



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。



【363】

氏名・(本籍) 池田 健一 (石川県)

博士の専攻分野の名称 博士 (農学)

学位記番号 博い第52号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成13年9月30日

【学位論文題目】

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

審査委員

主査 教授 眞山 滋志

教授 中村 千春 教授 辻 荘一

助教授 土佐 幸雄

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 F₁ 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 との関連性に興味を持たれた。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 F₁ 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、F₁ 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。

論文審査の結果の要旨

氏名	池田 健一		
論文題目	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		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	眞山 滋 志
	副査	教授	中村 千 春
	副査	教授	辻 庄 一
	副査	助教授	土佐 幸 雄
要 旨			
<p>いもち病菌は多くのイネ科植物に病原性を示すことが報告されているが、いもち病菌の中には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じる等の点で宿主に利する面もあるが、一方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菌の病原性変異への関与も含めて解明しようとしたも</p>			

のである。

Chapter I (General Introduction) に引き続き、Chapter II ではこれまでにいもち病菌において報告されている転移因子について各いもち菌系統における分布状況を調査した。各種イネ科植物 27 種から分離されたいもち病菌 83 菌株のゲノム DNA を用いて、各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 MGR583, 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示唆された。

Chapter III では、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 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行った。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、酸化ストレスに応答して活性化されるが、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示唆された。

Chapter IV では、MAGGYのいもち病菌における抑制機構について調査した。糸状菌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 配列もいもち病菌ゲノム上でメチル化を受けていた。そこで、脱メチル化剤として知られている 5-azacytidine 処理を行ったところ、MAGGY 配列は脱メチル化され、転写レベルで活性化することが明らかとなった。しかし、意外なことに脱メチル化によって、その後の MAGGY の転移頻度が変化することにはなかった。また、MAGGY のメチル化能を持たないいもち病菌と持つものとの交配し、その F1 における分離を見た所、子孫での MAGGY メチル化能は 1:1 に分離した。しかし、その子孫における MAGGY の転移頻度には有意な差が認められなかった。この結果は、いもち病菌における MAGGY の抑制にはメチル化は重要でなく、post-transcriptional な制御の影響が大きいことを示唆するものであった。

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と考えられる MAGGY 様の配列が報告されており、*N. crassa* 同様に転移因子の抑制機構として RIP 機構が存在する可能性が考えられた。RIP は有性世代を経た際に特異的に観察されることから、MAGGY を導入したコムギいもち病菌を交配させ、F1 後代における MAGGY の塩基置換について調査した。その結果、交配を経ずにプロトプラスト化を 8 回繰り返し、継代培養した菌株においては、MAGGY の塩基置換は少なく、その置換のパターンもランダムであったが、F1 における MAGGY 配列は、塩基置換の頻度が有意に多く、その 9 割以上が C;G から T;A への塩基置換という偏ったものであった。このことから、RIP がいもち病菌でも存在しており、本菌における転移因子の抑制機構として有効に機能していることが明らかとなった。

以上のように、本研究はいもち病菌に存在する転移因子について因子の分布・性状から宿主における制御機構までを総合的に解析し、いもち病菌の宿主寄生性の多様性メカニズムに関する多くの知見を得た。よって、学位申請者 池田健一は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。