いもち病菌の種寄生性分化過程の洞察を得ることができた。また、これは加藤らによって進められてきた病原性、RFLP 多型、交配型などをもとに作られた系統樹と類似したものであった (Kato et al 2000)。そこで今回は草場らの作製した系統樹を参考にして、いもち病菌の分化過程において転移因子はいつの段階で獲得され、それぞれのクラスター毎にどのような変遷を辿ったのかに注目して実験を計画した。そこでまず、各種転移因子をプローブとして用いるためにそれぞれの転移因子の遺伝子断片をクローニングし、対象とするいもち病菌株のゲノミック DNA を用いてサザン解析を行い、各転移因子の有無を調査した。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試菌株、ゲノミック DNA の抽出

9ヶ国より採集された27種のイネ科あるいはショウガ科植物より分離されたいもち病菌、計 79 菌株を用いた（Table 2-2)。菌株は穀粒培地に植菌し、4℃で長期保存してあるものを PDA 斜面培地（Table 7-1)に移植して実験に用いた。それぞれの菌株を CM 培地（Table 7-1)で 26℃にて 1 週間培養し、菌体を回収した。ゲノミック DNA は定法に従い、液体窒素で磨砕後、DNA 抽出バッファー（Table 7-1)に溶解し、TE 飽和フェノール・フェノール/クロロフォルム処理（Table 7-1)、エタノール沈殿を行って抽出した（Nakayashiki et al 1999a)。

また、いもち病菌とは種の異なる糸状菌として、*Alternaria longipes, Colletotrichum lagenarium* (104-T), *Fusarium oxysporum* (f. sp. *cucumerinum*, f. sp. *radicals-lycopersici*), *Cladosporium fulvum, Botrytis cinerea, Penicillium digitatum, Aspergillus nidulans* の 8 菌株を用いた。それぞれの菌株は PDA 培地にて保存し、いもち病菌と同様にゲノミック DNA を抽出した。

### 2) ハイブリダイゼーションに用いたプローブ

ハイブリダイゼーションに用いたプローブに関する情報は、その由来となる菌株、用いた断片の遺伝子領域、あるいは報告されている塩基配列との相同性などについて Table 2-3 に示した。MAGGY のプローブとして用いたプラスミド pMGY-SB、MGR586 のプローブとして用いたプラスミド pMGR-T1、および MGR583 のプローブとして用いた pEBA18-09 は、以前に報告されたものを用いた（Tosa et al 1995; Farman et al 1996b; Urashima et al 1999)。

Pot2, MgSINE, *grasshopper* のプローブとして用いたプラスミド pPO-H, pSI-H, pGH-H は既に報告されている塩基配列をもとにプライマーを設計して(Table 2-4)、増幅した各因子の断片をクローニングしたものである。PCR 反応は PCR Thermal Cycler Personal（TaKaRa 社）を用いて行った。PCR 反応液は 100ng の鋳型 DNA、1xPCR バッファー（Quiagen 社）、0.2μM ずつのプライマー、200μM の dNTP ミックス、1.25U の

HotstarTaq polymerase（Quiagen 社）を加えて 50μl とした。PCR 反応条件は 95℃、15 分間の熱変性の後、95℃1 分-50℃1 分-72℃1 分を 30 サイクル行った。PCR 反応産物は T4 ポリメラーゼ処理して平滑末端化し、*Eco*RV で切断した pBluescriptSKII+とライゲーションさせ、クローニングした。

また、本研究室において同定された新規な LTR レトロトランスポゾン Pyret のプローブとして用いたプラスミド pPYR-H はキビ菌のゲノムライブラリーより得られた同因子を含む 0.59kb の *Msp*I 断片を pBluescriptSKII+の *Cla*I 部位にサブクローニングしたものである。

### 3) サザンハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションは Amersham 社の Gene Images™ラベリング・検出システムキットの、添付されたプロトコール、付属試薬を用いて行った。1.5μg のゲノム DNA を制限酵素処理し、0.7%アガロースゲル（1xTAE 溶液）(Table 7-1)にて電気泳動を行い、ナイロンメンブレン Hybond™-N⁺（Amersham 社）へトランスファーした。その後、UV クロスリンカー（CL-1000 フナコシ社）で UV 照射（70,000μJ/cm$^2$）して DNA をメンブレンに固定した。Table 2-3 に示したプラスミドを用いてプローブを作製し、65℃のインキュベーターで 12 時間以上ハイブリダイゼーション反応させた。洗浄は 65℃の 1xSSC, 0.1%SDS 溶液で 15 分間を 2 回、65℃の 0.5xSSC, 0.1%SDS 溶液で 15 分間を 2 回それぞれ行った。検出は CDPstar™（Amersham 社）を塗布し、X 線フィルムに露光した。

## 3. 結　果

### 1)　各種転移因子のクローニング

プローブとして用いた、各種転移因子のプラスミドの特徴についてはTable 2-3 に示した。pMGY-SB, pMGR-T1 はこれまでに報告された MAGGY, MGR586 (Pot3)と同一のクローンを用いた (Tosa et al 1995, Farman et al 1996)。pEBA18-09 はシコクビエ菌株ゲノムライブラリーより MGR583 と相同性のある領域をサブクローニングしたもので、MGR583 と 98.6%の相同性を示した (Hamer et al 1989, Valent and Chumley 1991)。pPO-H は Pot2 のトランスポゼース領域特異的プライマーを用いてイネ菌より増幅された PCR 産物をクローニングしたもので、Pot2 と 92.1%相同であった (Kachroo et al 1994)。pSI-H は MgSINE のほぼ全長が増幅できる特異的プライマーを用いてイネ菌より増幅された PCR 産物をクローニングしたもので、MgSINE と 93.6%相同であった (Kachroo et al 1995)。pGH-H はシコクビエ菌より *grasshopper* の逆転写酵素領域特異的プライマーを用いて増幅された PCR 産物をクローニングしたもので、*grasshopper* と 97.2%の相同性が認められた (Dobinson et al 1993)。pPYR-H はキビ菌ゲノムライブラリーより相同性のある領域をサブクローニングしたもので、Pyret と 89.8%相同であった(Nakayashiki et al 2001b)。

### 2)　各種転移因子の分布様式

供試した菌株のゲノミック DNA は *Bam*HI で消化し、電気泳動後に HybondN$^{+}$へトランスファーし、各種転移因子プローブを用いてサザン解析を行った。MgSINE をプローブとしたサザン解析の結果を Fig. 2-1 に示した。制限酵素とプローブの組み合わせより、検出された 1 本のバンドはほぼ 1 コピーに相当するものと解釈された。そこで、サザン解析の結果は、検出されたバンド数は転移因子のコピー数として解析を進めた。また、それぞれの植物分離いもち病菌ごとにグループ分けし、菌群とまとめた。例えば、イネ分離いもち病菌を複数菌株供試したが、これらをまとめてイネ菌群と呼ぶことにした。Fig. 2-1 においてはイネ菌群やアワ菌群は 30 コピー以上という多コピーの状態で検出された。その一方

で、コムギ・シコクビエ菌群はコピー数が少なく、薄いバンドも認められた。メヒシバ菌群は薄いバンドのみが検出され、またミョウガ菌群はバンドが認められなかった。

各種転移因子の存在様式を比較するために、サザン解析より得られた結果を 6 段階に区分した。-はシグナルが検出されなかった菌株、f はほとんどが薄いシグナルであった菌株、+はバンドが 1ー5 本確認された菌株、++はバンドが 6ー15 本確認された菌株、+++はバンドが 16ー30 本確認された菌株、++++はバンドが 30 本以上確認された菌株とした。

サザン解析に用いた全てのプローブにおける結果を、rDNA の ITS 領域の塩基配列をもとに作成された系統樹上にまとめた（Fig. 2-2)。各種植物菌群ごとに見てみるとそれぞれの転移因子はイネ・アワ菌群（rDNA type; r1, 2)において多コピー存在している傾向が高いことが明らかとなった。その一方でこれら菌株とは遠縁と考えられる各種雑草菌群ではコピー数が少ない傾向にあり、またバンドも薄く検出された。各種転移因子ごとに注目してみると、MGR586 はほとんど全ての菌株においてバンドが検出された。Pot2, MGR583, MgSINE, Pyret なども広い菌群においてバンドが検出されたが、ミョウガ・タケ・ササ菌群（rDNA type; r13, 14)においてバンドは検出されなかった。Pyret ではメヒシバ菌群（rDNA type; r8, 9)においてもほとんどバンドが検出されない状態であった。一方で、MAGGY はイネ・アワ菌群（rDNA type; r1, 2)やそれと近縁である菌株（rDNA type; r3, 4)においてバンドが検出された。さらにブッフェルグラス・タケ・ササ菌群（rDNA type; r12, 13)の一部においてもバンドが検出された。*Grasshopper* はシコクビエ菌群（rDNA type; r6)においてのみバンドが検出された。

### 3) いもち病菌以外の糸状菌における各種転移因子の分布様式

MGR586, Pot2, MGR583, MGSINE, Pyret などはいもち病菌に広く分布していたので、いもち病菌とは種の異なる糸状菌においてこれら転移因子のホモログが存在しているか調査した。いもち病菌と、7 種（*Fusarium oxysporum* は異なる 2 つの forma specialis; *cucumerinum*, *radicals-lycopersici* を用いた）の異なる糸状菌よりゲノミック DNA を

抽出し、ハイブリダイゼーションの温度を 60℃に下げ、サザン解析を行った (Fig. 2-3)。その結果、MGR586, Pot2, MgSINE では *Botritis cinnerea* 以外の糸状菌でバンドが検出された。一方、MGR583, Pyret, MAGGY などではバンドが検出されなかった。ミョウガ菌群では Pot2, MgSINE のバンドが検出されていなかったことを本章結果-2) で示したが、今回はシグナルが検出された。これはハイブリダーゼーションの条件や露光時間などに違いが生じたためと考えられる。

## 4. 考　察

転移因子の分布様式については、これまでに *Drosophila* 属において詳細な解析が行われている。Biémont と Cizeron ら (1999)は 228 種の *Drosophila* 属における 43 種類の転移因子の分布様式について報告している。彼らは転移因子の分布様式と *Drosophila* 属の系統進化関係をもとにして、転移因子が垂直伝搬、水平移行、あるいは部分的に欠失した可能性などについて考察した (Biémont and Cizeron 1999)。

今回の実験によって、79 菌株のいもち病菌について各種転移因子をプローブとしたサザン解析の結果を、rDNA-ITS 領域をもとにした分子系統樹に当てはめた結果、Fig. 2-2 のような結果が得られた。この結果と Fig. 2-3 とを合わせて、それぞれの転移因子のいもち病菌への獲得過程について Fig. 2-4 のように考察した。いもち病菌に広く分布していた MGR586, Pot2, MGR583, MgSINE, Pyret はいもち病菌が分化する過程のかなり初期に獲得されたものと考えられた。また、Fig. 2-3 からの結果から、ハイブリダイゼーション温度を下げ、露光時間を長くした結果、ミョウガ菌株からも MGR586, Pot2, MgSINE はバンドが検出され、更に種の異なる *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium fluvum* などからもバンドが検出された。この結果は、類似した転移因子がそれぞれの種に同時期に別々に獲得された可能性と、これら転移因子は糸状菌が分化していく過程のかなり初期に獲得されて垂直伝搬された可能性が考えられる。いもち病菌の中でもバンドが薄いミョウガ・タケ・ササ菌株などと比較して、*Fusarium oxysporum* や *Cladosporium fulvum* からはより強いバンドが検出された。この結果は、転移因子が宿主に定着して、それぞれ異なる塩基置換速度によって宿主と共に変化していった可能性を示唆している。系統樹の中で一部にバンドが確認できない菌株が存在したが、これはそのような過程で大きく塩基配列が変化したか、あるいはその領域が欠失したものと考えられた。また、糸状菌には有性世代を経た際に反復配列が高頻度に C:G から T:A への塩基置換を引き起こす RIP (repeat induced point mutation)という現象が知られている (Selker et al 1987)。この現象がいもち病菌においても確認されたことについては第 5 章で触れるが、有性世代を経る頻度によって RIP による塩基置換の程度が異なってくることが考えられる。菌株間における交配頻度の差が

塩基置換の差となり、さまざまな強度のバンドが出現する可能性を持つと考えられる。

一方で、*grasshopper* や MAGGY などのレトロトランスポゾンは限られた菌株にのみ分布していた。これらはいもち病菌の分化過程において比較的新しい時期に獲得されたものであることが示唆された。*Grasshopper* はシコクビエ菌株（rDNA type; r6)においてのみ分布しており、シコクビエ菌として分化する際に獲得されたものと考えられる。MAGGY はイネ・アワ・キビ菌株(rDNA type; r1, 2, 3, 4)、ブッフェルグラス菌株（rDNA type; r12)の一部、及びタケ・ササ菌株（rDNA type; r13)に分布していた。この結果は、MAGGY は rDNA type; r1-4 が分化する過程において獲得され、その他の rDNA type の菌株へは水平移行した可能性が考えられた（Fig. 2-5）(Kusaba et al 1999)。しかし、MAGGY はいもち病菌を介して直接移行したのか、あるいは別のベクターによって移行したのか明らかにすることはできなかった。*Drosophila* では転移因子の水平移行が引き起こされた報告がなされているが（Daniels et al 1990; Flavell 1999; Jordan et al 1999)、*P* 因子ではダニの一種（*Proctolaelaps regalis*)が伝搬させていることが提唱されている（Houck et al 1991)。しかしながら、再現性が確認されておらず、これについては疑問な点も多い。MAGGY などが属する糸状菌の *gypsy* 型レトロトランスポゾンと類縁関係にあるものとして、魚類や両生類などに存在する *gypsy* 型レトロトランスポゾンが報告されている（Poulter and Butler 1998; Miller et al 1999)。生活圏を異にするこれら生物の間で、類縁したレトロトランスポゾンが存在しているという事実は、広範囲にわたって祖先を共通とするレトロトランスポゾンが存在している可能性や、これらの生物間を行き来するベクターの存在が考えられる。このような水平移行の可能性は、新たにいもち病菌に転移因子を獲得させ、さらに多様な形質を生み出す可能性をも示唆している。

また、イネ・アワ菌株（rDNA type; r1, 2)ではそれぞれの転移因子のコピー数は非常に多く、バンドのシグナルも強いものであった。この結果はプローブとした遺伝子断片がこれら菌株由来である場合が多く、保存性が高かった可能性も考えられる。しかし、シコクビエ菌由来の MGR583 断片などの結果においてはプローブとして用いた菌株よりもイネ・アワ菌株でのバンド

が濃い場合も見られた。このことは、イネ・アワ菌株では各転移因子の転移活性が高く、また転移因子の変異が少ない状態で保たれていることを示唆している。峡谷地帯に自生している同じ植物の中でも、より過酷な環境に生えている個体は転移因子の転移が頻繁に認められ、表現型との関連性が注目されている（Kalendar et al 2000)。

イネ・アワ菌株はレース-品種間特異的寄生性が認められる菌株であり、その他の菌株における種-種間特異的寄生性と比較して、より宿主植物との相互作用が進んだ状態であると考えられている（Kato et al 2000)。この結果は、宿主植物により適応していくために、これらの菌で転移因子の活性化を伴った変化が起こった可能性を示唆している。コピー数を増やした転移因子はその一部が非病原力遺伝子を破壊するなどして、新しいいもち病菌のレースの出現に貢献した可能性などが考えられる。実際に、イネ菌においてMGR586 が転移した結果、品種 Yashiro-mochi に病原性を示すようになった例が報告されている（Orbach et al 2000; Kang et al 2001)。

**Table 2-1** Classification of transposable elements

| Class | Type | Subtype | Elements |
|---|---|---|---|
| **Class I** (Via an RNA intermediate) | **LTR type** | gypsy | *gypsy, Ty3*, MAGGY, *grasshopper,* Pyret |
| | | copia | *copia, Ty1*, BARE1 |
| | **Non-LTR type** | | |
| | Automonous | LINE (long interspersed nuclear element) | *L1*, MGR583 |
| | Non-aoutonomous | SINE (short interspersed nuclear element) | *Alu*, MgSINE |
| **Class II** (Via a DNA intermediate) | **DNA type** | | |
| | Autonomous | Transposon | *Ac, P*, *Tc-1*, MGR586, Pot2 |
| | Non-autonomous | MITE (miniature inverted repeat transposable element) | *Gaijin, Tourist* |

**Table2-2** Original hosts and geographical origins of *Pyricularia* isolates tested

| Original host (common name) [abbreviation] | Locality | Isolate |
|---|---|---|
| Gramineae Bambusoideae Bambuseae | | |
| *Bambusa arundenacea* (bamboo) [Pba] | India | IN77-13-1-1, IN77-14-1-1 |
| *Phyllostachys bambusoides* (bamboo) [Pba] | Japan | INA-B-93-19 |
| *Sasa* sp. (bamboo grass) [Sas] | Japan | INA-B-93-45 |
| Oryzoideae Oryzeae | | |
| *Oryza sativa* (rice) [Osa] | Japan | 0903-4, 2012-1, 1836-3, 88A |
| *O. sativa* | China | UN-05-2, CHNOS59-6-11, CHNOS60-8-1 |
| *O. sativa* | India | IN77-46-1-3 |
| *O. sativa* | Indonesia | PO12-7402, PO02-7501 |
| *O. sativa* | Vietnum | VTG3.4, VHG3.10 |
| *O. sativa* | Brazil | Br10, Br11, Br14, Br18 |
| *O. sativa* | Cote d®voire | CD276, CD262 |
| *Leersia oryzoides* (rice cutgrass) [Lor] | Japan | NI919 |
| Festucoideae Festuceae | | |
| *Festuca arundinacea* (tall fescue) [Far] | Japan | NI899 |
| *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) [Lmu] | Japan | GFIT1-1, GFIT6-1 |
| Hordeae | | |
| *Triticum aestivum* (wheat) [Tae] | Brazil | Br3, Br48, Br115.7, Br130.1, Br127.11 |
| Aveneae | | |
| *Phalaris arundinacea* (reed canarygrass) [Par] | Japan | NI901, NI921 |
| *Anthoxanthum odoratum* (sweet vernalgress) [Aod] | Japan | NI904 |
| *Avena sativa* (oat) [Asa] | Brazil | Br58 |
| Eragrostoideae Eragrosteae | | |
| *Eragrostis lehmanniana* (Lehmann lovegress) [Ele] | Japan | NI986 |
| Chlorideae | | |
| *Eleusine coracana* (finger millet) [Eco] | Japan | G10-1, Z2-1 |
| *E. coracana* | India | IN77-24-1-1, IN77-31-1-1 |
| *E. coracana* | Nepal | NP10-17-4-1-3, NP10-28-1-1-1 |
| *E. coracana* | China | CH90-1-1, CH90-2-1 |
| *E. coracana* | Uganda | UG77-15-1-1 |
| *E. indica* (goose grass) [Ein] | Uganda | UG77-7-1-1 |
| Panicoideae Paniceae | | |
| *Setaria italica* (foxtail millet) [Sit] | Japan | GFSI1-7-2, NRSI2-2-2, NRSI3-1-3, NNSI3-2-1 |
| *S. italica* | India | IN77-16-1-1, IN77-18-1-1 |
| *S. viridis* (green bristlegrass) [Svi] | Japan | KANSV1-4-1, NI913, NI1078 |
| *S. tomentosa* [Sto] | India | IN77-27-1-2 |
| *S. geniculata* (knotroot bristlegrass) [Sge] | Brazil | Br37 |
| *Echinochloa colonum* (jungle rice) [Ecol] | Brazil | Br38 |
| *Panicum miliaceum* (common millet) [Pmi] | Japan | NNPM1-2-1, NNPM3-1-1, STPM4-2-2, STPM4-3-3, YNPM2-1-1 |
| *P. maximum* (Guinea grass) [Pma] | India | IN77-33-1-1 |
| *P. bisulcatum* [Pbi] | Japan | NI922 |
| *P. repens* (toredo grass) [Pre] | India | IN77-28-1-1, IN77-45-1-2 |
| *Digitaria sanguinalis* (crabgrass) [Dsa] | Japan | Dig41, NI907 |
| *D. smutsii* (pangola grass) [Dsm] | Japan | NI980 |
| *D. horizontalis* [Dho] | Brazil | Br29 |
| *Pennisetum clandestinum* (kikuyu grass) [Pcl] | Japan | NI979 |
| *Cenchrus ciliaris* (buffel grass) [Cci] | Japan | NI981 |
| *C. echinatus* [Cec] | Brazil | Br36 |
| *Brachiaria plantagina* [Bpl] | Brazil | Br34, Br35, Br54 |
| Zingiberaceae | | |
| *Zingiber mioga* (mioga) [Zmi] | Japan | HYZiM101-1-1-1, NRZiM101-1-1-1 |

**Table2-3** Representative clones of tranposable elements used in this study

| Clone | Insert | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Element | Region | Size(bp) | Homology(%)* | Source |
| pMGR-T1 | MGR586 | full-length | 1800 | 100.0 | PCR product from an *Oryza* isolate (Guy-11) |
| pPO-H | Pot2 | transposase | 520 | 92.1 | PCR product from an *Oryza* isolate (1836-3) |
| pEBA18-09 | MGR583 | reverse transcriptase | 900 | 98.6 | plasmid clone from an *Eluesine* isolate (G10-1) |
| pSI-H | MgSINE | full-length | 444 | 93.6 | PCR product from an *Oryza* isolate (1836-3) |
| pPYR-H | Pyret | *gag* | 597 | 89.8 | phage clone from a *Panicum* isolate (NNPM3-1-1) |
| pMGY-SB | MAGGY | *gag* | 560 | 100.0 | cosmid clone from a laboratory strain (2539) |
| pGH-H | *Grass hopper* | reverse transcriptase | 270 | 97.2 | PCR product from an *Eleusine* isolate (G10-1) |

*Homology with authentic sequences in Genbank database.

**Table2-4** Primers used for amplification of transposable elements

| Element | Primer | Sequence |
|---|---|---|
| Pot2 | Forward primer; Pot-F1 | 5©ATCGAATGTATATCNGC-3© |
| | Reverse primer; Pot-R2 | 5©TTTACCGGCCATAANCC-3© |
| MgSINE | Forward primer; Mg-SINE-F | 5©GGAATGGCGCAGTGGTTAAG-3© |
| | Reverse primer; Mg-SINE-R | 5©GTATTATTTAACGCCGGGCT-3© |
| *Grasshopper* | Forward primer; RT-4F | 5©ACCGTTACCCCCTGCC-3© |
| | Reverse primer; RT-3 | 5©ATGTCGTCCAAATA-3© |

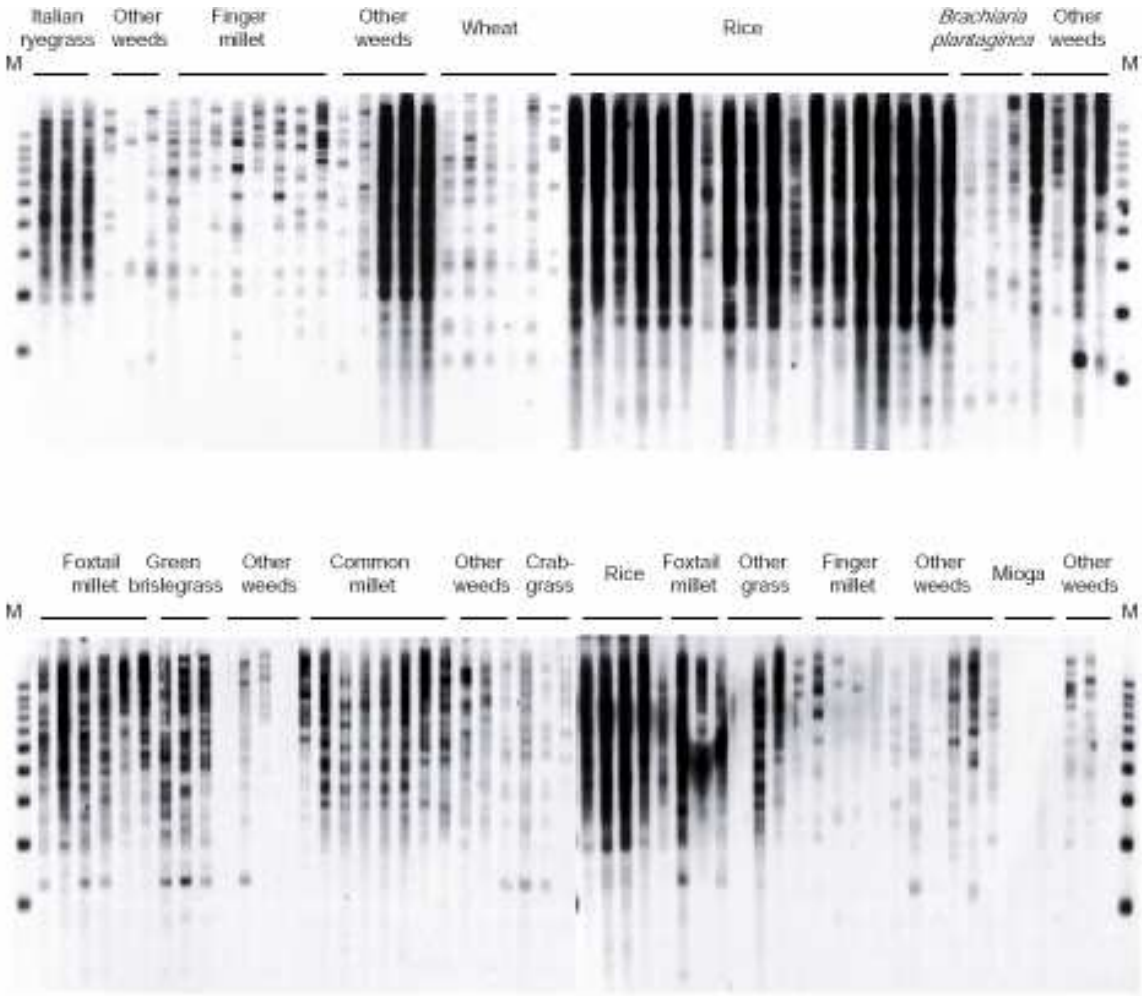



**Fig. 2-1** Southern blots of genomic DNA of *Pyricularia* spp. probed with MgSINE. Genomic DNA were digested with *Bam*HI, electrophoresed on 1XTAE agarose, and transeferred to a nylone membrane (HybondN$^+$).

**Upper sheet**(from left to right; GFIT6-1, GFIT1-1, NI899, NI1005, UG-77-7-1-1, UG77-15-1-1, CH90-2-1, CH90-1-1, NP10-28-1-1-1, NP10-17-4-1-3, IN77-31-1-1, IN77-24-1-1, Z2-1, G10-1, NI986, Br58, NI904, NI921, NI901, Br127.11, Br130.1, Br115.7, Br48, Br3, NI919, CD262, CD276, Br18, Br14, Br11, Br10, VNOM3.1, VNTG3.4, PO02-7501, PO12-7402, CHMOS60-8-1, CHNOS59-6-11, UN-05-2, IN77-46-1-3, 88A, 1836-3, 2012-1, 0903-4, Br54, Br35, Br34, Br36, NI981, NI979, IN77-50-1-1, M (molecular marker)

**Lower sheet** (from left to right): GFSI1-7-2, NRSI2-2-2, NRSI3-1-3, NNSI3-2-1, IN77-16-1-1, IN77-18-1-1, KANSV1-4-1, NI913, NI1078, IN77-19-1-1, IN77-26-1-1, IN77-27-1-1, Br37, Br38, NNPM1-2-1, NNPM3-1-1, STPM4-2-2, STPM4-3-3, YNPM2-1-1, IN77-28-1-1, IN77-45-1-2, IN77-33-1-1, NI922, Dig41, NI907, NI980, Br29, 0903-4, UN-05-2, PO12-7402, Br10, VNTG3.4, GFSI1-7-2, IN77-16-1-1, KANSV1-4-1, Br37, NNPM3-1-1, IN77-28-1-1, Z2-1, NP10-17-4-1-3, UG77-15-1-1, UG-77-7-1-1, Br48, Br35, NI907, Br29, Br38, IN77-50-1-1, NI981, HYZiM101-1-1-1, NRZiM101-1-1-1, INA-B-93-45, IN77-13-1-1, IN77-14-1-1, INA-B-93-19, M (molecular marker)

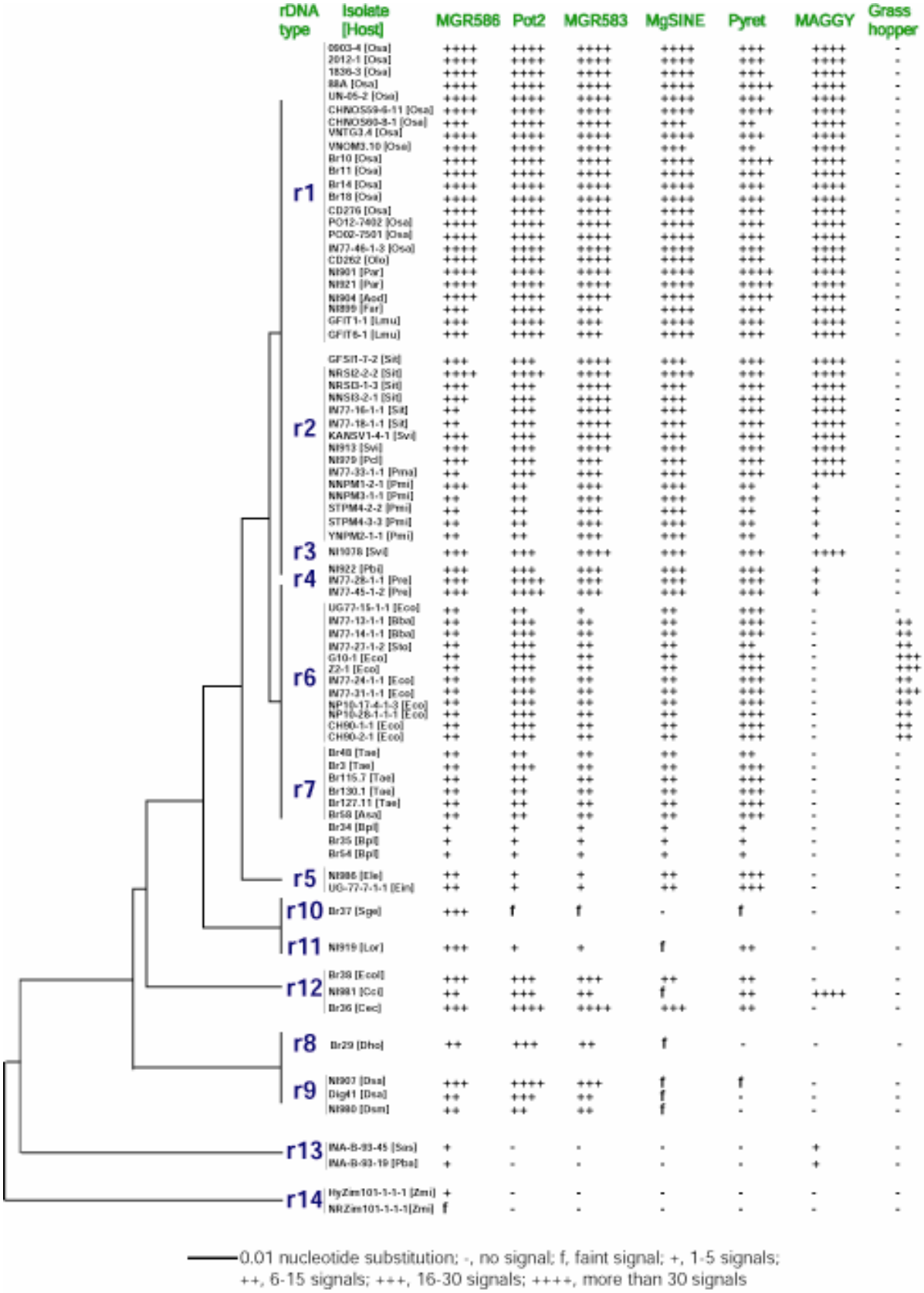



**Fig. 2-2** Distribution and copy number of transposable elements in *Pyricularia* spp.

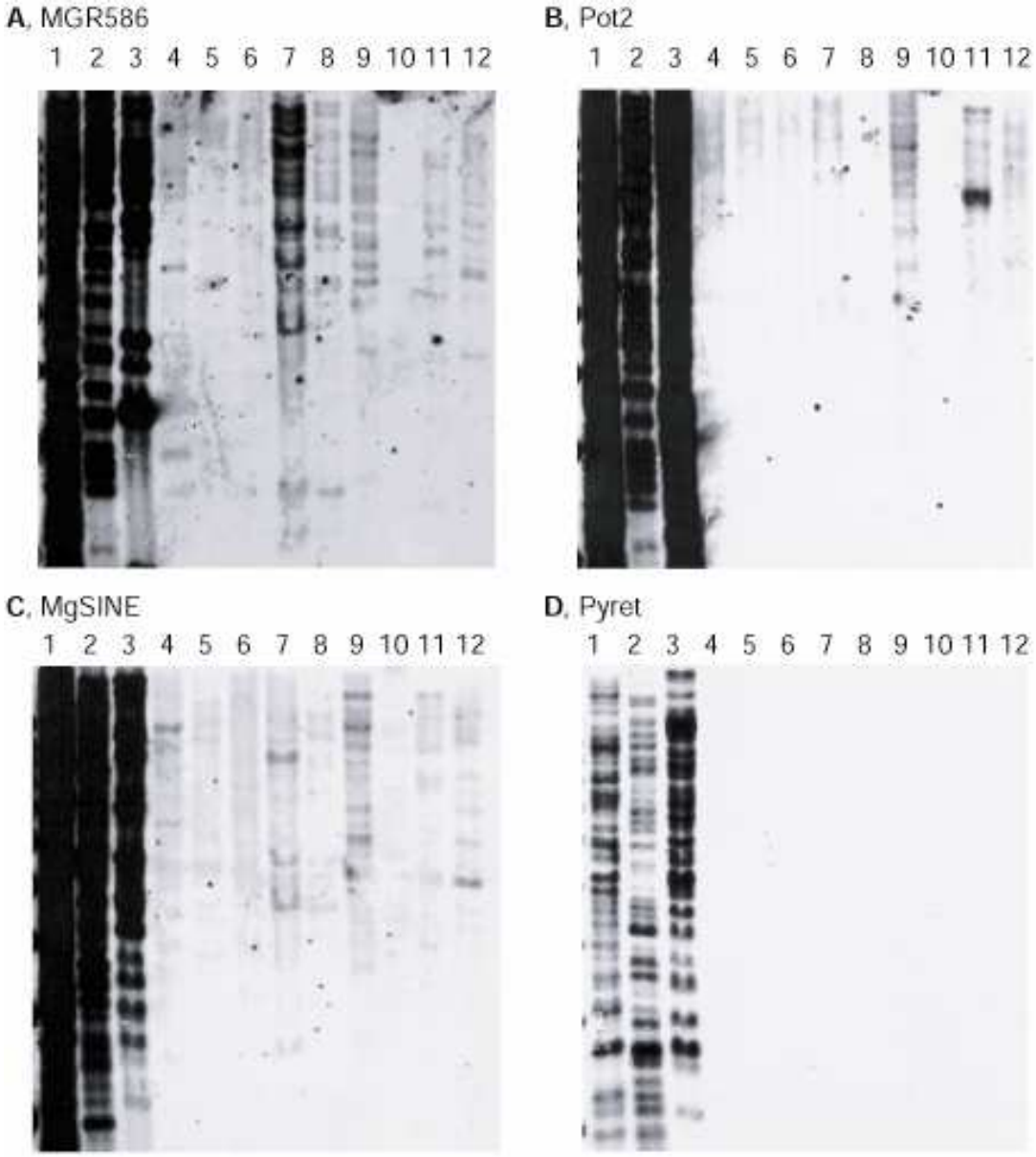



**Fig. 2-3** Distribution of homologs of transposable elements of *Pyricularia* spp. in various fungal species

Lane 1, *Pyricularia oryzae* (*Oryza* isolate 1836-3); lane 2, *Pyricularia grisea* (*Setaria* isolate GFSI1-7-2); lane 3, *Pyricularia grisea* (*Eleusine* isolate G10-1); lane 4, *Pyricularia grisea* (*Mioga* isolate HYZYM101-1-1); lane 5, *Alternaria longipes*; lane 6, *Colletotrichum lagenarium* (104-T); lane 7, *Fusarium oxysporum* (f. sp. *cucumerinum*); lane 8, *F. oxysporum* (f. sp. *radicals-lycopersici*), lane 9, *Cladosporium fulvum*; lane 10, *Botrytis cinerea*; lane 11, *Penicillium digitatum*; lane 12, *Aspergillus nidulans*

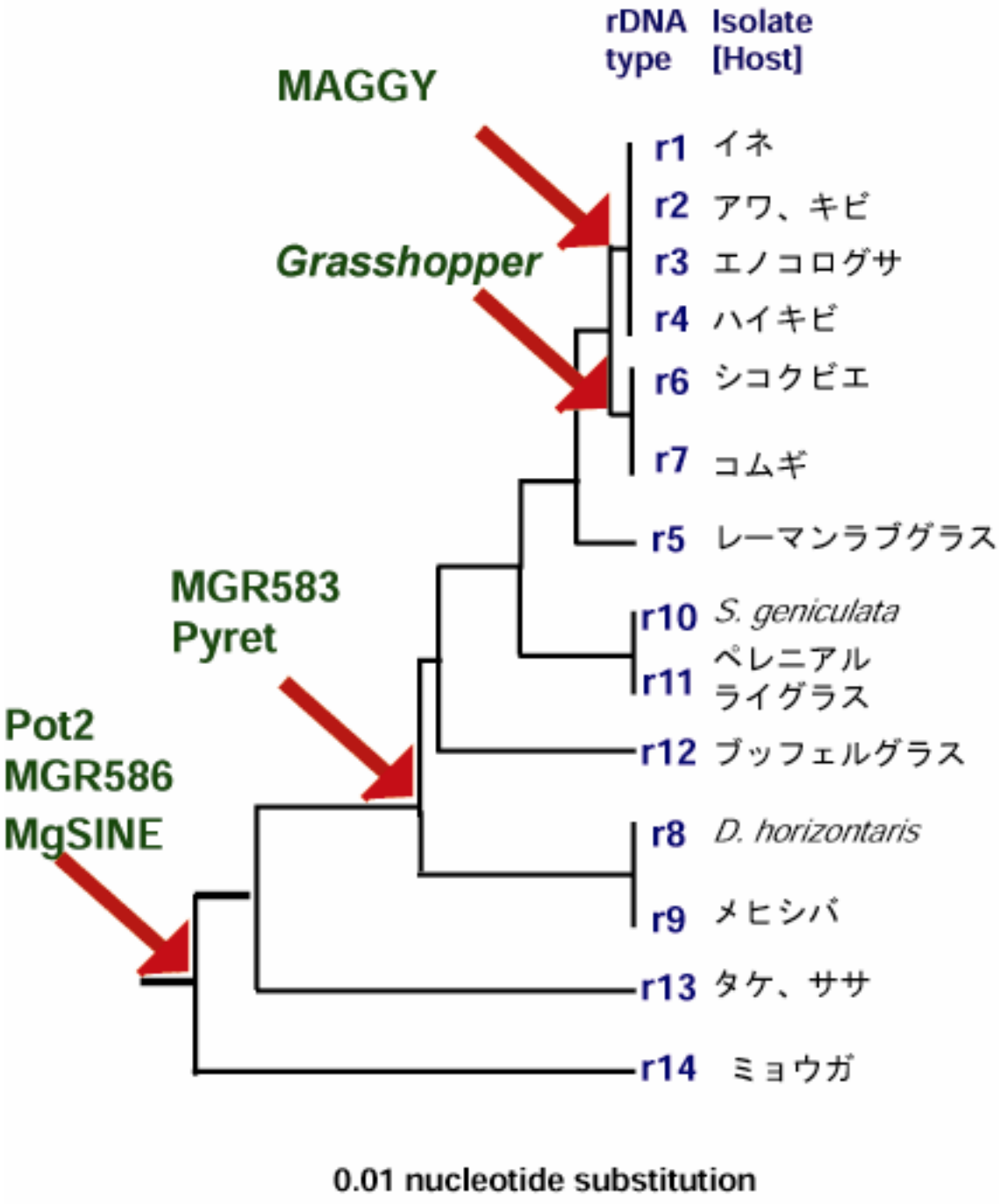



**Fig. 2-4** A hypothesis on the acquisition of transposable elements during differentiation of *Pyricularia* spp.

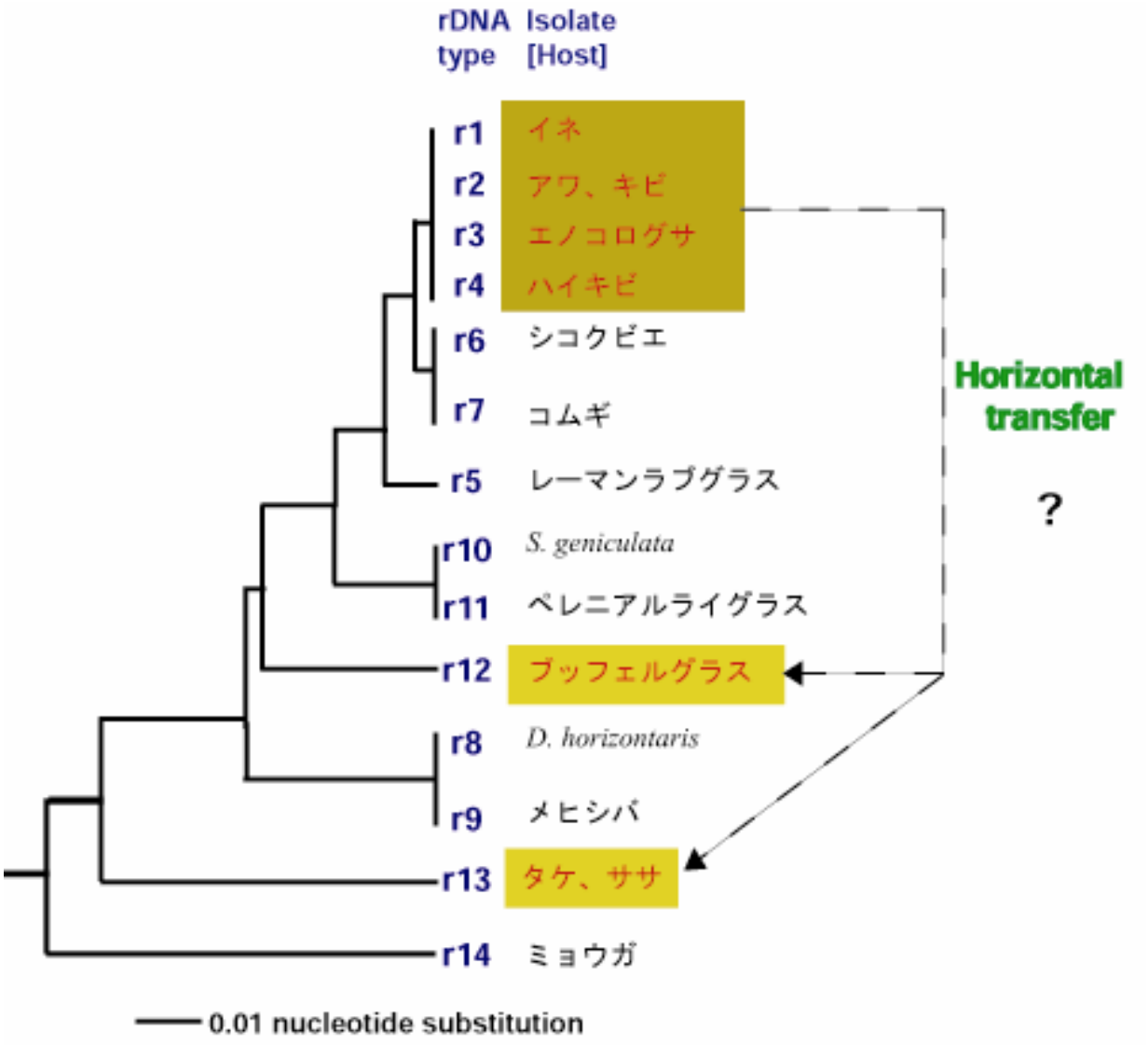



**Fig. 2-5** Distribution of MAGGY in *Pyricularia* spp.

# 第３章　MAGGY の転移活性化メカニズムの解析
## ―　特に転写活性化条件の検討　―

### 1. 緒　言

McClintock (1984)がゲノムストレス仮説を提案したように、生存に関わるようなストレスを受けた際に転移因子が活性化され、ストレス環境下で適応した形質を獲得する可能性が示されている。転移因子はどのようなストレスを受けると活性化を示すのか、またその活性化メカニズムはどのようなものであるのか興味が持たれる。これまでに転移因子の構造が多くの生物種から明らかとなっているが、その転移因子の転移活性や転移メカニズムについて明らかとなっている例は少ない (Syomin et al 1993; Domínguez and Albornoz 1996)。LTR 型レトロトランスポゾンの中では、イネに存在する *copia* 型の *Tos17* は組織培養を経た際に転写が活性化し、コピー数が増加したことが報告されている (Hirochika 1993)。糸状菌においても複数の LTR 型レトロトランスポゾンが明らかとなっているが、転移活性について検討されているのはわずかである。Nakayashiki et al. (1999a)はいもち病菌に存在している *gypsy* 型の MAGGY についてそれを本来保有していないコムギいもち病菌株に導入した際に、MAGGY のコピー数が増加したことを報告した。また、この転移活性は種を越えても保存されており、ウリ類炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*)においても転移することが示された(Nakayashiki et al 1999a)。さらに、本研究室ではアワいもち病菌とコムギいもち病菌を交配させた雑種後代においてそれぞれの転移因子の挿入様式をサザン解析によって調査したところ、MAGGY が高頻度で異なるバンドパターンを示したことより (Table 3-1)、いもち病菌に存在する転移因子の中でも MAGGY が最も転移活性が高いことが予想された (Eto et al 2001)。

転移因子がゲノム内を転移するためには、それに必要なタンパク質の合成を必要とする。クラス I 転移因子では RNA からの逆転写酵素、因子をゲノム内へ導入するためにインテグラーゼなどの酵素が重要と想定され、また、クラス II 転移因子では因子を切り出してゲノム内へ導入させるトランスポゼースなどが重要と考えられる (Coffin 1990; Sentry and Kaiser 1992)。そのため、転移活性を高めるためには転移に必要なタンパク質を供給するため

の RNA の転写量が大きく関与する (Hirochika 1996)。

転移因子の活性を調べるに当たって、転移因子のコピー数を調査することは転移が各細胞でランダムに起こることや、材料の扱いにくさなどから困難な場合が多い。このため、転移因子の活性化を調査するために、転写量の変化に着目することが一般的である。RNA レベルでストレスに対して活性化を示した例として、イネの *Tos17* が組織培養時 (Hirichika 1993)、ショウジョウバエの 1731 が UV・熱処理 (Bradshaw and McEntee 1989; Faure et al 1996)、酵母の Ty1 が UV 処理 (Rolfe et al 1986)、酵母の Ty5 がフェロモン処理 (Ke et al 1997)、またタバコの Tnt1, Tto1 がウイルス感染や重金属などの非生物的ストレス処理によって (Pouteau et al 1991; Mhiri et al 1997)活性化されることが報告されている (Table 3-2)。これらの多くは LTR 配列に特異的なシスエレメントが存在していることが示されている (Faure et al 1996; Vernhettes et al 1997; Takeda et al 1999)。

しかしながら、RNA レベルでの変化は RNA の不安定さや、ノーザン解析の原理からも数量化する事がやや困難であり、ストレスによる活性化の度合いを定量的に明らかにするには問題がある。そのため対象とする遺伝子のプロモーター領域に定量化が可能なタンパク質をコードしているレポーター遺伝子を結合させ、生じたタンパク質の活性によって定量的に比較する方法が広く用いられている (Naylor 1999)。例えば、GFP (green fluorescent protein)はオワンクラゲ由来のタンパク質で特定の波長を与えることによって蛍光を発する。GUS (beta-glucuronidase)は glucuronide の分解酵素であるが、MUG (4-methyl umbelliferyl-beta-D-glucuronide)を基質として与えることによって、355nm の励起光で 455nm の放出光を発する MU (Methylumbelliferone)を生成する。また X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide)を基質とすると青色に発色するため組織化学的な検出が可能となる。

本章においては、いもち病菌に存在する転移因子の中で、転移活性が高いと考えられる MAGGY に着目して、どのようなストレスに応じて活性化を示すのか、LTR 領域下流に GUS 遺伝子を結合させ、酵素化学的な検出を行って各種ストレスに対する発現パターンの定量化を試みた。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試菌株

供試菌株として、イネいもち病菌（*Magnaporthe grisea*; 1836-3)、コムギいもち病菌（*M. grisea*; Br48)、およびウリ類炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*; 104-T)を用いた。菌株は PDA 斜面培地(Table 7-1)にて保存し、GUS 活性、DNA・RNA 抽出の際には CM 液体培地(Table 7-1)を用いて 26℃で振とう培養を行った。

### 2) LTR-GUS 融合コンストラクトの構築

GUS 遺伝子の発現量を調べる際のコントロールとして、糸状菌では常時発現していると考えられているグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター領域と GUS 遺伝子を結合させた pNOM102 を用いた。これはオランダのカールスバーグ研究所 Oliver 博士より分譲して頂いた（Fig. 3-1）(Roberts et al 1989)。

LTR-GUS 融合遺伝子を作成するに当たって、GUS 遺伝子の翻訳開始部位に *Nsi*I 制限酵素部位を導入した pUC-GUS-Nsi（Mori et al 1993)を用いた。これは京都大学農学部古澤博士より分譲して頂いた。LTR-GUS 融合プラスミド pLTR-GUS は MAGGY の ORF 領域を GUS 遺伝子と置き換えるように設計された。その詳細について以下に示す（Fig. 3-2, 3-3)。

MAGGY の全長を含む pMGY70（Nakayashiki et al 1999a)を *Sna*BI, *Eco*52I で切断した約 5kb 断片を、*Eco*52I 付着末端を持つ合成リンカー（プラス鎖, 5'-GTAGCTCCTTCATTAGGTGCCCGCGATGCCTGAGCTCACCGCGACGTCCGGATCC-3'; マイナス鎖, 5'-GGCCGGATCCGGACGTCGCGGTGAGCTCAGGCATCGCGGGCACCTAATGAAGGAGCTAC-3'）とライゲーションさせ、pMGY-G を作成した。pUC-GUS-Nsi を *Nsi*I,*Sac*I で切断した GUS 断片と *Eco*52I 分解した pMGY-G をそれぞれ平滑末端化させライゲーションさせ pMGY-GUS を作成した。一方で、MAGGY の 3'末端側の LTR 領域約 270bp 断片を *Sac*I, *Sma*I 分解によって切り出し、平滑末端処理した後に pUC19 の *Sma*I 部位にサブクローニングし pLTR とした。*Xho*I 処理によって切り出された pMGY-GUS の 2.2kb 断片を pLTR の *Xho*I 部位に挿入し、pLTR-GUS を得た（Fig. 3-2)。pLTR-GUS では MAGGY ORF1 の本来の翻訳開始位置から GUS 遺伝子が翻訳

されるように設計されており（Fig. 3-3)、pMGY70 に存在したいもち病菌ゲノムに由来する配列は全て取り除かれている。得られた各プラスミドはシークエンスを行って正しい読み枠で GUS 遺伝子が挿入されていることを確認した（data not shown)。

### 3) シークエンス

シーケンス反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（Perkin Elmer 社）を用いて行った。プライマーはベクター内にあるユニバーサル、リバースプライマー（5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3', 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3')を用いた。Cycle 反応後のサンプルは、エタノール沈殿させ、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（Perkin Elmer 社）にて解析を行った。

### 4) LTR 欠失変異体シリーズの作成

LTR 領域におけるプロモーター活性部位を絞り込むために、LTR 配列を削り込んだ GUS 融合プラスミドを構築した。3'末端側の LTR をクローニングした pLTR をベクター部位の *Bam*HI 部位と LTR 内の *Dde*I, *Pma*CI, *Bss*HII 部位でそれぞれ切断し、末端を平滑化した後、セルフライゲーションさせ、それぞれを pLTRΔDde, pLTRΔPma, pLTRΔBss とした。pLTR-GUS と同様な行程でそれぞれのプラスミドを *Xho*I 切断し、pMGY-GUS を *Xho*I 分解して得られた 2.2kb 断片をライゲーションさせ、pLTRΔDdei-GUS, pLTRΔPma-GUS, pLTRΔBss-GUS を得た(Fig. 3-4)。

### 5) 形質転換体の作製

いもち病菌、ウリ類炭疽病菌の形質転換は菌糸体をプロトプラスト化させ、PEG (polyethylene glycol)法を用いて行った。プロトプラストの作成は以下の要領で行った。三角フラスコで培養した菌糸体の培養液をクリーンベンチ内で十分に絞り、菌体重量 0.1g あたり 1ml の細胞壁分解酵素液（Table 7-1)に溶解させた。遮光下、室温で 3 時間緩やかに振とうした。サンプルと同量の 0.6M ソルビトール溶液（Table 7-1)を、液面を乱さないように重層し、室温で 2000rpm, 5 分間遠心分離した。

中間層の画分を新しいコーニングチューブに移し、20ml の 1M ソルビトール溶液（Table 7-1)を加えて懸濁させた。ふたたび室温で 2000rpm, 5 分間遠心分離して生じた沈殿を 5ml の 1M ソルビトール溶液にて懸濁した。サンプル溶液を少量血球計算板に滴下し、生じたプロトプラスト数を計測した。室温で 2000rpm, 5 分間遠心分離した後、プロトプラスト濃度が $1x10^8$ 個/ml となるように 1M ソルビトール溶液を加えた。1/10 容の 60%PEG 溶液（Table 7-1)を加え、400µl ずつに分注して-80℃で保存した。

形質転換は、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子を持つプラスミド pSH75 (Kimura and Tsuge 1993)と対象となるプラスミドを同時に導入させる co-transformation 法で行った（Nakayashiki et al 1999a)。エッペンドルフチューブに入れた 200µl のプロトプラスト溶液に 5µg ずつのプラスミド （pSH75、および対象遺伝子プラスミド）を混合し、室温で 10 分間静置した。その後、200µl, 400µl, 800µl の 60%PEG 溶液を順次よくかき混ぜながら加えた。その後、室温で 15 分間静置して 6000rpm, 5 分間遠心分離を行い、プロトプラストを沈殿させた。60%PEG 溶液を取り除き、沈殿に 300µl の 1M ソルビトール溶液を加えた。このようにして得られたプロトプラストを懸濁した後、50℃に維持した 3ml の 80%PDA 培地（Table 7-1)を加え、ハイグロマイシン B 添加 PDA 選択培地（Table 7-1)に均一に分注した。数日して生じたコロニーは新たにハイグロマイシン B 含有選択培地に移植し、生育してきた個体について GUS 遺伝子を特異的に増幅するプライマー（Forward primer, 5'-CCCCAACCCGTGAAATCAAA-3';Reverse primer, 5'-ACGCCGTATTCGGTGATGAT-3')を用いて GUS 遺伝子が導入されていることを確認した。また、全長の GUS 融合遺伝子が挿入されていることを確認するために、GUS 融合遺伝子より外側のベクター領域で切断される制限酵素（*Eco*RI, *Hin*dIII)を処理してサザン解析を行い、予想された位置 （pLTR-GUS は 2.8kb、pNOM102 は 4.8kb）にシグナルが確認されたものを以降の実験に供試した（Fig. 3-5)。また同時にこれら形質転換体が異なる染色体位置に導入されたことを確認するために、それぞれのプラスミドを切断しない制限酵素 （pLTR-GUS は *Eco*T22I、pNOM102 は *Cla*I）を処理してサザン解析を行った（Fig. 3-6)。

### 6) サザンハイブリダイゼーション

詳細については第 2 章に記載した。用いたプローブは GUS 遺伝子の *Hin*cII 消化によって生じた 0.53kb 断片をゲル回収し、fluorescein 標識したものを用いた。ゲル回収は制限酵素処理したサンプルを 0.9%(1xTAE)アガロースゲル電気泳動にて分画し、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Pharmacia 社) を用いて精製を行った。

### 7) 各種ストレス処理

各種ストレス処理を行うための菌体は 40ml の CM 培地 (Table 7-1)を入れた 100ml 三角フラスコにいもち病菌を植菌し、5 日間培養した。培養した菌糸体にそれぞれの濃度のストレス処理を行った。熱処理はウォーターバスの中で、それぞれ 32, 37, 42℃で 45 分間培養して室温に戻した。硫酸銅 (0.01, 0.1, 1mM)あるいはメチルビオロゲン (0.1, 1, 10mM)処理は滅菌水に溶解させて処理した。パラクマル酸 (10, 50, 100μg/ml)、サクラネチン (100, 250, 500, 750μg/ml)、およびイソプロチオラン (1.2, 12, 120ppm)処理は溶媒 (メタノール:アセトン=1:1) に溶解させたものを処理した。これら化学物質処理は投与する溶液量が CM 培地の 2% (V/V)以上にならないように加えた。プロトプラスト化は形質転換法の行程に準じた。UV 処理は滅菌シャーレ上に広げたプロトプラストに UV ランプ (CLV-1000 Ulraviolet Crosslinker, UVP 社) を照射 (28, 56, 112mj/cm$^2$)して行った。それぞれのストレス処理を行った菌株は、16 時間培養後に回収して GUS 活性を測定した。

### 8) GUS 活性の測定

各種ストレスを処理した菌糸体に液体窒素を加え磨砕し、タンパク質抽出バッファー (Table 7-1)に溶解した。さらにカーボランダム (#6000 ; ナカライ社) を加え、十分に磨砕し、15,000rpm、4℃、10 分間の遠心分離を行い、上清をサンプル溶液として用いた。GUS 活性の測定は Jefferson らの蛍光分析法に従って行った (Jefferson et al 1987)。10μl のサンプル溶液と 390μl の MUG 溶液 (Table 7-1)を加え、

撹拌後に 200μl は 800μl の 0.2M $Na_2CO_3$ 溶液と混合し、反応を停止させ、反応前サンプルとした。残りの 200μl は 37℃で 30 分間反応させ、同様に 800μl の 0.2M $Na_2CO_3$ 溶液と混合し、反応を停止させ、反応後サンプルとした。蛍光分光光度計（821-FP, JASCO）を用い、励起光 365nm、放出光 455nm で反応前、反応後サンプルの値を測定した。標準曲線は MU (Methylumbelliferone, Sigma 社)を標準試料として 0〜10μM の濃度区の蛍光度を測定したものを用いた。タンパク質濃度は Bradford 溶液（Bio-Rad 社）を反応させ、分光光度計（U-3000, HITACHI）を用いて 595nm の吸光度を測定した（Bradford 1976)。標準曲線は牛血清アルブミン（Albumin bovine, Sigma 社）を標準試料として 0〜100μg の濃度区の吸光度を測定し、作成した。GUS 活性値は得られた GUS 蛍光度をタンパク質 1mg 当たり、時間 1 分間当たりの割合で求めた。

**9)　ノーザンハイブリダイゼーション**

トータル RNA は菌糸体を液体窒素で磨砕後、RNAeasy plant mini kit（Quiagen 社）を用いて抽出した。10μg のトータル RNA を電気泳動バッファーと混ぜ、65℃で変性させ、5%ホルムアルデヒドを含有した 1.2%アガロースゲル（1xMOPS）(Table 7-1)にて電気泳動を行った。以降の行程はサザンハイブリダイゼーションのプロトコールに準じて行った。用いたプローブは T3, T7 transcriptional system（Roche diagnostics 社）で UTP-fluorescein 標識した RNA プローブを用いた。転写反応の鋳型として用いたプラスミドはそれぞれ MAGGY の *gag* 領域 0.56kb を pBluescriptSKII+にクローニングした pMGY-SB（第 2 章参照）、GUS 遺伝子の *Hinc*II 断片 0.53kb を pBluescriptSKII+にクローニングしたものをそれぞれ用いた。アンチセンス RNA を適切に効率よく転写するために、T3, T7 プロモーターと反対側のベクター領域を制限酵素で切断した。

## 3. 結　果

### 1)　GUS 融合遺伝子形質転換体の作製

イネいもち病菌（1836-3)に MAGGY の LTR 領域の制御下においた GUS 遺伝子を含む pLTR-GUS あるいは、グリセルアルデヒド-3 リン酸-デヒドロゲナーゼプロモーターの制御下においた GUS 遺伝子を含む pNOM102 をそれぞれ co-transformation 法によって導入した。それぞれのプラスミド形質転換体菌株を LGL-0, PGD-0 とした。形質転換体は PCR 法によって選抜され、さらにサザン解析によってコピー数と GUS 遺伝子のゲノムへの挿入様式について調査した。GUS プラスミドのベクター領域で切り出せる制限酵素（*Eco*RI と *Hin*dIII の同時処理)あるいは GUS プラスミドを切断しない制限酵素（pLTR-GUS, *Eco*T22I; pNOM102, *Cla*I)を用いたサザン解析によって、それぞれの形質転換体では機能する GUS 遺伝子が異なる染色体位置に多コピー挿入されていることが明らかとなった(Fig. 3-5, 3-6)。

### 2)　イネいもち病菌形質転換体における各種ストレスに対する応答

(1) 熱ストレス

ストレスの応答性については、LGL-0 の GUS 活性の誘導比と恒常的に発現することが予想される形質転換体 PGD-0 の GUS 活性の誘導比とを比較することで検討した。GUS 活性の誘導比はストレス処理した菌体の GUS 活性量に 26℃、無処理で培養した菌体の GUS 活性量を割った数値とした。

まず、MAGGY の熱に対する応答性について調査した。熱処理はこれまでに幾つかの LTR 型レトロトランスポゾンで転写が活性化されることが報告されている（1731, gypsy）(Ziarczyk and Best-Belpomme 1991; Lyubomirskaya et al 1993; Ratner et al 1992)。

それぞれの形質転換体 LGL-0s と PGD-0s は 42℃で 45 分間培養し、その後 20 時間の培養後に GUS 活性量を調査した。LGL-0 形質転換体はいずれも熱処理によって GUS 活性量は増加した。GUS の誘導比は熱処理時の GUS 活性量にコントロールの 26℃培養時の GUS 活性量を割った数値とした。それぞれの形質転換体 LGL-01 から LGL-05 までの GUS 誘導比はそれ

ぞれ 5.53, 5.27, 3.27, 9.07, 11.27 倍であった (Fig. 3-7)。一方、PGD-01 から PGD-03 までの GUS 誘導比はそれぞれ 1.46, 2.00, 2.10 倍であった (Fig. 3-7)。この結果は熱処理によって MAGGY が活性化することを示した。

(2) 銅ストレス

重金属に関するストレス応答経路はよく知られており、重要なストレス因子と考えられる (O'Halloran 1993; Ruis and Schüller 1995)。銅に対する応答性を調べるために、CM 培地に 0.1mM 硫酸銅を加えて、20 時間培養した。LGL-01 から LGL-05 までの GUS 誘導比はそれぞれ 1.78, 1.97, 2.50, 4.52, 2.52 倍であった (Fig. 3-7)。一方で、PGD-01 から PGD-03 の GUS 誘導比は 0.50, 0.91, 1.46 倍であった (Fig. 3-7)。この結果は銅処理により MAGGY が活性化することを示した。

(3) 酸化ストレス

酸化ストレスに対する応答性を見るために、細胞質内に活性酸素種を生成するメチルビオロゲン (除草剤パラコートの原体) 処理を行った (Bus and Gibson 1984)。CM 培地に 10mM メチルビオロゲン処理し、20 時間培養した。LGL-01 から LGL-05 における GUS 誘導比はそれぞれ 2.27, 2.07, 1.99, 3.89, 1.28 倍であった (Fig. 3-7)。一方、PGD-01 から PGD-03 における GUS 誘導比はそれぞれ 0.33, 0.90, 1.49 倍であった (Fig. 3-7)。また、メチルビオロゲンの他に酸化ストレスを与える物質として 100mM の過酸化水素を LGL-04 菌株に処理したところ、7.4 倍の GUS 誘導比が認められた (data not shown)。この結果は酸化ストレスにより MAGGY が活性化することを示した。

(4) 抗菌性物質ストレス

パラクマル酸は植物体で生産されるフェニルプロパノイド系代謝産物で糸状菌の生育阻害作用を持っている (Aziz et al 1998)。パラクマル酸は 50ppm 以上でいもち病菌の胞子発芽を阻害した (data not shown)。100μg/ml (100ppm)のパラクマル酸を処理した場合、LGL-01 から LGL-05

の GUS 誘導比はそれぞれ 1.33, 1.05, 0.67, 1.44, 0.88 であった（Fig. 3-7)。一方、PGD-01 から PGD-03 の GUS 誘導比はそれぞれ 2.15, 2.89, 2.58 であった（Fig. 3-7)。この結果は、MAGGY はパラクマル酸によって活性化されないことを示した。また、パラクマル酸によって PGD-0 が LGL-0 より活性化された結果については、溶媒（アセトン：メタノール=1：1）のみでも PGD-0 形質転換体は活性化を示したことより（data not shown)、グリセルアルデヒド-3 リン酸-デヒドロゲナーゼのプロモーター領域に溶媒応答性のプロモーター領域が存在すると考えられた。

### 3） MAGGY の活性化を示した各種ストレス物質の濃度依存的な効果について

本章結果-2）で調査したストレス物質の中で、ストレス処理によって GUS 活性が上昇した、熱・硫酸銅・メチルビオロゲン処理について、濃度依存的な効果について検討した。実験には LGL-04 と PGD-03 を代表菌株として用い、各種ストレス因子の温度や濃度を変化させ、GUS 誘導比の変化を調査した。熱処理・メチルビオロゲン処理では温度・濃度依存的に GUS 活性量が増加した（Fig. 3-8)。その一方で、硫酸銅処理では 0.1mM で最も高い値であった（Fig. 3-8)。これは硫酸銅が高い毒性を持つために 1mM などの高濃度の硫酸銅処理下ではいもち病菌の基本的な代謝機能が阻害されることが考えられた。同様に PGD-03 においても 1mM 硫酸銅処理区では GUS 活性が低下していた（Fig. 3-8)。

以上の結果は MAGGY のプロモーター領域が明らかに熱・硫酸銅・メチルビオロゲンによって活性化されていることを示すものであった。また、PGD-03 において 42℃の熱処理でも GUS 活性は増加したが（Fig. 3-8)、これはグリセルアルデヒド-3 リン酸-デヒドロゲナーゼのプロモーターに熱応答性シスエレメントが存在する可能性と GUS タンパク質が熱に耐性なためにタンパク質当たりの GUS 活性値が増加した可能性などが考えられた。

### 4） GUS 遺伝子 MAGGY の発現パターンについて

実際に GUS 遺伝子がストレスに応じて転写レベルで活性化を示すのか、

LGL-04 と PGD-03 形質転換体にそれぞれ 42℃、45 分間の熱処理を与え、6 時間後にトータル RNA を抽出して、ノーザン解析を行った（Fig. 3-9)。2.0kb の GUS 遺伝子が LGL-04 では熱処理区においてのみ検出された(Fig. 3-9)。その一方で、PGD-03 では LGL-0 より高い発現量であるが、コントロール・熱処理区において同程度の発現量であった（Fig. 3-9)。この結果は GUS 活性量の結果と一致するものであった。

また、さまざまなストレス処理による MAGGY の発現量を調査した。MAGGY を保有していないコムギいもち病菌へ MAGGY を形質転換した菌株を用いて各種ストレス処理（42℃45 分間、0.1mM 硫酸銅、10mM メチルビオロゲン、100μg/ml パラクマル酸）を行い、6 時間後にトータル RNA を抽出後、MAGGY の *gag* 領域を RNA プローブとしたノーザン解析を行った(Fig. 3-10)。MAGGY のほぼ全長に当たる 5.4kb の RNA がいずれの処理区においても認められた（Fig. 3-10)。熱処理、メチルビオロゲン処理によって転写の活性化が認められた（Fig. 3-10)。しかし硫酸銅やパラクマル酸処理では転写の活性化は顕著ではなかった（Fig. 3-10)。この結果は GUS 活性の結果と比較して、ほぼ一致していたが、硫酸銅処理に関しては異なるものであった。硫酸銅処理ではコントロールと比較すると若干の転写活性化を示したのみであった。しかしながら、硫酸銅処理についてノーザン解析の反復実験を行った結果、いずれもコントロールと比較して MAGGY の転写量は若干増加していた（data not shown)。硫酸銅による転写の増高が顕著でない理由としては、転写の誘導のタイミングが他のストレス処理区と異なっている可能性が考えられた。

### 5） LTR プロモーター領域の欠失変異体解析

今回明らかとなった MAGGY の LTR 領域におけるストレス応答性がどのような塩基配列（シスエレメント）の制御で行われているのかを明らかにするために、LTR 配列の欠失変異体シリーズを作成し、熱処理に対する応答性について調査した（Table 3-3)。LTR の制限酵素部位 *Dde*I, *Pma*CI, *Bss*HII をもとにして 5'側 LTR を削り込んだプラスミドを作成し、それぞれの形質転換体を作成した。その結果、pLTRΔDde-GUS, pLTRΔPma-GUS では熱処理に対して応答性を示したが、pLTRΔBss-GUS では GUS

活性自体が喪失してしまった（Table 3-3）。このことは、*Pma*CI と *Bss*HII 部位の間に何らかの制御領域が存在すると考えられた。しかしながら pLTRΔBss-GUS では GUS 活性自体が失われてしまったことより（Table 3-3）、部位特異的な変異の導入を含めて、さらなる詳細な検討が必要であると思われる。

### 6） MAGGY を保有しない菌株におけるストレス応答性

MAGGY のプロモーターが MAGGY を保有していないコムギいもち病菌やウリ類炭疽病菌（*Colletotrichum lagenarium*）においてどのようなストレス応答性を示すのか、調査した。それぞれのプラスミド pLTR-GUS, pNOM102 を本章結果-1）と同様にそれぞれの菌株に導入し、コムギいもち病菌の形質転換体をそれぞれ LGL-T1ー3, PGD-T1ー3 とし、ウリ類炭疽病菌の形質転換体をそれぞれ LGL-C1ー3, PGD-C1ー3 とした。得られた形質転換体に 42℃45 分間の熱処理、0.1mM の硫酸銅処理、10mM のメチルビオロゲン処理を行った。LGL-T 形質転換体ではいずれの処理区においても GUS の活性化が認められたが、PGD-T 形質転換体ではいずれも活性化を示さなかった（Fig. 3-11）。この結果は MAGGY を保有していないコムギいもち病菌においても MAGGY のストレス応答性シスエレメントは機能することが示された。

一方で、LGL-C 形質転換体はいずれのストレス処理においても GUS の活性化が認められなかった（Fig. 3-11）。このことはウリ類炭疽病菌においては MAGGY のストレス応答性シスエレメントは機能しないことを示唆した。

## 4. 考　察

今回の実験によって、いもち病菌に存在しているレトロトランスポゾンMAGGY は熱処理・硫酸銅・酸化ストレスによって活性化されることが示された。その一方で、抗菌性物質であるパラクマル酸はMAGGYを活性化させなかった。これらストレスの他に、UV 照射・プロトプラスト化・イネのファイトアレキンであるサクラネチン・殺菌剤のイソプロチオランやフサライドなどをさまざまな濃度区で処理したが、いずれの濃度区においても活性化を示さなかった (Table 3-4)。これらストレス応答性は、MAGGY のプロモーター領域にある特異的なストレスあるいは複数のストレスに応答するシスエレメントが存在していることを示唆している (Ikeda et al 2001)。

酵母では幾つかのストレス応答性シスエレメントが明らかとされている。Ruis と Schüller (1996)はこれらシスエレメントをそれぞれ heat shock elements (HSEs), stress response elements (STREs), AP-1 responsive elements (AREs)と区分した。この３つのタイプのシスエレメントは応答するストレスが一部重なっているが、機能的に異なっていることを指摘した。HSEsはストレス強度が中間程度の際に活性化され、STREsは強いストレス条件下で活性化され、また AREs は酸化ストレスや細胞毒性を受けた際に活性化する (Ruis and Schüller 1996)。

MAGGY の LTR 配列にこのようなストレス応答性シスエレメントが存在するかどうか調査したところ、STREs である CCCCT モチーフが認められた (Table 3-3) (Ruis and Schüller 1996; Kobayashi and McEntee 1993)。このCCCCTモチーフはLTRの制限酵素部位 *Dde*I と *Pst*I の間に存在しており、*Pst*I 欠失変異体においても熱処理応答性が保持されていた結果からは、MAGGY のストレス応答性への、この CCCCT モチーフの関与は低いものと考えられた。

転移因子は利己的な遺伝子と考えられている一方で、ストレス条件を克服するような遺伝的変異をもたらす因子として働く例が報告されている (Schmit 1998; Teng et al 1996)。いもち病菌は多様な病原性を持った菌株の集団であり (Ou 1985; Kato et al 2000)、しばしば以前に抵抗性を示していた品種に対して、病原性を示す新たなレースの出現が圃場レベルで報告されている。このような新しいレースの出現が転移因子の関与によって引き

起こされるいう仮説は非常に魅力的なものである。実際に、イネの抵抗性品種 Yashiro-mochi（抵抗性遺伝子 *Pi-ta* 保有）に対して非親和性であるイネいもち病菌において、DNA 型トランスポゾン Pot3 (MGR586)が非病原力遺伝子 *Avr-Pita* の上流付近に挿入された変異体が報告されている（Orbach et al 2000; Kang et al 2001)。Nishimura et al. (2000)はまた、いもち病菌の胞子形成に関わる遺伝子 ACR1 に LINE 様因子 MGL (MGR583)が挿入されて病原性が喪失したことを報告した。

MAGGY のストレスによる活性化が、圃場レベルでいもち病菌の病原性の変異を含めた遺伝的な変異にどのような貢献をしているのか、明らかではない。しかし、過去においても、銅や水銀などを含んだ殺菌剤が使用されており、さらに低濃度の銅を含有した PDA 培地から銅耐性能力の高まった変異体が得られたと報告されている（Yamazaki and Tsuchiya 1964)。このような遺伝的な変化が転移因子の活性化によって導かれた可能性も考えられる。さらに、レタスに対して非親和性である *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* をレタスに接種した際には 1M 近くの活性酸素が局所的に蓄積されることが報告されている（Bestwick et al 1997)。このような抵抗性反応時における酸化ストレスによって MAGGY が活性化され、新しいレースが出現する可能性も考えられる。

MAGGY は MAGGY を保有していないいもち病菌においてもストレスに応じて活性化することが示された。しかしながら、ウリ類炭疽病菌においては通常の転写活性は認められるが、ストレスに対して活性化を示さなかった。MAGGY のストレス応答性シスエレメントは糸状菌に広く保存されているわけではなく、いもち病菌に特異的なものであることが示唆された（Ikeda et al 2001)。レトロトランスポゾンのストレス応答性シスエレメントは異なる種においても保存されている例がある。タバコのレトロトランスポゾン Tnt1 はシロイヌナズナにおいてもプロトプラスト化や病原菌などのエリシターによって活性化されることが示されている（Pauls et al 1994)。また、ショウジョウバエのレトロトランスポゾン 1731 はヒトの表皮細胞においても UV-B によって活性化したことが示されている（Faure et al 1996)。その一方で、タバコの Tnt1 はタバコではオーキシンに対して応答性を示さないが、シロイヌナズナではオーキシンに対して活性化を示した（Pauls et al

1994)。プロモーター領域の応答性が生物種によって異なるということは、転写因子の結合配列が異なる可能性や、対象となるストレスに対する反応経路が生物種によって異なる可能性が考えられる。

転移因子がどのようにしてストレス応答性を獲得していったのか、興味深い問題点である。植物のレトロトランスポゾンである Tnt1 と Tto1 は共に病原菌の防御応答に関連して活性化を示すが、Tnt1 と Tto1 のシスエレメントについて解析した結果、それぞれのシスエレメントは異なっていた。しかしながら、共に宿主植物がコードする PR-タンパク質や CHS (chalcone synthase)などの抵抗性反応時に発現する遺伝子のプロモーター領域に複数存在しているシスエレメントの中の一つとそれぞれ類似したものであった(Takeda et al 1999; Vernhettes et al 1997)。これらよりレトロトランスポゾンのストレス応答性は、レトロウイルスにおいてその可能性が報告されているように、近隣のゲノム領域に存在しているシスエレメントを転移因子が獲得した可能性が考えられる (Jin and Bennetzen 1994)。あるいは McDonald et al. (1997)によって提唱されているようにレトロトランスポゾンのシスエレメントはある特殊なストレスに対して活性化するように淘汰を受けて創り出された可能性が考えられる。

**Table 3-1** Estimation on the transpositon frequency of various repetitive elements in 80 $F_1$ progenies derived from a cross between GFSI1-7-2 and Br48 (Eto et al. 2001).

| Element | Number of | |
|---|---|---|
| | Pairs[a)] | Bands[b)] |
| MGR586 | 17 | 20 |
| Pot2 | 13 | 13 |
| MGR583 | 2 | 2 |
| Mg-SINE | 2 | 4 |
| Pyret | 2 | 2 |
| MAGGY | 39 | 186 |

Genomic DNA of the 80 $F_1$ progenies was digested with *Eco*RI and hybridized with each transposable element probes.

a) Pairs whose sister cultures had different fingerprints.

b) Bands which were absent in the other sister culture of a pair.

**Table 3-2** Activation of retrotransposon under stress conditions

| Retrotransposon | Host | Stressor |
|---|---|---|
| 1731 | Fruit fly | UV, heat |
| Ty1 | Yeast | UV |
| Ty5 | Yeast | Pheromone |
| Tnt1, Tnt4 | Tobacco | Tissue culture |
| *Tto1* | Tobacco | Virus infection |
| *Tos17* | Rice | Tissue culture |

**Table 3-3** Deletion analysis in LTR sequence for the promoter activity

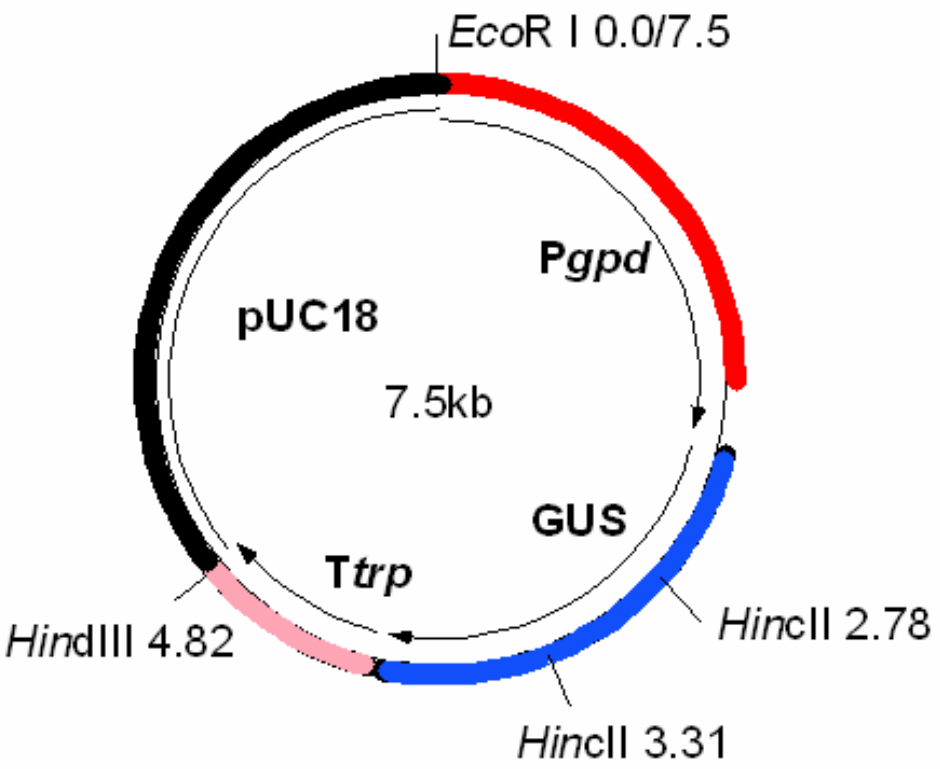
| Stress response element | | GUS activity (pmol MU/mg protein)* | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Control | Heat shock | Ratio** |
| STRE CCCCT ? | LGL-GUS | 439. 4±66. 8 | 3985. 8±637. 4 | 9. 1 |
| *Dde*I *Pma*CI *Bss*HII | LGLΔ*Dde*-GUS | 73. 1±72. 2 | 337. 1±91. 4 | 4. 9 |
| *Pma*CI *Bss*HII | LGLΔ*Pma*-GUS | 224. 4±139. 6 | 1235. 4±386. 5 | 6. 3 |
| *Bss*HII | LGLΔ*Bss*-GUS | N.D. | N.D. | – |

*, Average of triplicate experiments; **, The ratio was obtained by dividing the GUS activity with control value; N.D., The GUS activity was not detected

**Table 3-4** Effects of ultraviolet, antifungal substances and protoplast formation on GUS activity driven by the MAGGY promoter in *M. grisea*

| Stimuli | | LTR-GUS | | P*gpd*-GUS | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Activity[a] (pmol MU / min / mg protein) | Induciton factor | Activity (pmol MU / min / mg protein) | Induciton factor |
| P-coumaric acid | 0ug/ml | 1221.67 □189.69 | 1.00 | 5093.63 □1157.71 | 1.00 |
| | 100ug/ml | 690.77 □188.02 | 0.57 | 8168.97 □2970.71 | 1.60 |
| | 250ug/ml | 624.87 □91.98 | 0.51[b] | 7226.87 □1311.38 | 1.40 |
| | 500ug/ml | 1753.47 □444.62 | 1.44 | 12795.70 □1791.47 | 2.50[b] |
| Sakuranetin | 0□g/ml | 2168.90 □563.60 | 1.00 | 5355.40 □480.47 | 1.00 |
| | 100□g/ml | 1344.80 □334.20 | 0.62 | 7268.20 □711.87 | 1.40[b] |
| | 250□g/ml | 2089.30 □877.27 | 0.96 | 13785.40 □1840.13 | 2.60[b] |
| | 500□g/ml | 3844.33 □940.16 | 1.77 | 16044.83 □1489.62 | 3.00[b] |
| | 750□g/ml | 2719.27 □1186.16 | 1.25 | 24800.90 □1991.00 | 4.60[b] |
| Isoprothiolane | 0ppm | 1445.90 □34.87 | 1.00 | 5093.63 □1157.71 | 1.00 |
| | 1.2ppm | 1481.60 □296.67 | 1.02 | 6851.77 □2255.04 | 1.20 |
| | 12ppm | 1667.57 □380.62 | 1.15 | 7134.80 □1978.33 | 1.50 |
| | 120ppm | 2254.93 □701.78 | 1.56 | 9654.00 □3834.47 | 1.80 |
| Ultraviolet | 0mj/cm$^2$ | 439.43 □66.76 | 1.00 | 11065.23 □779.71 | 1.00 |
| | 28mj/cm$^2$ | 421.93 □2.89 | 0.96 | 10901.03 □366.16 | 0.99 |
| | 56mj/cm$^2$ | 403.87 □15.42 | 0.92 | 10942.33 □400.31 | 0.99 |
| | 112mj/cm$^2$ | 579.93 □50.04 | 1.32 | 10389.87 □428.84 | 0.94 |
| Protoplast formation | Mycelia | 442.86 □121.81 | 1.00 | 10336.03 □2339.69 | 1.00 |
| | Protoplasts | 430.85 □31.18 | 0.97 | 11065.23 □779.71 | 1.07 |

a, GUS activity represents the mean of three replicates □SD.
b, Significant difference by T-test ($p < 0.05$)




**pNOM102**

**Fig. 3-1** Maps of the plasmid used in this study GUS, β-glucuronidase; P*gpd*, promoter of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans;* T*trp*, terminater of *trpC* in *A. nidulans*

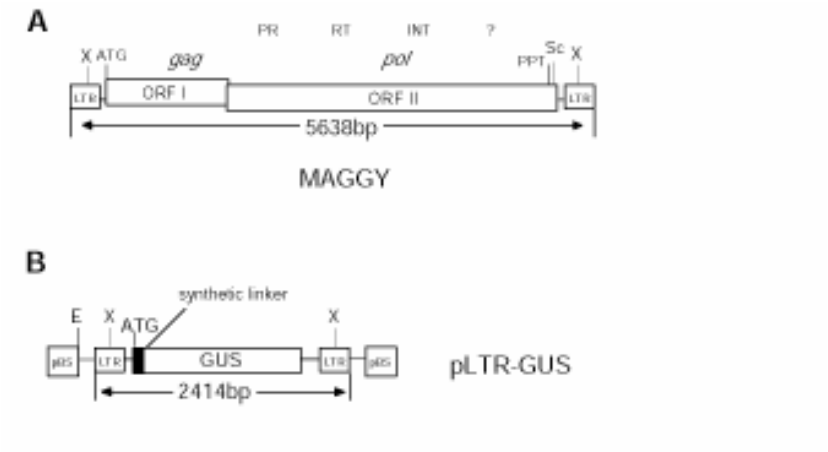



**Fig. 3-2** Schematic representation of MAGGY (**A**) and pLTR-GUS (**B**). pLTR-GUS was constructed by replacing MAGGY ORFs with the GUS gene. The GUS gene was inserted between LTRs so as to be translated from the original translation start site of ORF1 of MAGGY. LTR, long terminal repeats; ORF, open reading frame; PR, protease; RT, reverse transcriptase; INT, integrase; PPT, poly purine tract; GUS, $\beta$-glucuronidase; pBS, pBluescript (SK+); Ec, *Eco*RI; Sc, *Sac*I; X, *Xho*I

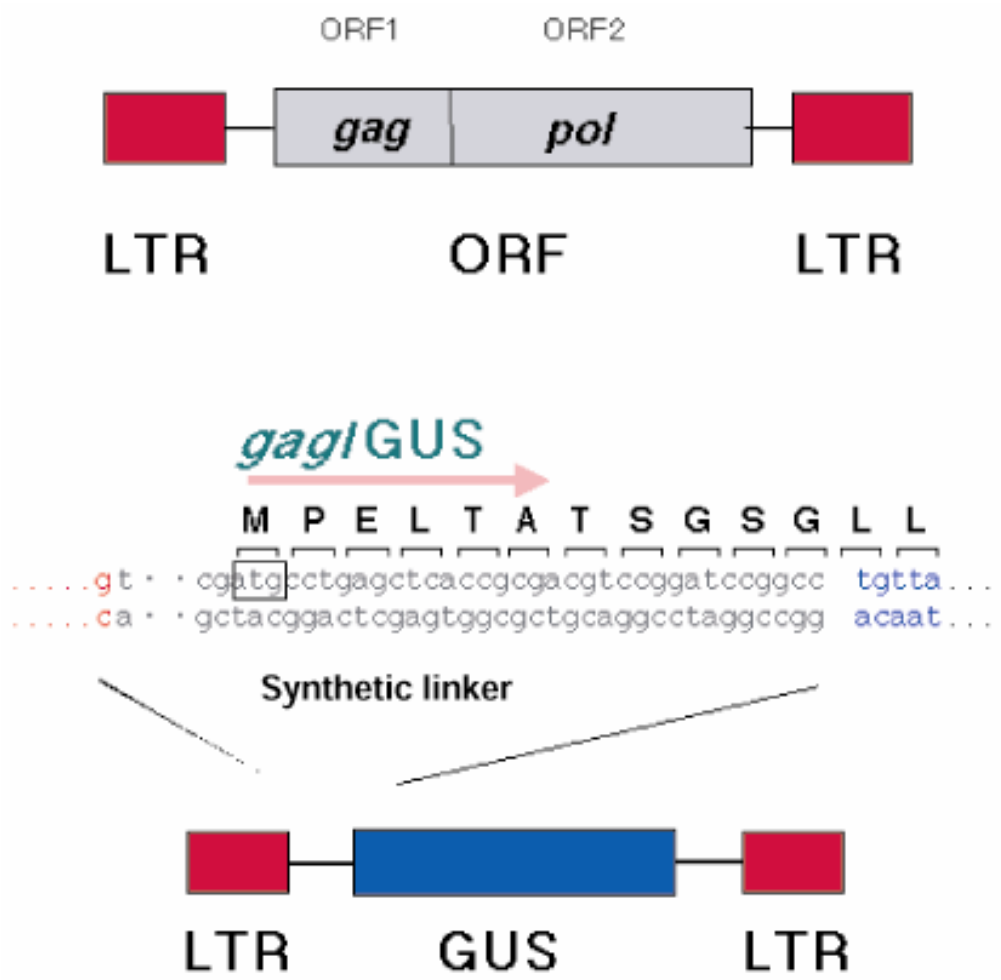



**Fig. 3-3** A detailed diagram of the LTR-GUS construct

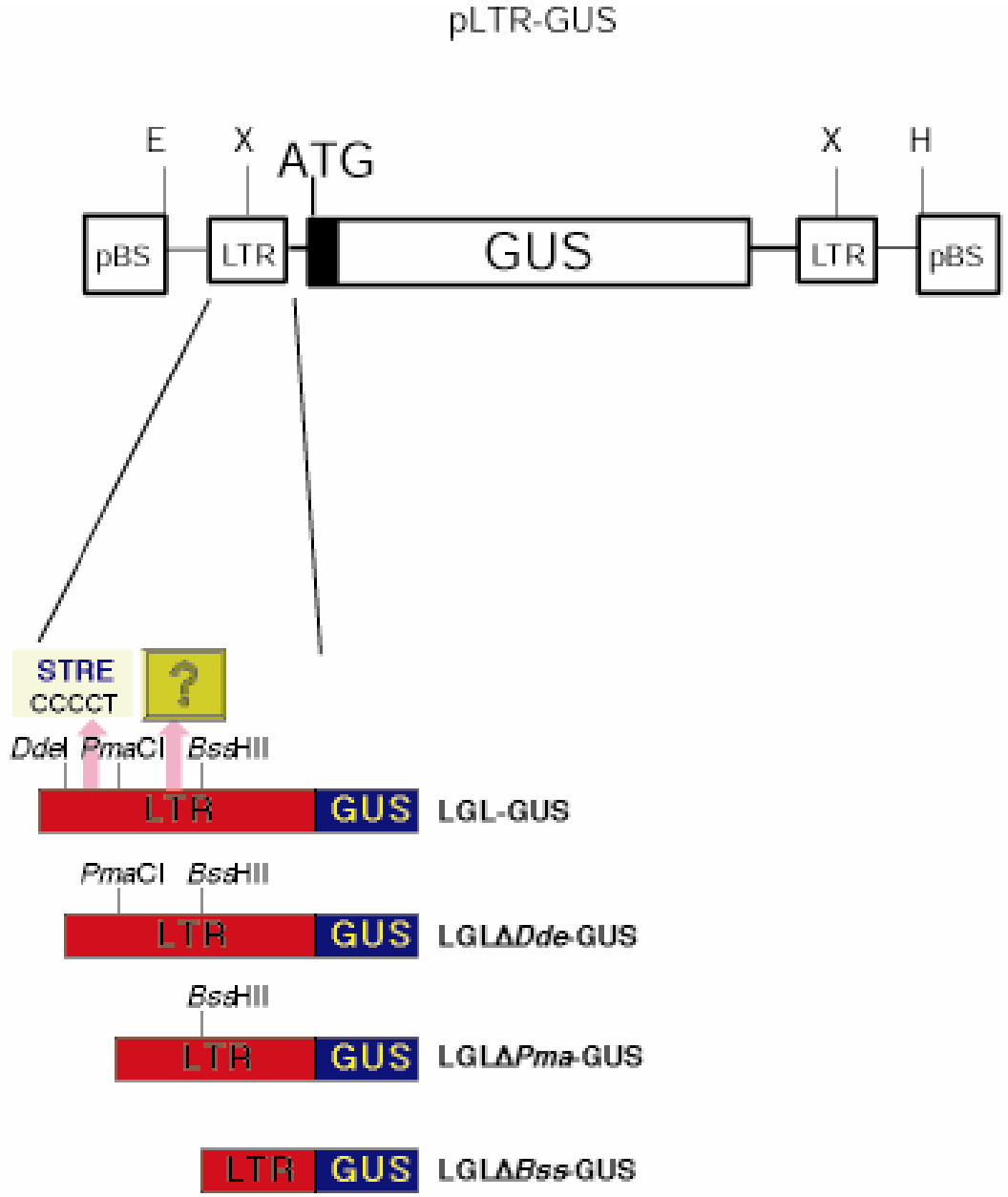



**Fig. 3-4** Construction of deletion series of pLTR-GUS
E, *Eco*RI; X, *Xho*I; H, *Hin*dIII

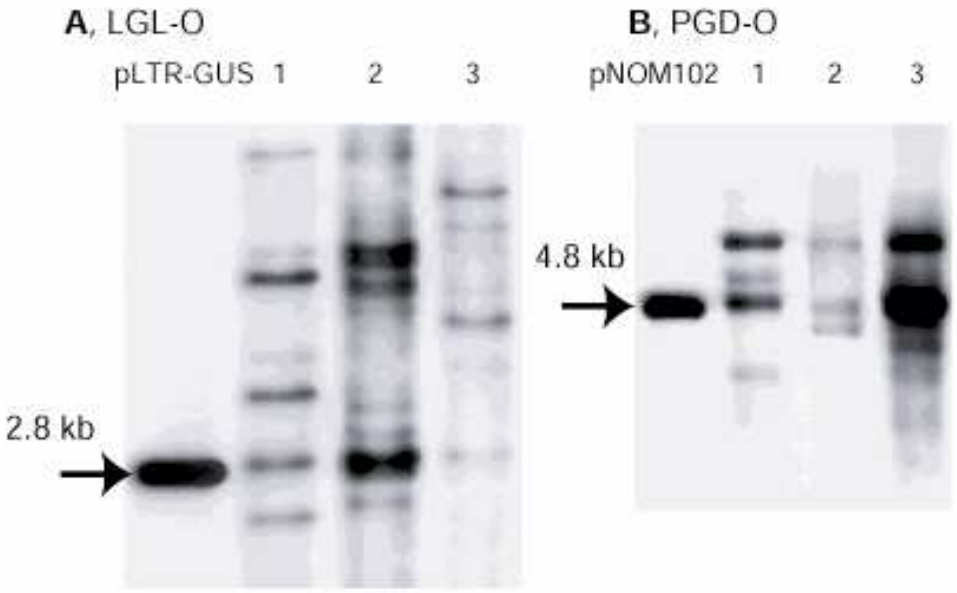



**Fig. 3-5** Southern blot analysis of LGL and PGD transformants

Each sample was digested with *Eco*RI and *Hin*dIII and probed with a 530 bp *Hin*cII fragment of the GUS gene. Arrows indicated the size of the linearlized construct (pLTR-GUS and pNOM102).
Lane 1-3 in **A**, transformants of LGL; lane 1-3 in **B**, transformants with PGD

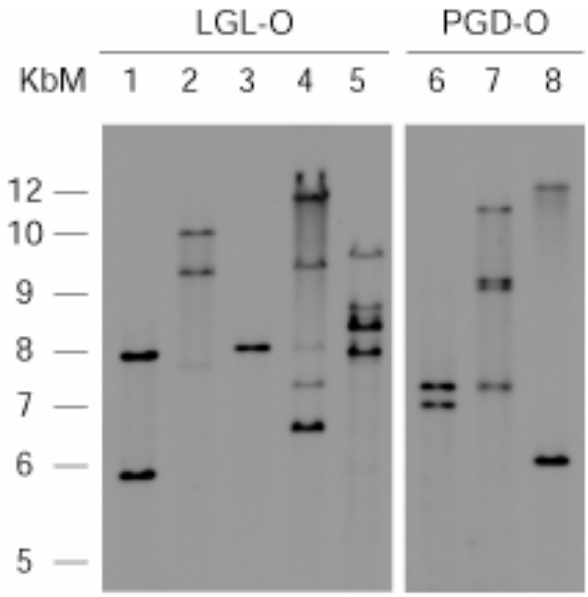



**Fig. 3-6** Southern blots of the pLTR-GUS and pNOM102 transformants of an *Oryza* isolate of *Magnaporthe grisea*. Genomic DNA was digested with *Eco*T22I (LGL-O) or *Cla*I (PGD-O) and probed with the GUS gene. Lane 1 to 5, transformants with pLTR-GUS (LGL1-5); lane 6 to 8, transformants with pNOM102 (PGD1-3)

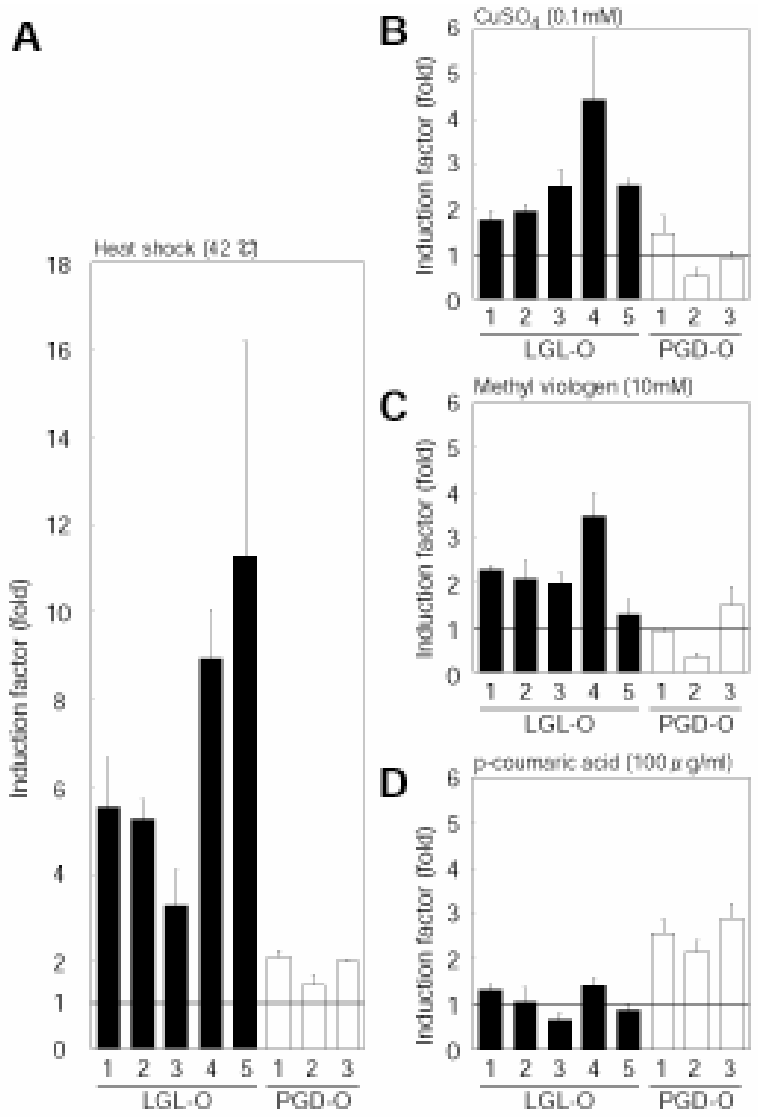



**Fig. 3-7** GUS activity in the transformants of an *Oryza* isolate of *Magnaporthe grisea* under various stress conditions. **A**, heat shock (42℃) ; **B**, $CuSO_4$ (0.1mM); **C**, Methyl viologen (10mM); **D**; p-coumaric acid (100 $\mu$ g/ml). Black bars, pLTR-GUS transformants (LGL-O1 to 5); white bars, pN0M102 transformants (PGD-O1 to 3). GUS activity was examined in at least three independent experiments. A mean of GUS activity and standard deviation are represented

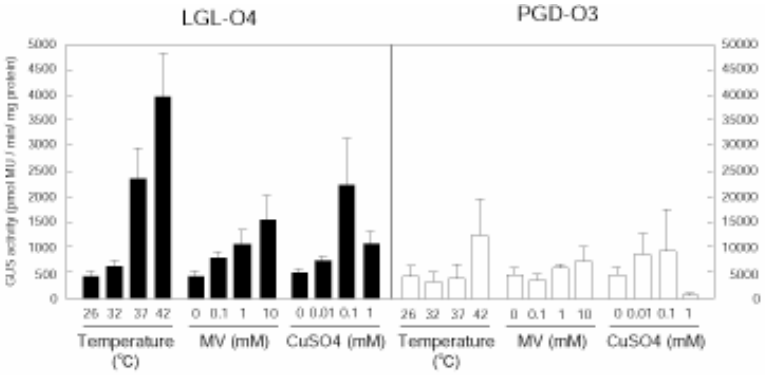



**Fig. 3-8** Effects of heat shock, methyl viologen (MV) and copper sulfate ($CuSO_4$) treatments on GUS activity in the *Magnaporthe grisea* transformants (*Oryza* isolate) with the GUS constructs, pLTR-GUS (LGL-O4, black bars) and pNOM102 (PGD-O3, white bars). GUS activity was examined in at least three independent experiments. A mean of GUS activity and standard deviation are represented

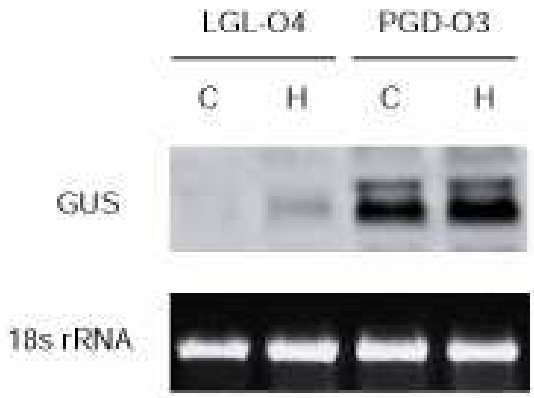



**Fig. 3-9** Northern blot analysis of GUS in the transformants with pLTR-GUS (LGL-O4) and pNOM102 (PGD-O3) after heat shock treatments. Fungal mycelia were treated with heat shock (42 ℃, 45 min) and total RNA was extracted. Twenty micrograms of total RNA was run on a 1.2% formaldehyde agarose gel, transferred to a nylon membrane, then probed with the GUS gene. The18s rRNA stained with ethidium bromide and photographed before blotting is shown below the blot. C, control (26℃); H, heat shock (42℃)

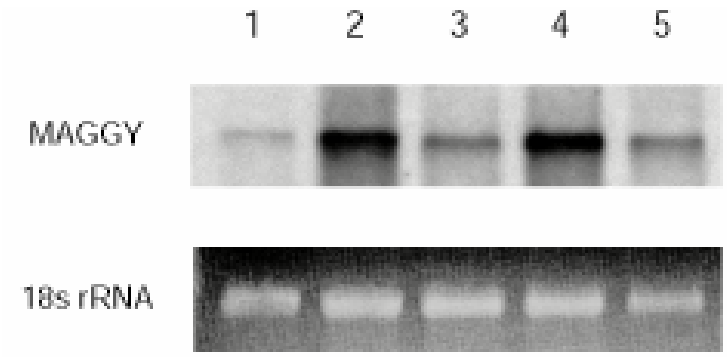



**Fig. 3-10** Northern blot analysis of MAGGY under various stress conditions. Fungal mycelia were treated with various stresses (see below) and total RNA was extracted. Twenty micrograms of total RNA was run on a 1.0% formaldehyde agarose gel, transferred to a nylon membrane, then probed with MAGGY. The18s rRNA stained with ethidium bromide and photographed before blotting is shown below the blot. Lane 1, control; lane 2, heat shock (42℃); lane 3, copper sulfate (0.1mM); lane 4, methyl viologen (10mM); lane 5, p-coumaric acid (100g/ml)

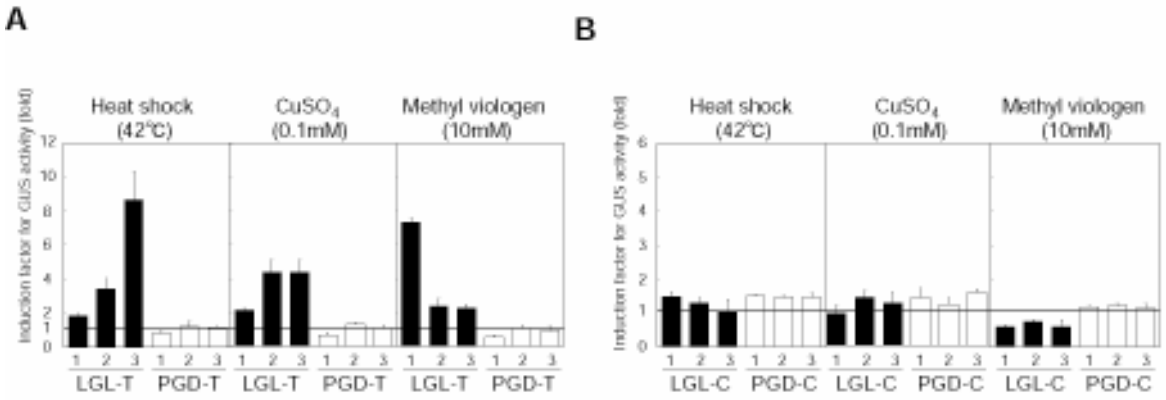



**Fig. 3-11** GUS activity in the transformants of a *Triticum* isolate of *Magnaporthe grisea* and *Colletotrichum lagenarium*. **A**, Transformants of *M. grisea* (*Triticum* isolate); **B**, Transformants of *C. lagenarium*. Black bars, transformants with pLTR-GUS; white bars, transformants with pNOM102. GUS activity was examined in at least three independent experiments. A mean of GUS activity and standard deviation are represented

# 第４章　MAGGY におけるメチル化の及ぼす影響について

## 1. 緒　言

メチル化された塩基はゲノムを構成・維持していく上で重要な役割を持っており、第 5 番目の塩基とも呼ばれている (Robertson and Wolfe 2000)。メチル化によって標識された遺伝子領域はそれと結合するタンパク質によって複合体を形成してクロマチン構造のダイナミックな変化を引き金とした転写パターンの変化などで発生調節や代謝変動などに影響を及ぼしている (Hsieh 2000; Finnegan et al 2000)。メチル化はまたプロモーター配列の認識効率に影響を与えたり、転写伸長時に障害となったりする。この現象はゲノムに新たに導入された遺伝子（トランスジーン）や転移因子の活性を抑制する機構として利用されている可能性が考えられている。これまでに遺伝子の不活性化を受けた領域において高頻度のメチル化が観察されたこと、またそのメチル化を薬剤や変異体を用いて解除した場合にはその遺伝子の発現が回復したことなどが報告されており、生物におけるジーンサイレンシング・トランスポゾンの抑制機構の本体を担っているという考え方が広く受け入れられている (Table 4-1) (Vaucheret and Fagard 2001)。これを TGS (transcriptional gene silencing)と呼んでいる (Vaucheret and Fagard 2001)。糸状菌においても有性世代を経た際にメチル化を伴って反復配列が不活性化する MIP (methylation-induced premeiotically)という現象が *Ascobolus immersus* において知られている (Goyon and Faugeron 1989)。

しかし、その一方でショウジョウバエ・線虫や酵母などではメチル化された塩基がほとんど検出されないにも関わらず、生命機能を保っている (Colot and Rossignol 1999)。ショウジョウバエには退化したと考えられるメチルトランスフェラーゼの存在が報告されており (Tweedie et al 1999)、これら生物においては、メチル化は必須でなくなったことが示唆される。

Nakayashiki et al. (2001a)はいもち病菌に存在するレトロトランスポゾン MAGGY の活性化とメチル化との関係について調査した。その結果、MAGGY は新たな宿主に導入されると、急速にそのコピー数を増加させるが、時間を経るに従い転移頻度は減じていく。この際の MAGGY のメチル化を調査した結果、MAGGY 自身は新たな宿主に導入直後からメチル化を受けていた。しかし、

メチル化の阻害剤として知られている 5-Azacytidine 処理によって、MAGGY の転写量は上昇したが、それだけでは転移の活性化には結びつかなかった。

遺伝子の不活性化現象機構として考えられるもう一つの現象は、mRNA が転写された後に分解されるもので、PTGS (post transcriptional gene silencing)と呼ばれている。この現象は RdRP (RNA dependent RNA polymerase)の作用により abberant に生じるアンチセンス鎖 RNA によって 2 本鎖 RNA が形成され、それを分解する RNase が働くものと考えられている (Bernstein et al 2001)。植物・線虫やショウジョウバエでは任意の 2 本鎖 RNA 断片を導入させることによって目的とする遺伝子を不活性化することに成功している。植物では co-suppression (Vaucheret et al 1998)、動物では RNAi (RNA interference) (Fire et al 1998)、また糸状菌では *Neurospora crassa* において Quelling (Romano and Macino 1992)と別名で呼ばれているが共通した機構が存在すると考えられている。しかし一方で、これら現象とは別に、酵母のレトロトランスポゾン Ty1 はタンパク質の翻訳レベルにおいて転移活性が制御されていることが示されている (Curcio and Garfinkel 1999)。また *Neurospora crassa* では交配を経た際に高頻度の C:G から T:A への塩基置換を伴って不活性化する RIP (repeat-induced point mutation)という現象が知られている (Selker et al 1987)。以上のように導入遺伝子のサイレンシングや転移因子の抑制機構は様々であり、広く生物に共通しているものと生物固有、あるいは限定された生物種のみに認められるものの両方が存在している。

本章ではいもち病菌における MAGGY のメチル化に焦点をあてて研究を行った。コムギいもち病菌に新たに MAGGY を導入した際には、急速に MAGGY 配列にメチル化が起こる (Nakayashiki et al 2001a)。これは宿主による何らかの認識機構が働いている可能性を示唆している。この MAGGY に対するメチル化能力の性格付けと、遺伝的な解析を行った。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試菌株

実験に用いた菌株はイネいもち病菌（1601-3, 1836-3)、アワいもち病菌（IN77-16-1-1, NNSI2-1-1, GFSI1-7-2)、コムギいもち病菌(Br48)、tBRC-1（Br48 の MAGGY, *hph* 形質転換体（第 5 章参照））、および GFSI1-7-2 と Br48 の雑種後代から得られた 80 菌株である（Table 4-2）(Murakami et al 2000)。雑種後代は対峙培養して形成された子のう殻から単離された完全な 4 分子由来の 8 つの子のう胞子をそれぞれ K1, K2, L1, L2, M1, M2, N1, N2 と区別し、10 セット分を用いた。菌叢の色や転移因子をプローブとしたフィンガープリント解析などによって 4 分子由来のペアを同定し、各セットの番号を頭に付けてセット 1 の菌株には 1K1, 1K2 となるように命名した（Murakami et al 2000)。この雑種後代より 5M1, 5M2 のハイグロマイシン B 耐性遺伝子を導入した形質転換体を作成した（それぞれ 5M1t-1, 5M2t-2 とした）。

### 2) サザンハイブリダイゼーション

詳細については第 2 章に記載した。メチル化の状態を調査するためのプローブとして、MAGGY を *Xho*I 消化して得られた 5.5kb 断片をゲル回収し、fluorescein 標識したものを用いた。その他の転移因子についてのプローブは第 2 章で用いたプラスミドからベクター領域をそれぞれ適切な制限酵素で切断し、ゲル回収によって転移因子領域を含んだ断片を精製し、fluorescein 標識したものを用いた。

### 3) ノーザンハイブリダイゼーション

詳細については第 3 章に記載した。MAGGY の転写を確認するために用いた RNA プローブは第 3 章と同じものを用いた。

### 4) 遺伝子マッピング

雑種後代 80 菌株における形質の連鎖について、Mapmaker vesion2.0 (Macintosh)プログラムを用いて解析した。これまでに Chuma (1999)がアワ菌株とコムギ菌株における雑種系統を用いて作製した、シングルコ

ピーマーカー、RAPD マーカー、AFLP マーカー等による遺伝子地図の中で、帰属する染色体や隣接したマーカー間の遺伝的距離を調査した。

## 3. 結　果

### 1)　各種いもち病菌における MAGGY のメチル化状態

MAGGY を保有するいもち病菌株において MAGGY に対するメチル化の状態について調査した。制限酵素 *Msp*I, *Hap*II は同じ CCGG 配列を切断するがシトシンにメチル化を受けた場合に *Msp*I は切断できるが *Hap*II は切断できなくなる。この制限酵素の組み合わせを利用して、いもち病菌のゲノミック DNA をそれぞれの制限酵素で消化し、MAGGY のほぼ全長をプローブとしたサザン解析を行い、検出されたバンドパターンの比較によって MAGGY におけるメチル化状態を調査した。これをアイソシゾマー(isoschizomer)解析と呼んでいる。MAGGY にメチル化を受けた場合に *Hap*II 消化したレーンでは *Msp*I 消化したレーンと比較してバンドが高分子領域において検出された。MAGGY を保有している菌株についてメチル化の状態を調査したところ、イネ菌株系統ではメチル化を受けており、アワ菌株系統ではメチル化を受けていない結果が得られた (Fig. 4-1)。また、MAGGY を保有していないコムギ菌株に MAGGY を形質転換させた系統ではメチル化を受けていた (Fig. 4-1)。

### 2)　アワ菌とコムギ菌雑種後代における MAGGY のメチル化状態

MAGGY にメチル化を起こさないアワ菌株 (GFSI1-7-2)と MAGGY を導入するとメチル化を起こすコムギ菌株 (Br48)とを交配して完全な 4 分子由来 8 菌株の 10 セット、合計 80 菌株の雑種後代を得た (Murakami et al 2000)。この子孫からゲノミック DNA を抽出し、*Msp*I, *Hap*II 消化してサザン解析を行った。その結果、各セットにおいて、雑種後代はメチル化を受けている菌株とメチル化を受けていない菌株とに 1：1 の割合で分かれた (Fig. 4-2; Table 4-3)。これより MAGGY に対するメチル化の機構に関して 1 遺伝子座が関わっていることが明らかとなった。

### 3)　メチル化関与遺伝子のマッピング

雑種後代において MAGGY に対するメチル化の有無が 1 対 1 に分離したことで、1 遺伝子座の存在が明らかとなった。この遺伝子を *mmd1* (**M**AGGY **m**ethylation **d**eficiency **1**)とした。この *mmd1* の遺伝子地図を

作成した。遺伝子地図の詳細なデータは、今回実験に供した雑種後代と同じ菌株を用いて、本研究室の Chuma (1999)によってコスミドクローン・RAPD マーカー・AFLP マーカーなどの分離データをもとに作成されたものである。この結果、*mmd1* は第 6 染色体の AFLP マーカー (A0402AB, AU07-1S)と 0cM の位置にマッピングされた (Fig. 4-3)。

**4) メチル化状態の異なる雑種後代間における転移因子の転移頻度について**

雑種後代についてメチル化を受けている菌株とメチル化を受けていない菌株に分け、それぞれの菌株における MAGGY の転移頻度について調査した。これは、それぞれの菌株を 3 つに分けて培養し、それぞれの得られた菌体からゲノミック DNA を抽出し、MAGGY をプローブとしたサザン解析を行って、バンドパターンを比較した。3 つの菌株の中で、異なるバンドパターンを示したものを転移バンドと見なした。この結果、t 検定においてメチル化による転移頻度は影響を受けないことが明らかとなった (Table 4-4)。

**5) その他の転移因子におけるメチル化状態**

各菌株における MAGGY 以外の転移因子のメチル化状態を調査した。MGR586, Pot2, MgSINE, MGR583, Pyret について本章結果-1) と同様に *Msp*I, *Hap*II 消化し、サザン解析を行った。その結果、各いもち病菌における MGR586, Pot2, Pyret のメチル化状態は MAGGY で観察されたものと同じ結果であり、同一遺伝子座によりメチル化状態が支配されていることが示唆された (Fig. 4-4)。しかしながら、MAGGY に対するメチル化の程度と比較すると、それぞれの転移因子に対するメチル化の度合いは非常に低いものであった。一方、MGR583, MgSINE は露光時間を長くして検出したにも関わらず、いずれの菌株においてもメチル化が観察されなかった (Fig. 4-4)。

## 4. 考　察

制限酵素を用いたアイソシゾマー解析によって、MAGGY に対するメチル化の状態はコムギいもち病菌とアワいもち病菌において異なっており、そのメチル化状態は両菌を交配させた雑種後代において 1 遺伝子座 (*mmd1*)で支配されていることが明らかとなった。この結果は、MAGGY に対する宿主側の認識機構が存在している可能性と、アワ菌におけるメチル化能力が欠損した可能性、あるいはアワいもち病菌における MAGGY 認識機構の解除因子が存在する可能性など 3 つの仮説が考えられた。

メチル化はほ乳類では発生段階において重要な役割を成しており、生存に関わる機能である (Finnegan et al 2000)。植物においてもメチル化能力を低下させた個体では著しい生育異常が認められた (Kakutani et al 1999)。その一方で、線虫、ショウジョウバエや酵母ではメチル化能力が失われているにも関わらず、正常に生育している (Colot and Rossignol 1999)。また、*Ascobolus immersus* ではメチラーゼ遺伝子を欠損させた個体では遺伝子の不活性化機構の一つである MIP (methylation induced premeiotically)が働かなくなり、交配能力も失われていたが、それ以外は正常であった (Malagnac et al 1997)。本研究で用いたアワいもち病菌でも正常に生育し、また交配して子孫が得られた。メチル化はそれぞれの生物種において重要度が様々であり、その生物学的意義を明らかにすることは難しい。

メチル化はトランスジーン・転移因子の不活性化に関与する機構として植物において特に報告されている。シロイヌナズナにおいてメチル化に関与する遺伝子を欠損させた個体では転移因子の転移頻度が増加していた (Hirochika et al 2000)。この他にメチル化が関与している例として、ボルボックスにおける転移因子の不活性化 (Babinger et al 2001)や、ペチュニアにおける導入遺伝子の不活性化 (Meyer et al 1994)が報告されている。一方、いもち病菌の MAGGY にメチル化を受けた菌株において 5-Azacytidine を処理して脱メチル化させたところ、MAGGY の転写は活性化を示したが、転移頻度の増加は認められなかった (Nakayashiki et al 2001a)。このことは、今回明らかとなったメチル化が転移因子の不活性化に直接関与しているものではないことが示された。

MAGGY 以外の転移因子についてもメチル化の状態について調査した結果、

MGR586, Pot2, Pyret においてメチル化を受けていたが、MGR583, MgSINE はメチル化を受けていなかった。いずれの転移因子も多コピー存在しているにも関わらず、メチル化を受けているものとメチル化を受けていないものに分けられた。MgSINE は全長 400bp と短い転移因子であり、メチル化を受ける対象となり得ない可能性も考えられるが、MGR583 は全長約 6kb と大きく、因子のサイズ以外の要因を考える必要がある。メチル化を受けていた MGR586, Pot2, Pyret において、メチル化の程度は MAGGY のメチル化の程度と比較すると低いものであった。これは複数コピー存在している転移因子の中でもメチル化を受けているコピーは僅かである可能性が考えられ、それぞれの転移因子を認識する程度が異なっていることが示唆された。これらのメチル化の程度が低い転移因子に対してはメチル化機構の何らかの寛容化が起こっている可能性も考えられた。

ホヤのゲノムに存在している各種レトロトランスポゾン *Cigr-1*（*gypsy* 型 LTR レトロトランスポゾン）、*Cimi-1, Cics-1*（SINE 因子）、*Cili-1*（LINE 因子）についてメチル化の状態を明らかにしたところ、いずれもメチル化の程度は低く、その一方で、構造遺伝子領域がメチル化を受けていた（Simmen et al 1999)。また、ほ乳類の体細胞ではトランスポゾンがメチル化を受けているが、生殖細胞や胚ではメチル化が解除されている（Bestor and Tycko 1996)。ほ乳類でのメチル化が解除された状態における宿主の転移因子に対する保護機構については明確な結論が得られていない。メチル化が転移因子の防御機構の一員であるという考えは、現在のところ植物においてのみ適用できるものである。転移因子に対するメチル化は、無秩序な転移に対する防御機構である可能性の他に、異なる役割が存在する可能性が考えられる。*Ascobolus immersus* ではメチル化を受けた遺伝子領域において相同組み換え頻度が低下したことが報告されている（Maloisel and Rossignol 1998)。宿主細胞は転移因子などの相同な反復配列に対して相同組み換えを防ぐためにメチル化を機能させている可能性も考えられた。このように生物種において、同じ機能を持った遺伝子（メチラーゼ）が同じような塩基配列を対象として機能するにも関わらず、異なる生物現象を引き起こすことは、生物現象に関わるタンパク質複合体の複雑さ、ひいては、生物が多様に進化したメカニズムを考える上で興味深い結果であると考える。

**Table 4-1** Methylation dependent gene silencing

| Gene | Source | Reference |
|---|---|---|
| Robertson® Mutator | *Arabidopsis* | Genes Dev. (2001) |
| Tto1 | *Arabidopsis* | Plant Cell (2000) |
| Transgene | *Arabidopsis* | Curr. Biol. (2000) |
| Transgene | Volvox | Nuc. Acids Res. (2001) |

**Table 4-2** *Magnaporthe grisea* isolates used in this study

| Isolate | Methylation status of MAGGY* | Mating type | Host | Origin |
|---|---|---|---|---|
| Br48 | N.D. | MAT1-1 | *Triticum aestivum* | Brazil |
| tBRC-1 | + | MAT1-1 | *T. aestivum* | This study |
| IN77-16-1-1 | - | MAT1-2 | *Setaria italica* | India |
| NNSI2-1-1 | - | MAT1-2 | *Setaria italica* | Japan |
| GFSI1-7-2 | - | MAT1-2 | *Setaria italica* | Japan |
| 1601-3 | + | -** | *Oryza sativa* L. | Japan |
| 1836-3 | + | -** | *Oryza sativa* L. | Japan |
| 80 $F_1$ progenies (Br48 X GFSI1-7-2) Set1-10 (8 ascospores, K1, 2,; L1, 2; M1, 2; N1, 2) | - or + | MAT1-1 or -2 | *S. italica* or *T. aestivum* | Laboratory strain |
| 5M1t-1*** | - | MAT1-1 | | Laboratory strain |
| 5M2t-2*** | - | MAT1-1 | | Laboratory strain |

*, Methylation status was determined by Southern analysis (+, methylated; -, non-methylated; N.D., not determined); **, Mating type was not determined; ***, *hph* transformant from F1 progenies

**Table 4-3** Segregation of methylation status of MAGGY in $F_1$ progenies

| | K1 | K2 | L1 | L2 | M1 | M2 | N1 | N2 | M:N |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Set1 | N | N | M | M | M | M | N | N | 4:4 |
| Set2 | M | M | M | M | N | N | N | N | 4:4 |
| Set3 | N | N | N | N | M | M | M | M | 4:4 |
| Set4 | M | M | N | N | M | M | N | N | 4:4 |
| Set5 | M | M | N | N | N | N | M | M | 4:4 |
| Set6 | M | M | N | N | N | N | M | M | 4:4 |
| Set7 | M | M | M | M | N | N | N | N | 4:4 |
| Set8 | N | N | N | N | M | M | M | M | 4:4 |
| Set9 | M | M | N | N | M | M | N | N | 4:4 |
| Set10 | M | M | N | N | M | M | N | N | 4:4 |

M, Methylated; N, Non-methylated

Total=40:40

**Table 4-4** Number of transpositions and methylation status of MAGGY in $F_1$ progenies

| | | Number of transpositions | Average |
|---|---|---|---|
| Methylated strains | | | |
| | 1-L1 | 9 | 6.00* |
| | 1-L2 | 4 | |
| | 1-M1 | 10 | |
| | 1-M2 | 1 | |
| Non-methylated strains | | | |
| | 1-K1 | 9 | 7.25* |
| | 1-K2 | 9 | |
| | 1-N1 | 3 | |
| | 1-N2 | 8 | |

*, No significant difference by a t-test (5%)

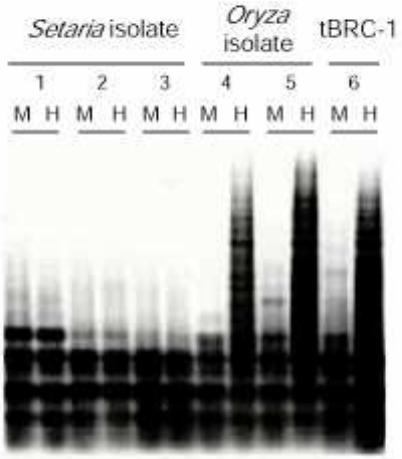



**Fig. 4-1** Methylation analysis of *Magnaporthe grisea* strains containing MAGGY. M, *Msp*I; H, *Hap*II
1, IN77-16-1-1; 2, NNSI2-1-1; 3, GFSI1-7-2; 4, 1601-3; 5, 1836-3; 6, tBRC-1

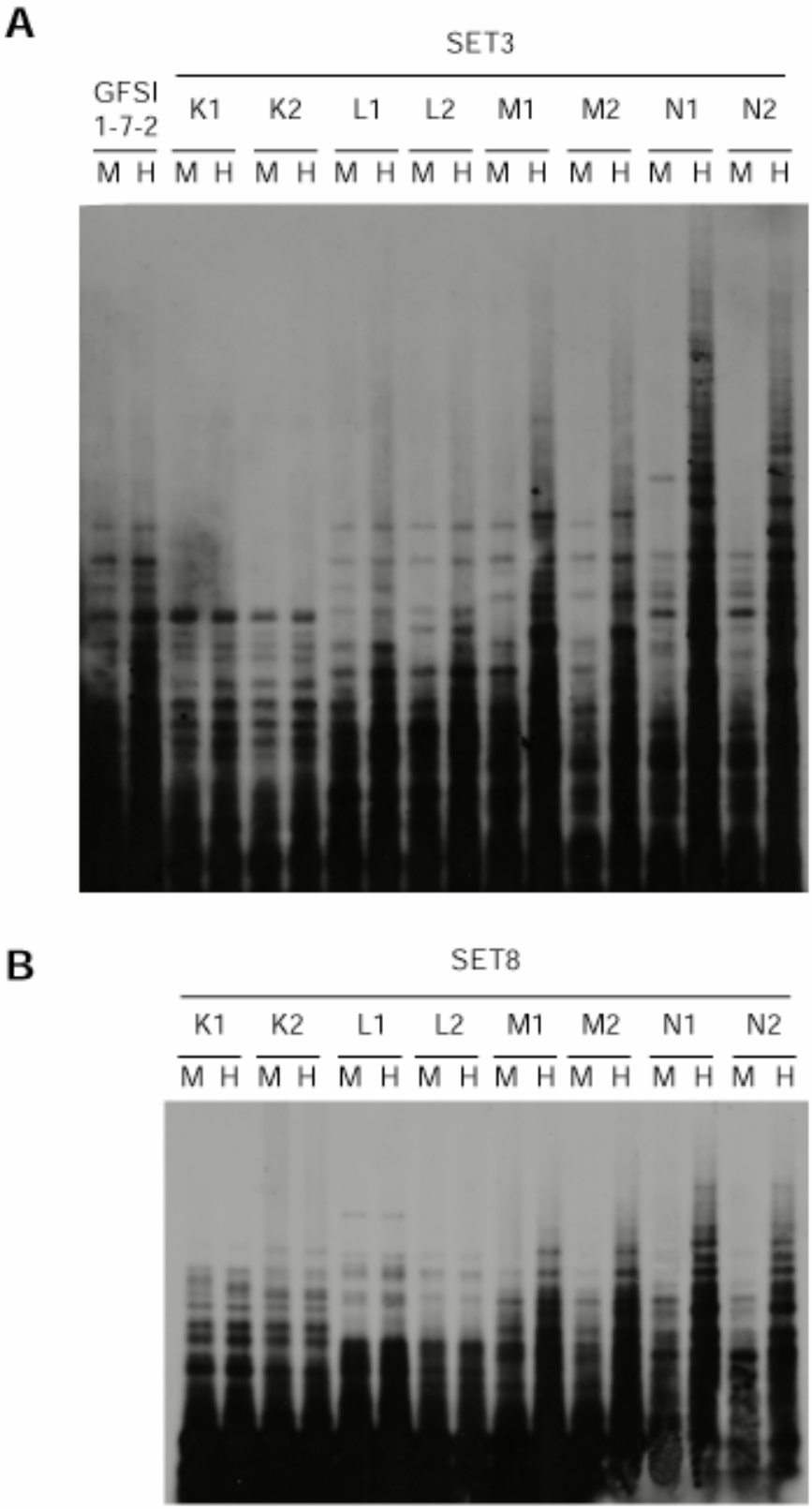



**Fig. 4-2** Methylation analysis of F1 progenies derived from a cross between a *Setaria* isolate and a *Triticum* isolate. M, *Msp*I; H, *Hap*II

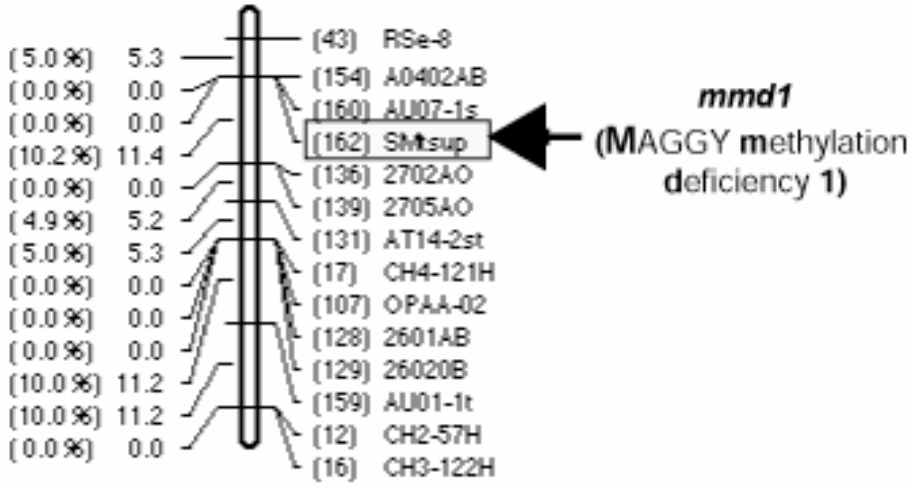



**Fig. 4-3** Genetic mapping of a methylation related gene on chromosome No.6 of *Magnaporthe grisea*. The genetic map is constructed by crossing a *Setaria* isolate with a *Triticum* isolate

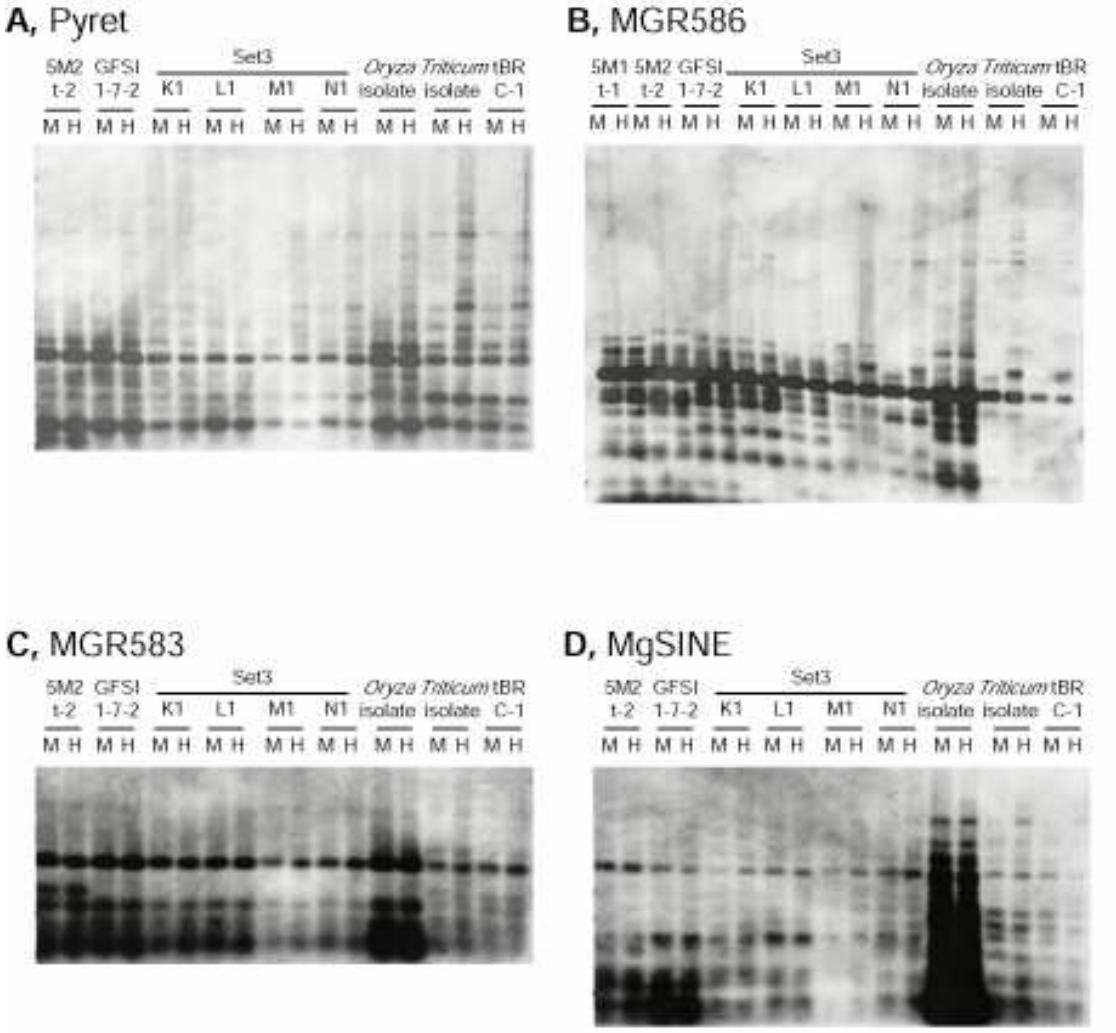



**Fig. 4-4** Methylation status of various transposable elements in *Magnaporthe grisea* strains. **A**, probed with Pyret; **B**, probed with MGR586; **C**, probed with MGR583; **D**, probed with MgSINE; M, *Msp*I; H, *Hap*II

# 第５章　いもち病菌における RIP (repeat-induced point mutation) 機構の存在の証明といもち病菌における有性世代

## 1. 緒　言

導入遺伝子やトランスポゾンの転移などは宿主細胞にとって新たな表現型を獲得するために有益に働く場合もあるが、そのほとんどは無秩序な転移により宿主細胞に有害な効果をもたらす (Labrador and Corces 1997)。導入遺伝子や転移因子などが多コピー挿入された場合、構造遺伝子の破壊や転写パターンの変化、またその相同な配列同士で染色体に不規則な立体構造を形成する (Labrador and Corces 1997)。第 4 章においても触れたが、これら有害に働く導入遺伝子や転移因子などを抑制する機構として TGS や PTGS などが考えられている (Table 1-1)。糸状菌においてもこの両者の現象が確認されており、それぞれ MIP, Quelling と呼ばれている (Goyon and Faugeron 1989; Romano and Macino 1992)。しかし、これら現象は限られた種でのみ報告されており、糸状菌全体に対する外来遺伝子の不活性化メカニズムとしての認識には至っていない。*Neurospora crassa* においてはこれらとは別に RIP (repeat-induced point mutation)という現象が知られている (Table 1-1) (Selker et al 1987)。これは反復配列が存在した際に有性世代を経た雑種後代において高頻度の C:G から T:A への塩基置換が認められるものである (Fig. 5-1)。MIP と RIP はそれぞれ有性世代を経た際に引き起こされるもので、非常に近い機構によって引き起こされているものと考えられている (Faugeron 2000)。

MIP は子のう菌の *Ascobolus immersus* で報告されているばかりでなく、担子菌の *Coprinus cinereus* においても報告されており (Freedman and Pukkila 1993)、その保存性は広いものと考えられる。その一方で、RIP は *Neurospora crassa* とその近縁種の *Podospora anserina* でのみ報告されている (Selker et al 1987; Hamann et al 2000)。ただしこの他に、RIP 様の塩基置換を伴った塩基配列が野外で有性世代の報告がない *Fusarium oxysporum* や *Aspergillus fumigatus* で発見されている (Hua-Van et al 1998; Neuveglise et at 1996)。本研究室でもキビいもち病菌において RIP 様の塩基置換を伴った MAGGY ホモログの存在が明らかとなり (Nakayashiki

et al 1999b)、いもち病菌において実際にRIPが機能するのか興味が持たれた。そこで本章では、MAGGYを保有していないコムギいもち病菌にMAGGYを導入し、多コピーのMAGGYを保有する菌株と、MAGGYを保有しないコムギいもち病菌を交配させ、その雑種後代におけるMAGGYの塩基配列の変化について検討を行い、RIPの有無を調査した（Fig. 5-2)。

いもち病菌は有性世代が確認されており、子のう菌に分類されている。しかし、これは実験室のシャーレ上で交配させたもので、実際の圃場において有性世代が確認された報告はない（Kato et al 1976)。糸状菌は子のう胞子を形成する有性世代の他に、分生胞子を形成し、自身のクローンを無性的に増殖させる手段も持ち合わせている（Leslie and Klein 1996; Chen and McDonald 1996)。有性世代はその交配相手から生存に有利な遺伝子を交換し合うという目的からすれば、新たな進化を遂げるために重要な行程である。その一方で、無性的な増殖は時間やコストなどが削減され、安定した環境下においてポピュレーションを広げるためには有効な手段である。いもち病菌はさまざまな植物に寄生性を示し、現在に至っている。この過程において、有性世代や無性世代はどのような頻度で繰り返されてきたのか、興味が持たれている。RIPは有性生殖を経た際にのみ起こる現象であり、もしこれがいもち病菌で起こっているとすると、有性生殖のマーカーとして用いることが出来る。そこで、いもち病菌に広く存在するレトロトランスポゾンPyretの塩基配列を比較することによって、いもち病菌の有性世代についての考察を行った。

## 2. 材料と方法

### 1） 供試菌株

コムギいもち病菌（Br48；*MAT1-1*）、また Br48 と交配可能なコムギいもち病菌（Br116.5；*MAT1-2*）、イネいもち病菌（1836-3）、およびアワいもち病菌（GFSI1-7-2）を用いた（Table 5-1）。Br48 の MAGGY 形質転換体 tBRC-1 と Br116.5 を交配させてランダムな子のう胞子から得られた雑種後代 $F_1$-1 から $F_1$-50 を解析に用いた（Table 5-1）。

### 2） サザンハイブリダイゼーション

詳細については第 2 章にて記載した。プローブは pMGY-SB と *hph* 遺伝子を含む pSH75 を *Sal*I 消化して得た 1.8kb の断片をゲル回収したものを fluorescein 標識して用いた。

### 3） PCR 法による MAGGY, *hph*, Pyret ホモログ遺伝子の増幅、クローニング

MAGGY, *hph* 遺伝子のそれぞれほぼ全長を増幅できるプライマーを設計した（Table 5-2）。また、Pyret の *gag* 領域を増幅させるプライマーも設計した（Table 5-2）。なおプライマーは RIP などの塩基置換が起こっている塩基配列でも増幅できるようにプライマーの 3'末端側を AT 配列になるように設計した。PCR 反応の過程における Taq ポリメラーゼのエラーを減ずるため、high fidelity を持つ LA Taq polymerase（TaKaRa 社）を用いた。PCR 反応液は 100ng の鋳型 DNA、1XGC buffer（TaKaRa 社）、それぞれ 0.2μM のプライマー、200μM の dNTP ミックス、1.25U の LA Taq polymerase を加えた 50μl の溶液とした。PCR 反応は 95℃5 分間の熱変性の後、95℃1 分間-65℃30 秒間-72℃7 分間を 35 サイクル行った。PCR 反応後のサンプルはゲル回収を行った。得られたサンプルを T4 ポリメラーゼ処理し、*Sma*I で切断した pUC19 とライゲーションを行い、クローニングした。

### 4） シーケンス

シーケンス反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready

Reaction Kit (Perkin Elmer 社) を用いて行った。シーケンスに用いた MAGGY の領域特異的プライマーは Table 5-2 に示した。用いたプライマーは RIP などの塩基置換が起こった塩基配列でもアニーリングできるようにプライマーの 3'末端側を AT 配列になるように設計した。Cycle 反応後のサンプルは、エタノール沈殿させ、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer 社) にて解析を行った。

## 3. 結　果

### 1)　栄養生長、雑種後代個体における MAGGY の塩基配列

MAGGY をハイグロマイシン耐性遺伝子（*hph*)と co-transformation 法によってコムギいもち病菌 Br48 へ導入し、形質転換体 tBRC-1 を得た。MAGGY は導入後、転移を繰り返して 20 コピー以上に増加していることがサザン解析によって確認された（data not shown)。また、*hph* 遺伝子は 3 コピーの挿入が同様にして確認された（data not shown)。この tBRC-1 とコムギいもち病菌 Br116.5 を交配させ、ランダムな子のう胞子由来の 50 菌株（$F_1$-1〜$F_1$-50)を得た（Fig. 5-1)。得られた雑種後代の 2 菌株（$F_1$-4, $F_1$-6)よりゲノミック DNA を抽出し、MAGGY のほぼ全長に当たる 5340bp を増幅させるプライマー（MAGFWEcoT, MAGREcoT）(Table 5-2)によって増幅した。得られた PCR 断片を *Eco*T22I で消化し、pBluescriptSKII+の *Pst*I 部位へクローニングした。得られた複数のクローンについて MAGGY 特異的な複数のプライマーを用いて塩基配列を明らかにした（Fig. 5-3)。また、対照として親菌株である tBRC-1 を単プロトプラスト化させたコロニーを選抜する行程を 8 回繰り返した菌株における MAGGY の塩基配列についても同様に調査した（Fig. 5-2, 5-3)。その結果、雑種後代における MAGGY は高頻度で塩基置換が認められた。$F_1$-4（clone 1〜4)では塩基置換頻度がそれぞれ 0.51, 0.49, 0.17, 0.21%で起こっており、その中で C:G から T:A への塩基置換はそれぞれ 77.8, 76.9, 55.6, 90.9%であった（Table 5-3)。$F_1$-6（clone 5〜8)では塩基置換頻度がそれぞれ 0.37, 0.90, 0.90, 1.03%で起こっており、その中で C:G から T:A への塩基置換の割合はそれぞれ 70.0, 89.6, 89.6, 92.7%と高い傾向にあった。一方で、親菌株（TBR1〜3)においては、塩基置換頻度はそれぞれ 0.09, 0.07, 0.15 %と低く、さらに C:G から T:A への塩基置換の割合もそれぞれ 60.0, 50.0, 50.0%と低いものであった。

$F_1$-4 において MAGGY における塩基置換頻度が低いクローンも見られたが（clone 3, Table 5-3)、いずれも親菌株の塩基置換頻度より高い傾向があり、有性世代を経た後に RIP と考えられる C:G から T:A への塩基置換が引き起こされたことが示された。

### 2） 栄養生長、雑種後代個体における *hph* 遺伝子の塩基配列

得られた雑種後代 50 菌株を 200μg/ml のハイグロマイシン B を含んだ PDA 培地にて培養して、生育能力の有無を調査し、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子が機能しているのかを調査した。また雑種後代の 50 菌株において *hph* 遺伝子が intact に挿入されているかどうかをサザン解析によって確認した。その結果、*hph* 遺伝子の導入が確認されたにも関わらず、ハイグロマイシン B 培地において生育できない菌株（$F_1$-23, $F_1$-40）を選抜した。この菌株より *hph* 遺伝子を特異的に増幅するプライマー(Table5-2)を用いてクローニングを行い、導入されている 3 コピーの塩基配列を明らかにした。いずれのコピーにおいても RIP による塩基置換が認められ、その結果、ストップコドンが生じた場合や、アミノ酸の置換が認められた（Fig. 5-4, Table 5-3, 4)。この変異によってハイグロマイシン B 耐性遺伝子の機能が失われたものと考えられた。一方、親菌株の tBRC-1 における *hph* 遺伝子では塩基置換は認められなかった(Table 5-3)。

### 3） 塩基置換が引き起こされた周辺塩基の傾向

これまでに得られた塩基配列より、RIP が引き起こされた塩基の特徴付けを行った。RIP のターゲットとなったシトシンに隣接する 5', 3'側の塩基の傾向、さらに、MAGGY の塩基配列中に存在している塩基の組み合わせの中で塩基置換を受けた割合についても Table 5-5 にまとめた。MAGGY の 206 の塩基置換における傾向を調べたところ、5'側の塩基は頻度が高いものから T, A, G, C の順となり、その中でも T, A の占める割合が 76.3%と高いものであった（Table 5-5)。3'側の塩基は頻度が高いものから T, A, C, G の順となり、T, A の占める割合が 90.3%と高いものであった（Table 5-5)。以上より、いもち病菌における RIP のターゲット配列は（A/T)pCp(A/T)であることが明らかとなった。

### 4） RIP とメチル化の関係について

RIP を受けた塩基配列ではメチル化を受けていることがこれまでに報告されている（Selker et al 1993; Singer et al 1995; Irelan and

Selker 1997)。RIP による塩基置換のメカニズムの一つとして、メチル化されたシトシンが脱アミノ化を受けるとチミンへと置換される仕組みが挙げられている (Yebra and Bhagwat 1995) (Fig. 5-5)。このように RIP とメチル化は非常に密接した現象であることが考えられる。第 4 章において示したように、MAGGY はメチル化を受けていることが明らかとなっている (Fig. 4-1, 5-6)。第４章でメチル化の解析に用いたイソシゾマー (*Msp*I, *Hap*II)は CCGG 配列を対象としたものであった。しかし、この配列は RIP のターゲット配列とは異なっていた。そこで、その他のイソシゾマーを用いて MAGGY のメチル化の状態を調査した。その結果 CATG 配列を対象とした *Sau*3AI, *Mbo*I (data not shown)あるいは CC(A/T)GG 配列を対象とした *Eco*RII, *Mva*I (Fig. 5-6)においてもメチル化を受けていることが明らかとなった。

**5) いもち病菌に広く存在している転移因子 Pyret における塩基置換の傾向と稔性の関係について**

レトロトランスポゾン Pyret はいもち病菌に広く存在していることが確認された (Nakayashiki et al 2001b)。そこで、この Pyret ホモログの塩基配列を比較することによって各菌株間における RIP が引き起こされた頻度や有性世代について考察した。異なる植物に寄生性を示す 3 つの野生分離菌株、イネいもち病菌 (1836-3)、アワいもち病菌 (GFSI1-7-2)、コムギいもいち病菌 (Br48)のゲノミック DNA より、Pyret に特異的な複数のプライマーセットを用いて PCR 増幅し、クローニングしたそれぞれのクローンの塩基配列を決定した。既に塩基配列が報告されている Pyret 自身も RIP を受けて塩基配列が変化しているものと考えられた。そこで、得られた塩基配列をもとに、Hamann et al. (2000)の方法に従って、最も RIP を受けていない塩基配列を *in silico* で作成した (Fig. 5-7)。得られた塩基配列は deRIP-Pyret とした。表 5-6 ではこの deRIP-Pyret 配列とそれぞれの菌株における Pyret ホモログ塩基配列とを比較して、C/G 配列における RIP の出現頻度とそれぞれの塩基配列における A/T 含有比についてまとめた。RIP 出現頻度と A/T 含有比はイネいもち病菌ではそれぞれ平均 8.17%、47.13%、アワいもち病菌ではそれぞれ平

均 16.48%、51.71%、またコムギいもち病菌ではそれぞれ平均 33.24%、60.67%であった（Table 5-6)。この結果は、イネが最も RIP の程度が低く、コムギが最も RIP を受けていることが明らかとなった。その結果、塩基配列も RIP を受けるに従って A/T 含有比が増加する結果が得られた。それぞれの菌株の稔性は Kato et al. (2000)によると、イネいもち病菌では交配する能力が失われており、アワ・コムギいもち病菌は交配能力が高い結果であった（Table 5-6)。

## 4. 考　察

今回の実験によって、いもち病菌においてもRIPが起こることが示された。これまでに RIP が報告された例は *Neurospora crassa* とその近縁である *Podospora anserina* においてのみである (Selker et al 1987; Hamann et al 2000)。いもち病菌におけるRIPの証明によって、目のオーダーで異なる糸状菌においても RIP が引き起こされることが証明された。また、これら報告の他に、有性世代が確認されていない *Fusarium oxysporum* や *Aspergillus fumigatus* においても RIP 様の現象が確認されている (Hua-Van et al 1998; Neuveglise et at 1996)。一方で、綱のオーダーで異なる *Ascobolus immersus* ではRIPは起こらず、MIPが起こることが報告されている (Goyon and Faugeron 1989)。MIPは担子菌亜門の *Coprinus cinereus* においても報告されている (Freedman and Pukkila 1993)ことよりMIPはより広い糸状菌で機能し、RIP は子のう菌の中でも綱のオーダーの中で引き起こされる現象である可能性が示唆された。

RIP のターゲット配列として、いもち病菌では(A/T)pCp(A/T)配列が明らかとされた (Table 5-5)。この結果は *Neurospora crassa* のRIPのターゲット配列として知られている NpCpA とは多少異なっているものと考えられる (Cambareri et al 1989)。また、*Podospora anserina* におけるターゲット配列はNpCp(A/T)、*Fusarium oxysporum* や *Aspergillus fumigatus* におけるターゲット配列は NpCp(A/G)であった (Hamann et al 2000; Hua-Van et al 1998; Neuveglise et al 1996)。いもち病菌におけるRIPのターゲット配列は *Podospora anserina* と最も類似しており(A/T)pCp(A/T)であった。今回の研究より、5'側においても規則性を見出したことが重要であると考える。

メチル化されたシトシンは脱アミノ化を受けると容易にチミンに塩基置換することより (Yebra and Bhagwat 1995)、メチル化は RIP に関与している可能性が考えられる (Selker et al 1993; Singer et al 1995; Irelan and Selker 1997)。本研究においても、複数のイソシゾマー解析によって、RIPを受けたMAGGYは交配する以前からさまざまな配列のシトシンにおいてメチル化を受けていることが明らかとなった。動物や植物ではCpGやCpNpG配列などの対称的な塩基配列をターゲットとするメチラーゼが大きな役割を果た

しているが (Montero et al 1992; Finnegan and Kovac 2000; Robertson and Wolfe 2000)、これらと類似した酵素の関与が示唆された。しかしながら、今回のRIPのターゲット配列は対称性が認められず、転移因子の認識に関わるメチル化とRIPに関与するメチル化については全く異なる酵素の存在が考えられた。

*Ascobolus immersus* の MIP や *Neurospora crassa* の RIP では導入された反復遺伝子配列は、交配する以前にはメチル化を受けていないが、交配した後にほとんどのシトシンがメチル化を受けていることが明らかとされている (Goyon et al 1994; Selker et al 1993)。このことは、交配過程において、対称的な配列をメチル化するような酵素の存在ではなく、配列非特異的なメチルトランスフェラーゼが存在することを示唆している (Goyon et al 1994; Selker et al 1993)。RIP の場合にはさらに特異的な領域である CpA において塩基置換が認められることより (Cambareri et al 1989)、さらなる因子の存在を考える必要があるが、明らかとはされていない。RIP のターゲット特異性は種によって多少異なることより、この未知なる因子の特異性によってRIPが種によって特徴付けられているものと考えられた。

雑種後代において、RIP を受けた程度はそれぞれのコピーによって異なっていた (Table 5-3)。RIP の程度はさまざまで、*Podospora anserina* での RIP は *Neurospora crassa* の RIP と比較すると塩基置換の頻度が低いことが報告されている (Graïa et al 2001)。いもち病菌における RIP の程度も *Neurospora crassa* と比較すると低いものと考えられる。これは解析した遺伝子配列の状態やRIPのターゲット配列の違いなどが影響しているものと考えられる。Cambareri et al. (1989)は反復した遺伝子間の距離によって RIP の頻度が変化したことを報告している。また、*Neurospora crassa* のトランスポゾン Tad はほとんどの菌株においてRIPにより退化していたが、一つの菌株のみで活性のあるコピーが保持されていた (Kinsey et al 1994)。この結果は、RIP が機能するメカニズムは、反復した配列同士がゲノム内で直接相互作用する際に働く可能性が考えられ、RIP はゲノムに挿入された反復配列の位置によって影響が異なる可能性を示している。

また、今回はハイグロマイシンB耐性遺伝子においてもRIPが引き起こされ、それに伴って、遺伝子の不活性化も確認された。このことは、いもち病

菌においてもRIPが遺伝子を不活性化させる機構として働くことを明らかとした。しかし、ハイグロマイシンB耐性遺伝子における塩基置換の解析により、ストップコドンの生成ばかりでなく、アミノ酸の置換も多く認められた。このアミノ酸の置換がハイグロマイシンB耐性能力にどれたけ影響を与えるのか検討は行っていないが、全てが不活性化へ導くことは考えにくい。キビいもち病菌で認められたMAGGYホモログではRIPにより高頻度にストップコドンが認められた（Nakayashiki et al 1999b)。遺伝子を不活性化させるためには、塩基配列をストップコドンに置換させるのに効率が良いと思われるが、ORF内の配列がRIPによってストップコドンを生じる確率は極めて低い。仮にランダムにRIPが起こったとした場合、それによりストップコドンが生じる頻度は 4/54 である。今回認められたアミノ酸置換においては、ロイシンからフェニルアラニン、スレオニンからイソロイシンへの置換が高頻度で認められた（Fig. 5-4, Tble 5-4)。これは RIP のターゲット配列から推定すると予想される結果である。これらのアミノ酸は側鎖の性質や電荷などの変化を導くと予想され、RIP は遺伝子の不活性化へと導く一方で、アミノ酸の置換によって新しい表現型を生み出す可能性も持ち合わせているものと考えられた。

RIP は有性世代を経た際に引き起こされる現象であることから、RIP による塩基置換の程度と稔性との間に関連性があるものと考えられた。いもち病菌に広く分布しているPyretの塩基配列について異なる宿主植物から分離されたいもち病菌の間で比較を行ったところ、菌株によってRIPの程度に差が認められた。いもち病菌の有性世代についてはシャーレ上や人工接種した罹病葉の上で確認されているが、自然界において有性世代は確認されていない。今回、圃場分離菌株からRIPが確認されたことより、自然界においてもいもち病菌が交配活動を行っていたことを示唆している。

いもち病菌は多くのイネ科植物に感染することが報告されている。イネいもち病菌では最もRIPの程度が低く、コムギいもち病菌ではRIPの程度が高かった。実際に、コムギいもち病菌は培地上でも稔性が高く、さまざまな菌株と交配する能力を持っているが、イネいもち病菌はほとんど交配能力を失っている。これら菌株は病原性を分化させていく過程において異なった戦略を取ったのではないかと推論できる。イネいもち病菌の置かれた環境は、イ

ネの栽培化が進み、宿主が広範囲に分布した状態であった。このニッチェに効率よく蔓延するには無性世代を繰り返し、短期間に効率よく感染を行うことが有利に働いたと考えられる（Fig. 5-8）（Leslie and Klein 1996; Chen and McDonald 1996; Yamauchi 1999)。また、アワ・コムギいもち病菌などは有性世代を繰り返し、遺伝子を交換し合うことにより、新たな形質を獲得して新たな宿主植物に感染するように進化していった可能性が考えられた(Fig. 5-8)。実際に、コムギいもち病菌はUrashimaら（1993)によって最近報告された病原菌である。

また、これを裏付ける結果として、イネ・アワいもち病菌それぞれに存在するレトロトランスポゾンMAGGYの塩基配列を明らかにした結果、アワいもち病菌ではRIPを受けていることが確認されたが、イネいもち病菌ではほとんどRIPを受けていなかった（Table 5-3)。このことはMAGGYを獲得してイネ菌とアワ菌が分化した時点を境にして、イネ菌では交配活動がほとんど途絶えたのに対して、アワ菌では引き続き交配活動が起こっていたことを示唆している。

**Table 5-1** *Magnaporthe grisea* isolates used in this study

| Isolate | Mating type | MAGGY | MGSR1 | Host | Origin |
|---|---|---|---|---|---|
| Br48 | MAT1-1 | - | + | *Triticum aestivum* | Brazil |
| tBRC-1* | MAT1-1 | + | + | *T. aestivum* | This study |
| Br116.5 | MAT1-2 | - | + | *T. aestivum* | Brazil |
| $F_1$ progenies (tBRC-1 X Br116.5) | MAT1-1 or -2 | + | + | *T. aestivum* | This study |
| GFSI1-7-2 | MAT1-2 | + | + | *Setaria italica* | Gifu, Japan |
| 1836-3 | -** | + | + | *Oryza sativa* L. | Niigata, Japan |

*, Br48 transformant with MAGGY. **, Mating type was not determined

**Table 5-2** Primers used in this study

| Gene | Primer | Sequence | Nucleotide number* |
|---|---|---|---|
| MAGGY | MAGFWEcoT | CCGGATGCATTGTCACGACCTGAAGGAYAGCCAYT | CCGG+EcoT22I+nt.1-26 |
| | GagR1 | CCTTGCGGTTGTGGCGGCGTTGG | nt. 1417-1394 |
| | IV#1394 | GAGCAGCCAACGCCGCCACAACCGCAAGG | nt. 1394-1420 |
| | GagR2 | GGGTTTTTAGGGAGTTTGGTTTGTATTT | nt. 1553-1580 |
| | FW2166 | GCTTTACACGCCGTACCAAAAAAA | nt. 2166-2189 |
| | RV2206 | GCCTGGTACTGGGGGCGGCTTTTT | nt. 2206-2183 |
| | RTR | ATTCAGCGCGCGGTAATCCACG | nt. 2665-2644 |
| | MAG350F | ACGGCATTCCGCACGAGATTY | nt. 2805-2826 |
| | MAG400B | AATCAAAATGTCGTCCAGRTA | nt. 2957-2937 |
| | MAGFW3650 | TGGGCCGAATTCCTGTCAAGATTT | nt. 3650-3673 |
| | MAGRNR | GCGGGCAGGTAAATTGTGTTCTTT | nt. 3822-3797 |
| | FW4410 | CTGTACCTACACCACGTATGGAAA | nt. 4410-4433 |
| | RV4482 | CGAATTGGGTGCCTCTATCCGAAA | nt. 4482-4459 |
| | MAGGYR2 | TATTCTCTCTCACCTTCCACTTCCAAAT | nt. 5149-5167 |
| | MAGREcoT | CCGGATGCATGGGGGTATCGACGGTRRAAATT | CCGG+EcoT22I+nt. 5340-5313 |
| *Hph* | HygFW | GGAAGTGCTTGACATTGGGGAATT | nt. 2141-2164 |
| | HygRV | GGTCGGCATCTACTCTATTCCTTT | nt. 2956-2933 |
| Pyret | SRFW1 | GTCCTAATGTGGTGGGTT | nt. 78-96 |
| | SRFW2 | AATGTGGTGGGTTTGTCC | nt. 84-101 |
| | SRFW3 | GGTAGTTGGGTCTCTTATCGG | nt. 150-170 |
| | SRFW4 | AACTTCGTTGGTTGTCCTGTCCC | nt. 174-196 |
| | SRRV1 | GATTTACGAACGCCGACA | nt. 722-705 |
| | SRRV2 | CCGACAGGAAAAAGAAGG | nt. 710-693 |
| | SRRV3 | AAAAACAAGGCGGACAGCG | nt. 702-684 |
| | SRRV4 | GATTTACGAACGGCGACAG | nt. 722-704 |

*, Nucleotide numbers are referred to accession number L35053 (MAGGY), L76273 (*hph*), AB062507(Pyret), respectively

**Table 5-3** Nucleotide substitutions in MAGGY and *hph* sequences

| Strain | | Total substitutions (%) | Average | Substitutions by C:G to T:A (RIP) (%) | Average | RIP/Total substitutions (%) | Average |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Triticum* isolate** (tBRC-1) | | | | | | | |
| **Parents** (MAGGY) | | | | | | | |
| | TBR1 | 0.09 | | 0.06 | | 60.0 | |
| | TBR2 | 0.07 | 0.11 (17/16020) | 0.04 | 0.06 (9/16020) | 50.0 | 52.94 (9/17) |
| | TBR3 | 0.15 | | 0.07 | | 50.0 | |
| **Parents** (*hph*) | | | 0.04 (2/4200) | | 0 (0/4200) | | 0 (0/2) |
| **F1 progenies** | F1-4 (MAGGY) | | | | | | |
| | clone1 | 0.51 | | 0.39 | | 77.8 | |
| | clone2 | 0.49 | 0.34 (73/21360) | 0.37 | 0.26 (56/21360) | 76.9 | 76.71 (56/73) |
| | clone3 | 0.17 | | 0.09 | | 55.6 | |
| | clone4 | 0.21 | | 0.19 | | 90.9 | |
| | F1-6 (MAGGY) | | | | | | |
| | clone5 | 0.37 | | 0.26 | | 70.0 | |
| | clone6 | 0.90 | 0.84 (180/21360) | 0.81 | 0.71 (151/21360) | 89.6 | 83.89 (151/180) |
| | clone7 | 0.90 | | 0.81 | | 89.6 | |
| | clone8 | 1.03 | | 0.96 | | 92.7 | |
| | F1-23 (*hph*) | | 1.04 (25/2400) | | 1.00 (24/2400) | | 96.00 (24/25) |
| | F1-40 (*hph*) | | 0.92 (22/2400) | | 0.79 (19/2400) | | 86.36 (19/22) |
| ***Oryza* isolate** (1836-3) | | | 0.19 (7/3636) | | 0.11 (4/3636) | | 57.89 (4/7) |
| ***Setaria* isolate** (GFSI1-7-2) | | | 1.57 (222/14130) | | 1.20 (169/14130) | | 76.43 (169/222) |

**Table 5-4** Summary of amino acid substitutions caused by RIP

| Clone | Number of A. A. exchange | A. A. substitutions |
|---|---|---|
| hph23-1 | 3 | D to N (20); L to F (153); Q to stop codon (158) |
| hph23-2 | 1 | T to I (27) |
| hph23-3 | 4 | H to Y (43); V to A (77); Y to F (109); A to V (122) |
| hph40-1 | 5 | H to Y (43); T to I (46); L to F (65); T to I (94); T to I (217) |
| hph40-2 | 3 | M to V (48); H to R (75); T to I (217) |
| hph40-3 | 3 | A to V (122); L to F (144); Y to H (158) |

A. A., amino acid.

**Table 5-5** Frequency distribution of C:G to T:A transitions with respect to sequence context

**A, MAGGY**

| Nucleotide* | C to T transitions | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5′ flank | | | 3′ flank | | |
| | Frequency | Total sites | Percentage | Frequency | Total sites | Percentage |
| A | 72 | 3304 | 2.18 | 63 | 2296 | 2.74 |
| C | 17 | 5312 | 0.32 | 13 | 5304 | 0.25 |
| G | 31 | 3080 | 1.01 | 7 | 3768 | 0.19 |
| T | 86 | 1952 | 4.41 | 123 | 2280 | 5.39 |

**B, *hph* gene**

| Nucleotide* | C to T transitions | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5′ flank | | | 3′ flank | | |
| | Frequency | Total sites | Percentage | Frequency | Total sites | Percentage |
| A | 11 | 252 | 4.37 | 15 | 294 | 5.10 |
| C | 0 | 336 | - | 0 | 336 | - |
| G | 9 | 492 | 1.83 | 1 | 498 | 0.20 |
| T | 24 | 312 | 7.69 | 28 | 264 | 10.61 |

**Table 5-6** Occurence of RIP on Pyret sequence in the field isolates of *Magnaporthe grisea*

| Clone | | Percentage of RIP* | Average | AT contents (%) | Average | Fertility** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DeRIP-Pyret (A/T=254, C/G=346) | | | | 42.33 | | |
| *Oryza* isolate (1836-3) | oSR1-1 | 8.38 | 8.17±1.32 | 47.10 | 47.13±0.94 | – |
| | oSR1-2 | 7.83 | | 48.44 | | |
| | oSR1-3 | 6.65 | | 46.23 | | |
| | oSR1-4 | 7.80 | | 46.76 | | |
| *Setaria* isolate (GFSI1-7-2) | sSR1-1 | 16.18 | 16.48±1.62 | 51.50 | 51.71±1.01 | +++ |
| | sSR1-2 | 15.90 | | 51.34 | | |
| | sSR1-3 | 15.03 | | 50.83 | | |
| | sSR1-4 | 18.79 | | 51.02 | | |
| *Triticum* isolate (Br48) | tSR1-1 | 33.53 | 33.24±0.33 | 61.23 | 60.67±0.45 | +++ |
| | tSR1-2 | 32.95 | | 60.25 | | |
| | tSR1-3 | 32.95 | | 60.37 | | |
| | tSR1-4 | 33.53 | | 60.81 | | |

*, Percentage of C:G to T:A nucleotide substitutions at C/G bases within 600bp sequence of Pyret. **, The degree of fertility is referred to Kato et al. (2000)

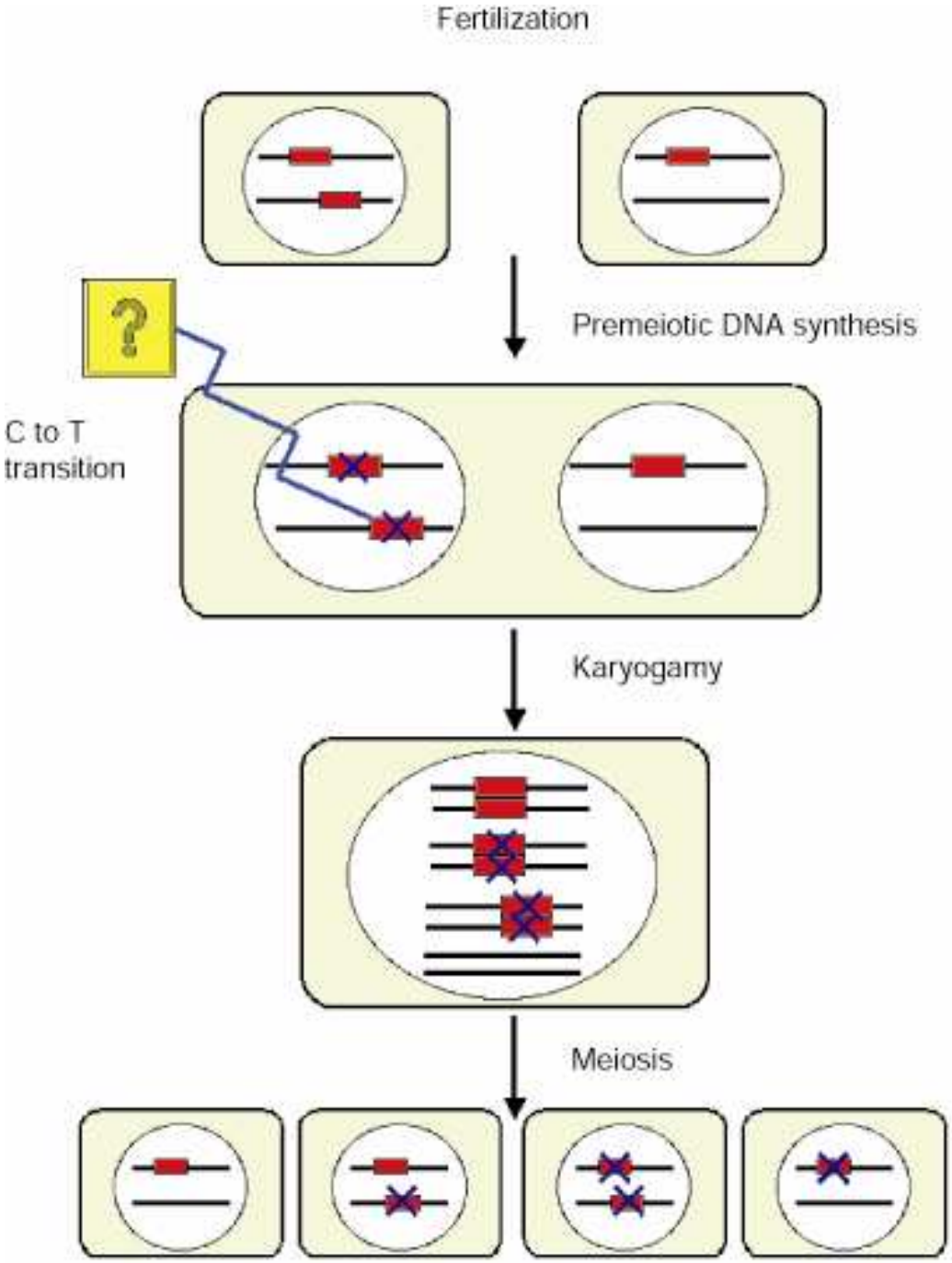



**Fig. 5-1** The mechanism of RIP (repeat-induced point mutation)

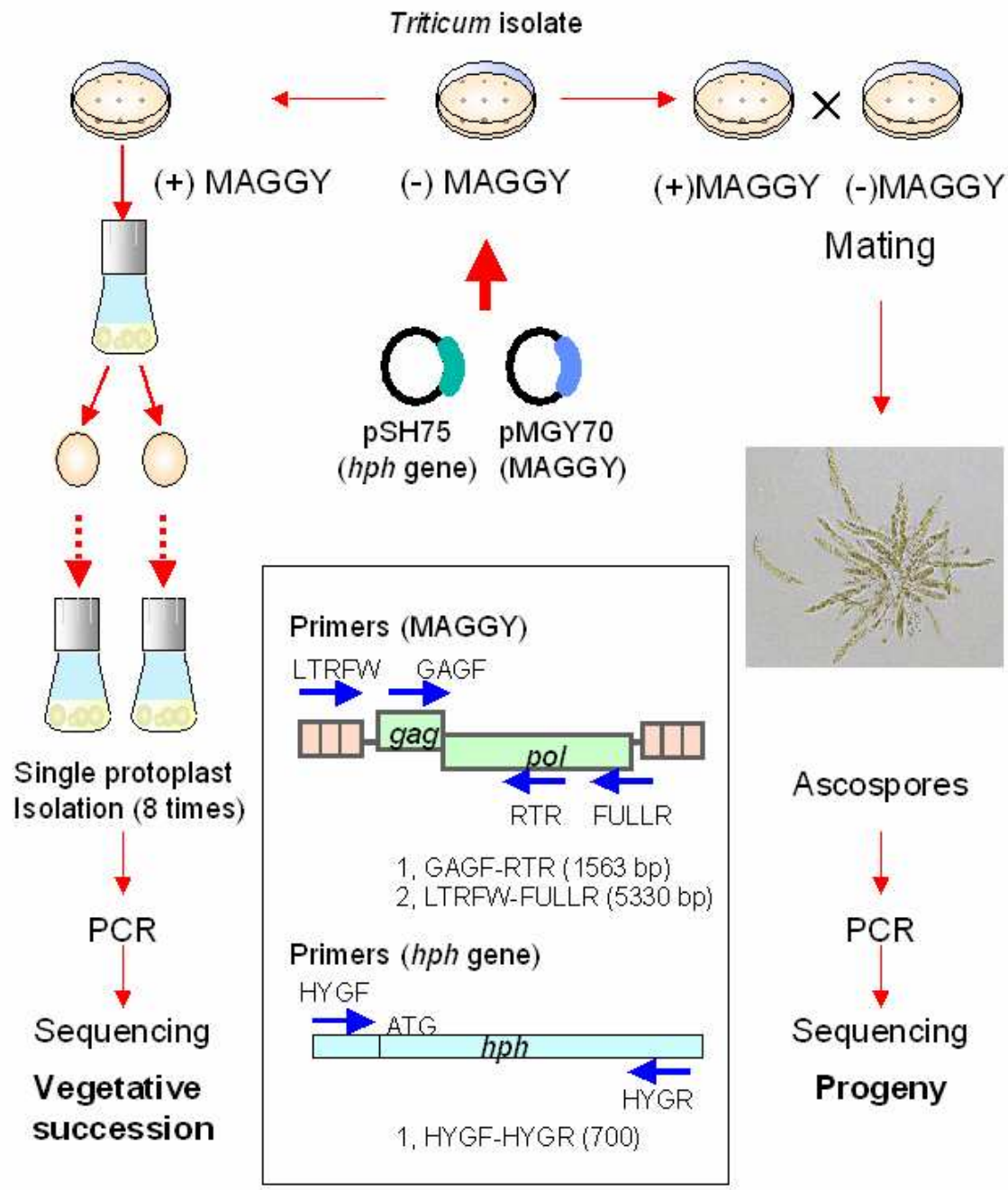
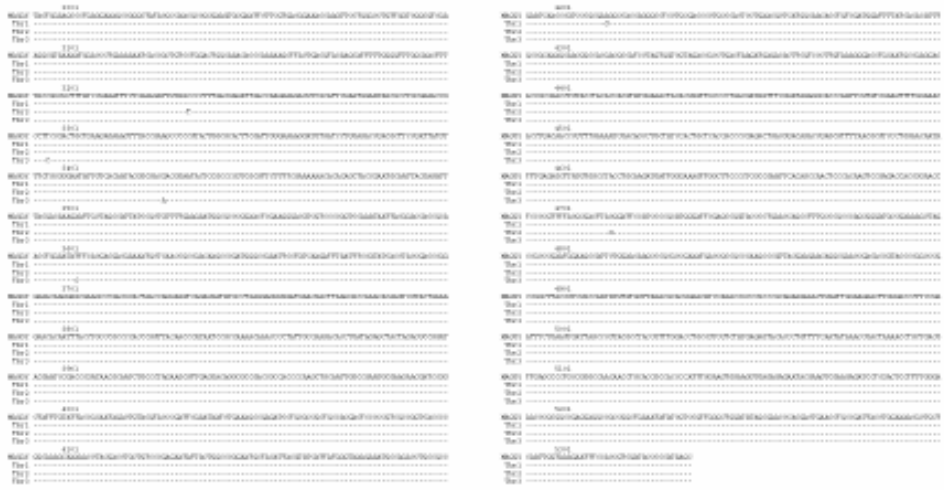



**Fig. 5-2** The outline of the experiment to detect RIP in *Magnaporthe grisea*

**A,** tBR parent strain



**B,** F1 progenies

**Fig. 5-3** Nucleotide sequences of MAGGY in tBR parent strain (**A**) and $F_1$ progenies (**B**)

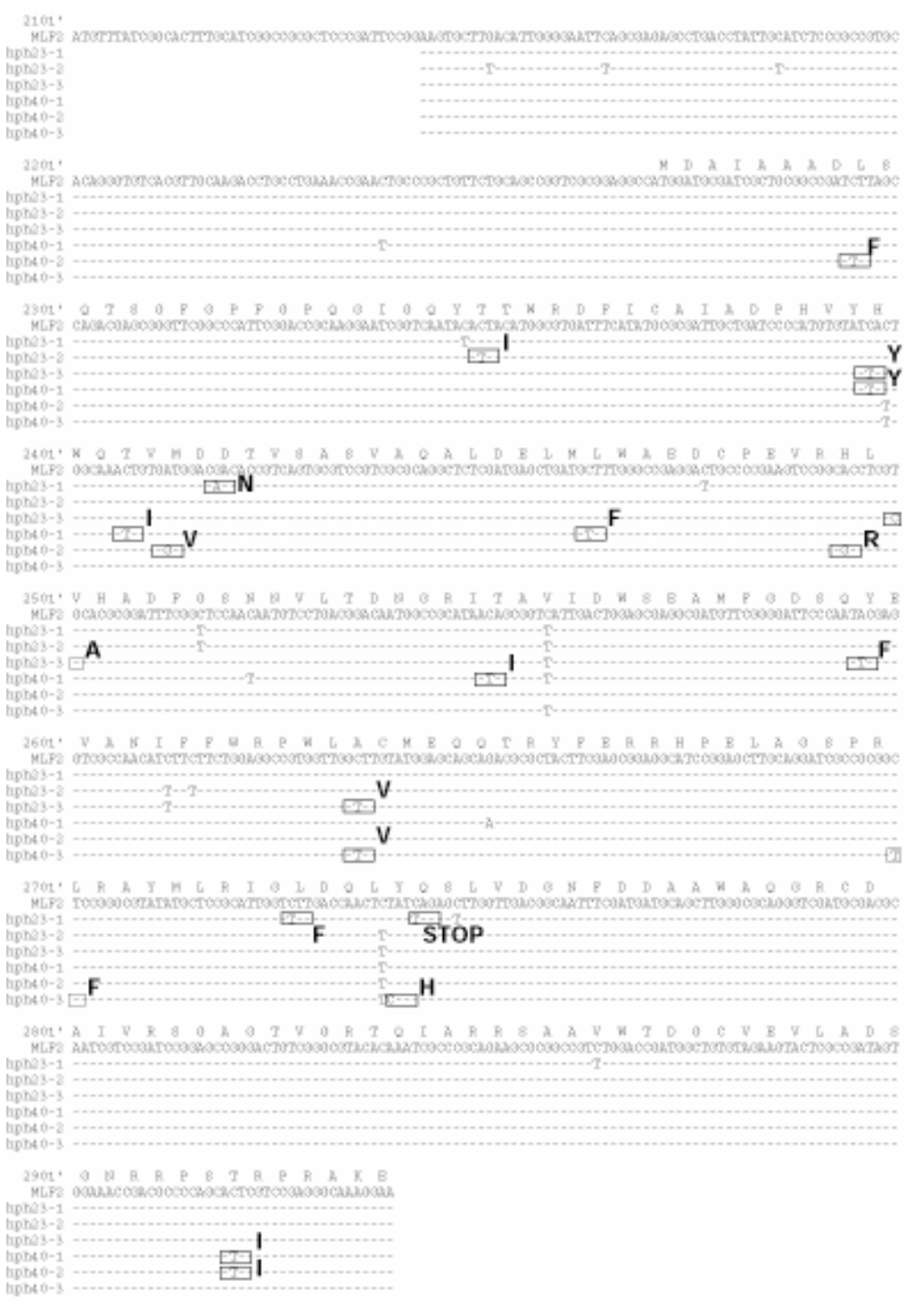



**Fig. 5-4** Nucleotide substitutions in *hph* genes of F1 progenies
F, phenylalanin; I, Isoleucine; Y, tyrosine; N, asparagine; V, valine; R, arginine; A, alanine; H, histidine

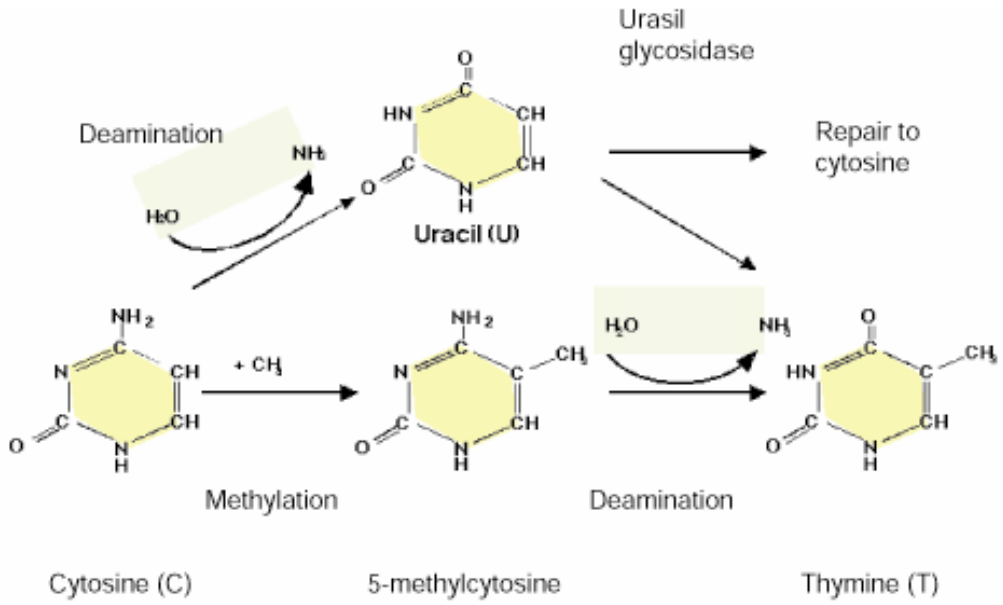



**Fig. 5-5** The proposed mechanism for cytosine to thymine transitions

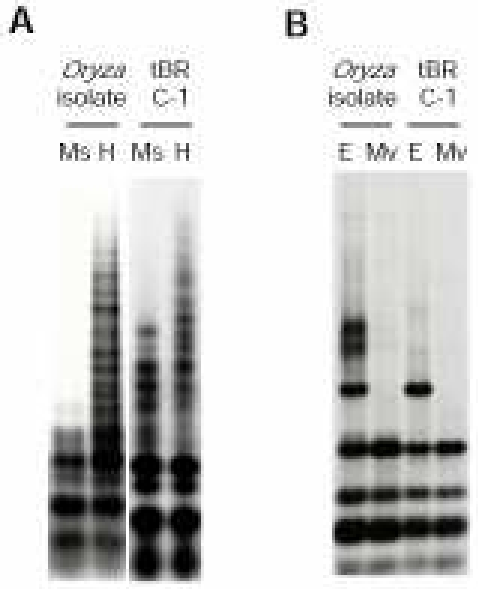



**Fig. 5-6** Methylation status of MAGGY analyzed by two sets of isoschizomers. Ms, *Msp*I; *Hap*II; E, *Eco*RII; Mv, *Mva*I.

1

CTCGAGGGCATGATCTCTTCCTCGCTGGACTCTTTCTCGGAATCCTCG

CTTAATTCTTCTGTTGAGGATTGATTGGTTGTCCCAATGTGGTGGGTT

TGTCCCGAAGGTTCCTCATCCGATTCTCCGGAGGCATCCGAGTCCGTG

AGCTCGGGTAGTTGGGTCTCCCGTCGGTGTAACTTCGCTGGTTGCCCT

GTCCCCAGGGGTACTCGGTTTCCTACTGCTAGGGTTCGAGTGCCTCGG

GGCTTCTGTGGGTACCATCCTGCGTCGTTCTTGGAGCTGTTGTGTGCC

ATGCAATTGTCATCGTAGCAGGTGGTCCAGCTCATCGTGCTGTGTTGG

TCAGGCCGTAGTTGCTGGCGATTGGTGGCATTAAGTCCTCGTGGTTTT

TCGGTCTTGCCCCTAAAACCAGGGACATCTTCCTGGTTTCTCGGGCAG

TTTCTGGCGATGTGCCCTGTCTTGCCGCACTTGAAGCACTCGCCGCTC

TTGGGGTCTTTACGGGGCTTCTTGTGTTGTGTGGCTCTGAGGTCCATG

GGTCCACTGTGGGTACCATAAGCTGTACTGCAGGTCTGGGGCGCCGTG

TGACGGGGCTGCTGCCATCCACCATTGTTTCTGTGGTATGTGGGTTGG

GGGTGTTGGTACTTGCGTCCCGTGTTGGCTTGTCGAGTCGAGGTGACG

AACACTCGCTGTCCGCCTTGTTTTTCCTGTCGGCGTTCGTAAATCCGG

TTGTCAAGTTTGATGGCAAGTTCGACGTACTCGAG

755

**Fig. 5-7** The nucleotide sequence of DeRIP-Pyret

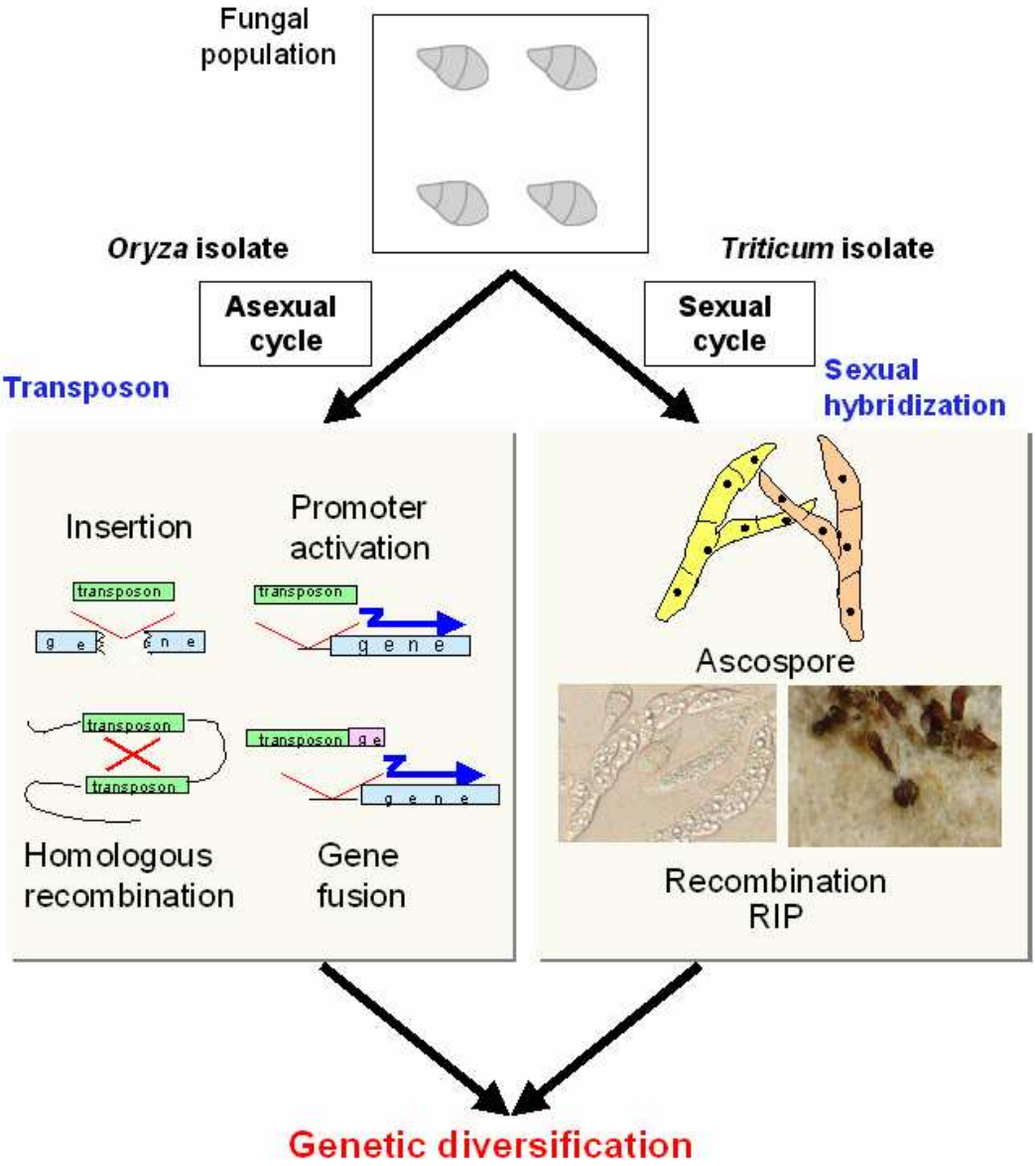



**Fig. 5-8** Proposal mechanisms for producing genetic variation

# 第６章　総合考察

本研究においていもち病菌における転移因子の分布様式と、転移活性化機構、転移の抑制機構について検討を行った。転移因子はその性質より、宿主の遺伝的多様性へ貢献する可能性が示唆されている。生存に関わるようなストレス環境下では、大きな淘汰圧が加わる。転移因子の転移により、ランダムな変異を受けた生物集団の中から、過酷な環境に適応した個体が選抜されると想定される。このボトルネックから抜け出した個体は強い選択圧の中で、さらに多様性を広げて発展していくものと考えられる。動物種の中には多様な SINE 因子が多コピー存在している (Smit 1999)。この SINE の膨大なコピーの増加は、頻繁に行われるのではなく、ある環境要因などによって活性化され、分化した種ごとに固定されたと考えられている (Okada 1991)。この SINE の増加がどれだけ適応力に貢献したのか現在では明らかにすることはできないが、興味深い点である。本研究においても、イネいもち病菌で、転移因子が病原性に変化を与える可能性について、抵抗性品種のイネ上で、稀に生じた罹病性病斑から分離した 3 つの病原性変異菌株を用いて検討した。それぞれの病原性変異株とその起源となった菌株のゲノミック DNA を用いて、MAGGY, MGR586, Pot2, MGR583, MgSINE, Pyret をプローブとしたサザン解析を行ったが、変異菌株はすべて元の菌株と同じバンドパターンを示した (data not shown)。今回の研究においては、転移因子が変異に関与した結果は得られなかったが、今後の研究に期待したい。

第 3 章において MAGGY が熱処理、硫酸銅、酸化ストレスにおいて転写活性化したことを明らかにした。しかし、これらストレスによる転移因子の転写の活性化が直接転移へ結びつくのかは明らかとされていない。第 4 章、第 5 章で触れたように、転移因子に対しては宿主側が、メチル化や転写後の不活性化機構、RIP などさまざまな機構によって抑制していることが考えられる。転移が活性化するためには、転写を活性化するだけでなく、これら転移因子に対する認識・不活性化機構を抑制する必要があると考えられる。

植物のトウモロコシでは、レトロトランスポゾンのコピー数が極端に増加し、ゲノムの 7 割近くを占めている (Sanmiguel and Bennetzen 1998)。一方、トウモロコシと近縁であるソルガムではレトロトランスポゾンのコピー

数はトウモロコシと比較すると少なく、ゲノムは小さく収まっている(Sanmiguel and Bennetzen 1998)。オオムギやエンバクなどはゲノムサイズがとても大きいが、その中に占める転移因子の割合は大きいものと考えられている (Pearce et al 1997)。いもち病菌などの糸状菌のゲノムサイズは非常に小さく、転移因子のコピー数は少ない傾向にある (Kim et al 1998; Dabousi and Langin 1994)。このように転移因子のコピー数とゲノムサイズには相関関係が認められ、生物種によってはゲノムにおける転移因子のコピー数を制限する機構が存在する可能性が考えられる (Petrov 2001)。第２章で触れたように、イネ・アワいもち病菌では他の菌株と比較してそれぞれの転移因子のコピー数が多く、各々50 コピー以上に達するものと考えられた。これはゲノムにおいてコピー数を制限するような要因が一時的に解除された可能性も考えられた。イネいもち病菌では第５章で触れたように、イネに寄生性を持つ菌として分化して以降、あまり有性世代を経ていないことが示された。有性生殖による遺伝的交換を失った状態で病原性の多様性を導く要因として、転移因子の活性化は大きな役割を担うものではないかと考えられた(Fig. 5-8)。

ストレスによる転移因子の活性化と病原性の変化について直接的な関連性は見出すことができなかったが、今回の研究により転移の活性化ばかりでなく、転写後の不活性化機構や RIP など、宿主細胞にはさまざまな転移因子に対する制御機構が存在していることが示された。今回解析した要因だけでなく、その他にも転移因子に対する制御が関わっていることが予想され、これら制御要因とストレスによる活性化との微妙なバランスの上に生命が成り立っていることが伺えた (Fig. 6-1)。転移因子が活性化し、新たな表現型を備えた個体が出現するというモデルを検証するためには、活性化に関わる要因と、そればかりでなく、複数の遺伝子不活性化機構を抑制するような条件を見つけ出すことが重要である。自然界における複合的な要素は実験室レベルで再現するのは困難である。遺伝子不活性化機構を抑制させるような要因について検討し、自然界でこれら要因と転移の活性化が同時に起こり得るものなのか、今後の課題として提起し、本論文を結びとする。

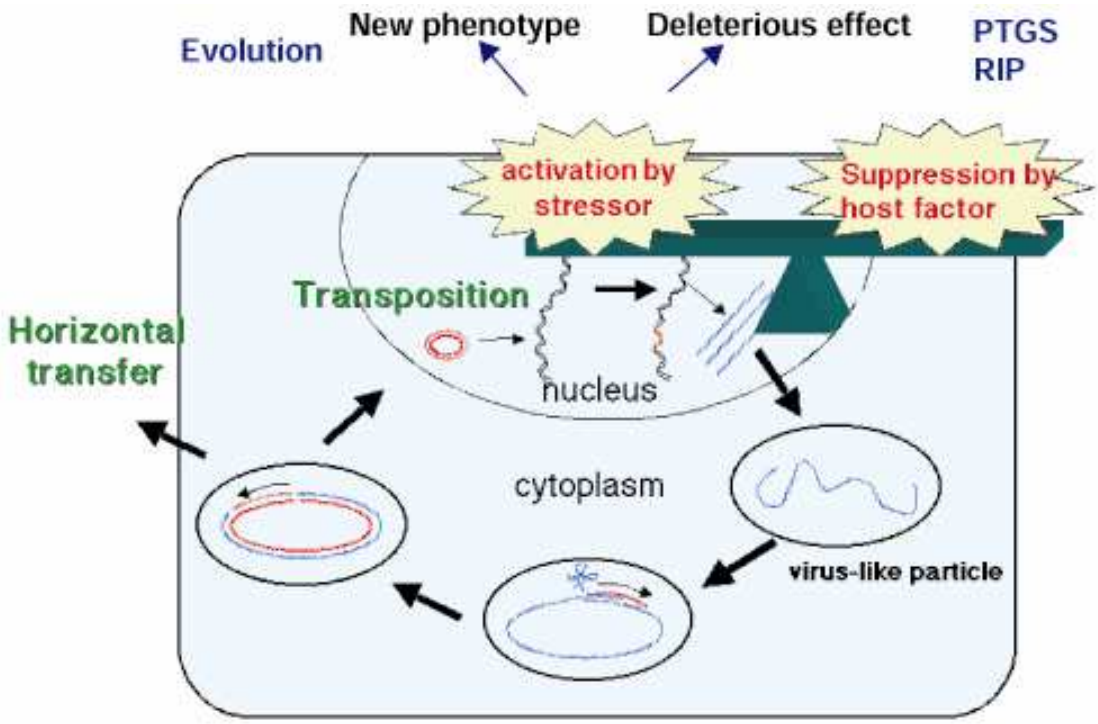



**Fig. 6-1** A model of the interactions between an LTR-retrotransposon and the host cell

Table 7-1 実験に用いた培地・試薬

| 培地・試薬 | 組成 | 作成方法 |
|---|---|---|
| PDA斜面培地（1000ml） | ジャガイモ　200g<br>glucose　20g<br>寒天粉末　15g | ジャガイモの煮汁と混合し、試験管に8mlずつ分注してオートクレーブし、斜面で固める |
| CM培地(1000ml) | Yeast extract　3g<br>Casamino acids　3g<br>Sucrose　5g | 培養瓶に分注し、オートクレーブする |
| 80%PDA培地(200ml) | 粉末PDA　6.24g<br>glucose　21.61g | オートクレーブする |
| ハイグロマイシンB含有培地 | 粉末PDA　7.8g<br>glucose　21.61g | オートクレーブした後、適量のフィルター滅菌したハイグロマイシンB液（10mg/ml in D.W.）を加える |
| DNA抽出バッファー | 100mM LiCl<br>100mM EDTA<br>10mM Tris-HCl (pH7.5)<br>0.5% SDS | オートクレーブをした後にSDSを加える |
| TE飽和フェノール溶液 | 固形フェノール<br>TE<br>0.1% hydroxyquinoline | フェノールを湯煎にて溶解させ、TEでpH7.8以上にして飽和させ、0.1%のhydroxyquinolineを加える |
| TE | 10mM Tris-HCl (pH8.0)<br>1mM EDTA | オートクレーブする |
| フェノール/クロロホルム溶液（1000ml） | TE飽和フェノール 500ml<br>クロロホルム　480ml<br>イソアミルアルコール 20ml | |
| 1xTAEアガロースゲル | 40mM Tris-acetate (pH8.0)<br>1mM EDTA<br>agarose (GP-36) | これらを混合して電子レンジで溶解させる |
| 1xMOPS変性ゲル | 40mM MOPS (pH7.0)<br>10mM sodium acetate<br>1mM EDTA<br>5% formaldehyde (37%)<br>agarose (GP-36) | 1xMOPSはNaOHを用いてpHを調整し、フィルターで濾過したものを用いる。これらを混合して電子レンジで溶解した後にformaldehydeを加える |
| 細胞壁分解酵素 | 1.2M $MgSO_4$溶液<br>15mg/ml Lysing Enzymes (Sigma)<br>5mg/ml Zymolyase 20T (Seikagaku Co.) | これらを混合後に、フィルター滅菌する |
| 1.2M $MgSO_4$溶液 | 1.2M$MgSO_4$<br>10mM $Na_2HPO_4$ | オートクレーブする |
| 0.6Mソルビトール溶液 | 0.6M D-sorbitol<br>50mM $CaCl_2$<br>50mM Tris-HCl (pH8.0) | オートクレーブする |
| 1.0Mソルビトール溶液 | 1.0M D-sorbitol<br>50mM $CaCl_2$<br>50mM Tris-HCl (pH8.0) | オートクレーブする |
| 60%PEG溶液 | 60% polyethylene glycol (4000 sigma)<br>50mM $CaCl_2$<br>50mM Tris-HCl (pH8.0) | オートクレーブする |
| タンパク質抽出バッファー | 50mM $NaH_2PO_4$<br>50mM $Na_2HPO_4$<br>10mM EDTA<br>10mM beta-mercaptoethanol | $NaH_2PO_4$　$Na_2HPO_4$にてpH7.0に調整 |
| MUG溶液 | タンパク質抽出バッファー<br>1mM 4-methylumbelliferyl beta-D-glucuronide | |

# 摘要

いもち病菌はイネ科植物の多くに病原性を示す報告があるが、いもち病菌の中にもサブグループが多く存在し、それぞれが異なる植物への寄生性を獲得している。このような多様性を引き起こした要因について考察するにあたり、生物種に広く存在が知られている転移因子に注目した。転移因子は遺伝的な変異を誘発し新たな形質を生む等の宿主に利する面もあるが、無秩序な転移は宿主にとって脅威といえる。本研究では、転移因子の分布様式を始めとし、宿主内における転移因子の活性・不活性化に関わる現象について分子生物学的に解析し、転移因子の宿主に及ぼす影響について病原性への関与も含めて解明しようとしたものである。

まず、これまでに報告されている転移因子の分布状況を調査するために、各種イネ科植物 27 種から分離されたいもち病菌 79 菌株のゲノム DNA を用いて、各種転移因子をプローブとしたサザン解析を行った。その結果、DNA 型トランスポゾンである MGR586, Pot2 が最も広い菌群に存在しており、一方でレトロトランスポゾンである MAGGY, *Grasshopper* は限られた菌群に存在するのみであった。以上の結果は、DNA 型トランスポゾンはいもち病菌が寄生性を分化させる以前に獲得された因子であり、上述のレトロトランスポゾンは寄生性分化が進んだ状態で獲得された因子であることが推察された。

次に、これらいもち病菌に存在する転移因子がどのように制御されているのか調査するために、転移活性が高いと考えられたレトロトランスポゾン MAGGY に注目し解析を行った。MAGGY のプロモーターを含むと考えられる LTR (long terminal repeats)配列にレポーター遺伝子である GUS (β-glucuronidase)遺伝子を結合し、同因子の活性化動向について定量化を試みた。様々なストレスを与えて、GUS 活性を測定した所、MAGGY は熱、硫酸銅、酸化ストレスに対して活性化を示すが、抗菌性物質であるパラクマル酸や農薬、UV 照射処理等のストレスに対しては反応しないことが明らかとなった。また、この傾向は MAGGY のノーザン解析によっても確認され、MAGGY がいもち菌において特定のストレスに反応して活性化されることが示された。一方、同様の調査をウリ類炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*)において行った

結果、MAGGY の活性化はいずれのストレス処理区においても確認されず、MAGGY の熱、硫酸銅、酸化ストレスに対するシスエレメントはいもち病菌という比較的限られた宿主において機能するものであることが明らかとなった。

次に、いもち病菌における MAGGY の抑制機構について調査した。植物では転移因子抑制へのメチル化の関与を示唆する報告が多く、事実 MAGGY 配列もイネいもち病菌でメチル化を受けていた。しかしながら、アワいもち病菌では MAGGY に対してメチル化能を失っていた。そこで MAGGY のメチル化能を持たないアワいもち病菌とメチル化能を持つコムギいもち病菌とを交配し、その $F_1$ における分離を見たところ、子孫での MAGGY メチル化能は 1:1 に分離した。メチル化の状態が異なる雑種後代において、それぞれの転移頻度に違いは認められなかった。この結果は、MAGGY に対するメチル化を制御する 1 遺伝子座の存在が明らかとなった。その一方で、メチル化自体は転移因子の不活性化には直接影響せず、転写後の抑制機構が働く可能性が考えられた。

一方、糸状菌における独特の反復因子の不活化機構に *Neurospora crassa* で報告された RIP (repeat induced point mutation)が知られている。RIP は、有性生殖時に反復配列内に高頻度の C;G から T;A への塩基置換が生じるというものである。いもち病菌においてもキビいもち病菌で RIP 様の塩基置換をうけた MAGGY が報告されており、RIP との関連性に興味が持たれた。いもち病菌における RIP を明らかにするために、MAGGY を保有しないコムギいもち病菌に MAGGY を導入し、それと交配させた $F_1$ 後代における MAGGY の塩基置換について調査した。その結果、親菌株を８世代プロトプラスト化させた菌株における MAGGY の塩基置換は少なく、ランダムであったが、$F_1$ における MAGGY は C;G から T;A への塩基置換が多く、RIP がいもち病菌でも機能していることが明らかとなった。さらに、いもち病菌に広く分布が確認されている転移因子 Pyret の塩基配列について、異なる植物から分離された菌株間で比較したところ、RIP と思われる塩基置換の程度に差が認められた。RIP は有性世代を経た際に引き起こされる現象であることより、菌株間によって有性世代の頻度が異なることが考えられた。すなわち、イネいもち病菌ではほとんど交配活動を行わないのに対して、コムギいもち病菌では頻繁に交配活動を行っていることが推測された。

# 謝辞

本論分をまとめるにあたり、懇切な御指導および御校閲頂いた神戸大学農学部植物病理学研究室、眞山滋志教授、土佐幸雄助教授、中屋敷均助手、植物遺伝学研究室、中村千春教授、遺伝生化学研究室、辻荘一教授、また多くのご助言を頂いた、神戸大学農学部植物病理学研究室、加藤肇元教授、本研究室員の方々、細胞構造学研究室、朴杓允教授、並びに独立行政法人農業環境技術研究所微生物生態研究室、松本直幸室長、中村仁研究員に深く感謝いたします。また、実験材料として、各種プラスミドを分譲して頂いた、名古屋大学農学部柘植尚志教授、京都大学農学部古澤巌元教授、鳥取大学農学部児玉基一郎助手、カールスバーグ研究所 R. P. Oliver 博士、オレゴン大学 M. L. Farman 博士に深く感謝いたします。また、神戸大学大学院自然科学研究科博士後期課程在学中の生活を支えてくれた池田又一、池田裕行、池田久美子、池田陽子、中道徹、村尾佳美、諸氏にも深く感謝いたします。

# 引用文献


Aziz NH, Farag SE, Mousa LA, Abo-Zaid MA (1998) Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. Microbiosis 93:43-54

Babinger P, Kobl I, Mages W, Schmitt R (2001) A link between DNA methylation and epigenetic silencing in transgenic *Volvox carteri*. Nucleic Acids Research 29:1261-1271

Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. Science 276:726-733

Benhamou N (1996) Elicitor-induced plant defense pathways. Trend Plant Science 1:233-240

Bennetzen JL (2000) Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. Plant Mol Biol 42:251-269

Bernstein B, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409:295-296

Bestor TH, Tycko B (1996) Creation of genomic methylation patterns. Nature Genet 12:363-367

Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Mansfield JW (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Plant Cell 9:209-221

Biémont C, Cizeron G (1999) Distribution of transposable elements in *Drosophila* species. Genetica 105:43-62

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254

Bradshaw VA, McEntee K (1989) DNA damage activates transcription and transposition of yeast Ty retrotransposons. Mol Gen Genet 218:465-474

Bus JS, Gibson JE (1984) Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. Environ Health Perspect 55:37-46

Cambareri EB, Jensen BC, Schabtach E, Selker EU (1989) Repeat-induced G-C to A-T mutations in *Neurospora*. Science 244: 1571-1575

Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature 371:215-220

Chen RS and McDonald BA (1996) Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. Genetics 142:1119-1127

Chuma I (1999) Construction of RFLP, RAPD, and AFLP map using an $F_1$ population derived from a cross between a *Setaria* isolate and a *Triticum* isolate of *Magnaporthe grisea*. Master Course Thesis in Kobe Univ

Coffin JM (1990) Retroviridae and their replication. in Fields BN, Knipe DM eds. Virology 2nd ed New York Raven Press 1437-1500

Cogoni C, Macino G (2000) Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. Curr Opin Genet Dev 10:638-643

Colot V, Rossignol JL (1999) Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. BioEssays 21:402-411

Curcio MJ, Garfinkel DJ (1999) New lines of host defense: inhibition of Ty1 retrotransposition by Fus3p and NER/TFIIH. Trends Genet 15:43-45

Daboussi MJ, Langin T (1994) Transposable elements in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. Genetica 93:49-59

Daniels SB, Peterson KR, Strausbaugh LD, Kidwell MG, Chovnick A (1990) Evidence for horizontal transmission of the *P* transposable element between *Drosophila* species. Genetics 124:339-355

Dobinson KF, Harris RE, Hamer JE (1993) *Grasshopper*, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. Mol Plant Microb Interact 6:114-126

Domínguez A, Albornoz J (1996) Rates of movement of transposable elements in *Drosophila melanogaster*. Mol Gen Genet 251:130-138

Don LD, Kusaba M, Urashima AS, Tosa Y, Nakayashiki H, Mayama S (1999) Population structure of the rice blast fungus in Japan examined by DNA fingerprinting. Ann Phytopathol Soc Jpn 65:15-24

Ellis GE, Lawrence GJ, Luck JE, Dodds PN (1999) Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene-for-gene specificity. The Plant Cell 11:495-506

Eto Y, Ikeda K, Chuma I, Kataoka T, Kuroda S, Kikuchi N, Don LD, Kusaba M, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2001) Comparative analyses of the distribution of various transposable elements in *Pyricularia* and their activity during and after the sexual cycle. Mol Gen Genet 264:565-577

Farman ML, Tosa Y, Nitta N, Leong SA (1996a) MAGGY, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Mol Gen Genet 251:665-674

Farman ML, Taura S, Leong SA (1996b) The *Magnaporthe grisea* DNA fingerprinting probe MGR586 contains the 3' end of an inverted repeat transposon. Mol Gen Genet 251:665-674

Faugeron G (2000) Diversity of homology-dependent gene silencing strategies in fungi. Curr Opin Microbiol 3:144-148

Faure E, Best-Belpomme M, Champion S (1996) UV-B irradiation upregulation of the *Drosophila* 1731 retrotransposon LTR requires the same short sequence of U3 region in a human epithelial cell line as in *Drosophila* cells. Photochem Photobiol 64:807-813

Finnegan DJ (1989) Eucaryotic transposable elements and genome evolution. Trends Genet 5:103-107

Finnegan EJ, Peacock WJ Dennis ES (2000) DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. Curr Opin Genet Dev 10:217-223

Finnegan EJ, Kovac KA (2000) Plant DNA methyltransferases. Plant Mol Biol 43:189-201

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391:806-811

Flavell AJ (1992) Ty1-copia group retrotransposons and the evolution of retroelements in plants. Genetica 86:203-214

Flavell AJ (1999) Long terminal repeat retrotransposons jump between species. Proc Natl Acad Sci USA 96:12211-12212

Flor HH (1947) Inheritance of reaction to rust in flax. J Agr Res 74:241-262

Freedman T, Pukkila PJ (1993) *De novo* methylation of repeated sequences in *Coprinus cinereus*. Genetics 135: 357-366

Goyon C, Faugeron G (1989) Targeted transformation of *Ascobolus immersus* and *de novo* methylation of the resulting duplicated DNA sequences. Mol Cell Biol 9:2818-2827

Goyon C, Nogueira TIV, Faugeron G (1994) Perpetuation of cytosine methylation in *Ascobolus immersus* implies a novel type of maintenance methylase. J Mol Biol 240:42-51

Graïa F, Lespinet O, Rimbault B, Dequard-Chablat M, Coppin E, Picard M (2001) Genome quality control: RIP (repeat-induced point mutation) comes to *Podospora*. Molecular Microbiol 40:586-595

Gray YHM (2000) It takes two transposons to tango: transposable element-mediated chromosomal rearrangements. Trend Genet 16:461-468

Hamann A, Feller F, Osiewacz HD (2000) The degenerate DNA transposon *Pat* and repeat-induced point mutation (RIP) in *Podospora anserina*. Mol Gen Genet 263:1061-1069

Hamer JE, Farral L, Orbach MJ, Balent B, Chumley FG (1989) Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. Proc Natl Acad Sci USA 86:9981-9985

Hernandez-Munain C, McMurry MT, Krangel MS (1999) Regulation of chromatin accessibility for V(D)J recombination. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 64:183-189

Hirochika H (1993) Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. EMBO J 12:2521-2528

Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H, Kanda M (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc Natl Acad Sci USA 93:7783-7788

Hirochika H, Okamoto H, Kakutani T (2000) Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation. The Plant Cell 12:357-368

Houck MA, Clark JB Peterson KR, Kidwell MG (1991) Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. Science 253:1125-1129

Hsieh CL (2000) Dynamics of DNA methylation pattern. Curr Opin Genet Dev 10:224-228

Hua-Van A, Héricourt F, Capy P, Daboussi MJ, Langin T (1998) Three highly divergent subfamilies of the *impala* transposable element coexist in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. Mol Gen Genet 259:354-362

Iida S, Hoshino A, Johzuka-Hisatomi Y, Habu Y, Inagaki Y (1999) Floricultural traits and transposable elements in the Japanese and common morning glories. Ann N Y Acad Sci 870:265-274

Ikeda K, Takagi M, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2001) Heat shock, copper sulfate, and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. Molecular Genetics and Genomics 266:318-325

Irelan JT, Selker EU (1997) Cytosine methylation associated with repeat-induced point mutation causes epigenetic gene silencing in *Neurospora crassa*. Genetics 146:509-523

Jefferson RA, Kavanagh TA, Beven MW (1987) GUS fusion: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6:3901-3907

Jin YK, Bennetzen JL (1994) Integration and nonrandom mutation of a plasma membrane proton ATPase gene fragment within the Bs1 retroelement of maize. The Plant Cell 6:1177-1186

Joosten MHAJ Vogelsang R, Cozijnsen TJ, Verberne MC, De Wit PJGM (1997) The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents *Cf-4*-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. The Plant Cell 9:367-379

Jordan IK, Matyunina LV, McDonald JF (1999) Evidence for the recent horizontal transfer of long terminal repeat retrotransposon. Proc Natl Acad Sci USA 96:12621-12625

Kachroo P, Leong SA Chattoo BB (1994) *Pot2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Mol Gen Genet 245:339-348

Kachroo P, Leong SA, Chattoo BB (1995) Mg-SINE: a short interspersed nuclear element from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Proc Natl Acad Sci USA 92:11125-11129

Kachroo P, Ahuja P, Leong SA, Chattoo BB (1997) Organization and molecular analysis of repeated DNA sequences in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Curr Genet 31:361-369

Kakutani T, Munakata K, Richards EJ, Hirochika H (1999) Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana*. Genetics

151:831-838

Kalendar R, Tanskanen J, Immonen S, Nevo E, Schulman AH (2000) Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. Proc Natl Acad Sci USA 97:6603-6607

Kang S Lebrun MH, Farrall L, Valent B (2001) Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. Mol Plant Microb Interact 14:671-674

Kato H, Yamaguchi T, Nishihara N (1976) The perfect state of *Pyricularia oryzae* Cav. in culture. Ann Phytopathol Soc Jpn 42:507-510

Kato H, Yamamoto M, Yamaguchi-Ozaki T, Kadouchi H, Iwamoto Y, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S, Mori N (2000) Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from Gramineae, Bambusideae and Zingiberaceae plants. J Gen Plant Pathol 66:30-47

Ke N, Irwin PA, Voytas DF (1997) The pheromone response pathway activates transcription of *Saccharomyces cerevisiae*. The EMBO J 16:6272-6280

Kearney B, Ronald PC, Dahlbeck, Staskawicz BJ (1988) Molecular basis for evasion of plant host defence in bacterial spot disease of pepper. Nature 332:541-543

Kempken F, Kück U (1998) Transposons in filamentous fungi- facts and perspectives. BioEssays 20:652-659

Kidwell MG, Lisch D (1997) Transposable elements as sources of variation in animals and plants. Proc Natl Acad Sci USA 94:704-7711

Kim JM, Vanguri S, Boeke JD, Gabriel A, Voytas DF (1998) Transposable elements and genome organization: A comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. Genome Res 8:464-478

Kimura N, Tsuge T (1993) Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. J Bacteriol 175:4427-4435

Kinsey JA, Garrett-Engele PW, Cambareri EB, Selker EU (1994) The *Neurospora* transposon Tad is sensitive to repeat-induced point mutation (RIP). Genetics 138:657-664

Kobayashi N, McEntee K (1993) Identification of *cis* and *trans* components of a novel heat shock

stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cellular Biol 13:248-256

Kumpatla SP, Chandrasekharan MB, Iyer LM, Li G, Hall TC (1998) Genome intruder scanning and modulation system and transgene silencing. Trends Plant Science 3:97-104

Kusaba M, Eto Y, Don LD, Nishimoto N, Tosa Y, Nakayashiki H, Mayama S (1999) Genetic diversity in *Pyricularia* isolates from various hosts revealed by polymorphisms of nuclear ribosomal DNA and the distribution of the MAGGY retrotransposon. Ann Phytopathol Soc Jpn 65:588-596

Labrador M, Corces VG (1997) Transposable element-host interactions: regulation of insertion and excision. Ann Rev Genet 31:381-404

Laugé R, De Wit PJGM (1998) Fungal avirulence genes: structure and possible functions. Fungal Genet Biol 24:285-297

Leonhardt H, Cardoso MC (2000) DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer. J Cell Biochem Suppl 35:78-83

Leslie JF, Klein KK (1996) Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. Genetics 144:557-567

Lyubomirskaya NV, Arkhipova IR, Ilyin YV (1993) Transcription of *Drosophila* mobile element *gypsy* (mdg4) in heat-shocked cells. FEBS Lett 325:233-236

Malagnac F, Wendel B, Goyon C, Faugeron G, Zickler D, Rossignol JL, Noyer-Weidner M, Vollmayr P, Trautner TA, Walter J (1997) A gene essential for *de novo* methylation and development in *Ascobolus* reveals a novel type of eucaryotic DNA methyltransferase structure. Cell 91:281-290

Maleck K, Dietrich RA (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? Trend Plant Science 4:215-219

Maloisel L, Rossignol JL (1998) Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascobolus*. Genes Development 12:1381-1389

Martin GB (1999) Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. Curr Opin Plant Biol 2:273-279

Mayama S, Tani T, Matsuura Y (1981) The production of phytoalexins by oat in response to crown

rust, *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Physiol Plant Pathol 19:217-226

McClintock B (1984) The significance of responses of the genome to challenge. Science 226:792-801

McDonald JF, Matyunina LV, Wilson S, Jordan IK, Bowen NJ, Miller WJ (1997) LTR retrotransposons and the evolution of eucaryotic enhancers. Genetica 100:3-13

Meyer P, Niedenhof I, Lohuis M (1994) Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*. EMBO J 13:2084-2088

Mhiri C, Morel JB, Vernhettes S, Vasacuberta JM, Lucas H, Grandbastien MA (1997) The promoter of the tobacco Tnt1 retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. Plant Mol Biol 33:257-266

Miller K, Lynch C, Martin J, Herniou E, Tristem M (1999) Identification of multiple *gypsy* LTR-retrotransposon lineages in vertebrate genomes. J Mol Evol 49:358-366

Montero LM, Filipski J, Gil P, Capel J, Martínez-Zapater JM, Salinas J (1992) The distribution of 5-methylcytosine in the nuclear genome of plants. Nucleic Acids Res 20:3207-3210

Mori M, Zhang GH, Kaido M, Okuno T, Furusawa I (1993) Efficient production of human gamma interferon in tobacco protoplasts by genetically engineered brome mosaic virus RNAs. J Gen Viol 74:1255-1260

Murakami J, Tosa Y, Kataoka T, Tomita R, Kawasaki J, Chuma I, Sesumi Y, Kusaba M, Nakayashiki H, Mayama S (2000) Analysis of host species specificity of *Magnaporthe grisea* toward wheat using a genetic cross between isolates from wheat and fextail millet. Phytopathology 90:1060-1067

Nakayashiki H, Kiyotomi K, Tosa Y, Mayama S (1999a) Transposition of the retrotransposon MAGGY in heterologous species of filamentous fungi. Genetics 153:693-703

Nakayashiki H, Nishimoto N, Ikeda K, Tosa Y, Mayama S (1999b) Degenerate MAGGY elements in a subgroup of *Pyricularia grisea*: a possible example of successful capture of a genetic invader by a fungal genome. Mol Gen Genet 261:958-966

Nakayashiki H, Ikeda K, Hashimoto Y, Tosa Y, Mayama S (2001a) Methylation is not the main force repression the retrotransposon MAGGY in *Magnaporthe grisea*. Nucleic Acids Research 29:1278-1284

Nakayashiki H, Matsuo H, Chuma I, Ikeda K, Betsuyaku S, Kusaba M, Tosa Y, Mayama S (2001b) Pyret, a Ty3/Gypsy retrotransposon in *Magnaporthe grisea* contains an extra domain between the nucleocapsid and protease domains. Nucleic Acids Res 29:4106-4113

Naylor LH (1999) Reporter gene technology: the future looks bright. Biochem Pharmacol 58:749-757

Neuveglise C, Sarfati J, Latge JP, Paris S (1996) *Afut1*, a retrotransposon-like element from *Aspergillus fumigatus*. Nucleic Acids Res 24:1428-1434

Nishimura M, Hayashi N, Jwa NS, Lau GW, Hamer JE, Hasebe A (2000) Insertion of the LINE retrotransposon MGL causes a conidiophore pattern mutation in *Magnaporthe grisea*. Mol Plant Microbe Interact 13:892-894

O'Halloran TV (1993) Transition metals in control of gene expression. Science 261:715-725

Okada N (1991) SINEs. Curr Opin Genet Dev 1:498-504

Orbach MJ, Farrall L, Sweingard JA, Chumley, FG, Valent B (2000) A telomeric avirlence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. Plant Cell 12:2019-2032

Ou SH (1985) Blast. in Rice Diseases. Commonwealth Mycological Institute, Slough, United Kingdom. pp 109-201

Parniske M, Hammond-Kosack KE, Golstein C, Thomas CM, Jones DA, Harrison K, Wulff BB, Jones JDG (1997) Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf-4/9* locus of tomato. Cell 91:821-832

Pauls PK, Kunert K, Huttner E, Grandbastien MA (1994) Expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon promoter in heterologous species. Plant Mol Biol 26:393-402

Pearce SR, Harrison G, Heslop-Harrison JS, Flavell AJ, Kumar A (1997) Characterization and genomic organization of *Ty1-copia* group retrotransposons in rye (*Secale cereale*). Genome 40:1-9

Peng YL, Chen G, He M (1998) A possible mechanism for breakdown of resistance in hybrid rice to blast disease. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenchappen Universiteit Gent. 63(3B):947-956

Petrov DA (2001) Evolution of genome size: new approaches to an old problem. Trend Genet

17:23-28

Poulter R, Butler M (1998) A retrotransposon family from the pufferfish (fugu) *Fugu rubripes*. Gene 215:241-249

Pouteau S, Huttner E, Grandbastien MA, Caboche M (1991) Specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in protoplasts. EMBO J 10:1911-1918

Ratner VA, Zabanov SA, Lolesnikova OV, Vasilyeva LA (1992) Induction of the mobile genetic element Dm-412 transpositions in the *Drosophila* genome by heat shock treatment. Proc Natl Acad Sci USA 89:5650-5654

Roberts IN, Oliver RP, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ (1989) Expression of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase gene in industrial and phytopathogenic filamentous fungi. Curr Genet 15:177-180

Robertson KD, Wolffe AP (2000) DNA methylation in health and disease. Nature Reviews (Genetics) 1:11-19

Rolfe M, Spanos A, Banks G (1986) Induction of yeast Ty element transcription by ultraviolet light. Nature 319:339-340

Romano N, Macino G (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. Mol Microbiol 6:3343-3353

Ronald PC (1998) Resistance gene evolution. Curr Opin Plant Biol 1:294-298

Rossman AY, Howard RJ, Valent B (1990) *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. Mycologia 82: 509-512

Ruis H, Schüller C (1995) Stress signaling in yeast. BioEssays 17:959-965

Sanmiguel P, Bennetzen JL (1998) Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. Annals of Botany 82(Suppl A):37-44

Schmid CW (1998) Does SINE evolution preclude *Alu* function? Nucleic Acids Res 26:4541-4550

Selker EU, Cambareri EB, Jensen BC, Haack KR (1987) Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*. Cell 51:741-752

Selker EU, Fritz DY, Singer MJ (1993) Dense nonsymmetrical DNA methylation resulting from repeat-induced point mutation in *Neurospora*. Science 262:1724-1728

Sentry JW, Kaiser K (1992) *P* element transposition and targeted manipulation of the *Drosophila* genome. Trends Genet 8:329-331

Shull V, Hamer JE (1996) Genetic differentiation in the rice blast fungus revealed by the distribution of the Fosbury retrotransposon. Fungal Genet Biol 20:59-69

Simmen MW, Leitgeb S, Charlton J, Jones SJM, Harris BR, Clark VH, Bird A (1999) Nonmethylated transposable elements and methylated genes in a chordate genome. Science 283:1164-1167

Singer MJ, Marcotte BA, Selker EU (1995) DNA methylation associated with repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. Mol Cell Biol 15:5586-5597

Smit AFA (1999) Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. Curr Opin Genet Dev 9:657-663

Springer MS, Britten RJ (1993) Phylogenetic relationships of reverse transcriptase and RNase H sequences and aspects of genome structure in the gypsy group of retrotransposons. Mol Biol Evol 10:1370-1379

Syomin BV, Kandror KV, Semakin AB, Tsuprum VL, Stepanov AS (1993) Presence of the *gypsy* (MDG4) retrotransposon in extracellular virus-like particles. FEBS Lett 323:285-288

Takeda S, Sugimoto K, Otsuki H, Hirochika H (1999) A 13-bp *cis*-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon Tto1 is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. Plant J 18:383-393

Tapiero A (1994) Resistance of rice to inoculant strains of *Pyricularia grisea* Sacc. in Colombian varieties. Fitopatologia Colombiana 18:53-65

Teng SC, Kim B, Gabriel A (1996) Retrotransposon reverse transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks. Nature 383:641-644

Thomas CL, Jones L, Baulcombe DC, Maule AJ (2001) Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. Plant J 25:417-425

Tosa Y, Nakayashiki H, Hyodo H, Mayama S, Kato H, Leong SA (1995) Distribution of retrotransposon MAGGY in *Pyricularia* species. Ann Phytopathol Soc Jpn 61:549-554

Tweedie S, Ng HH, Barlow AL, Turner BM, Hendrich B, Bird A (1999) Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*? Nature Genet 23:389-390

Urashima AS, Igarashi S, Kato H (1993) Host range, mating type and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. Plant Dis 77:1211-1216

Urashima AS, Hashimoto Y, Don LD, Kusaba M, Tosa Y, Nakayashiki H, Mayama H (1999) Molecular analysis of the wheat blast population in Brazil with a homolog of retrotransposon MGR583. Ann Phytopathol Soc Jpn 65:429-436

Valent B, Chumley FG (1991) Molecular genetic analysis of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Ann Rev Phytopathol 29:443-467

Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC, Vernhetes S (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. Plant J 16:651-659

Vaucheret H, Fagard M (2001) Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. Trends Genet 17:29-35

Vernhettes S, Grandbastien MA, Casacuberta JM (1997) In vivo characterization of transcriptional regulatory sequences involved in the defence-associated expression of the tobacco retrotransposon Tnt1. Plant Mol Biol 35:673-679

Walbot Y (1999) UV-B damage amplified by transposons in maize. Nature 397:398-399

Walbot Y (2000) Saturation mutagenesis using maize transposons. Curr Opin Plant Biol 3:103-107

Wessler SR, Bureau TE, White SE (1995) LTR-retrotransposons and MITEs- important players in the evolution of plant genomes. Curr Opin Genet Dev 5:814-821

Xiong Y, Eickbush TH (1990) Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. EMBO J 9:3353-3362

Yamauchi A (1999) Evolution of cyclic sexual reproduction under host-parasite interactions. J Theor Biol 201:281-291

Yamazaki Y, Tsuchiya S (1964) Studies on drug-resistance of the rice blast fungus, Pyricularia oryzae Cav. I. Acquisition of the resistance in successive passages through media containing drugs and the nature of such acquired resistance. in Bulletin of the national institute of agricultural science (Japan). Series D, No.11:pp. 1-52

Yebra MJ, Bhagwat AS (1995) A cytosine methyltransferase converts 5-methylcytosine in DNA to thymine. Biochemistry 34:14752-14757

Ziarczyk P, Best-Belpomme M (1991) A short 5' region of the long terminal repeat is required for regulation by hormone and heat shock of *Drosophila* retrotransposon 1731. Nucleic Acids Research 19:5689-5693

## これまでに公表した論文及び著書

1, S. Mayama, Y. Tosa, H. Nakayashiki, M. Kusaba, T. Kataoka, W. Kishimoto, J. Murakami, K. Kawashima, Y. Sesumi, N. Kikuchi, L. D. Don, K. Ikeda, and T. Tsurushima. (1998) Genetical and physiological studies on the species-specific parasitism of *Magnaporthe grisea* in gramineous plants with a special reference to a cross between the *Triticum* isolate and the *Setaria* isolate. in Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Disease (Proceedings of the 3rd Tottori international symposium on Host-specific toxins, Daisen, Tottori, Japan). pages in 211-221.

2, H. Nakayashiki, N. Nishimoto, K. Ikeda, Y. Tosa, and S. Mayama. (1999) Degenerate MAGGY elements in a subgroup of *Pyricularia grisea*: a possible example of successful capture of a genetic invader by a fungal genome. Molecular and General Genetics 261: 958-966.

3, Y. Eto, K. Ikeda, I. Chuma, T. Kataoka, S. Kuroda, N. Kikuchi, L. D. Don, M. Kusaba, H. Nakayashiki, Y. Tosa, and S. Mayama. (2001) Comparative analysis of the distribution of various transposable elements in *Pyricularia* and their activity during and after the sexual cycle. Molecular and General Genetics 264: 565-577.

4, H. Nakayashiki, K. Ikeda, Y. Hashimoto, Y. Tosa, and S. Mayama. (2001) Methylation is not the main force repressing the retrotransposon MAGGY in *Magnaporthe grisea*. Nucleic Acids Research 29: 1278-1284.

5, K. Ikeda, H. Nakayashiki, M. Takagi, Y. Tosa, and S. Mayama. (2001) Heat shock, copper sulfate, and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. Molecular Genetics and Genomics 266: 318-325.

6, H. Nakayashiki, H. Matsuo, I. Chuma, K. Ikeda, S. Betsuyaku, M. Kusaba, Y. Tosa, and S. Mayama. (2001) Pyret, a *Ty3/Gypsy* retrotransposon in *Magnaporthe grisea* contains an extra domain between the nucleocapsid and protease domains. Nucleic Acids Research 29:4106-4113

## 学会発表

### 国際学会

１、K. Ikeda, M. Takagi, H. Nakayashiki, Y. Tosa, and S. Mayama (2000) Activation of the promoter of the retrotransposon MAGGY in *Pyricularia* spp. by stresses. The First Asian Conference on Plant Pathology (Beijing, China)

２、K. Ikeda, H. Nakayashiki, M. Takagi, Y. Tosa, and S. Mayama (2000) Activation of the retrotransposon MAGGY by heat shock, copper sulfate and oxidative stress. NIAR-COE/BRAIN/CREST joint international symposium "Self-defense Signaling Pathways in Plants" (Tsukuba, Japan)

3、Hitoshi Nakayashiki, Kenichi Ikeda, Yoko Hashimoto, Yukio Tosa, Shigeyuki Mayama (2001) Methylation is not the main force repressing the retrotransposon MAGGY in *Magnaporthe grisea*. 10th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (Wisconsin Madison, USA)

4、Y. TOSA, H. NAKAYASHIKI, Y. ETO, K. IKEDA, S. MAYAMA : Transposable elements in *Pyricularia* species - their distribution, activity, and role in the genome. 土佐幸雄、中屋敷均、衛藤由希子、池田健一、眞山滋志；いもち病菌のトランスポゾンーその分布、活性とゲノムにおける役割（平成 12 年(2000)植物感染生理談話会論文集；Kochi, Japan）

### 国内学会

1、池田健一、中馬いづみ、衛藤由希子、草場基章、中屋敷均、土佐幸雄、眞山滋志；*Pyricularia* 属菌における各種転移因子および 2 本鎖 RNA の分布（平成 10 年(1998)日本植物病理学会大会；北海道大学）

2、衛藤由希子、中馬いづみ、池田健一、中屋敷均、土佐幸雄、眞山滋志；いもち病菌の種特異的寄生性機構に関する研究(5)：アワ菌とコムギ菌の雑種後代における MAGGY の転移の確認並びに各種散在反復配列の転移活性（平成 10 年(1998)日本植物病理学会関西部会；滋賀県立大学）

3、高木真理子、池田健一、中屋敷均、土佐幸雄、眞山滋志；イネいもち病菌に存在する MAGGY の転移活性化機構：β-glucuronidase (GUS)遺伝子を用いたプロモーター活性の解析（平成 11 年(1999)日本植物病理学会大会；新潟大学）

4、池田健一、中屋敷均、土佐幸雄、眞山滋志；キビいもち病菌に見られる転移因子の RIP 様機構による退化（平成 12 年(2000)日本植物病理学会大会；岡山大学）

5、池田健一、高木真理子、中屋敷均、土佐幸雄、眞山滋志；イネいもち病菌に存在するレトロトランスポゾン MAGGY のプロモーター活性の解析（2000 年日本分子生物学会年会；神戸国際展示場）

6、中屋敷均・池田健一・橋本容子・土佐幸雄・眞山滋志；MAGGY のいもち病菌における転移の抑制はメチル化が主要因ではない（平成 13 年（2001）日本植物病理学会大会；東北大学）

7、池田健一・中屋敷均・土佐幸雄・眞山滋志；交配時の反復遺伝子不活性化機構 RIP のいもち病菌における存在（平成 13 年（2001）日本植物病理学会大会；東北大学）

8、池田健一・中屋敷均・土佐幸雄・眞山滋志；いもち病菌における RIP (repeat-induced point mutation)と本菌における有性世代について（2001 年度日本分子生物学会年会；横浜パシフィコ）

**その他（研究レポート）**

眞山滋志、池田健一；環境ストレス指標植物の作出に対する基礎と展望（平成 11 年通商産業省生態系情報機能報告書）