

# イネいもち病菌の分子遺伝学的解析研究の現状

高知大学農学部生物資源科学科 <sup>と</sup>土 <sup>さ</sup>佐 <sup>ゆき</sup>幸 <sup>お</sup>雄  
 茨城大学農学部生物生産学科 <sup>あ</sup>阿 <sup>く</sup>久 <sup>つ</sup>津 <sup>かつ</sup>克 <sup>み</sup>己

イネいもち病は、日本を含むイネ栽培地域で最も重要な病害の一つであるが、近年、植物病理学におけるモデル実験系としても世界的に注目されるようになった (VALENT, 1990)。特に 1980 年代より DNA 解析技術が糸状菌に適用できるようになると、多くの研究者が本菌を材料として用いるようになり、現在では植物病原糸状菌の中で最も DNA 解析の進んだ菌の一つとなっている (VALENT and CHUMLEY, 1991)。本稿では、いもち病菌における DNA 解析の現状を、この新しい技術が植物病理学の諸分野に及ぼした波及効果を考えながら概観したい。

## I RFLP 分析

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: 制限酵素断片長多型) は、近年、糸状菌ゲノム解析の有用なマーカーとして利用されるようになったが (MICHELMORE and HULBERT, 1987)、いもち病菌の解析にも多方面で応用され、大きな成果を上げている。

### 1 類縁関係の解析への応用

いもち病菌は、イネ菌のほかに、メヒシバ菌、シコクビエ菌など多くの菌群が存在する (加藤・山口, 1980; 八重樫, 1981)。多賀 (1989) は、種々の宿主由来のいもち病菌からミトコンドリア DNA を抽出し、その制限酵素切断パターンを比較した。その結果、イネ菌、シコクビエ菌、オヒシバ菌、シナダレスズメガヤ菌は相互に近縁であるが、メヒシバ菌はこれらと遠縁であることを示唆する結果を得た。これは、rDNA をプローブとして用いた核 DNA の RFLP 分析によっても支持された。最近、より広範な宿主から分離された菌株を用いて分析が進められ (森ら, 1993; 林ら, 1993)、単一コピープローブを用いた核 DNA の RFLP 分析の結果をもとに、いくつかの表型的樹状図 (phenogram) が描かれている (BORROMEO et al., 1993; LEBRUN et al., 1991)。

### 2 RFLP 地図の作成

核 DNA の RFLP は、それを示す 2 個体を交雑してその子孫における分離を調べると、通常、単純なメンデル遺伝を示す。そこで、多くの RFLP について分離分析を行えば、それらの連鎖地図を作成することができる。この場合のプローブとしては、通常ゲノム上の単一コピー

を検出できるものを用いる。したがって、地図上にはプローブの位置がプロットされる。LEONG とその共同研究者 (BUDEE et al., 1993; SKINNER et al., 1993) はこの方法を用いて、いもち病菌の RFLP 地図を作成した。いもち病菌の染色体数は  $n=6$  であるとされている (YAEGASHI and HEBERT, 1976; TANAKA et al., 1979; LEUNG and WILLIAMS, 1987)。従来、このような細胞学的知見と遺伝解析より得られた連鎖群を対応づけることは、菌類においてはきわめて困難であった。しかし、近年電気泳動法の改良により、染色体をゲル上で分離し、“electrophoretic karyotype” を分析することが可能となった (SKINNER et al., 1991)。特に、CHEF (Contour-clamped homogeneous electric field) 電気泳動法の開発は、これをさらに容易にした (CHU et al., 1986)。LEONG のグループは、本法を用いて、いもち病菌の各染色体を分離することにほぼ成功し、 $n=7$  であると結論した (BUDEE et al., 1993; SKINNER et al., 1991, 1993)。さらに、このゲルをサザンプロッキングし、各連鎖群の代表的な RFLP マーカーをプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、RFLP 連鎖群と染色体との対応関係を明らかにした。同様の試みは VALENT のグループによっても報告されているが (HAMER et al., 1989; VALENT and CHUMLEY, 1991; SWEIGARD et al., 1993)、両グループの報告に共通して興味深い点は、ゲル上で分離された各染色体のサイズが菌株間でかなり異なる (多型が認められる) こと、さらに転座が確認されたことである。これは、いもち病菌が染色体レベルにおいてかなりダイナミックな変異を起こしていることを示唆しており、本菌の生殖的隔離、病原性変異等との関連において興味深い。

### 3 MGR と Parallel RFLP マッピング

HAMER et al. (1989) は、イネいもち病菌の核ゲノム中に高頻度に存在する繰り返しの配列のファミリーを見だし、これを MGR (Magnaporthe grisea repeat) と命名した。その特徴は次のとおりである。①すべての染色体上に散在する。②ファミリーのメンバーの間でかなりの多型を示す。③イネ菌にはゲノム当たり 40~50 コピー存在するが、イネ科雑草菌のゲノム中には非常にわずしか存在しない。この配列は、いもち病菌のゲノム解析、さらに系統関係の解析、生態学へと多方面に利用されている (HAMER, 1991)。

彼らはまず、MGRをRFLP地図の作成に応用した。すでに述べたように、RFLP地図作成のためにプローブとして通常ゲノム上に単一コピー存在するものを用いるが、これは多コピー存在するものを用いると多数のバンドが現れ、解析が困難になるためである。しかし、多コピー存在するものであっても、MGRのようにゲノム上に散在し、しかも個体(菌株)間にコピー数の極端に差があるものであれば、逆に有用なプローブとなる。すなわち、多コピーを持つイネ菌とほとんど持たない雑草菌を交雑し、そのF<sub>1</sub>集団においてイネ菌の各サイズのMGRバンドが現れるか否かを調べてゆけば、一つのプローブで一度に多くの遺伝子座の解析ができることになる。この方法で、地図上にはゲル上のバンド名がプロットされる。このような散在繰り返し配列を用いたRFLPマッピングは、Parallel RFLPマッピングと呼ばれている(RUVKUN et al., 1989)。HAMERら(HAMER and GIVAN, 1990; ROMAO and HAMER, 1992)は本法を用いて、いもち病菌のRFLP地図を作成し、表現型形質に関与するいくつかの遺伝子をその上にプロットした。

#### 4 MGRとDNAフィンガープリント

MGRは菌群の起源、系統関係の推定にも応用された。HAMER et al. (1989)は、世界中から集めたイネ菌がMGRを有しているのに対して、イネ科雑草菌がそれをほとんど持たない事実から、世界各地のイネ菌は共通の祖先集団から一元的に由来したものであり、イネ菌とその他の菌群は遺伝的に隔離されたまま独自に進化してきたと考えた。さらに、1980年代初頭にブラジルで発生したコムギいもち病菌はMGRをほとんど持たないことから、本菌はイネ菌由来ではなく、イネ科雑草菌に由来すると考えた(HAMER, 1991)。

ところで、ゲノムDNAを適切な制限酵素で切断し、電気泳動後ゲノム中に多コピー散在する配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行うと、バーコード様のバンドが得られるが、これが個体(菌系)、あるいは系統に特有のパターンを示し、それらの識別に利用できることがある。このような遺伝子型特異的RFLPパターンを広義にDNAフィンガープリントという(狭義にはJEFFREYS et al., 1985参照)。LEVY et al. (1991)はMGRをいもち病菌のフィンガープリンティングのプローブとして利用し、アメリカ合衆国で30年間にわたって採集されたイネ菌株について、それらのpathotypeとフィンガープリントが示す系統関係の間に関連があるかどうかを検討した。その結果、同じpathotypeに属する菌株はほぼ同じフィンガープリントを示すことが明らかとなった。このことから、彼らはpathotypeは比較的安定なものであり、そのおのおのはほぼ同一系統群に属する菌系から構成されていると考えた。イネの栽培の歴史

の長いアジアにおいて同様なことが成り立つかどうかは今後の検討を待たなければならないが、上記の報告はいもち病菌の生態学、系統進化学に新局面を開いた価値ある成果といえよう。

## II 遺伝子操作系の確立

遺伝子のクローニング、クローニングした遺伝子の機能・発現の解析には形質転換系の確立が不可欠である(LEONG and HOLDEN, 1989)。いもち病菌においては、①栄養要求性突然変異体をAspergillusの野生型遺伝子をマーカーに持つプラスミドベクターで形質転換して原栄養体を選抜する系(PARSONS et al., 1987; DABOUSSI et al., 1989)、②hygromycin B抵抗性遺伝子をマーカーに持つベクターで形質転換する系(LEUNG et al., 1990)が確立された。これらの系を利用して、ある遺伝子が感染成立に不可欠か否かを検討した事例が報告されているので、紹介したい。

SWEIGARD et al. (1992 a)は、いもち病菌のクチナーゼ遺伝子をクローニングし、*CUT1*と名づけた。次にSWEIGARD et al. (1992 b)は*CUT1*の中間領域に形質転換の際の選択マーカーを挿入したベクターを構築した。これらを用いていもち病菌野生株の形質転換を行い、破壊された*CUT1*が相同組換えによって正常*CUT1*と置換された形質転換体を得た。これらは予想どおり*CUT1*を発現していなかったにもかかわらず、宿主に対し親株と同程度の病原性を示した。このことから、彼らは*CUT1*は病原性に不可欠ではないと結論した。

## III 非病原性遺伝子のクローニング

FLOR (1956)は、アマとアマのさび病菌の間の特異性を遺伝学的に研究し、「宿主の抵抗性遺伝子それぞれに対し、特異的に対応する(非)病原性(力)遺伝子が寄生者に存在する」というGene-for-gene theory(遺伝子対遺伝子説)を提唱した。この理論はいもち病(SILUE et al., 1992)を含む多くの宿主-病原菌系で成り立つことが証明されている(DAY, 1974; VANDERPLANK, 1984)。この非病原性遺伝子の実体がどのようなものかは、病原菌の病原性機構、レース-品種間特異性の成立機構にかかわる重要な問題である。糸状菌の非病原性遺伝子のクローニングに成功した最初の例は、トマト葉かび病菌(*Cladosporium fulvum*)の*avr9*であるが(VAN KAN et al., 1991)、この場合には非病原性遺伝子は抵抗性遺伝子に認識される特異的エリシターの産生を直接コードし、それに対立する病原性遺伝子をもつとされていたレースは*avr9*のコード領域を全く欠失していた。

非病原性遺伝子のクローニング戦略としては、一般に次の三つが考えられる。①遺伝子産物からさかのぼる。

遺伝子産物が判明しているか、あるいは推測されている系においてはこの方法が最も簡単であろう。先に述べた *avr9* の例はこの方法を用いている。すなわち、*avr9* の産物と推測される特異的エリクターのアミノ酸配列がわかっていたので、これを参考にオリゴヌクレオチドプローブを合成し、cDNA ライブラリーをスクリーニングしてポジティブクローンに到達した。しかし、いもち病菌の場合はそのような産物はまだ知られていない。②機能の相補。非親和性レースのゲノム DNA ライブラリーで親和性レースを形質転換し、非親和性に形質転換したものをスクリーニングする。いもち病菌においては形質転換系が確立しているため、本法は原理的には可能であるが、非親和性形質転換体のスクリーニングに多大な労力を要する。③連鎖したマーカーからのクロモソームウォーキング。いもち病菌においてはすでにかなり詳細な RFLP 地図が作成されているので、利用可能である。VALENT et al. (1991) は *Avr1-CO39* (イネ品種 CO39 に対する非病原力遺伝子) に連鎖した MGR マーカーを報告している。VALENT のグループは、②と③の手法を用いていもち病菌の非病原力遺伝子のクローニングを試みた (CHUMLEY and VALENT, 1991)。その結果、いくつかの非病原力遺伝子のクローニングに成功したようである (VALENT et al., 1993)。

#### IV 転移因子

染色体上の位置を変える DNA 配列、転移因子 (transposable element) は、現在では原核、真核を問わず、広く生物界に存在することが知られている (FINNEGAN, 1989)。最近、植物病原糸状菌においても、転移因子が次々と発見されるようになった。

転移因子は、大きく二つのグループに分けることができる (FINNEGAN, 1989)。一つは、DNA から DNA へと直接転移するものである。植物病原糸状菌において最初に報告された転移因子は、*Fusarium oxysporum* に見いだされた *Fot1* (DABOUSSI et al., 1992) であるが、これはこのグループに属するものである。もう一つのグループは、RNA 中間体を介して転移するもので (DNA→RNA→DNA)、レトロトランスポゾンと呼ばれている。その転移機構の性質上、逆転写酵素を持つことが特徴となる。レトロトランスポゾンは、その構造からさらに LTR レトロトランスポゾンとポリ A タイプ (あるいは non-LTR, LINE1 様) レトロトランスポゾンに大別される。前者はレトロウイルスと非常によく似た構造を持つもので、その特徴は両端にある LTR (Long Terminal Repeat) と呼ばれる同方向反復配列である。後者は LTR をもたず、一方の鎖の 3' 末端に特徴的なポリ A 配列を持つ。VALENT and CHUMLEY (1991)、HAMER (1991) は、

MGR がポリ A タイプレトロトランスポゾンである可能性を示唆している。

最近特に注目を集めているのは、LTR レトロトランスポゾンである。MCHALE et al. (1992) はトマト葉かび病菌に LTR レトロトランスポゾン (約 7000bp) を見いだし、*CfT-1* と命名した。これは、植物病原糸状菌における LTR レトロトランスポゾンの最初の報告であった。続いて、DOBINSON et al. (1993) は、シコクビエいもち病菌 (*Eleusine* 属に寄生する菌) から LTR レトロトランスポゾンを分離し、*Grasshopper* と名づけた。さらに LEONG のグループ (土佐ら, 1993; LEONG et al., 1993) は、イネいもち病菌に LTR レトロトランスポゾン (約 5500bp) を見いだし、*Maggy* と命名した。これらの報告で、見いだした因子をレトロトランスポゾンとした根拠は構造上の類似性、及び状況証拠によるもので、転移することの証明はされていなかった。ところが、LEBRUN et al. (1993) は、いもち病菌に導入した *miaD* (*Aspergillus nidulans* の硝酸還元酵素遺伝子) でレトロトランスポゾンをトラップすることに成功した。この因子は塩基配列レベルで *Maggy* とほぼ同じものであった。このことから、*Maggy* が転移能力を持つことが間接的に証明された。

このように、最近になっていもち病菌を中心にレトロトランスポゾンの報告が相次いでいるが、DOBINSON et al. (1993) の *Grasshopper* の報告は系統進化的にも興味深い知見をもたらした。本因子は、日本、ネパール、インド、西アフリカ由来のシコクビエ菌には存在するが、他の地域由来のシコクビエ菌、及び他の単子葉植物由来の菌には存在しなかった。このことから彼らは、*Grasshopper* は、いもち病菌の宿主特異的分化型が形成された後、比較的最近、水平移動によってシコクビエ菌群の一部に入りこんだと考えた。さらに、現在 *Grasshopper* を持っている菌系は、シコクビエの伝播に伴って上記の国々に分散していったクローン集団であるとした。この報告は、レトロトランスポゾンがいもち病菌とその宿主の共進化 (KATO, 1978) の研究の有用なマーカーとなることを示しているように思われる。ところで、水平移動が起こったとすれば、どのような機構が働いたのだろうか。LTR レトロトランスポゾンは構造的にレトロウイルスと非常によく似ており、細胞外に出る相を欠いたレトロウイルスと考えることもできる (BALTIMORE, 1985)。レトロウイルスが感染性を失って LTR レトロトランスポゾンになったのかどうかは議論の余地のあるところであるが (GRANDBASTIEN, 1992)、もしそうだとすれば水平移動を説明しやすい。*CfT-1* が見いだされたトマト葉かび病菌の菌体内には、逆転写酵素活性をもつウイルス様粒子が認められている (MCHALE et al., 1992)。

以上のほかに、さらに別のタイプのトランスポゾン様因子が、いもち病菌に見いだされている (SONE et al., 1993)。これからも、植物病原糸状菌からの転移因子発見の報告はさらに増えるであろう。転移因子はゲノムに様々な変異を引き起こし、またゲノムのダイナミックな再構成にも関与する (FINNEGAN, 1989)。これまでフィールドで観察されてきた植物病原菌の変異に、転移因子がどのようにかかわっているのかが興味深い問題である。

### おわりに

以上のように、いもち病菌のDNA解析に関する報告は最近急激に増加しているが、その成果をまとめると次のようになる。第一に、DNAを分類学、生態学、系統進化化学における有効なマーカーとして利用できることが明らかになった。第二に、種々の遺伝子をクローニング、解析するための準備段階が終わった。すなわち、遺伝子操作系を確立し、一方で詳細なRFLP地図を作成し、その上に表現型にかかわる遺伝子をプロットできた。この二つを両輪として、今後多くの遺伝子のクローニング、その機能の解明が加速的に進んでいくであろう。いもち病菌の病原性機構、その変異機構がDNAレベルで明らかにされるのも、そう遠い将来ではないように思われる。

本稿を終えるにあたり、最近のいもち病研究の動向について有益なご示唆を賜った神戸大学農学部 加藤 肇博士、岡山大学教養部 多賀正節博士に心から感謝の意を表す。

### 引用文献

- BALTIMORE, D. (1985) : Cell 40 : 481~482.
- BORROMEO, E.S. et al. (1993) : Phytopathology 83 : 393~399.
- BUDDE, A.D. et al. (1993) : In Genetic maps. —Locus maps of complex genomes—. Six edition Ed. by S.J. O'Brien. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 3.110~3.111.
- CHU, G. et al. (1986) : Science 234 : 1582~1585.
- CHUMLEY, F. G. and B. VALENT. (1991) : In Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants. Ed. by S. S. Patil et al. Springer-Verlag. pp.131~138.
- DABOUSSI, M. J. et al. (1989) : Curr. Genet. 15 : 453~456.
- et al. (1992) : Mol. Gen. Genet. 232 : 12~16.
- DAY, P. R. (1974) : Genetics of host-parasite interaction. Freeman, San Francisco.
- DOBSON, K. F. et al. (1993) : Mol. Plant-Microbe Interact. 6 : 114~126.
- FINNEGAN, D. J. (1989) : Trends Genet. 5 : 103~107.
- FLOR, H. H. (1956) : Adv. Genet. 8 : 29~54.
- GRANDBASTIEN, M. (1992) : Trends Genet. 8 : 103~108.
- HAMER, J. E. (1991) : Science 252 : 632~633.
- and GIVAN, S. (1990) : Mol. Gen. Genet. 223 : 487~495.
- et al. (1989) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 9981~9985.
- 林 長生ら (1993) : 日植病報 59 : 270 (講要).
- JEFFREYS, A. J. (1985) : Nature 316 : 76~79.
- 加藤 肇・山口富夫 (1980) : 関東病虫研報 27 : 14~15.
- KATO, H. (1978) : Gamma Field Symposia. 17 : 1~22.
- LEBRUN, M. H. et al. (1991) : In Rice Genetics II : Proceedings of the Second International Rice Genetics Symposium, 1990, IRRI, Philippines.
- et al. (1993) : In the Abstracts of an International Symposium on Rice Blast Disease. Univ. of Wisconsin-Madison, 1993, USA.
- LEONG, S. A. and HOLDEN, D. W. (1989) : Annu. Rev. Phytopathol. 27 : 463~481.
- et al. (1993) : In the Abstracts of an International Symposium on Rice Blast Disease. Univ. of Wisconsin-Madison, 1993, USA.
- LEUNG, H. and WILLIAMS, P. H. (1987) : Can. J. Bot. 65 : 112~123.
- et al. (1990) : Curr. Genet. 17 : 409~411.
- LEVY, M. et al. (1991) : Plant Cell 3 : 95~102.
- MCHALE, M. T. et al. (1992) : Mol. Gen. Genet. 233 : 337~347.
- MICHELMORE, R. W. and HULBERT, S. H. (1987) : Annu. Rev. Phytopathol. 25 : 383~404.
- 森 直樹ら (1993) : 日植病報 59 : 270 (講要).
- PARSONS, K. A. et al. (1987) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 4161~4165.
- ROMAO, J. and HAMER, J. E. (1992) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 5316~5320.
- RUVKUN, G. et al. (1989) : Genetics 121 : 501~516.
- SKINNER, D. Z. et al. (1991) : In More gene manipulations in fungi. Academic Press, Inc., NY. pp. 86~103.
- et al. (1993) : Theor. Appl. Genet. 87 : 545~557.
- SONE, T. et al. (1993) : Biosci. Biotech. Biochem. 57 : 1228~1230.
- SWEIGARD, J. A. et al. (1992a) : Mol. Gen. Genet. 232 : 174~182.
- et al. (1992b) : Mol. Gen. Genet. 232 : 183~190.
- et al. (1993) : In Genetic maps. —Locus maps of complex genomes—. Six edition. Ed. by S.J. O'Brien. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 3.112~3.117.
- SILUE, D. et al. (1992) : Phytopathology 82 : 577~580.
- 多賀正節 (1989) : In 植物病害と遺伝子工学. 大内成志・豊田秀吉編. 朝日出版社. pp.135~147.
- TANAKA, Y. et al. (1979) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 45 : 182~191.
- 土佐幸雄ら (1993) : 日植病報 59 : 272 (講要).
- VALENT, B. (1990) : Phytopathology 80 : 33~36.
- and CHUMLEY, F. G. (1991) : Annu. Rev. Phytopathol. 29 : 443~467.
- et al. (1991) : Genetics 127 : 87~101.
- et al. (1993) : In the Abstracts of an International Symposium on Rice Blast Disease. Univ. of Wisconsin-Madison, 1993, USA.
- VANKAN, J. A. L. et al. (1991) : Mol. Plant-Microbe Interact. 4 : 52~59.
- VANDERPLANK J. E. (1984) : Disease Resistance in Plants. 2nd ed. Academic Press, Inc., London.
- 八重樫博志 (1981) : 東北農試研報 63 : 49~125.
- YAEGASHI, H. and HEBERT, T. T. (1976) : Phytopathology 66 : 122~126.