

氏名	高 原 浩 之
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	農 学
学位授与番号	博甲第2827号
学位授与の日付	平成16年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科エネルギー転換科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	マメ科植物病原菌の病原性関連遺伝子の探索と形質転換系の作成
論文審査委員	教授 白石友紀    教授 一瀬勇規    教授 豊田和弘

#### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、褐紋病菌の病原性関連遺伝子スクリーニングの第一段階として、植物への感染過程に変動する遺伝子の同定を試みた。サブトラクト法 (suppression subtractive hybridization; SSH) を用いて褐紋病菌の孢子発芽時に発現が増減するクローンの選抜を試み、それぞれ 232 個と 128 個の候補クローンを単離した。それらの部分塩基配列を決定するとともに、未発芽孢子の発芽孢子から調製された mRNA をプローブとしたマクロアレイ解析によって単離したクローンの発現を確認し、発現変動クローンを同定した。続いて、それらクローンの感染過程における重要性を明らかにする為に、RT-PCR 法を用いて半定量的な発現解析を試みた。21 の up-regulated クローンと 11 の down-regulated クローンの発現を、モデル表層である paper sheet 上と植物上 (宿主エンドウ葉、非宿主ササゲ葉) で調べたところ、多くのクローンが菌の感染過程および植物への感染時に発現していることが確認された。さらに、本菌の形質転換系の確立を目指し、褐紋病菌への外来遺伝子の導入法の検討と、遺伝子タギング法を用いた褐紋病菌変異体の作出を試み、プロトプラスト-PEG 法を用いた形質転換系を確立した。現在は、確立した形質転換系を利用し、感染時に発現が認められる褐紋病菌遺伝子の機能を明らかにする為、loss of function の実験を進めている。

エンドウ褐紋病菌は自然宿主であるエンドウ以外にマメ科のモデル植物である *Medicago truncatula* にも病原性を示すことが最近明らかにされ、植物-病原菌相互作用のモデル化が進行している。糸状菌の病原性の本質 (共通性) を明らかにするため、炭そ病菌 (*Colletotrichum trifolii*) を新たな候補菌とし、本菌の変異体ライブラリーの作成を目指し、近年、糸状菌の有効な形質転換系として注目されているアグロバクテリウム法 (AtMT法) を用いた形質転換系を確立した。様々な条件設定から導かれた形質転換効率は比較的高く、random mutagenesis を目的とした本実験には有効であった。TAIL-PCR法を用いたタグ領域近傍の単離も可能で、変異体系統の原因遺伝子を速やかに同定できる点で、本系は優れた解析ツールとなることを示した。

## 論文審査結果の要旨

植物病原菌の分子生物学的研究が急速に進展し、それらの非病原性遺伝子 (Avr) が次々と明らかにされている。しかしながら、病原性遺伝子 (Vir) に関する研究は、一部の菌を除き解析が遅れている。本研究は、世界でも研究が遅れているマメ科の植物病原菌である *Mycosphaerella pinodes* [エンドウ褐紋病菌] の病原性関連遺伝子の検索と本菌並びに *Colletotrichum trifolii* [アルファ炭疽病菌] の形質転換法の開発に関する内容である。本研究では、褐紋病菌の病原性関連遺伝子を明らかにするため、感染の第1段階である発芽の過程で変動する遺伝子を、suppression subtractive hybridization (SSH) を用いてクローニングした。まず、胞子発芽時に発現が増減する、それぞれ232個と128個のcDNAクローンを選抜し、それらの部分塩基配列を決定した。次に、それらを搭載したマクロアレイの解析によって発現が変動するクローンを選抜した。続いて、21のup-regulatedクローンと11のdown-regulatedクローンの発現変動について、胞子を接種したモデル表層 (paper sheet) 上と植物上 (宿主エンドウ葉、非宿主ササゲ葉) で、経時的にRT-PCRで調べ、植物感染時に特異的に発現が制御される遺伝子を見いだした。さらに、これらの遺伝子の機能解析を進めるため、2菌種の形質転換系を作成した。褐紋病菌への外来遺伝子の導入・形質転換法はプロトプラスト-PEG法、また、炭そ病菌はアグロバクテリウム法 (AtMT法) が有効であることを明らかにした。これらの知見は、遅れていたマメ科病原菌また *Ascochyta* 属菌の分子生物学的研究に道を開くだけでなく、モデル植物である *Medicago truncatula* と病原菌との相互作用研究の進展と植物保護に向けた応用研究に手掛かりを与えるものである。以上のことから、本論文は、博士 (農学) の学位に値すると判定した。