



Development of a novel RNA silencing system for functional genomics in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*

Nguyen Bao Quoc

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Date of Publication)

2008-03-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4367

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004367>

※ 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。



氏 名	NGUYEN BAO QUOC
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学 位 記 番 号	博い第 744 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Development of a novel RNA silencing-based system for functional genomics in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (イネ科植物いもち病菌における RNA サイレンシングを用いた機能ゲノム学システムの構築)

審 査 委 員

主 査	教 授	土佐 幸雄
	教 授	眞山 滋志
	教 授	杉本 幸裕
	准教授	中屋敷 均

本研究で取り扱った *Magnaporthe oryzae* はイネやコムギなどのイネ科栽培植物にいちもち病を引き起こす世界的に重要な植物病原糸状菌である。本菌は、2002 年に植物病原糸状菌としては、最初に全ゲノム配列が決定された種であり、宿主であるイネも全ゲノム配列が決定されていることから、ポストゲノム時代における植物-糸状菌相互作用のモデル系と目されている。RNA サイレンシング、あるいは RNAi は、ポストゲノム時代における有力な逆遺伝学ツールと考えられているが、糸状菌における応用はこれまでの所、限られている。その一要因として、ハイスループットな解析系の不足が挙げられ、本研究では糸状菌における新しい RNA サイレンシング解析系のプラットフォームの構築を試みた。

第 1 章で、これまでの RNA サイレンシングの歴史やその糸状菌での応用例の知見を概観した後、第 2 章では、これまで糸状菌で一般的であったヘアピン RNA 転写型 RNAi ベクターの改良を試みた。ヘアピン RNA 転写型 RNAi ベクターは、対象遺伝子の配列を逆方向に二度挿入することによってヘアピン構造を作成するが、このためには挿入方向が限定された二度のクローニングが必要とされ、作業効率に問題があった。そこで、対象配列の 5' および 3' に向き合う形で二つのプロモーターを導入し、各々のプロモーターからセンス RNA およびアンチセンス RNA を転写させ細胞内で dsRNA を形成させる Dual-Promoter 型のベクター構築を行った。異なる二つのプロモーターを用いた pSilent-Dual1(pSD1)および同一プロモーターを二つ用いた pSilent-Dual2(pSD2)を作成し、モデル遺伝子である GFP を用いてサイレンシング誘導能を調査した所、RNAi 経路の鍵酵素である Dicer 依存的にサイレンシングが起こることが明らかとなった。また、サイレンシング株を高効率でスクリーニングする目的で、対象遺伝子を GFP 遺伝子断片と融合させた形で転写させることを試みた所、対象遺伝子と GFP のサイレンシングが一定の相関で起こることが示され、このベクターを GFP 発現株に導入すれば、GFP 蛍光の消失をマーカーとして対象遺伝子のサイレンシングが判断できることが示された。

第 3 章では、構築された pSD1 を用いていちもち病菌のゲノムで同定されている 42 個のカルシウムシグナル系遺伝子のうち 37 遺伝子を対象として、サイレンシング株を作成し、その機能を解析することを試みた。このうち 23 個の遺伝子は、本研究において糸状菌で初めて、その機能が調査された。コンストラクト構築は、対象遺伝子の DNA 断片を PCR によって増幅し、pSD1 のマルチクローニング部位に導入することにより行った。GFP 蛍光の

消失で一次スクリーニングを行った後、ノーザン解析により対象遺伝子がサイレンシングを受けている形質転換体を選抜し、菌糸成長、胞子形成、付着器形成、病原性などの表現形を調査した。その結果、37 個の遺伝子のうち、26 個が菌糸成長に、35 個が胞子形成に、また 15 個が病原性に関与していることが明らかとなった。この中で、Pmc1-, Spf1-, Neo1-様のカルシウムポンプ、calreticulin 様蛋白質、また calpactin heavy chain 様蛋白質といった遺伝子が、本研究により初めて植物糸状菌の病原性に関与することが示唆された。

第 4 章では、第 3 章の結果を受けて、糸状菌ゲノムに存在するカルシウムシグナル系遺伝子の機能と出芽酵母に明らかにされているホモログ遺伝子の機能を比較し、その違いと共通点について論じている。糸状菌におけるカルシウムシグナル経路は、哺乳動物や出芽酵母における知見と比較すると、多くのことが未知のまま残されており、これらの問題点や現状の知見を大きくまとめたレビューとなっている。

以上の研究は、RNA サイレンシングを用いた糸状菌の遺伝子機能解析としては世界で最先端の研究であり、ハイスループット解析系を確立した意義は極めて大きい。また、それに留まらず実際に確立された解析系を利用してこれまでまったく知見のなかった 20 を越える遺伝子の機能について知見を得ており、糸状菌の病原性におけるカルシウムシグナル系の重要性について明らかにした。これらの知見は、今後の糸状菌のポストゲノムにおける遺伝子解析法に新たな道を開いただけでなく、本菌の新たな防除法につながる知見を得たものとして、高い価値のあるものである。

氏名	NGUYEN BAO QUOC		
論文 題目	Development of a novel RNA silencing-based system for functional genomics in the rice blast fungus, <i>Magnaporthe oryzae</i> イネ科植物いもち病菌における RNA サイレンシングを用いた機能ゲノム学システムの構築		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	土佐幸雄
	副 査	教授	眞山滋志
	副 査	教授	杉本幸裕
	副 査	准教授	中屋敷均
	副 査		
要 旨			
本研究で取り扱った <i>Magnaporthe oryzae</i> はイネやコムギなどのイネ科栽培植物にいもち病を引き起こす世界的に重要な植物病原糸状菌である。本菌は、2002 年に植物病原糸状菌としては、最初に全ゲノム配列が決定された種であり、宿主であるイネも全ゲノム配列が決定されていることから、ポストゲノム時代における植物－糸状菌相互作用のモデル系と目されている。RNA サイレンシング、あるいは RNAi は、ポストゲノム時代における有力な逆遺伝学ツールと考えられているが、糸状菌における応用はこれまでの所、限られている。その一要因として、ハイスループットな解析系の不足が挙げられ、本研究では糸状菌における新しい RNA サイレンシング解析系のプラットフォームの構築を試みた。 第 1 章で、これまでの RNA サイレンシングの歴史やその糸状菌での応用例の知見を概観した後、第 2 章では、これまで糸状菌で一般的であったヘアピン RNA 転写型 RNAi ベクターの改良を試みた。ヘアピン RNA 転写型 RNAi ベクターは、対象遺伝子の配列を逆方向に二度挿入することによってヘアピン構造を作成するが、このためには挿入方向が限定された二度のクローニングが必要とされ、作業効率に問題があった。そこで、対象配列の 5’ および 3’ に向き合う形で二つのプロモーターを導入し、各々のプロモーターからセンス RNA およびアンチセンス RNA を転写させ細胞内で dsRNA を形成させる Dual-Promoter 型のベクター構築を行った。異なる二つのプロモーターを用いた pSilent-Dual1(pSD1)および同一プロモーターを二つ用いた pSilent-Dual2(pSD2)を作成し、モデル遺伝子である GFP を用いてサイレンシング誘導能を調査した所、RNAi 経路の鍵酵素である Dicer 依存的にサイレンシングが起ることが明らかとなった。また、サイレンシング株を高効率でスクリーニングする目的で、対象遺伝子を GFP 遺伝子断片と融合させた形で転写させることを試みた所、対象遺伝子と GFP のサイレンシングが一定の相関で起こることが示され、このベクターを GFP 発現株に導入すれば、GFP 蛍光の消失をマーカーとして対象遺伝子のサイレンシングが判断できることが示された。			

氏名	NGUYEN BAO QUOC
第 3 章では、構築された pSD1 を用いていもち病菌のゲノムで同定されている 42 個のカルシウムシグナル系遺伝子のうち 37 遺伝子を対象として、サイレンシング株を作成し、その機能を解析することを試みた。このうち 23 個の遺伝子は、本研究において糸状菌で初めて、その機能が調査された。コンストラクト構築は、対象遺伝子の DNA 断片を PCR によって増幅し、pSD1 のマルチクローニング部位に導入することにより行った。GFP 蛍光の消失で一次スクリーニングを行った後、ノーザン解析により対象遺伝子がサイレンシングを受けている形質転換体を選抜し、菌糸成長、胞子形成、付着器形成、病原性などの表現形を調査した。その結果、37 個の遺伝子のうち、26 個が菌糸成長に、35 個が胞子形成に、また 15 個が病原性に関与していることが明らかとなった。この中で、Pmc1-, Spfl-, Neol-様のカルシウムポンプ、calreticulin 様蛋白質、また calpactin heavy chain 様蛋白質といった遺伝子が、本研究により初めて植物糸状菌の病原性に関与することが示唆された。 第 4 章では、第 3 章の結果を受けて、糸状菌ゲノムに存在するカルシウムシグナル系遺伝子の機能と出芽酵母に明らかにされているホモログ遺伝子の機能を比較し、その違いと共通点について論じている。糸状菌におけるカルシウムシグナル経路は、哺乳動物や出芽酵母における知見と比較すると、多くのことが未知のまま残されており、これらの問題点や現状の知見を大きくまとめたレビューとなっている。	
以上の研究は、RNA サイレンシングを用いた糸状菌の遺伝子機能解析としては世界で最先端の研究であり、ハイスループット解析系を確立した意義は極めて大きい。また、それに留まらず実際に確立された解析系を利用してこれまでまったく知見のなかった 20 を越える遺伝子の機能について知見を得ており、糸状菌の病原性におけるカルシウムシグナル系の重要性について明らかにした。これらの知見は、今後の糸状菌のポストゲノムにおける遺伝子解析法に新たな道を開いただけでなく、本菌の新たな防除法につながる知見を得たものとして、高い価値のあるものである。よって学位申請者 NGUYEN BAO QUOC は、博士（学術）の学位を得る資格ありと認める。	