



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	いもち病菌の日本菌系における遺伝子解析系の確立および病原性レース変異機構解析への応用
Author(s)	曽根, 輝雄
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第4162号
Issue Date	1997-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3122320
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32784
Type	doctoral thesis
File Information	4162.pdf



いもち病菌の日本菌系における遺伝子解析系の確立および
病原性レース変異機構解析への応用

北海道大学大学院農学研究科 農芸化学専攻 博士後期課程

曾根 輝雄

目次
(Table of Contents)

第1章 緒論	1
第2章 いもち病菌の交配実験系の確立	8
はじめに	8
第1節 いもち病菌交配系の検索	8
第2節 RFLPプローブの探索	11
第3節 カスガマイシン耐性遺伝子の分離	16
第4節 RAPDマーカーのスクリーニング	18
第5節 Bulk segregant analysis によるカスガマイシン耐性遺伝子付近の RAPDマーカーの検索	19
第6節 cross2107の交配実験系としての評価	20
第8節 戻し交配による稔性の改善	22
第8節 cross5307を用いたカスガマイシン耐性遺伝子のマッピング	23
第9節 小括	24
第3章 いもち病菌圃場分離株の解析	43
はじめに	43
第1節 DNAフィンガープリンティング用プローブの検索	43
第2節 pMG6015とMGR586の類似性	44
第3節 DNAフィンガープリンティングによる日本菌系の解析	46
第4節 パルスフィールドゲル電気泳動法による日本菌系の電気泳動核型解析	50
第5節 小括	53
第4章 RFLPプローブpMG6015の塩基配列解析	65
はじめに	65
第1節 MGSR1の発見	65
第2節 MGSR1の塩基配列の解析	70
第3節 MGSR1のゲノムにおける分散性	75
第4節 小括	76
第5章 イネいもち病菌Ina168の染色体長変異の解析	85
はじめに	85
第1節 保存菌株の核型変化の発見	85
第2節 核型変異の方向性	87
第3節 v 染色体の由来	87

第4節 rDNAの染色体長変異への関与	92
第5節 小括	94
第6章 総括	109
第7章 English Abstract	112
第8章 謝辞	116
第9章 参考文献	117

第1章 緒論

イネ (*Oryza sativa*) は世界の約半数の人々が主食としている主要作物である。いもち病はこのイネの最重要病害であり、全ての栽培地域で毎年多くの被害をもたらしている。いもち病の病徴は病原菌いもち病菌の寄生部位によって、葉、節、穂に病斑を生じることである。特に穂首（穂の付け根）に発生した場合には白穂となり、著しい減収をもたらす。我が国における1993年の大凶作はまだ記憶に新しいところであるが、その主要な原因はいもち病の大発生にあった。

いもち病防除において特に日本では集約的農業のために多くの薬剤、いもち病抵抗性イネ品種の育種、導入が盛んに行われ、かなりの効果を上げてきた。しかし、上述のように時に大発生することは、これらの薬剤、抵抗性品種の効果は恒久的なものではないことを裏付けている。このような現象の主因は薬剤、あるいは抵抗性遺伝子に耐性のいもち病菌の発生にあると考えられている。したがって、いもち病菌の変異機構は、病害防除における鍵となる。その解明のために、いもち病菌の遺伝子についての詳細な知見が必要であり、現在までに多くの研究者により少しずつ解明されてきた。

1. いもち病菌

いもち病菌は子う菌類で学名 *Magnaporthe grisea* (Hebet) Barr, 不完全世代名 *Pyricularia grisea* である。いもち病菌はイネの病原菌として有名であるが、小麦、シコクビエ、メヒシバなどの各種イネ科植物に寄生できる。さらに単一菌株の寄主範囲は狭く、強い宿主特異性を示す。従って各菌株は宿主の名前とあわせて、「〇〇いもち病菌、〇〇菌」と呼ばれることが多い。本論文においても以下そのように記すこととする。本来、*P. grisea* は、メヒシバイもち病菌について与えられたものであり、これに対しイネいもち病菌は *P. oryzae* とされており現在でも用いられているが、メヒシバ菌、イネ菌の相互交配が可能であることから、現在では *P. grisea* と呼ぶのが正しいとされている¹⁾。Hebert によって人工培地上で本菌の完全世代が発見されたのは1971年のことであり²⁾、現在でも自然状態では発見されていないが、宿主上での人工的な完全世代形成は試みられており、成果が報告されている³⁾。

いもち病菌は自然状態では宿主上で増殖する。増殖は通常不完全世代で起こる。分生孢子 (conidia) は罹病宿主上の分生子柄上に形成される。分生孢子は洋梨型で2個の隔膜を持つ。宿主上で発芽した分生孢子は、発芽管の先端に付着器 (appressorium) を形成し、侵入糸により宿主体内に侵入し、病斑を形成する。病斑では分生子柄が形成され、分生子が形成される。

完全世代は宿主上では見つからないが、培地上での形成から予想すると、次のようになる。まず、いもち病菌はヘテロタリックであり、完全世代形成のためには交配型の異なる2種の菌株が出会う必要がある。出会った菌糸は融合し、核融合が起こると、子う殻 (perithecium) が形成される。子う殻の中には8個の子う胞子が包まれた子うが数多く形成される。子う胞子は4核

からなるクロワッサン型である。

イネいもち病菌同士では少数の例外を除き、完全世代を形成しない。これは、イネいもち病菌に1種の交配型のみが存在するためではなく、雌性機能が失われたためだと考えられている。従って、完全世代を形成できるメヒシバ、シコクビエのいもち病菌などは、雌雄の両性を併せ持っているということになる。また、完全世代形成には少なくとも一方の株が雌性を持っている必要があることが知られている 4)。

2. 病原性レースとイネいもち病抵抗性遺伝子

いもち病菌はイネの病原菌としての研究の蓄積が豊富である。中でも最もよく研究されている分野の一つに病原性レースがある。病原性レースとは、植物病理学に特有の言葉であるが、そもそもは病原菌の宿主植物の品種に対する病原性の差によって分類した菌群のことであった。現在では、宿主植物の病害抵抗性遺伝子にもとづいて分類されている。イネいもち病菌は早くから遺伝子に基づくレース判別が行われた1つの例である。またいもち病の研究の歴史に於いて、最も早く遺伝子レベルの知見が得られたのはイネのいもち病抵抗性遺伝子であった。

日本のいもち病菌レースの研究は1960年代、山崎、清沢が始めた。彼らはそれまでの菌株のコレクションから7種の病原性が安定した菌株を選び、それまで抵抗性を示すものとされていたイネ品種の遺伝子解析を開始した 5)。これが発端となり、Table 1-1に示す9遺伝子が現在日本でレース検定に用いられている 6)。また、このとき用いられた7菌株は以後「日本判別菌系 (Japanese Differential Strains)」と呼ばれるようになった。これらの抵抗性遺伝子は頭文字Pi-が与えられているが、国際遺伝子命名法により、当時イネいもち病菌に与えられていた *Piricularia* の頭文字をとったものである。後ろの文字はその遺伝子が由来した品種、例えば、a, i ならばそれぞれ愛知旭、石狩白毛からとられている。

いもち病菌レース判別には各国によってそれぞれ別の判別体系が用いられているが、ここでは日本の判別体系についてのみ説明する。日本の判別体系では上記9遺伝子が用いられている。これらの抵抗性遺伝子にはTable 1-1のように3種類ずつ1桁、2桁、3桁のコード番号を与えてあり、それぞれを1つずつもった判別品種を育成し、そこにいもち病菌の胞子液を噴霧し、イネの反応を調べ、その菌株が侵すことができる抵抗性遺伝子のコード番号の和でレースは表される。つまり、正確には、病原性レースとはこれらの抵抗性遺伝子に対する反応にもとづいた、いもち病菌の分類のことである。

上記のようにイネのいもち病抵抗性遺伝子があっても全てのいもち病菌に抵抗性が発現するわけではないことから、イネのいもち病抵抗性が発現する為には、イネ側の抵抗性遺伝子だけではなくいもち病菌側の因子が必要であることがわかる。このような関係は他の植物-病原菌の間でも見られ、それを遺伝学的に説明するものとして、遺伝子対遺伝子説 (Gene-for-Gene Hypothesis) がある。

この説は1956年にFlorによって、アマとアマさび病菌について提唱されたもので⁷⁾、「植物の病原菌に対する抵抗性は植物の抵抗性遺伝子とそれと特異的に対応した病原菌の非病原性遺伝子の2つの優性遺伝子の相互作用によって発現する」というのがその基本的な考え方である。つまり、病原菌のレースを決めている遺伝子は非病原性遺伝子であり、この遺伝子に突然変異が起これば、レースが変化するのである。この非病原性遺伝子はレース変化の鍵を握るターゲットとして非常に重要である。

3. いもち病菌の宿主特異性の遺伝学的解析

今日、遺伝子解析は、その産物から遺伝子を想定し、クローニングするという方法が一般的である。しかし、いもち病菌の非病原性遺伝子、あるいはその変異機構を解析するためには、その産物が未知の遺伝子を解析しなければならない。上述の通り、いもち病菌は子のう菌類であるので、古典遺伝学的解析が可能である。遺伝学的解析によりその遺伝子の座を決定し、染色体歩行によりクローニングしようというわけである。

この目的を達成するには精度の良い遺伝子地図を作成する必要がある。そのためには稔性の高い交配系を得る必要がある。完全世代の発見以後、高稔性のシコクビエいもち病菌などを用いたアルビノ⁸⁾、薬剤耐性⁹⁻¹¹⁾などのマーカーについて解析が行われ、いもち病菌が通常の子のう菌と同じく遺伝解析が可能であることが確認された。しかし、上述の通り、イネのいもち病菌のほとんどは雌性機能を失っており、イネ菌相互での交配が非常に困難である。DuPontのValentは、多数の交配により高稔性交配系を育種することに成功し、イネ菌の非病原性遺伝子に関する解析を始めた¹²⁾。またNotteghemによる、イネ菌でありながら雌雄同株のGuy11の発見により¹³⁾、直接イネ菌の遺伝子解析が可能になると、多くの研究者たちがこの菌株を使って遺伝子解析を開始した。またHayashiらは、中国雲南省で分離された雌雄同株のイネ菌を使って解析を行っている¹⁴⁾。

イネいもち病菌の交配によって、現在では20以上の非病原性遺伝子の存在が示され、イネ-いもち病菌間で遺伝子対遺伝子説が成り立つことが示されている。また、非病原性遺伝子は多様であり、1遺伝子で支配されているものもあれば、複数の遺伝子座によって支配されているものもある¹⁵⁾。しかし、クローニングのためには、これらの遺伝子座は染色体地図上に座定される必要がある。現在いもち病菌に用いられているのはRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 制限断片長多型) マーカーとRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカーである。Du Pontのグループ¹⁶⁾とBuddle¹⁷⁾ら、林ら¹⁸⁾はRFLPマーカーによって染色体地図を作成し、非病原性遺伝子座を決定している。これらの座のうち、その形質が変異しやすく不安定なものはテロメア近傍にあることがわかっており、染色体レベルでの変異がレース変化に関与している可能性があることを示している¹⁹⁾。

遺伝学的に解析し染色体地図上にその座を決定した非病原性遺伝子は染色体歩行によってクローニングされる。これまでにクローニングされたいもち病菌の機能する非病原性遺伝子のうち2つが遺伝子地図の位置を利用してクローニングされた。この2つは、PWL2(ウィピングラブグラスに

対する非病原性遺伝子) 20)とAVR2-YAMO (イネ品種ヤシロモチに対する非病原性遺伝子) 19)である。形質転換実験によりこれらの遺伝子が宿主特異性を支配していることは明らかであるが、それらの遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸1次配列はPWL2が145アミノ酸、AVR2-YAMOが223アミノ酸からなり、それぞれデータベースに相同なものがなく、生化学的機能については不明である。

これらの研究の中で興味深いのは、その変異機構に関する知見である。特に、前述の2遺伝子是不安定であることが知られている。PWL2の変異株、すなわちPWL2を不活性化する突然変異は30kbの範囲にわたる配列の欠失が頻繁に見られた19)。またAVR2-YAMOでは、その遺伝子座が不安定性に関連していると報告されている。その遺伝子座は、染色体の末端、すなわちテロメアの近傍に位置する。ここでは、PWL2のような特異的な変異はなく、様々な変異が起こっていた20)。酵母でもこのような例は報告されており、テロメア近傍は遺伝的に不安定であると考えられる。

4. 圃場分離株の分子遺伝学的解析

分子遺伝学的解析法は現在広く普及している。いもち病菌においてもそれらにより多くのことが明らかになってきている。これらの方法は圃場分離株を直接解析できるので、得られたデータがフィールドにフィードバックしやすいという長所がある。その目的に用いられているのは、反復配列によるDNAフィンガープリンティングと、パルスフィールドゲル電気泳動法による核型解析である。圃場では毎年いもち病が発生している。このいもち病サンプルからいもち病菌を分離しレースを判定してみると数多くのレースの異なる菌株があることがわかる。これらのレースが違う菌株の系統関係を知ることで、いもち病菌集団の圃場における生態の一端が解析できる。全く関係のない菌株がそれぞれのレースを代表しているのか、それとも元々同じ菌株が変異を重ねて別のレースになったのか、その疑問に答えられる。

(1) DNAフィンガープリンティング

いもち病菌ゲノムには多くの反復配列が存在していることが知られている。これらは制限酵素で消化したゲノムDNAとのサザンハイブリダイゼーションで多数のバンドを生じる。この生じたバンドのパターンが各菌株に特異的なものになる。このバンドのパターンの類似度により菌株の同定・系統解析を行うことをDNAフィンガープリンティングという。この方法ではパターンで全ての解析が行われるので、それを得るのに使う反復配列プローブが非常に重要である。現在最も多く使われているのがHamerら21)のMGR586という配列である。この配列を使うと、約40本のバンドを生じ、様々な解析が可能になる。

この方法によって、アメリカ22) 23)、コロンビア24)の菌株が解析された。どの解析でも、限られた地域から6以上の系統が見つかり、それぞれの系統に属する菌株のレースは一定になる傾向があ

ることが知られている。このことは、上記の国々では、レースと系統との対応関係があり、異なるレースの菌株の出現は突然変異によるよりも、別系統の菌株の伝播によることが多いという傾向を示している。フィリピンの菌株の解析²⁵⁾では、同じ系統に属する菌株の病原性の詳細な解析が行われ、各系統に特異的に保存されている少なくとも1つの非病原性遺伝子があることが示された。この結果に基づき、フィリピンでは栽培地域の優占系統を調べ、その系統の特異的な非病原性遺伝子に対応した品種を育成し、導入するという、新しい防除法の開発が進められている²⁵⁾。

(2) 核型の多型性

パルスフィールドゲル電気泳動法は、染色体のような巨大なDNA分子も分離できる方法である²⁶⁾。この解析の結果から、いもち病菌の染色体は6～7本であることがわかっている。さらに同じ系統に属する菌株で、レースの他に染色体の構成(核型)にも多型性があること、イネいもち病菌には特異的に約2 Mb以下のミニクロモソームが存在していることがわかっている。

この方法で初めていもち病菌の圃場分離株の核型を解析したのはTalbotらである²⁷⁾。彼らは、アメリカと中国で分離された菌株の中で、同じ系統に属するものの核型を解析した。その結果、系統内で核型が著しい多型性を示していることを見つけた。しかし、これらの菌株は系統内でのレースの差異がなかったため、彼らは染色体再編成はゲノムの多様化をもたらすが、レース変化には中立的であると結論した。さらにOrbachら²⁸⁾は、核型の多型性が交配にどのような影響を与えるかを調べた。その結果、稔性の高い菌株に比べて、交配不可能な菌株が著しい核型の多型性を示すことから、核型の多型性と稔性との間に関連があることを示した。また、ミニクロモソームの一部が交配において正常に分離しないことを観察し、B様染色体(高等真核生物に見られる正常に分離しない染色体²⁹⁾)であることを証明した。これらのことは、いもち病菌が無性的に生殖し続けた結果、核型が多様化し、交配に影響を与えるまでになったと考察されている。しかし、核型の多様化とレース変化を結びつけた研究はまだない。

5. ゲノムの多様性をもたらすもの

いもち病菌ゲノムからこれまでに7種のトランスポゾンが発見されている(Table 1-2)。DNAフィンガープリンティングのプロープであるMGR586にも、レトロトランスポゾンの1部が含まれている³⁰⁾。さらに、このトランスポゾンがAVR2-YAMOのプロモーター部位に挿入されることにより宿主特異性遺伝子の変異に関わっていることが示されている。また、MAGGYが、熱ショックなどのストレスにより転写が活性化されることが示されている³¹⁾。これらのトランスポゾンがいもち病菌の多様化に寄与していることは十分に考えられる。

6. 日本産いもち病菌研究の重要性

本章では、現在までのいもち病菌の遺伝子解析に用いられている手法とそれによって得られた

成果について概説してきた。上述の通り、いもち病菌の遺伝子解析に関する研究成果はほとんどが海外の研究者により海外の菌株を用いて行われたものである。これは、日本のいもち病菌がその様な研究材料として不適であることを示しているのではない。むしろ以下の観点より、興味深い研究材料であることが期待される。

まず第一に、日本のいもち病菌は優れた非病原性遺伝子資源である。非病原性遺伝子は宿主側の抵抗性遺伝子と特異的に対応している。日本のいもち病抵抗性遺伝子の研究成果は優れており、それに用いられた菌株はその抵抗性遺伝子に直接対応した非病原性遺伝子を持っているはずである。いもち病抵抗性遺伝子に関する知見を生かすためには、その抵抗性遺伝子の解析に用いられた日本判別菌系が非病原性遺伝子のターゲットとするのが適当である。その観点から見て、日本は早くから抵抗性品種の導入が行われ、幾度となくその抵抗性の崩壊が報告されているので³²⁾、圃場分離株の中には非病原性遺伝子の変異が蓄積されていることが期待される。従って遺伝子レベルでの病原性レースの変異機構を解析するのに適当な材料である。

第二に、集団遺伝学的観点から、日本のいもち病菌は興味深い材料となり得る。Levyら²⁴⁾は、いもち病菌の病原性の多様化の要因として、抵抗性品種導入などの農業環境があることを示唆している。つまり、抵抗性品種が導入された地域ではその克服のためにいもち病菌は病原性レースを多様化させる、というわけである。その点からいえば、圃場から分離されたいもち病菌集団の動向を解析することにより、圃場における抵抗性遺伝子の導入とその抵抗性の崩壊の過程における病原菌の役割を解析できる可能性がある。またその過程がいもち病菌のゲノムに与えた影響を解析できる。言い換えれば、集団レベルでの病原性レースの変異機構を解析できる材料である。

第三に、日本は島国という特異な地理的条件を持っている。従って、本邦のいもち病菌は海外からの遺伝子の伝播を受けにくく、独自の病原性レースの進化をたどってきたことが期待される。

このような優れた材料でありながら、日本のいもち病菌についての遺伝子解析の報告はほとんどない。筆者はこれらの観点から、日本のいもち病菌を用いた病原性レース変異機構の解明の為の遺伝子解析系の確立を目的として一連の研究を行った。まず、日本産菌株、特に日本判別菌系を用いた交配実験系の確立を行った³³⁾。非病原性遺伝子の解析には至らなかったが薬剤耐性遺伝子をモデルとした実験で分子マーカーによる染色体地図の作成に成功し、有用な交配系であることを示した³⁴⁾。一方、日本菌系よりDNAフィンガープリンティングのプローブを得、その有用性を示した。また、日本菌系における系統 (Clonal Lineage) を初めて見だし、抵抗性の崩壊といもち病菌集団における系統の単純化の関係を明らかにした。さらにパルスフィールドゲル電気泳動により、日本産いもち病菌の染色体が非常に多様であることが明らかになった³⁵⁾。その様なゲノムDNA、あるいは染色体の多様化をもたらすものとして、レトロポソン様反復配列³⁶⁾及び染色体長変異株³⁷⁾を得、その解析を行った。

本論文は以上の解析の結果に加えて、日本のいもち病菌が優れた病原性レース変異機構の研究材料である^{38,39)}ことを報告するものである。

Table 1-1. Pathogenic race differentiating system and typical pathogenic races in Japan

Differential Varietis	Resist. gene	Code No.	Pathogenic races ^{b)}													
			001	003	007	017	031	033	037	101	102	103	107	137	303	333
Shin 2	<i>Pi-ks</i>	1	Sa)	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S
Aichi-asahi	<i>Pi-a</i>	2	-	S	S	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S
Ishikari-shiroge	<i>Pi-i</i>	4	-	-	S	S	-	-	S	-	-	-	S	S	-	-
Kanto 51	<i>Pi-k</i>	10	-	-	-	S	S	S	S	-	-	-	-	S	-	S
Tsuyuake	<i>Pi-k^m</i>	20	-	-	-	-	S	S	S	-	-	-	-	S	-	S
Fukunishiki	<i>Pi-z</i>	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yashiro-mochi	<i>Pi-ta</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	S
Pi No. 4	<i>Pi-ta²</i>	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S
Toride-1	<i>Pi-z^t</i>	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a) S: susceptible, -: resistant

b) Pathogenic race is responsible for the mass of code No. of susceptible resistance genes. For example, the pathogenic race of an isolate which can invade Shin 2 and Ishikari-shiroge is 005 (1+4). Conversely, we can tell which cultivar is susceptible for a particular pathogenic race. For example, the race 301 can invade Shin 2, Yashiro-mochi and Pi No. 4 (301 = 1 + 100 + 200).

Table 1-2. Transposons and transposon-like elements in *M. grisea*

Elements	Type	References
Pot 2	DNA-type transposon	40
MGR586	DNA-type transposon	30
MGR583	LINE (Long Interspersed Elements)	41
MAGGY (Fosbury)	LTR-type retroposon	42, 43
<i>grasshopper</i>	LTR-type retroposon	44
MGSRI	SINE (Short Interspersed Elements)	36, this report
MG-SINE1	SINE	45

第2章 いもち病菌交配実験系の確立

はじめに

第1章に記したとおり、一般にイネいもち病菌は雌性機能を失っており、本邦産のイネいもち病菌菌株同士では交配可能な組み合わせを得るのは非常に困難であることが予想された。従って交配実験系を得るためには、一方の菌株を稔性の高い菌株にする必要がある。本研究では、仏領ギアナから分離された例外的に雌性機能を持つイネいもち病菌Guy 11¹²⁾を用いて、交配可能な日本産いもち病菌菌株を検索し、得られた交配系を用いてモデル遺伝子カスガマイシン耐性遺伝子の分子マーカーによるマッピングを試みた。

現在まで分子マーカーとしてはRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)が主に用いられてきたが、近年ランダムオリゴヌクレオチドプライマーとPCR(Polymerase Chain Reaction)を用いるRAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)解析がWilliamsら⁴⁶⁾によって開発された。この方法はサザンハイブリダイゼーションを用いないため、RFLPよりも迅速に多型を解析することができ、またゲノム中の高度反復配列領域においても多型を検出する事ができるという利点を持つ。そこで本研究ではこのRAPDマーカーを用いて遺伝子地図の作成を目指した。

第1節 いもち病菌交配系の検索

日本産イネいもち病菌の中からGuy11と交配可能な菌株を検索した。

2-1-1 材料及び方法

菌株 イネいもち病菌Guy11及びTable 2-1に示す20株を用いた。

培地

ブルーニアガー培地：ブルーネエキス（明治製菓株式会社）4 g/L，ラクトース5 g/L，酵母エキス（オリエンタル酵母工業株式会社）1 g/Lをイオン交換水に溶解し，定容後，17 g/Lの寒天末（伊那食品工業株式会社）を加え，オートクレーブ滅菌（121℃，10分間）した。

オートミールアガー培地（交配用）：オートミール（雪印乳業株式会社）50 gを500 mlの逆浸透水に浸し，70℃で1時間保持した。これを木綿布（天竺）でろ過し，1 Lに定容し20 gの伊那寒天（伊那食品工業株式会社）を加え，121℃，10分間オートクレーブ滅菌した。

オートミールアガー培地（孢子形成用）：オートミールアガー培地（交配用）と同様にオートミール

を加熱・濾過し、15 g/Lのサッカロースを加え、1 Lに定容し、35 gの伊那寒天（伊那食品工業株式会社）を加えて121℃、10分間オートクレーブ滅菌した。

3%水寒天：寒天末（細菌培地用、和光純薬工業株式会社）3 gを100mlのRO水に加え、121℃で10分間オートクレーブ滅菌した。

方法

菌株の冷凍保存

本研究で使用した菌株は全て以下に示す方法⁴⁷⁾で冷凍保存した。まず、ブローンアガー培地をペトリ皿に用意し、オートクレーブ滅菌（121℃、10分）した、約5 mm四方に切った濾紙を隙間なく並べた。この中心に菌を接種し、菌糸が全体に広がるまで約2週間27℃で培養した。ここから濾紙をはがし、サンプル瓶に入れ綿栓をして、約10日間室温でデシケーター内で乾燥させた。この濾紙片をグラシン袋に詰め、-20℃で保存した。接種の際は、この濾紙片を直接培地に接種した。

完全世代形成法

八重樫⁴⁸⁾の方法を参考にした。まず、ガラスペトリ皿（直径9 cm）にオートミールアガー（交配用）を約50 ml いれ、そこにGuy11 と供試菌株を約3 cm 間隔で接種した。水分の蒸発を防ぐため周囲にパラフィルムを巻き人工気象機内で25℃、ブラックライト（FL-20S・BLBもしくはFL-10S・BLB）の光線下で対峙培養した。両菌株の菌糸が接触した時点でパラフィルムを外し、培養を続けた。

子のを殻を50個以上形成した交配については、子のを孢子由来の菌株の分離を試みた。培養期間中実体顕微鏡で注意深く検鏡し、子のを殻の成熟度を観察した。頸部が十分に伸長し子のを殻が成熟してきたら、子のを殻の体部が大きく膨らんでいるものを選択し、実体顕微鏡下で柄付き針で注意深く分離し、エタノールで拭いたスライドグラス上の1滴の滅菌水中に浮遊させた。ここに、エタノールで拭いたカバーグラスを上から乗せ、観察しながら子のを殻を押しつぶした。通常ここで子のを殻が放出されるが、放出されなかった場合はその子のを殻は未熟であったとみなし次の子のを殻を分離した。子のを殻が放出された場合はこれを光学顕微鏡下で観察し、子のを孢子の成熟度を観察した。子のを孢子が成熟し発芽が期待できる場合、カバーグラスをはがし、スライドグラス、カバーグラス上にある子のをを3%水寒天上に滅菌水で洗い流した。これをスプレッターで子のを孢子を傷つけないように静かに塗り広げ、27℃で一晩培養し子のを孢子を発芽させた。

実体顕微鏡下で観察し、子のをの発芽率（発芽した子のを孢子を含む子のを数/全子のを数）を計算した。子のを孢子が発芽している子のをを柄付き針を用いて孢子形成用オートミールアガー培地に移植した。蛍光灯下25℃で3～4日培養し分生孢子を形成させた。

分生孢子を形成させたら、この菌叢の1部を柄付き針で切り出し、3%水寒天上に菌叢面を下にして押しつけ、分生孢子を寒天上に付着させた。これをガラス針で塗り広げ、27℃で一晩培養し

た。実体顕微鏡下で観察し、胞子の発芽を確認し、隣接しているものと混在しないよう注意しながら発芽胞子をプルーニアガー培地のスラントに移植し、培養後保存した。

2-1-2 結果

Table 2-1に子とう殻形成の有無を示した。合計10株の菌がGuy11との交配で子とう殻を形成したが、その数は菌株によって異なっていた。そのうち5種の菌株（Hanawa 4, Hitachiohta II-9, Ina168, Ina72, Kitaibaragi 4）は、子とう殻を50個以上形成し、以後の交配実験に適しているものと思われる。また、これらの子とう殻は全て菌叢のGuy 11側に形成された。供試菌株側にも子とう殻を形成した菌株は無く、全ての菌が雌性を失った株である事が示された。

50個以上の子とう殻が形成された交配のうち、子とう胞子の発芽がみられたのは、Ina168×Guy11のみであった。40株のF1株が得られた。以後この交配をcross 2107と呼ぶこととする。F1株が得られなかった4種の交配のうち、Ina72×Guy11では子とうは分離できたものの、子とう胞子の発芽がみられたものと比較して子とう殻当たりの子とうの数が少なく、その子とうも光学顕微鏡下で観察すると子とうの中に子とう胞子が明確に観察されるものがほとんど無く、未熟なものであった（Fig.2-1）。また、その他の交配では子とう殻の中に子とうを形成しているものも得る事ができなかった。

交配2107より得られた菌株は子とうの中で発芽し、子とうを突き破って菌糸を伸長させたものがほとんどであった。また、子とうの中に8個の正常な形態の胞子入っている場合でも全てが発芽するものはなく、多くても2個しか発芽しなかった。子とうの発芽率は1.8%であった。

2-1-3 考察

本節では本講座保有のイネいもち病菌菌株をフランス領ギアナから分離されたGuy11と交配させ、その完全世代形成能を調査した。その結果、全20菌株中10株が交配可能であった。そのうちIna168とGuy11の交配cross2107からは目的通りF1菌株を得る事ができた。イネいもち病菌の交配実験は特に稔性が低く、野生株のみでは十分なF1株を得る事ができない場合がほとんどである。その為、一旦稔性の高いシコクビエいもち病菌と交配させ、F1のうち稔性の高い菌株を選択して戻し交配し、高稔性の菌を育種したり、イネいもち病菌同士で交配し、さらにそのF1菌株の近親交配を行う方法などで稔性を高めたりして遺伝解析が行われている。その様な観点から見ると稔性は低いものの（子とうの発芽率1.8%）日本産菌株を用いた交配が得られたことは以後の遺伝子解析に可能性を与えるものである。さらに菌株Ina168は日本判別菌系の1つであり、非病原性遺伝子資源として重要なものであるので、得られた交配を基本にして非病原性遺伝子の遺伝解析を行うことができることを示している。しかし、この交配を直接遺伝子解析に用いることができるかどうか確認する必要がある。

第2節 RFLPプローブの探索

cross 2107での遺伝子解析が可能かどうかを評価するには理論上1:1に分離する分子マーカーを用いるのが都合がよい。分子マーカーは染色体上の一点を示すものであり、交配すると、理論上1:1に分離するはずである。まず、この目的に用いるRFLPマーカーを探索した。

2-2-1 材料及び方法

使用菌株 イネいもち病菌 Ina72, Ina168, Guy11
 Escherichia coli JM109
 プラスミドpUC19

培地・試薬等

2YEG液体培地：RO水に、2 g の酵母エキス（オリエンタル酵母工業株式会社）、10 g のグルコースを溶解し、1 L に定容した。121 ℃、10 分間オートクレーブ滅菌した。

1M トリスー塩酸緩衝液（pH7.5, 8.0, 8.5）：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン121.14 g を計量し、約800 ml のイオン交換水に溶解し、濃塩酸でpHを調整した後、1 L に定容した。オートクレーブ（121℃、10 分間）し保存した。

0.5M EDTA (pH8.0)：EDTA・2Na・2H₂Oを186.12 g 計量し、約800 mlのイオン交換水に懸濁し、粒状の水酸化ナトリウムを用いてpHを調整した後、1 L に定容した。オートクレーブし保存した。

抽出用緩衝液：200 mMトリスー塩酸緩衝液（pH 8.5）、250 mM NaCl、25 mM EDTA、0.5% SDS . オートクレーブ（121 ℃、10分間）し保存した。

TE緩衝液：10mMトリスー塩酸緩衝液（pH 8.0）、1mM EDTA（pH 8.0）オートクレーブ（121 ℃、10分間）し保存した。

フェノール：核酸抽出用フェノール（和光純薬工業株式会社）を温水中で溶解し、0.1%のキノリノールを加え、1Mトリスー塩酸緩衝液（pH 8.0）を加え、攪拌し、静置した。水槽を取り除き、再度トリスー塩酸緩衝液を加えた。同様に攪拌、静置、水槽交換を数回繰り返した後、水槽をTE緩衝液にし、4 ℃で保存した。

クロロホルム：クロロホルムとイソアミルアルコールを24:1の割合で混合したものを使用した。

RNase A溶液：RNase A (From bovine Pancreas, SIGMA CHEMICAL Co., MO, USA)を20 mg/mlの濃度になるように10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5), 15 mM 塩化ナトリウム溶液に溶解し, 10 分間沸騰水中で加熱し, DNase活性を失活させたものを用いた。

プラスミド調製用 Solution I : 50 mM グルコース, 25 mM Tris · HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

プラスミド調製用 Solution II : 0.2 N NaOH, 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)

プラスミド調製用 Solution III (100 ml) : 5M CH₃COOK 60.0 ml, 氷酢酸 11.5 ml, イオン交換水 28.5 ml を混合し, オートクレーブ滅菌 (121℃, 10分) した。

リゾチーム液：リゾチーム (卵白リゾチーム, 和光純薬工業株式会社) を10 mg/mlの濃度になるように10 mMのトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で溶解して使用した。

LB培地：ポリペプトン (日本製薬株式会社) 10 g/L, NaCl 10 g/L, 酵母エキス (オリエンタル酵母工業株式会社) 5 g/Lを混合し, pHは2N NaOHを用いて7.0に調整した。オートクレーブ滅菌 (121℃, 10分) した。アンピシリンを添加する場合には10 mg/mlの溶液から50 μg/mlになるように加えた。

臭化エチジウム溶液：臭化エチジウム (SIGMA CHEMICAL Co., MO, USA) を10mg/mlになるように滅菌水に溶解して使用した。

水飽和1-ブタノール：約30 mlの1-ブタノールと滅菌水を50 ml容の遠心管にいれ, よく混合し, 900×g, 2000 rpm 5分間遠心し, 上清を使用した。

SOB培地：バクトートリプトン (DIFCO LABORATORIES, MI, USA) 5.0 g/L, バクトー酵母エキス (DIFCO) 1.25 g/L, NaCl 0.58 g/L, KCl 0.19g/L, MgCl₂ 2.03 g/L, MgSO₄·2H₂O 2.46 g/L. 寒天を添加する場合には寒天末 (ナカライテスク株式会社) を15 g/L になるように添加した。オートクレーブ滅菌 (121℃, 10分) 。

SOC培地：SOB 培地に3.60 g/L の割合でグルコースを添加して調製した。

5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド (X-gal) : 20 mg/mlのジメチルホルムアミド溶液として使用した。保存は、遮光して-20℃で行った。培地に添加する場合には4 mg/100mlになるように添加した。

イソプロピル- β -D-チオ-ガラクトシド(IPTG) : 100 mM (0.238 gを10 mlの滅菌水に溶解) の水溶液として使用した。保存は、1 mlずつ分注して-20℃で行った。培地に添加する場合は、2.38mg/100mlになるように添加した。

5×TBE (電気泳動用緩衝液) : トリス (ハイドロキシメチル) アミノメタン 54.0 g/L, ほう酸 27.5 g/L, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20.0 ml/L. 使用時にはイオン交換水で10倍に希釈した。

Denaturation buffer : 1.5 M 塩化ナトリウム, 0.5 M 水酸化ナトリウム

Neutralization buffer : 1.5 M 塩化ナトリウム, 0.5 M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン. pH は濃塩酸で7.5に調整した。

20×SSC : 0.3 M クエン酸3ナトリウム, 3.0 M 塩化ナトリウム. pHは1M塩酸で7.0に調整した。

Hybridization Buffer : 2.5 M 塩化ナトリウム (特級) , 5.0 % Blocking Reagent

Primary wash buffer : 6.0 M 尿素, 0.4 % SDS, 0.5×SSC

各制限酵素はTable2-2に示したメーカーより購入した。バクテリアルアルカリンフォスファターゼは東洋紡績株式会社より購入した。T4DNAリガーゼは、株式会社ニッポンジーンより購入した。

いもち病菌ゲノムDNAの抽出

Raeder and Broda の方法⁴⁹⁾を参考にした。振とうフラスコ (500 ml容) 中の2YEG液体培地に接種し、5日~10日間、27℃で振とう培養 (130 rpm) した。菌体をろ紙 (No. 1, 東洋濾紙株式会社) 上で減圧ろ過し、イオン交換水で数回洗浄した。得られた菌体のケーキを-80℃で凍結し、一晚凍結乾燥した。乾燥後、乳鉢にとり、乳棒で粉末状になるまでよくすりつぶした。50 mgを計量し、マイクロチューブ (1.5 ml) に入れた。抽出用緩衝液を500 μ l加え、ピペットチップ (10 μ l) を使って懸濁した。フェノール350 μ lを加え、均一になるまで (約20秒) 攪拌した。さらにクロロホルム150 μ lを加え、同様に混合した。微量高速遠心機で15000 rpm, 4℃で1時間遠心分離した。

上層をRNase A溶液25 μ lの入った別のマイクロチューブに移し（液は白濁した），37℃で60分間保持した．ここにフェノール500 μ lを加え混合し，15000 rpm，4℃で5分間遠心分離し上層を得た．フェノールとクロロホルム各250 μ lを加え，同様に5分間遠心し，上層を得た．この操作を繰り返した．ここに500 μ lのクロロホルムを加え，同様に遠心し上層を得た．この操作を繰り返した後，上層の0.54体積のイソプロパノールを加えて，よく振り混ぜた．15000 rpm，4℃で10分間遠心し，上清をデカンテーションで捨て，遠心管に残ったペレットを70%エタノールでよくすすいだ後，同様に遠心し，DNAのペレットを得た．ペレットをベルジャーで10分間減圧乾燥させた．50 μ lのTE緩衝液を加え，DNAを再懸濁し-20℃で保存した．

大腸菌プラスミドDNAの調製

Sambrookらの方法⁵⁰⁾に従って行った．

1. 大量調製

目的のプラスミドを導入した*Escherichia coli*のコロニーを滅菌した爪楊枝を用いて振とうフラスコ(500 ml容)中のアンピシリン添加LB培地に接種し，37℃で12時間振とう培養（130 rpm）した．培養液をFalcon 2070遠心管（Becton Dickinson and Co., NJ, USA）に移し，4℃，3000 rpmで20分間遠心分離し，上清を捨てた．得られたペレットに5 mlのSolution Iを加え，細胞を完全に懸濁した．ここにリゾチーム溶液1 mlを加え攪拌し，さらに10 mlのSolution IIを加え，数回反転し，室温に10分間放置した．細胞の溶解を確認し，7.5 mlのSolution IIIを加え，よく攪拌し，氷中で10分間放置した．4℃，3000 rpm，15分間遠心分離し，上清を50 ml容のテフロン遠心管に移した．ここに0.6体積のイソプロパノールを加え，20分間室温で放置し，核酸を沈澱させた．これを20℃，15000 rpm，20分間遠心分離し，上清を捨てた．ペレットを70%エタノールでよくすすぎ，再度遠心し，得られたペレットを減圧乾燥し，4 mlのTE緩衝液に溶解した．

上記の核酸溶液を3.8 ml，塩化セシウムを3.8 g，臭化エチジウム溶液を0.38 ml別の遠心管にとり，よく攪拌し，2000 rpm，室温で5分遠心しRNAを沈澱させた．上清を超遠心用チューブ（5PAシールチューブ，日立工機株式会社）にとり，日立分離用小型超遠心機CS120で20℃，80000 rpmで17時間遠心し，密度勾配によって生じたスーパーコイルしたプラスミドを含むバンドを抜き取り，マイクロチューブに移した．このDNA溶液から水飽和1-ブタノール溶液で臭化エチジウムを除去した．こうして得られたDNA溶液を滅菌水で3倍に希釈し，2.5倍のエタノールを加え，15000 rpm，4℃，5分間遠心分離してDNAを沈澱させた．このペレットを70%エタノールでよくすすぎ，減圧乾燥し，50 μ lのTE緩衝液に溶解して-20℃で保存した．

2. 少量調製

アンピシリンを含むLB培地2 mlを試験管（15 mm×180 mm）にいれ，目的のプラスミドを持つ*E.coli*のコロニーを滅菌したつまようじを用いて接種し，37℃，12時間振とう培養（23 mm，160

rpm)した。この菌液の1.5 mlをマイクロチューブにいれ、15000 rpm, 4 °C, 30秒間遠心分離して菌体を分離した。上清を捨て、100 μ lのSolution Iに懸濁した。200 μ lのSolution IIを加え、数回反転し、チューブ全体にSolution IIが行き渡るようにした。チューブを氷冷しながら、150 μ lのSolution IIIを加えた。チューブをさかさまにし、攪拌した。15000 rpm, 4 °C, 5 分間遠心分離し、上清を別のマイクロチューブに移した。等量のフェノール：クロロホルム混液を入れ、攪拌し、15000 rpm, 4 °C, 5 分間遠心分離し、水層を別のマイクロチューブに移した。2 倍量のエタノールを加え、15000 rpm, 4 °C, 5 分間遠心分離し、上清を捨て、1 mlの70 % エタノールを入れ、ベレットを洗浄した。15000 rpm, 4 °C, 5 分間遠心分離し、上清を捨て、得られたプラスミドDNAのベレットを減圧乾燥して50 μ lのTE緩衝液に溶解した。

いもち病菌ゲノムライブラリーの作成

いもち病菌ゲノムDNA (10 μ g) を制限酵素*Sau3AI* (0.05 U/ μ l) で2分間部分消化した。これをアガロースゲル電気泳動 (0.6 % アガロース, 1 $\times$ TAE) し、2~6 kbの領域のゲルを切り出し、フィルター付き遠心チューブ (SUPREC-01, 宝酒造株式会社) を用いて回収した。一方, pUC19DNA (5 μ g) を制限酵素*BamHI*で完全消化し、バクテリアルアルカリフォスファターゼで脱リン酸化した。両者をT4DNAリガーゼを用いて、ライゲーション反応を行った。反応液は、Hanahan の方法⁵¹⁾により*E. coli* JM109に導入し、LB-Amp-Xgal-IPTG培地上に形成された白色コロニーを別のLB-Amp培地上に釣菌した。これらのコロニーよりプラスミドDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動 (1% アガロースゲル, 1 $\times$ TAE) を行い、pUC19よりも分子量が大きいものを保存した。

サザンブロッティング

ECL direct nucleic acid labelling and detection system(Amersham, Buckinghamshire, UK) のプロトコルに従って行った。各レーンごと5 μ gのいもち病菌ゲノムDNAをTable 2-2に示す制限酵素で消化した。DNAはエタノール沈殿し、20 μ lのTEに溶解し、0.5 $\times$ TBE, 0.7%アガロース (SeaKEM GTG, FMC)中を電気泳動した。電気泳動終了後、臭化エチジウムで染色、撮影したゲルを、0.25M HClにひたし、色素が変色するまでつけ、さらに10分放置した。ゲルを水ですすぎ、denaturation bufferにひたし、30分室温で振盪した。ゲルを水ですすぎ、neutralizing bufferにひたし、30分室温で振盪した。水槽を20 $\times$ SSCで満たし、台を20 $\times$ SSCに浸したろ紙 (3MM paper, Whatmann International Ltd., Maidstone UK) 3枚で覆った。次に、ゲルをそのろ紙の上に乗せ、泡を取り除いた。ナイロンメンブタン (Hybond-N+, Amersham) をゲルのサイズに切り、ゲルの上に載せ、泡を取り除いた。メンブタンの上に20 $\times$ SSCに浸したろ紙(3MM paper, Whatmann) 3枚をのせ、5 cmの高さのペーパータオル (株式会社クレシア, キムサービスペーパータオル100) を載せた。ガラス板を置き、一晚置いた。その後、メンブタンを取り出し、0.4M NaOHで浸したろ紙(Whatmann 3MM paper) の上に置き、20時間放置し、DNAを固定した。メンブタンを5 $\times$ SSCで軽く (最高で1分間) すすぎ、ラップで包み

4℃で保存した。

プローブDNAの標識

ECL direct nucleic acid labelling and detection system (Amersham)を使用し、そのプロトコルにそって実験した。DNAを10 ng/ μ lに滅菌水で希釈し、必要量(10 ng/ml Hybridization Buffer)だけマイクロチューブに取り、沸騰水中で5分間変性した。氷中で5分冷却し、等量のDNA labelling reagentを加え、完全に混合した。さらにDNA labelling reagentと等量のグルタルアルデヒド溶液を加え、完全に混合し、37℃、10分間インキュベートした後、氷中で保存した。

ハイブリダイゼーション

ECL direct nucleic acid labelling and detection system (Amersham)を使用し、そのプロトコルにそって実験した。ハイブリダイゼーション・バッグ(コスモ・バイオ、ハイブリ・バック、200×300mm)にメンブランを入れ、125 μ l/cm²メンブランの割合でhybridization bufferを加えた。バッグから気泡を注意深く取り除き、ポリシーラーを用いてシールした。42℃、60 rpmで1時間プレ・ハイブリダイズさせた後、プローブDNAをhybridization bufferに加え、42℃、60 rpmで16時間ハイブリダイズさせた。メンブランをバッグから取り出し、primary wash bufferに浸し、42℃で10分間振とう(約40 rpm)する事を2回行い、さらに20分間振とうした。次に溶液を2×SSCに変え、室温で5分間振とう(約40 rpm)する事を2回行った。このメンブランにdetection reagentをかけ、1分間室温で発光させ、ラップにくるみ、X線フィルム(NIF RX100、富士写真フィルム株式会社)に10分間～数時間室温で感光させた。

2-2-2 結果

イネいもち病菌Ina72及びGuy11のゲノムDNAを調製し、それを用いてプラスミドpUC19によるゲノムライブラリーを作成した。そのライブラリーよりランダムに選択したクローンのプラスミドDNAを抽出し、それをプローブとしていもち病菌Ina168とGuy11のゲノムDNAとハイブリダイゼーションを行った。両者でRFLPを示すプローブが4種得られた。そのRFLPの例及び制限酵素の組み合わせをそれぞれFig. 2-2, Table 2-3に示す。

第3節 カスガマイシン耐性遺伝子の分離

本研究の最終的な目的はいもち病菌の宿主特異性に関する遺伝子である非病原性遺伝子の解析である。しかし、非病原性遺伝子の解析にはいもち病菌のイネ体上での病原性のアッセイが必要不可

欠である。このアッセイにはイネの生育のために約1カ月間を要する。従って、今回得られた交配系の有用性を検討するには他の表現型の遺伝子をモデルとして行うのが都合がよい。Ina168はカスガマイシン耐性であり、Guy11は感受性であるので、Ina168のカスガマイシン耐性遺伝子を表現型のモデル遺伝子とする。本節ではcross2107におけるカスガマイシン耐性遺伝子の分離を解析した。

2-3-1 材料及び方法

菌株 Ina168, Guy11, 2107交配後代

培地, 試薬

カスガマイシン水溶液：カスガマイシン塩酸塩（和光純薬工業株式会社）を50 mg/mlの濃度で滅菌水に溶解し、フィルター除菌した。

リン酸／クエン酸緩衝液（pH 5.0）：0.1Mクエン酸溶液と0.2Mリン酸2ナトリウム溶液を混合し、pH 5.0に調整した。

ポテトデキストロースアガー寒天培地：Potato dextrose agar (MERCK, Darmstadt, Germany)を使用した。

カスガマイシンを添加する場合は、下記の方法でpHを5.0に調製した。通常の2倍の濃度で調製し、オートクレーブ滅菌した。オートクレーブ滅菌したリン酸／クエン酸緩衝液と等量混合し、カスガマイシンを加え、シャーレに分注した。

実験方法

Hamada et al.⁵²⁾, Taga et al.⁹⁾の方法を参考にした。

供試菌株をポテトデキストロースアガーに接種し、3～5日間前培養した。乾熱滅菌したコルクボーラー（φ6 mm）を使って菌叢を打ち抜き、カスガマイシンの添加してある培地に移植した。3～4日間27℃で培養し、菌叢の直径を測定した。Ina168, Guy11を対照として耐性、感受性を判定した。

2-3-2 結果及び考察

1. カスガマイシン濃度の検討

カスガマイシン0～1000 mg/Lの範囲で両菌株の耐性を検討した。結果をTable 2-4に示す。10 mg/Lで、両者に差が見られたが、培養2～3日で、Guy11に耐性のセクタが出現したので安定した判定のために50～100 mg/Lが適当であると判断した。

2. cross2107における分離

cross2107交配後代における分離を判定した (Table 2-5) . Ina168の生育直径が濃度決定時に比べて小さいのは、セクタ出現を避けるために培養早期に判定を行った為である。交配後代はほとんどがIna168,あるいはGuy11と類似した反応を示し、それらをR (耐性) , S (感受性) としたが、親株と異なったパターンを示す株が2株あった。つまり、カスガマイシン濃度50 mg/LではIna168と同等の生育を示すものの、100 mg/Lでは明らかにIna168に比べて生育が劣っている株である。これらの株をMR (中程度耐性) とした。MRの2株を除くと耐性：感受性=1：1に分離しており、Ina168のカスガマイシン耐性は1つの遺伝子によって支配されていると考えられた。これによりカスガマイシン耐性遺伝子を *ksr-1* と呼ぶことにした。いもち病菌のカスガマイシン耐性遺伝子はTagaらにより解析され、複数の遺伝子があることが確認されている⁹⁻¹⁰⁾が、*ksr-1* とそれらの遺伝子の関係は不明である。それらの菌株が保存されており、交配可能であれば解析できるが、本研究では *ksr-1* はモデル遺伝子であるので、その様な解析は不必要であるため行わなかった。

第4節 RAPDマーカーのスクリーニング

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカーはRFLPに比べて迅速な実験が可能で、Bulked segregand analysis⁵³⁾により、ある特定の遺伝子の周辺の遺伝子地図の作成に用いられている。本研究においても、カスガマイシン耐性遺伝子をモデルとして、RAPDマーカーによる解析が可能であるかを検討した。その第一段階として、cross2107の両親の間で多型性を示すRAPDプライマーを検索した。

2-4-1 材料及び方法

使用菌株 稲いもち病菌 Ina168, Guy11

使用プライマー Operon 10-mer Kits (Operon Technologies, Inc., CA, USA) のキット A, B, D, E, F, G, Hを用いた。

試薬

dNTP mixture：濃度10mMのdATP, dTTP, dCTP, dGTP (宝酒造株式会社) 溶液を、各1.25 mMになるように滅菌水で希釈したものを用いた。

Random primer：マイクロチューブ中のDNAのペレットを、滅菌水で 50 pmol/ μ lになるように希釈したものを用いた。

0.5×TBE, 臭化エチジウム溶液：本章第2節参照.

PCR反応

Table 2-6に示す様に反応液を調製し、マイクロチューブに入れた。反応液の濃縮を防ぐため、ミネラルオイル (SIGMA CHEMICAL COMPANY, MO, USA) を1滴加えて反応液の表面を覆った。反応はDNAサーマルサイクラー PJ-1000 (Perkin-Elmer Corporation, CA, USA) を用いて Table 2-7に示す条件で行った。反応終了後、反応液の 6 μ lを取り、1.5% アガロース(H14, 宝酒造)上で 50V定電圧で電気泳動した。緩衝液は 0.5×TBE, 泳動層はMupid (コスモ・バイオ株式会社) を用いた。泳動後のゲルを臭化エチジウム溶液で20分間染色し、UVトランスイルミネーター (フナコシ薬品株式会社) で増幅されたバンドを確認し、ポラロイドカメラ(MP-4-LAND CAMERA, POLAROID, MA, USA)で撮影した。

2-4-2 結果

増幅されたDNAの電気泳動パターンは、各プライマーによって異なり、多数のバンドが見られるものもある一方で、全く増幅しないものもあった。2つの鋳型ゲノムDNA間で特定のバンドの有無が認められるもの、あるいは明らかにバンドの濃さが異なるものを、多型があると判定した。供試した140個のプライマーのうち、Ina168とGuy11間で増幅断片が多型を示すRAPDプライマーを47個が多型を示した。その配列を、Table 2-8に示す。多型を示した配列に共通性はなかった。また多型を示したプライマーによる増幅のパターンの例をFig. 2-3に示した。これらのプライマーを用いて、次節でカスガマイシン耐性に連鎖したマーカーとなりうるものを選択した。

第5節 Bulk segregant analysis によるカスガマイシン耐性遺伝子付近の RAPDマーカーの検索

1991年に Michelmoresらにより開発された Bulk segregant analysis⁵³⁾は、ゲノムの特定領域に連鎖しているマーカーを迅速に検出することができる新しい方法である。この方法はまず、1つの交配から得られた交配後代のゲノムDNAを、注目する形質や遺伝子について2つのグループ (バルク) に分ける。そして2つのバルク間でRFLP解析やRAPD解析を行う。この解析で多型性がみられた分子マーカーは、注目するゲノムの部分に連鎖していると考えられる。このような分子マーカーがいくつか得られれば、注目するゲノムの部分付近の遺伝子地図を描くことができる。そこで本実験でもcross2107交配後代36株について、RAPDマーカーを用いてBulk segregant analysisを行い、カスガマイシン耐性遺伝子ksr-1付近に存在するRAPDマーカーの検索を行った。

2-5-1 材料及び方法

使用菌株 稲いもち病菌 Ina168, Guy11およびその交配後代36株 (2107-2~39)

使用マーカー 第4節で得られた47個のRAPDマーカーを用いた.

試薬等

TE緩衝液 本章第2節参照

方法

(1) バルクDNAの調製

第3節の結果から, 各交配後代は抵抗性 (R) グループと感受性 (S) グループに分けられた. 各グループから12株の後代を選択し, そのゲノムDNAを第2節の方法に従って抽出し, 各5 μ g分をまとめてバルクDNAとした. 使用時には5 ng/ μ lになるようにTE緩衝液で希釈した.

(2) Bulk segregant analysis

(1) で調製されたバルクDNAを鋳型として, 本章第4節の実験方法に従ってPCR及びアガロースゲル電気泳動を行い, バルク間で多型を示すRAPDマーカーを検索した. こうして得られたRAPDマーカーはcross2107交配後代のうちカスガマイシン抵抗性, 感受性各8株のゲノムDNAを鋳型としてPCRをおこない, 連鎖を確認した.

2-5-2 結果及び考察

第4節で得られた47個のRAPDマーカーのうち, 8個のマーカーがバルク間で多型を示した. Fig 2-4.にその例を示した. これらのマーカーのうち, OPA-11とOPG-06がカスガマイシン抵抗性遺伝子に強く連鎖しているものと考えられた (Fig. 2-5).

第6節 cross2107の交配実験系としての評価

cross2107における各遺伝子マーカーの分離を調べ, カスガマイシン抵抗性遺伝子の連鎖地図作成を試みた. いもち病菌にはmat1-1, mat1-2の2つの交配型があり, 1対の対立遺伝子である. これを遺伝子マーカーとして利用するためにcross2107交配後代の交配型を決定する.

2-6-1 材料及び方法

菌株 イネいもち病菌 cross2107交配後代36株, Ina168, Guy11, Y93-308a(mat1-1)

プローブ pMG6057, pMG6068, pMG6073, pMG7044, pMG7046

RAPDマーカー OPA-11, OPG-06

方法

1. RFLPの分離

RFLPプローブプラスミドDNAをTable 2-9に示した制限酵素を用いて二重消化し、アガロースゲル電気泳動し、ゲルからプローブDNAを回収した。回収にはフィルター付き遠心チューブ (SUPREC-01, 宝酒造株式会社) を用いた。サザンブロッティングは、それぞれのプローブに適切な制限酵素 (Table 2-2) を用いて、抽出した各菌株のゲノムDNAを消化し、本章第2節と同様に行った。

2. RAPDの分離

各交配後代のゲノムDNAを鋳型にして本章第6節と同様にPCR及びアガロースゲル電気泳動を行い、分離を判定した。

3. 交配型の決定

各交配後代を交配型標準菌株と交配させ、子のう殻の形成により判定した。つまり子のう殻の形成が見られた場合、標準菌株とは異なる交配型と判定した。交配型標準菌株はGuy11 (mat1-2)とY93-308a (mat1-1)を使用した。これは講座にある雌雄同株菌の中で最もよく完全世代を形成するという予備実験に基づいて決定した。交配は本章第1節の方法に従って行った。

4. 遺伝子地図の作成

マッピングは、リンケージ解析ソフトウェアMapmanager v2.6.5⁵⁴⁾を用いて行った。LOD (Log of odds) 値は3.0以上とした。

2-6-2 結果及び考察

Fig. 2-6.にpMG6073のサザンハイブリダイゼーションの結果を例として示した。分離の結果を、Table 2-10.にまとめた。交配型は18:18と、1:1の分離を示した。これは、これまでの解析と一致するものである。RFLPマーカーは、プローブによって異なった分離比を示した。また、RAPDマーカーにより描かれたカスガマイシン耐性遺伝子の遺伝子地図をFig. 2-7に示す。しかし、得られた地図は2通りの作り方ができ、どちらもマーカー間の距離にも矛盾が生じてしまった。これは、このクロスの稔性の低さから、正しい分離比が得られなかったことが原因と考えられた。そこで、RFLPマーカーの分離比が、1:1に分離しているかを検証した。

理論的にはすべてのRFLPマーカーは1 : 1に分離すべきである。RFLPマーカーの分離をカイ2乗検定した結果をTable2-11に示す。1つのマーカーで、0.05%の信頼限界で有意だと判定された。この結果は、cross2107の稔性が低く、子とう胞子の発芽率も悪いため、すべてのRFLPが1 : 1に分離するほど十分な数の交配後代をとることができなかったと解釈できる。よって、この交配は交配実験系の確立という意味は持つものの、得られた遺伝子地図の信頼性に関しては十分ではない。この交配後代を用いた戻し交配でより稔性の高い交配を得る必要があると考えられる。

第7節 戻し交配による稔性の改善

第6節で、cross2107が稔性の低さのため、遺伝子解析に適さないことが示された。本節では、cross2107の交配後代をGuy11に戻し交配することにより、稔性の高い交配を得ることを試みた。また、得られた交配後代で、RFLPが理論値通りに分離するか調べることにより、遺伝子解析へ適用可能かを確認する。

2-7-1 材料及び方法

使用菌株 イネいもち病菌cross2107交配後代 2107-2, 6, 7, 11, 12, 14, 18, 19, 20, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 33, 35, 37, Guy11
使用プローブ pMG6057, pMG6068, pMG6073

方法

第6節で交配型mat1-1と判定されたカスガマイシン耐性のcross2107交配後代とGuy11との交配を、本章第1節の通りおこなった。多くの子とう殻を形成している場合、その子とう殻より子とうの分離を試みた。RFLPの分離の解析は、本章第6節に準じて行った。

2-7-2 結果

供試したうち、もっとも多くの子とう胞子由来の菌株が得られた交配は、2107-33とGuy11の交配であり、65の交配後代が得られた。以後この交配をcross5307と呼ぶ。子とうの発芽率は2.0%とcross2107とさほど変わらなかったが、数多くの後代が得られたことより、遺伝子解析への有用性が期待された。そこで本章第3節同様分子マーカーによる評価を行った。Table 2-12 に交配後代におけるRFLPの分離をまとめた。解析の結果、RFLPプローブによって異なる分離比を示したが、すべ

てのRFLPが1 : 1に分離すると考えられる検定の結果となった。この結果は、cross2107に比べてcross5307は遺伝子解析に適当であることを示している。次節以降、この交配を用いて遺伝子マッピングを試みた。

第8節 cross5307を用いたカスガマイシン耐性遺伝子のマッピング

前節で、cross5307は遺伝子マッピングに適した交配であることがわかった。そこで、カスガマイシン耐性遺伝子 *ksr-1* に連鎖しているマーカーを用いてマッピングを行った。

2-8-1 材料及び方法

菌株 cross5307交配後代, 2107-33, Guy11

RAPDマーカー OPA-11, OPG-06

方法

カスガマイシン耐性の検定は、本章第3節に従った。RAPDマーカーの分離は本章第4節に従って調べた。マッピングは、リンケージ解析ソフトウェアMapmanager v2.6.5⁵³⁾を用いて行った。LOD (Log of odds) 値は3.0以上とした。

2-8-2 結果及び考察

各マーカーの分離をTable 2-13に示した。交配型については、数株の予備調査の結果、連鎖が期待できなかったため、マーカーとして使用しなかった。このデータを元に作成したカスガマイシン耐性遺伝子の遺伝子地図をFig. 2-7に示す。マーカーは1通りの組み換え価も正しい配列となった。従ってcross2107を元に作成したものと比較して、正確な地図といえる。距離は、pMG6057と *ksr-1* の間が23.0cM (センチモルガン), *ksr-1* とOPG-06が8.1 cM, OPG-06からOPA-11が15.7 cMとなった。cross2107による地図では連鎖なしと判定されていたRFLP pMG6057が新たに連鎖していると判定された。

第9節 小括

本章では日本産いもち病菌株による交配実験系の確立を試みた。まず、雌性機能のあるイネいもち病菌Guy11と交配可能である菌株を検索した。その結果、Ina168との交配で、36株の交配後代を得ることができた。この交配をcross2107とした。次にこの交配を使ってカスガマイシン耐性遺伝子をモデルとした遺伝解析を行った。まずいもち病菌ゲノムライブラリーから5種のRFLPマーカーを得た。カスガマイシン耐性はcross2107で1:1に分離し、1つの遺伝子*ksr-1*によって支配されていた。また、47種の多型を示すRAPDマーカーを得た。これらのRAPDマーカーから、Bulked Segregant Analysisにより2つの*ksr-1*に密接に連鎖したマーカーOPA-11, OPG-06を得ることができた。これらのマーカーの解析の結果、*ksr-1*の遺伝子地図をつくることができたが、RFLPマーカーの分離から、この交配が地図作成には不適當であることが示された。そこで、交配の稔性を高めるためにcross2107交配後代のGuy11への戻し交配が行われた。その結果、2107-33とGuy11の交配で65株の後代が得られ、この交配をcross5307とした。cross5307交配後代を使って、*ksr-1*の遺伝子地図が作成され、日本菌系を用いた交配実験が十分に可能であることを示した。

Ina168は、本研究以前にも、交配実験に用いられており^{13, 47)}、今回の結果とも併せて、日本のイネ菌の中では交配しやすい菌株なのかもしれない。しかし、これまでの研究では直接病原性の解析に用いられることはなかった。Ina168は、日本判別菌系の1つであり、日本のイネいもち病菌抵抗性遺伝子に対応した非病原性遺伝子の遺伝資源として非常に重要である。さらに、レース番号101と、判別品種中新2号とK1の2種の品種にしか病原性をもたず、残りの7品種にたいする非病原性遺伝子がゲノム中にあると考えられる。本研究で、稔性は低いけど遺伝子解析可能な交配系が得られたことで、以降の非病原性遺伝子の解析に期待がもたれる。

Table 2-1. Crossing abilities of rice pathogenic isolates with Guy11(Mat1-2).

Isolates	Race No. ^{a)}	Perithecia formation ^{b)}
Ao 14-20	337.3	+
CCB-YKH-1		
Dai 74-03	003.2	
ESD-SMH-1		
Hanawa 4	003.0	++
Hitachiohta II-9	001.0	++
Huku 5-2	337.3	
Ina 168	101.1	++
Ina 72	024.1	++
KMN-TME-2		
Ken 53-33	137.1	
Ken 54-20	003.0	
Hoku 1	007.0	
Kitaibaragi 4	001.0	++
Kitaibaragi 9	133.1	+
Nakayama 1-9	001.0	+
Nakayama 3-10	033.1	
Nakayama 3-3	001.0	
P-2b	303.1	+
Shimomurogashima 3	037.1	

a) Kiyosawa, S. *Rice Genetics Newsletter* 1, 95-97 (1984).

b) +=1 to 50 perithecia formed. ++= more than 50 perithecia formed.

Table 2-2. Restriction Endonucleases used in the study.

Enzyme	(Manu. ^{a)})	Recog.	Enzyme	(Manu.)	Recog.
Bam HI	(TAKARA)	G ↓ ATCC	Hin fI	(TAKARA)	G ↓ ANTC
EcoRI	(TAKARA)	G ↓ AATTC	KpnI	(TAKARA)	GGTAC ↓ G
HindIII	(TAKARA)	A ↓ AGCTT	BglII	(TAKARA)	A ↓ GATCT
Pst I	(TAKARA)	CTGCA ↓ G	Csp45I	(TOYOBO)	TT ↓ CGAA
SalI	(TAKARA)	G ↓ TCGAC	EcoRV	(TAKARA)	GAT ↓ ATC
Xho I	(TAKARA)	C ↓ TCGAG	Msp I	(TOYOBO)	C ↓ CGG
BstPI	(TAKARA)	G ↓ GTNACC	XbaI	(TOYOBO)	T ↓ CTAGA
HaeIII	(TAKARA)	GG ↓ CC	DraI	(TAKARA)	TTT ↓ AAA
PvuII	(TAKARA)	CAG ↓ CTG	Sty I	(GIBCO)	C ↓ CAA(TT) GG

a) TAKARA=Takara Shuzo Co. Ltd. Otsu; TOYOBO=TOYOBO Co. Ltd Osaka; GIBCO=LIFE TECHNOLOGIES, MD, USA.

Table 2-3. RFLP probes and their detective endonucleases.

RFLP probe	genomic origin	restriction enzyme for detection
pMG6057	Ina 72	<i>Eco</i> RI
pMG6068	Ina 72	<i>Eco</i> RI
pMG6073	Ina72	<i>Bam</i> HI
pMG7044	Guy11	<i>Xho</i> I

Table 2-4. Kasugamycin resistance of strain Ina168.

Strains	Diameter of myceria					
	concentration of kasugamycin					
	0	10	50	100	500	1000
Ina 168	37.7	27.0	20.4	17.5	9.5	7.6
Guy 11	38.0	5.3	4.7	5.2	5.0	4.9

Table 2-5. Segregation of resistance to kasugamycin in progenies of cross2107.

Progeny	Mycelia (mm)			Progeny	Myceria (mm)		
	KSM (mg/l)				KSM(mg/l)		
	50	100	Reaction		50	100	Reaction
Ina168	12.4	13.2	R	Guy11	6.6	6.3	S
2107-2	15.4	15.0	R	2107-21	11.0	11.4	R
2107-3	6.9	6.5	S	2107-23	14.3	12.7	R
2107-4	8.9	9.7	S	2107-25	12.7	12.4	R
2107-5	9.7	7.0	S	2107-26	6.6	6.5	S
2107-6	12.7	12.6	R	2107-27	7.5	7.1	S
2107-7	14.3	13.1	R	2107-28	14.2	11.4	R
2107-8	7.0	6.6	S	2107-29	14.2	13.0	R
2107-9	8.5	8.5	S	2107-30	8.2	7.3	S
2107-10	6.4	6.2	S	2107-31	14.7	14.1	R
2107-11	13.6	12.8	R	2107-32	8.2	7.2	S
2107-12	10.1	7.9	S	2107-33	13.8	13.4	R
2107-13	11.4	12.0	R	2107-34	6.8	6.2	S
2107-14	13.1	10.6	MR	2107-35	14.2	13.4	R
2107-15	8.6	6.6	S	2107-36	7.1	7.0	S
2107-16	6.5	7.0	S	2107-37	11.7	11.0	R
2107-17	7.0	6.3	S	2107-38	14.2	13.7	R
2107-18	12.2	9.9	MR	2107-39	6.4	6.5	S
2107-19	13.5	12.4	R				
2107-20	13.8	13.2	R	R:MR:S=17:2:17			

R:resistant, MR:moderately resistant, S:susceptible.

Table 2-6. Composition of amplification mixture

Reagent	Volume	Final concentration
10× PCR Buffer(Gibco BRL)	1.25 μ l	
200mM Tris-HCl(pH8.4)		20mM
500mM KCl		50mM
50mM MgCl ₂ (Gibco BRL)	1.25 μ l	5mM
1.25mM dNTP mixture	1 μ l	0.1mM
50pmol/ μ l Random primer	0.5 μ l	2 μ M
5U/ μ l Taq DNA Polymerase(Boehringer Mannheim)	0.07 μ l	0.3Unit/12.5 μ l
5ng/ μ l template DNA	1 μ l	5ng/12.5 μ l
Sterile distilled H ₂ O	7.43 μ l	
final volume	12.5 μ l	

Table 2-7. Condition of polymerase chain reaction.

Step	Reaction	Temperature	Time
Step 1.	Denaturation	94℃	1min30sec
Step 2.	Annealing	37℃	1min30sec
Step 3.	Polymerisation	74℃	2min30sec
Numbers of cycle	40 cycles		

Table 2-8. RAPD markers identified in this study.

No.	Sequence (5' → 3')	Polymorphism	No.	Sequence (5' → 3')	Polymorphism
OPA-01	CAGGCCCTTC	Relative ^b	OPF-02	GAGGATCCCT	Relative
OPA-05	AGGGGTCTTG	Absolute ^a	OPF-06	GGGAATTCGG	Absolute
OPA-06	GGTCCCTGAC	Relative	OPF-07	CCGATATCCC	Absolute
OPA-07	GAAACGGGTG	Relative	OPF-11	TTGGTACCCC	Absolute
OPA-10	GTGATCGCAG	Absolute	OPF-15	CCAGTACTCC	Absolute
OPA-11	CAATCGCCGT	Absolute	OPF-17	AACCCGGGAA	Absolute
OPA-14	TCTGTGCTGG	Absolute	OPF-19	CCTCTAGACC	Absolute
OPA-15	TTCCGAACCC	Relative	OPF-20	GGTCTAGAGG	Relative
OPA-19	CAAACGTCCG	Absolute	OPG-06	GTGCCTAACC	Absolute
OPB-02	TGATCCCTGG	Relative	OPG-07	GAACCTGCGG	Absolute
OPB-06	TGCTCTGCCC	Absolute	OPG-09	CTGACGTCAC	Absolute
OPB-12	CCTTGACGCA	Relative	OPG-11	TGCCCCTCGT	Absolute
OPD-01	ACCGCGAAGG	Absolute	OPG-13	CTCTCCGCCA	Relative
OPD-09	CTCTGGAGAC	Absolute	OPG-15	ACTGGGACTC	Absolute
OPD-12	CACCGTATCC	Relative	OPG-16	AGCGTCCTCC	Absolute
OPD-20	ACCCGGTCAC	Absolute	OPG-17	ACGACCGACA	Absolute
OPE-01	CCCAAGGTCC	Absolute	OPG-19	GTCAGGGCAA	Absolute
OPE-03	CCAGATGCAC	Relative	OPH-03	AGACGTCCAC	Absolute
OPE-04	GTGACATGCC	Absolute	OPH-06	ACGCATCGCA	Absolute
OPE-08	TCACCACGGT	Absolute	OPH-07	CTGCATCGTG	Absolute
OPE-10	CACCAGGTGA	Absolute	OPH-09	TGTAGCTGGG	Absolute
OPE-11	GAGTCTCAGG	Absolute	OPH-12	ACGCGCATGT	Absolute
OPE-12	TTATCGCCCC	Absolute	OPH-18	GAATCGGCCA	Absolute
OPE-17	CTACTGCCGT	Relative			

^a 'Absolute' means polymorphism was apparently detected as the presence or absence of amplified bands..

^b 'Relative' means polymorphism was detected in the intensity of amplified bands.

Table 2-9. Restriction endonucleases for probe purification.

Probe	Restriction Endonucleases
pMG6057	<i>Sma</i> I, <i>Xba</i> I
pMG6068	<i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III
pMG6073	<i>Sma</i> I, <i>Xba</i> I
pMG7044	<i>Eco</i> RI, <i>Pst</i> I

Table 2-10. Segregation of mating type and other genetic markers in cross 2107.

Progeny	Mat	6068	6057	6073	7044	7046	KSM	OPA-11	OPG-06
Ina168	mat1-1	1	1	1	1	1	R	1	1
Guy11	mat1-2	2	2	2	2	2	S	2	2
2107-02	mat1-1	2	1	1	2	1	R	1	1
2107-03	mat1-2	1	2	1	2	1	S	2	2
2107-04	mat1-2	1	2	1	1	2	S	2	2
2107-05	mat1-2	2	1	1	1	1	S	2	2
2107-06	mat1-1	1	1	2	1	2	R	1	1
2107-07	mat1-1	1	1	1	1	2	R	1	1
2107-08	mat1-2	2	1	1	1	1	S	2	2
2107-09	mat1-2	1	2	2	1	1	S	1	2
2107-10	mat1-2	2	2	2	2	2	S	2	2
2107-11	mat1-1	1	1	1	1	ND	R	1	1
2107-12	mat1-2	1	2	1	1	ND	R	1	2
2107-13	mat1-1	2	1	1	1	2	R	2	2
2107-14	mat1-1	1	2	2	1	2	M	1	1
2107-15	mat1-2	2	2	1	2	1	S	2	2
2107-16	mat1-2	2	2	1	2	1	S	2	2
2107-17	mat1-2	1	1	2	1	1	S	2	2
2107-18	mat1-1	1	1	2	2	2	M	1	1
2107-19	mat1-1	1	1	1	1	1	R	1	1
2107-20	mat1-1	1	1	1	1	1	R	1	1
2107-21	mat1-2	2	2	1	2	2	R	2	2
2107-23	mat1-1	1	1	2	1	2	R	1	1
2107-25	mat1-1	1	1	1	1	1	R	1	1
2107-26	mat1-1	1	ND	1	1	2	R	1	1
2107-27	mat1-2	2	1	1	2	2	R	2	2
2107-28	mat1-1	1	1	2	2	2	R	1	1
2107-29	mat1-1	1	1	2	1	1	R	1	1
2107-30	mat1-2	1	2	1	2	1	S	2	2
2107-31	mat1-1	1	1	2	2	1	R	1	1
2107-32	mat1-2	2	2	1	2	1	S	2	2

Table 2-10 (continued).

2107-33	mat1-1	1	1	1	2	1	R	1	1
2107-34	mat1-2	1	2	2	2	2	S	2	2
2107-35	mat1-1	1	2	2	2	2	R	1	1
2107-36	mat1-2	2	1	1	2	2	S	2	2
2107-37	mat1-1	1	2	1	2	1	R	1	1
2107-38	mat1-2	1	1	1	1	1	R	1	1
2107-39	mat1-2	2	2	2	2	2	S	2	2

Abbreviations: Mat; Mating type, Numbers as 6068 are RFLP probe numbers, KSM; Kasugamycin resistance, R; Resistant, S; Sensitive, M: Medium (=MR in Table 2-5), 1; Ina168-type, 2; Guy11-type.

Table 2-11. Segregation of RFLPs in cross 2107.

RFLP probe	No. of progeny Ina168 type	No. of progeny Guy11 type	Ratio Ina type:Guy type	$\chi^2(1:1)$
pMG6057	20	15	4:3	0.714
pMG6068	24	12	2:1	4.0*
pMG6073	23	13	23:13	2.7
pMG7044	18	18	1:1	0.0
pMG7046	18	16	9:8	0.118

*Significant at P=0.05

Table 2-12. Segregation of RFLPs in cross 5307.

RFLP probe	No. of progeny Ina168 type	No. of progeny Guy11 type	Ratio Ina type:Guy type	$\chi^2(1:1)$
pMG6057	31	33	31:33	0.0625
pMG6068	26	39	2:3	2.6
pMG6073	33	31	33:31	0.0625

Table2-13. Segregation of Markers in cross 5307.

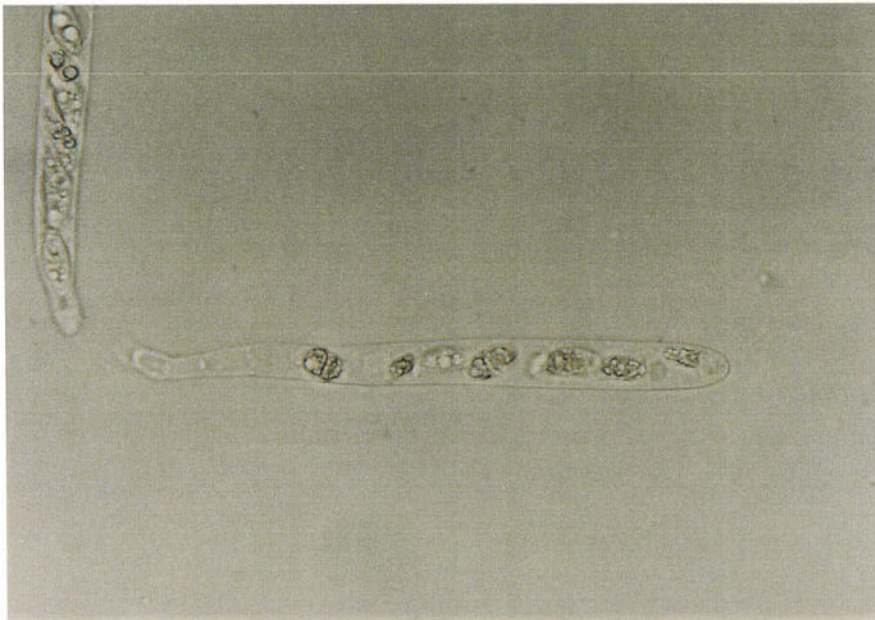
Progeny	KSM	6057	A-11	G-06	Progeny	KSM	6057	A-11	G-06
2107-33	R	1	1	1	5307-34	R	2	1	1
Guy11	S	2	2	2	5307-35	S	1	1	2
5307-01	R	2	2	2	5307-36	R	1	1	1
5307-02	S	2	2	2	5307-37	R	1	1	1
5307-03	S	2	2	2	5307-38	S	1	1	2
5307-04	S	2	2	2	5307-39	S	2	2	2
5307-05	S	2	2	2	5307-40	MR	1	2	2
5307-06	R	1	2	1	5307-41	R	1	1	1
5307-07	R	1	1	1	5307-42	R	1	1	1
5307-08	S	2	2	2	5307-43	S	2	2	2
5307-09	S	2	1	2	5307-44	S	2	2	2
5307-10	S	2	2	2	5307-45	R	1	1	1
5307-11	S	2	2	2	5307-46	S	2	2	2
5307-12	S	2	2	2	5307-47	S	1	2	2
5307-13	S	1	2	2	5307-48	S	2	2	2
5307-14	R	2	2	1	5307-49	S	2	2	2
5307-15	R	2	2	2	5307-50	S	1	2	2
5307-16	S	2	1	2	5307-51	R	1	1	1
5307-17	S	2	2	2	5307-52	S	2	2	2
5307-18	MR	1	2	2	5307-53	R	1	1	1
5307-19	R	1	1	1	5307-55	S	2	1	2
5307-20	S	2	2	2	5307-56	R	1	2	ND
5307-21	R	1	1	1	5307-57	R	1	1	1
5307-22	S	2	2	2	5307-58	R	ND	1	1
5307-23	R	1	1	1	5307-59	R	2	1	1
5307-24	S	1	2	2	5307-60	R	1	1	1
5307-25	S	1	1	2	5307-61	S	2	2	2
5307-27	S	2	1	1	5307-62	S	2	2	2
5307-28	R	2	1	1	5307-63	R	1	1	1
5307-29	R	1	1	1	5307-64	R	1	1	1
5307-30	MR	1	1	2	5307-65	R	1	1	1
5307-31	R	2	2	2	5307-66	S	2	2	2
5307-32	S	2	1	1	5307-67	R	1	2	1
5307-33	R	1	1	1					

Abbreviations:: KSM; Kasugamycin resistance, R; Resistant, S; Sensitive, MR: Medium, 6057; RFLP probe pMG6057, A-11 and G-06: RAPD markers OPA-11 and OPG-06, 1; Ina168-type, 2; Guy11-type.

A



B



C

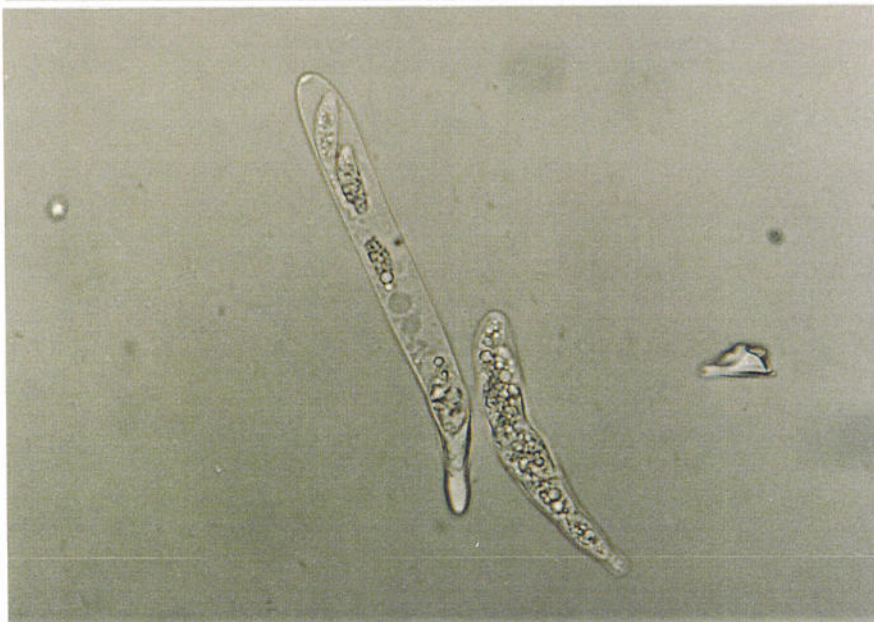


Fig. 2-1. cross 2107 formed abnormal asci.
 A: normal asci, B: abnormal ascospore form , and C: deficiency
 of ascospores. Magnitude: x600

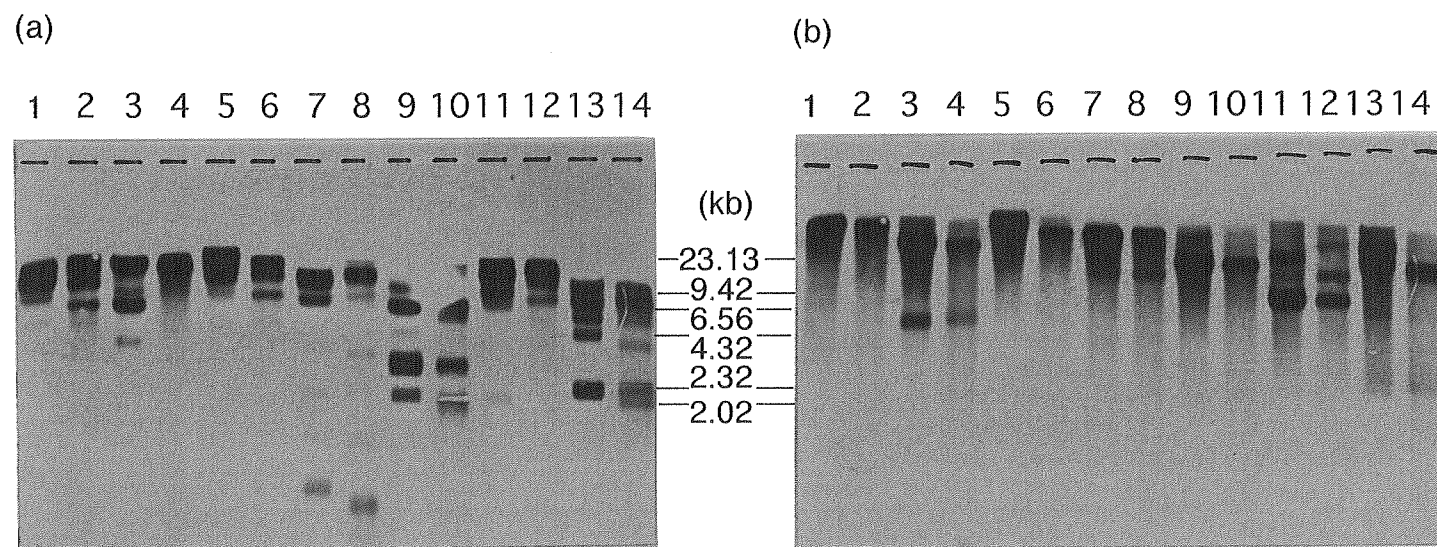


Fig. 2-2. Screening of RFLP probes.

Genomic DNA of Ina168 (odd lanes) and Guy11 (even lanes) were digested with *Bam*HI (lanes 1 and 2), *Eco*RI (lanes 3 and 4), *Hind*III (lanes 5 and 6), *Pst* I (lanes 7 and 8), *Sal* I (lanes 9 and 10), *Xho* I (lanes 11 and 12) and *Csp*45 I (lanes 13 and 14). pMG7044 (a) and pMG7016 (b) were used as probes.

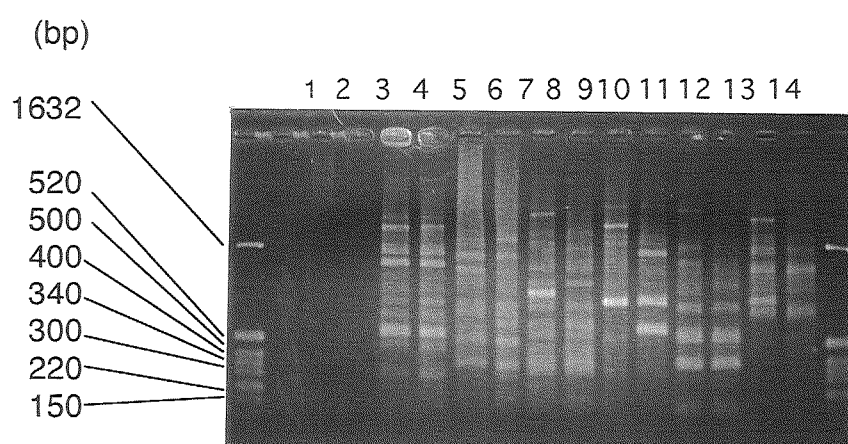


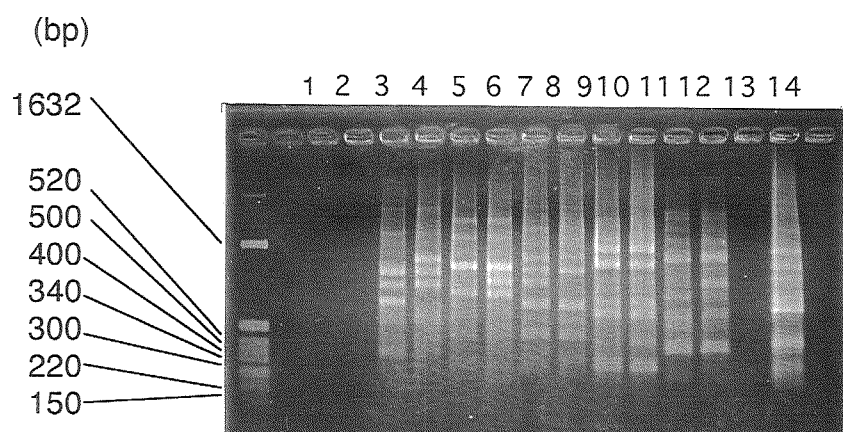
Fig. 2-3. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis.

M. grisea genomic DNA of strain Ina168 (odd lanes) and Guy11 (even lanes) were amplified with random primers OPA-08 (lanes 3 and 4), OPA-09 (5 and 6), OPA-10 (7 and 8), OPA-11 (9 and 10), OPA-12 (11 and 12) and OPA-13 (13 and 14).

Polymorphic patterns were detected in lanes 5 and 6, 7 and 8, 9 and 10, 13 and 14.

Lanes 1 and 2 were control ; amplified without a primer.

(a)



(b)

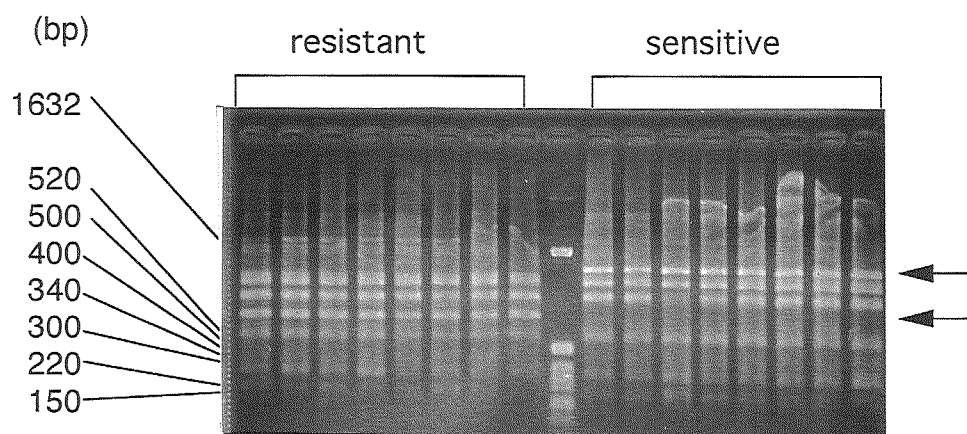


Fig. 2-4. Bulked segregant analysis.

(a) amplification of two bulk DNA; R bulk (odd lanes) and S bulk (even lanes) with RAPD primers. Lanes 1 and 2 were control ; amplified without a primer.
(b) Linkage was checked by analysis with some progenies. OPA-11 was used as a primer.

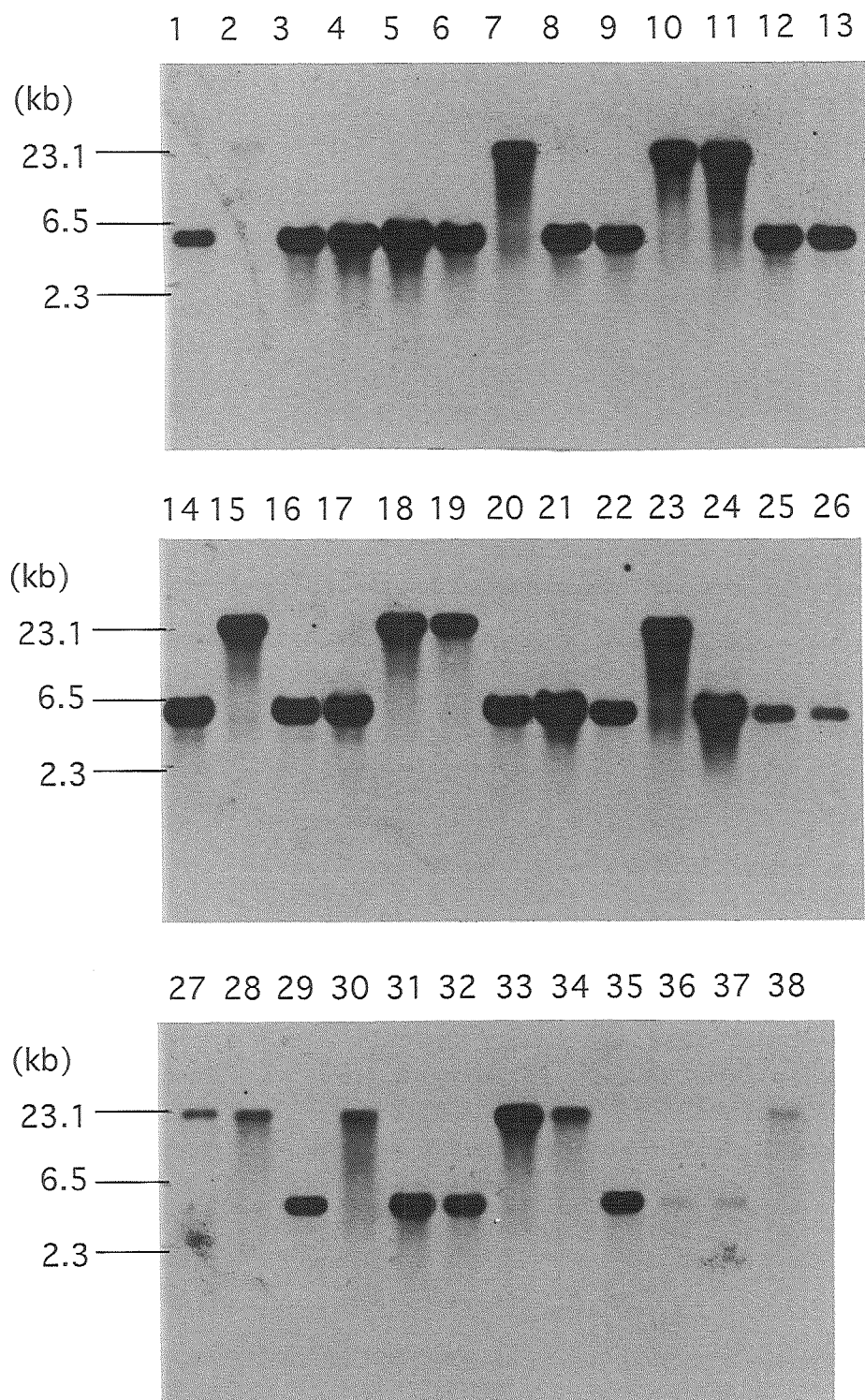


Fig. 2-5. RFLP analysis of cross2107.
M. grisea genomic DNA was digested with Eco RI, and hybridized with pMG6073. Lane1;
 Ina168, Lane 2; Guy11 and Lanes 3 to 38; cross2107 progenies.

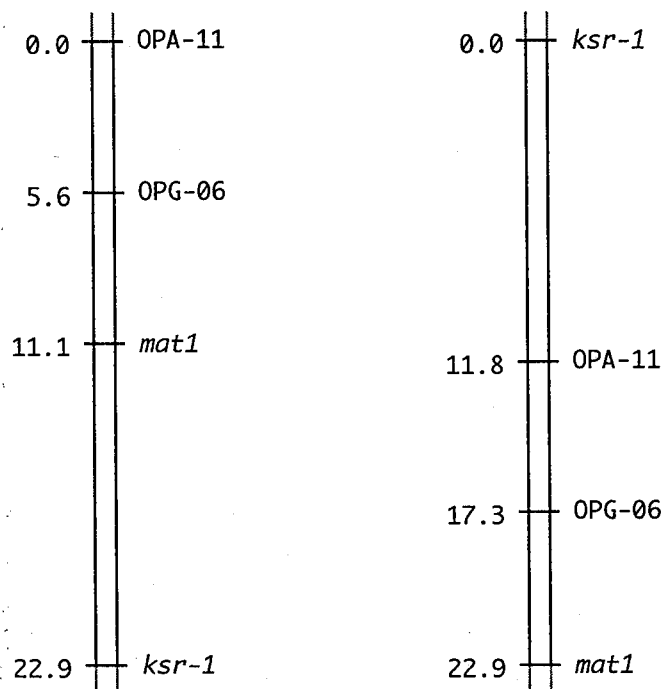


Fig. 2-6. Genetic maps of *ksr-1* based on marker segregation of cross2107.

Maps were made by MapManager. Two inconclusive maps were made from cross2107. Numbers on the right side of the map are map distances expressed in cM (centimorgans). OPA-11 and OPG-06 were RAPD marker loci. *mat1* is a locus for mating type.

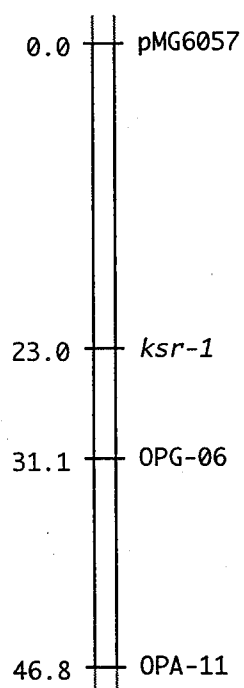


Fig. 2-7. Genetic map of *ksr-1* based on marker segregation of cross 5307.

Map was made by MapManager. Numbers on the right side of the map are map distances expressed in cM (centimorgans). OPA-11 and OPG-06 were RAPD marker loci. pMG6057 is a RFLP loci, which are revealed to be distantly linked with *ksr-1*.

第3章 いもち病菌圃場分離株の解析

はじめに

本章では、日本産いもち病菌の圃場分離株についてDNAフィンガープリンティング及びパルスフィールドゲル電気泳動法を用いて直接的な解析を試みた。DNAフィンガープリンティングは特定のプローブとゲノムDNAとのハイブリダイゼーションにより得られるパターンにより個体の識別、同定を行うことをさすが、本菌の解析の場合、反復配列をプローブとして行い、得られたパターンにより菌株の遺伝的相互関係を調べることもっとも一般的である。イネいもち病菌は完全世代が圃場では見つかっておらず、またその形成能もほとんど失っていることから、もっぱら無性的な増殖のみを行っていると考えられている。その様な環境の中で、どのようにして多様なレースが現れてくるのか。レースの相違する菌株間の遺伝的相互関係を調べることにより、病原性レースの分化についての遺伝的な側面を照らすことができる。特に本邦の稲作は多くの農薬およびいもち病抵抗性品種の導入が行われ、その能力の崩壊も報告されている³²⁾。その様な現象と、いもち病菌の遺伝子との相互関係の解析を試みた。

またパルスフィールドゲル電気泳動は巨大なDNA分子の分離のために行われる方法であり、これによりいもち病菌の染色体DNAをその分子量により分けることが可能である。これまでの解析により、いもち病菌の染色体DNAが菌株間で変化に富んでいることが明らかになってきている。本研究ではこの手法を日本産いもち病菌に適用し、染色体DNAの多型性と病原性レースの分化との関連性の解析を試みた。

第1節 DNAフィンガープリンティング用プローブの検索

これまで、いもち病菌のDNAフィンガープリンティングにはMGR586という反復配列がもっとも多く用いられてきている。この配列は、中国で分離されたいもち病菌O-137からクローニングされたものである²¹⁾。本節では日本産菌株から、DNAフィンガープリンティングのプローブとして使用できる、新たな反復配列のクローニングを試みた。またその制限酵素地図も作成した。

3-1-1 材料及び方法

菌株 イネいもち病菌Ina72, Guy11

第1章第2節で作成した菌株Ina72のゲノムDNAライブラリー

方法

1. プロープの探索

第1章第2節と同様にサザンハイブリダイゼーションによって、多数のバンドを示すプロープを選択した。

2. 制限酵素地図の作成

pMG6015プラスミドDNAはTable2-1に示す12種類の制限酵素で消化し、アガロースゲル電気泳動によって解析された。

3-1-2 結果

約50のクローンを検索したうち、pMG6015とpMG6019の2つのクローンが反復配列として選択された。この2つのプロープによるハイブリダイゼーションの結果を、Fig. 3-1に示す。両者とも多数のバンドを示したが、以後バンドのパターン解析をする上で、pMG6019のパターンは1つ1つのバンドが判別しづらい。pMG6015のパターンはバンドの数がpMG6019に比べると少ないが、バンドがはっきりとしていて判別に適しているので、以後の実験にはpMG6015を用いることとした。pMG6015の制限酵素地図をFig3-2. に示した。pMG6015には2.7kbpのいもち病菌ゲノムDNA断片が挿入されていた。

第2節 pMG6015とMGR586の類似性

pMG6015は、イネいもち病菌のゲノムに特異的に保存されていることが示されている³⁶⁾。この特徴は、イネ菌のDNAフィンガープリンティングに用いられているMGR586と類似している。本節ではpMG6015, MGR586両プロープの類似性を、クロスハイブリダイゼーション及びDNAフィンガープリントのパターンから検討した。

3-2-1 材料及び方法

菌株 イネいもち病菌 Ina168

プロープDNA pMG6015, MGR586 (Dr. B. Valentより分与), pUC19

方法

1. クロスハイブリダイゼーション

まずpMG6015とMGR586を線状化するために制限酵素XbaIで消化した。各プラスミドDNA約1 μ gをマイクロチューブにいれ、制限酵素XbaI 50Uを用いて消化し、フェノール・クロロホルム処理

を行った。その後、エタノール沈殿を行い、DNAは50 μ lのTE緩衝液に溶解した。A₂₆₀を分光光度計 (DU-7, BECKMAN) によって計測し、DNA濃度を推定した。各サンプル10 ngを、アガロースゲル電気泳動し、第1章第2節の方法に従ってナイロンメンブランに固定した。pUC19以外のプローブDNAは、適当な制限酵素で消化し、アガロースゲル電気泳動後ゲルから回収することにより、いもち病菌ゲノムDNA由来の断片のみを用いた。pUC19は制限酵素XbaIで消化したものをを用いた。ハイブリダイゼーションは1枚のメンブランを、3種のプローブで3回リハイブリダイズすることにより行った。プローブの標識、ハイブリダイゼーション、シグナルの検出、リハイブリダイズの方法は、ECL direct nucleic acid labelling / detection kit (Amersham) のプロトコルに従って行った。

2. DNAフィンガープリントのパターンの比較

第2章第2節の方法に従ってIna168ゲノムDNAを抽出し、その2 μ gを制限酵素EcoRIによって完全消化した。これをエタノール沈殿してDNAを回収した。アガロースゲル電気泳動は12.5cm $\times$ 21.0cmの0.6%アガロース (SeaKem GTG, FMC BioProducts, MA, USA) /0.5 $\times$ TBEで、定電圧25Vで約40時間行った。このゲルを第2章第2節の方法に従い、サザンブロットイングおよびハイブリダイゼーションを行った。2種のプローブによるハイブリダイゼーションは1枚のメンブランをリハイブリダイズすることにより行った。

3-2-2 結果

1. クロスハイブリダイゼーション

Fig. 3-3に結果を示す。pMG6015とMGR586のハイブリダイゼーションでは、pMG6015をプローブとしたときにシグナルが見られたが、それはpMG6015同士でのシグナルよりも明確に弱いものであった。またMGR586をプローブとした際にはpMG6015のバンドにはハイブリダイズしなかった。これは上記の結果と矛盾するが、メンブランに転写されたDNA量の誤差による差だと考えられた。つまり、メンブラン上のpMG6015の量が少なく、MGR586とのハイブリダイズによる弱いシグナルが検出できなかったと考えられた。また、pUC19は両者ともに強くハイブリダイズした。上記の結果は、両プローブの間には若干の配列の相同性があるが、基本的には異なった配列であることを示している。

2. DNAフィンガープリントの比較

Fig. 3-4に両者のパターンを示す。明瞭に異なったパターンを示した。pMG6015は20kbから1kbの範囲にわたって約30のバンドを生じるが、MGR586は20kbから0.5kbの範囲で約40のバンドによるパターンを形成する。これは両者のDNAフィンガープリンティングにおける主要な反復配列が全く異なったものであることを示している。

3-2-3. 考察

本節ではDNAフィンガープリンティングの2つのプローブの比較を行った。クロスハイブリダイゼーションとDNAフィンガープリントのパターンの比較から、両者は異なった反復配列を含んでいることが示唆された。またLeongらは、最近MGR586について詳細な解析を行った。その解析中に示されているMGR586の制限酵素地図は、前節で作成したpMG6015のものとは全く異なっていた³⁰⁾。これは我々の結果と一致していた。従って、以後の解析で、pMG6015をMGR586とは独立したプローブとして用いることができると考えられた。

またMGR586の反復配列はそのゲノム挿入断片の1部であり、LTR型レトロポゾンの1部であることがわかっており興味深い。pMG6015の反復配列の同様な解析は第4章で試みた。

第3節 DNAフィンガープリンティングによる日本菌系の解析

3-3-1 材料及び方法

菌株 イネいもち病菌 日本判別菌系7株及び圃場分離株17株 (Table 3-2)

プローブ pMG6015, MGR586

方法

1. DNAフィンガープリンティング

第2章第2節の方法に従っていもち病菌ゲノムDNAを抽出し、その2 μ gを制限酵素EcoRIによって完全消化した。これをエタノール沈殿してDNAを回収した。アガロースゲル電気泳動は大型の泳動槽 (HE-14型, 宝酒造株式会社) 12.5cm×21.0cmの0.6%アガロース (SeaKem GTG, FMC BioProducts)/0.5×TBEで、定電圧25Vで約40時間行った。このゲルを第2章第2節の方法に従い、サザンブロッティングおよびハイブリダイゼーションを行った。2種のプローブによる2回のハイブリダイゼーションは1枚のメンブランをリハイブリダイズすることにより行った。

2. パターン解析

得られたDNAフィンガープリンティングのパターンを透過型イメージスキャナで取り込み、画像ファイル化した。このファイルをもとに、画像解析ソフトウェア (Advanced Quantifier 1-D match, B. I. Systems Co., MI, USA) を補助的に用いて解析を行った。つまり、1.6kbから19kbの範囲で、各パターンにおけるバンドの有無を調べ、ある特定のバンドがあるときは1、ないときは0、として各菌株のパターンは2進数のデータの行列として表された。この行列はプログラムWINDIST⁵⁵⁾を使ってダイスの係数 (Dice's coefficient) $F [F = 2N_{xy}/(N_x + N_y), N_{xy}$ はある菌株の組で共有されているバンドの数: $(N_x + N_y)$ 菌株の組のバンドの総数] によって類似性のデータの行列として表された。2種

類のDNAフィンガープリンティングのパターンをあわせて解析する場合は、2つの行列を菌株ごとに加算して行った。このデータより、UPGMA (Unweighted pair group method, arithmetic mean) 法により NTSYS-pc package⁵⁶⁾のSAHNプログラムを用いて、系統樹を作成した。

得られた系統樹の信頼度の指標として、ブートストラップ解析⁵⁷⁾を行った。ブートストラップ法は、データから得られた統計量の標本誤差を、パラメーターを使わずに評価する方法の一つであり、近年系統学では系統樹の信頼度を評価する目的で広く用いられている。本研究ではWINBOOTプログラム⁵⁵⁾を用いて、1000回の反復におけるクラスターの出現頻度により、各クラスターの信頼度を表した。

3-3-2 結果

1. 予備実験

まず、日本判別菌系7株と圃場分離株2株による予備実験を行い、実験系の有用性を確認した。pMG6015, MGR586による予備実験のDNAフィンガープリンティングのパターンをFig. 3-5に示す。両方のパターンに共通して、Ina72とIna168, Ken53-33とKen54-20, Ken54-04と2つの圃場分離株のそれぞれのグループでパターンの類似性が認められた。このパターンを解析し、系統樹を作成した (Fig. 3-6)。パターンの類似性が見られた菌株の組は、系統樹上でもクラスターを形成していた。

2. 圃場分離株の解析

系統樹が作成できたので、次に圃場分離株17株を加えて遺伝的系統と病原性レースの関係を解析した。まず、病原性レースごとに分類した。この分類は判別菌系を基準に、レース判別9品種中1品種への病原性が異なる範囲でまとめたもの (グループ003, 007, 137, 303) と、同じ病原性レースを示す圃場分離株をまとめたもの (グループ001, 337) である (Table3-2)。その分類ごとにDNAフィンガープリンティングを行い、病原性レースと遺伝的系統の間の関係を解析した。Ina72とIna168はどのグループにも属していない。これはこれらの菌株に病原性レースが類似した圃場分離株がコレクションに存在しなかった為である。グループごとのDNAフィンガープリンティングの例をFig. 3-7に示す。パターンの観察で、判別菌系を含むグループ003, 007, 137, 303ではパターンは判別菌系のものと圃場分離株とで異なっていた。従ってこれらのグループではレースと遺伝的系統が関係ないことがうかがえた。したがって、より詳細な解析を行うために予備実験で得られたパターンと併せて解析し供試菌株全体の系統樹をそれぞれのプローブのパターンに基づくものと、両方のプローブのデータをあわせたものと計3種類作成した。

Fig. 3-8にその系統樹を示す。プローブpMG6015, MGR586の系統樹を比較して共通しているのは2つのクラスターである。1つはIna72とIna168のもの、そしてもう1つは圃場分離株のものである。これらの共通のクラスターは両方のプローブより得られた系統樹でも共通している。

しかし、残りの菌株、あるいはクラスター間の関係については、2つの系統樹で異なっている。Ken53-33, Ken54-20, Hoku 1およびP-2bは異なったクラスターを形成した。pMG6015の系統樹では、これら4菌株はKen53-33とKen54-20, Hoku1とP-2bの2つのグループに類似度0.8で分けられているのに対して、MGR586による系統樹では、Ken53-33とP-2b, Ken54-20とHoku1が2つのグループに分けられている。またKen54-04も2つの系統樹の間で異なったクラスターを形成している。また、どちらの系統樹でもすべての圃場分離株は1つのクラスターを形成しているが、その内部では、Ena 3とEna 9とKamisato 13を除いて異なったまとまりを示している。

3. ブートストラップ解析

この異なったクラスターの信頼度を判断する基準として、ブートストラップ解析により各クラスターの信頼度が示されている。ここで、高い信頼度を持つクラスターに注目すると、このクラスターが両方のプローブより得られた系統樹に現れていることがわかる。従って両方のプローブより得られた系統樹がもっとも信頼性が高く、多くの情報を反映していると言える。

4. 系統 (clonal lineage)

いもち病菌の野生株の解析では、系統 (clonal lineage) という概念がよく用いられる。いもち病菌は圃場では完全世代が見つからないため、不完全世代で増殖していると考えられる。そのために、いもち病菌集団のDNAフィンガープリントはいくつかの明確に異なったパターンに分かれる。このパターンは系統樹でもクラスターとして分けられ、そのクラスターに属する菌株のグループを系統 (clonal lineage) と呼び、共通の祖先菌から生まれた、遺伝的に関連ある菌群と考えられている。この考えに基づいて、両方のプローブによって得られた系統樹を用いて日本菌系の系統を想定した。系統は類似度0.68のところで当てはめられ、これによると、日本判別菌系7株は類似度0.7において、3つのグループに分けられる。このグループを系統JBLA, JBLB, JBLC (Japanese Blast Lineage A, B, and C) とした。しかし、これらのグループは類似度0.74でさらにクラスターを形成していることがわかる。1つはIna72, Ina168のグループ。Ken54-04と圃場分離株のグループ、そしてKen53-33, Ken54-20のグループ、残りはHoku1, P-2bの1株のグループである。これは、予備実験で観察されたパターンの類似を反映している。これらの情報も併せて、系統として表すことは、菌株の遺伝的関係を知る上で好都合である。従って、日本のいもち病菌の系統として、JBLA-INA (Ina72, Ina168), JBLA-K04 (Ken54-04, 圃場分離株), JBLB-K33 (Ken53-33, Ken54-20), JBLB-HK1 (Hoku1), JBLC-P2B (P-2b) の5つを定めた。

5. 病原性レースとの関係

この系統に従って病原性レースとの関係を解析した。病原性グループ001と337の菌株はすべてJBLA-K04に属した。残りのグループは2つ系統、つまり、判別菌系の系統と、JBLA-K04に属する菌株からなっていた。言い換えると、JBLA-K04はすべての圃場分離株と、Ken54-04が含まれている。これらの圃場分離株は様々なレースの菌株からなっており、JBLA-K04の圃場における優占性と、系統内での病原性レースの多様さを示している。さらに、圃場分離株は2つのクラスターA, B

を形成していた。それぞれのクラスターにはレースの共通性はなく、系統と病原性レースとの直接的な関連はなく、系統内で病原性レースは多様に分化していることを示している。しかし、クラスターAの中の1つのサブクラスターは、すべてレース001.0の菌株からなっており、これは系統と病原性レースが無関係ではないことを示すものである。

3-3-3 考察

1. pMG6015の有用性

DNAフィンガープリンティングにおいて、MGR586はもっとも多く使用されているプローブである。我々もMGR586を使用した。その能力はすべての菌株を詳細に解析するには十分ではなかった。MGR586にpMG6015を併用すると、もっとも信頼度の高い系統樹を描くことができた。これは、異なる2つのプローブによりその特徴が相補された為だと考えられる。この2つのプローブのもっとも大きな違いはフィンガープリントの類似性のレベルであった。pMG6015では、類似性が高いため、各菌株のレベルでは遺伝的な違いを解析できなかったのに対し、MGR586では、類似性が低く、長い期間にわたって集められた菌株を全体的に解析できなかったと考えられる。この2つをあわせた結果、全体的に詳細な解析ができたと考えられる。また、このDNAフィンガープリントの類似性の違いから、いもち病菌の進化の過程で、pMG6015に含まれている反復配列はMGR586のそれとは早い時期に増幅したと言える。

2. 系統と病原性レース

日本のいもち病菌のDNAフィンガープリンティングによる系統の解析は未だに例がなく、本報告が最初である。これにより、日本判別菌系、圃場分離株を含めた病原性レースの異なった菌株の遺伝的関連性の解析が可能となった。日本判別菌系は、1966年に、イネのいもち病抵抗性遺伝子の解析に使われたのが最初である。これは、それまでの菌株のコレクションの中から、病原性が異なり、比較的安定した菌株を選んだものである⁵⁾。我々の結果から、この7株の菌株は5つの系統に分類されることがわかった。従って、判別菌系においては、病原性レースと遺伝的由来に、ともに明確な差があり、レースと系統の対応性があるのかもしれない。

一方、我々が解析した圃場分離株は、1つの系統JBLA-K04に属しており、この系統で、病原性レースが多様化したことを示している。これは、圃場における新病原性レースの出現が、非病原性遺伝子の変異によるものであることを示唆している。第2章で確認されたイネ菌の稔性の低さと、現在でも自然状態では完全世代が見つかっていないことから、完全世代は圃場ではまず行われていないと考えられる。同じ系統に属する菌株による疑似有性世代による組み換えによることも考えられるが、これを突然変異と区別することは圃場から得られた菌株の解析では非常に困難である。

系統JBLA-K04の圃場における優占性、病原性レースの多様性といもち病抵抗性品種の抵抗性の崩壊との関連性を考察することは非常に興味深い。本研究の結果から、圃場における系統JBLA-K04の優占化と、病原性レースの多様化が1960年から1980年の間に起こったことが示唆される。判別菌

系は1960年以前に分離され⁵⁾、当時は少なくとも5の系統が存在し、病原性と系統との関連があったと予想される。今回用いた圃場分離株は1株を除いて1980年以降に分離されたもので、多様なレースに分化している。時期を同じくして、いくつかのいもち病抵抗性品種の抵抗性の崩壊が起こっている。この期間を通じて採集された菌株を解析することにより、さらに詳細に解析する事ができる。

3. 日本産いもち病菌の特徴

外国菌系ではいくつかいもち病菌の系統についての解析がなされている。当然のことながら、それぞれ解析対象でありもっとも重要なファクターでもある菌株の集団が異なっており、今回得られた日本のいもち病菌の系統と比較することは非常に困難である。同様に長期にわたる菌株のコレクションを解析した例としてはLevyらによる報告がある。彼らは合衆国で30年にわたり採取された菌株を解析し、いくつかの系統を発見し、病原性レースと系統の関連性を見いだした。従って、合衆国では系統内での病原性レースの分化はそれほど進んでいないと解釈される。Levyらは、後の報告の中で、菌のレースの多様化は、イネの栽培環境に依存すると述べており、今回発見された日本におけるレースの多様化は日本の農業の環境によるものと考えられる。したがって、日本のいもち病菌は、病原性レースの研究対象として有用であると言える。

第4節 パルスフィールドゲル電気泳動法による日本菌系の電気泳動核型解析

3-4-1 材料及び方法

菌株 Table3-2に示すイネいもち病菌24株

培地, 試薬

2YEG培地：第2章第2節参照.

enzyme solution：0.7M NaCl溶液にNovozym234 (Novo Nordisk, Denmark) を2 mg/ml になるように溶解し、フィルター除菌して用いた。

isotonic buffer：1.2M ソルビトール, 20mM EDTA溶液. オートクレーブ滅菌 (121℃, 10分) して用いた。

ESP：0.5MEDTA (pH 9.2) を用意し、オートクレーブ (121℃, 10分間) した。ここにラウロイルサルコシンを1%の濃度になるように加え、攪拌し、溶解する。さらにプロテイナーゼK (和光純薬工業株式会社) を1mg/mlになるように加え、37℃で2時間保温した。分注し-20℃で保存した。

1×modified TBE：50 mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン, 45mM ほう酸,

0.1 mM EDTA (pH 7.5). 使用時にはイオン交換水で2倍に希釈して用いた。

方法

1. 染色体DNAサンプルの調製

Talbotらの方法²⁷⁾を改良した。いもち病菌を10 mlの2YEG培地 (21 mm×200 mm試験管) に接種し、27℃で3日から4日振とう培養した。これを15 ml様のコニカルチューブ (Falcon 2096, Becton Dickinson and Co., NJ, USA) にいれ、遠心分離 (800×g, 5分間) し、菌体を回収した。菌体は5 mlのenzyme solutionに再懸濁し、3時間室温で静かに揺らした。反応液の1部をとり、スフェロプラストの形成を確認した後、JKワイパー (株式会社クレシア) で濾過し、菌体残査を取り除いた。濾液中のスフェロプラストは1700×gで10分間遠心分離し回収し、100 μlのisotonic bufferに再懸濁した。血球計算版でスフェロプラストの濃度を測定し、溶解した低融点アガロース (InCert, FMC Bioproducts, ME, USA) を使って、10⁸スフェロプラスト/ml 1% agaroseになるように希釈した。このアガロース溶液はサンプルモールドに分注し、4℃で固化した。このサンプルゲルブロックはESP中で50℃で2日静かに振とうした後、4℃で保存した。

2. パルスフィールドゲル電気泳動

電気泳動は電気泳動槽 (CHEF-DR11, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を使用した。を使用した。泳動条件はゲルのアガロース濃度を除いて、Buddeら¹⁷⁾が定めた条件で、泳動泳動した。0.7%ゲル (FastLane, FMC BioProducts, ME, USA), 0.5×modified TBE, 25 Vで、パルスタイム90分で5日、60分で2日間電気泳動した。泳動中バッファーは14℃に調整した。ゲルは臭化エチジウム水溶液 (1 μg/ml) で30分間染色し、イオン交換水中で30分から1日脱色し、トランストランスイルミネーターで観察、撮影した。サイズマーカーとして *Schizosaccharomyces pombe* 染色体DNA (FMC Bioproducts) を使用した。

3-4-2 結果

まず第3節同様日本判別菌系7株と2株の圃場分離株の核型を解析した。Fig. 3-9にその結果を示す。各菌株は特有の核型を示していた。パルスフィールドゲル電気泳動ではしばしばバンドの重複が見られるので正確ではないが、染色体数はバンドの数から6から7と判定された。また、電気泳動像の最も分子量の小さい部分にあるバンドは、サンプル調製中に生じた低分子のDNA断片によるものである。2 Mb (Megabase pairs)以下の長さのミニクロモソームが、全ての菌株で観察された。また、核型の多型性は同一系統に属する (前節参照) 菌株間でも見られた。そこで、同じ系統に属する菌株間での核型の多型性と病原性レースの関係を解析するため、第3節で用いた病原性グループを参考に、系統JBLA-K04の菌株の核型を解析した。

Fig. 3-10にその結果を示す。全ての病原性グループで核型の多型性が観察された。しかし、興味深いことに、同じグループの菌株で核型の共通性が見られる例があった。例えば、グループ007の菌株はともに4.7 Mbのバンドを欠いている。グループ303ではミニクロモソームのバンドがない。グループ337では両者とも3.5 Mbのバンドが失われている。これらの3つの菌株の組は第3節の系統樹では非常に密接に関係があり、核型とDNAフィンガープリントと病原性レースの関連を示している。

3-4-3 考察

日本産いもち病菌の核型は多型性を示していた。しかし、圃場分離株で同じ系統に属する菌株は、病原性レースに関連した核型の共通性が見られた。このことは染色体レベルでの多様化（染色体再編成）が病原性レースも含めたいもち病菌の遺伝的多様性に関与している可能性を示すものである。Talbotら²⁷⁾は同様に系統内での核型の多様性について報告しており、染色体再編成が遺伝子の多様性をもたらす主要なシステムであるとしている。さらに、筆者らは菌株Ina168の染色体長変異を発見した。この変異は、病原性には中立であったが、12.5%の高頻度で起こる（第5章, Sone et al.³⁷⁾）。これらの事実は、染色体再編成がいもち病菌の遺伝的不安定性に関与している可能性とともに、電気泳動核型解析が病原性レースの多様性の解析において鍵となることを示唆するものである。

第5節 小括

本章では日本産イネいもち病菌のDNAフィンガープリント解析とパルスフィールドゲル電気泳動法による特徴付けを行った。まず菌株Ina72のゲノムDNAライブラリーからDNAフィンガープリンティングに適したプローブpMG6015を得た。このプローブはMGR586とは別の反復配列を含んでいることが、クロスハイブリダイゼーション及びDNAフィンガープリントのパターンの比較によって示された。7種の日本判別菌系と1974年以降に各地で分離された、様々なレースの17株の圃場分離株を解析に用いた。pMG6015とMGR586をDNAフィンガープリント解析のプローブとして用いた。系統樹は、UPGMA法により作成した。ブートストラップ解析により、2種のプローブによるDNAフィンガープリントに基づく系統樹が、いもち病菌系統の判定に适当であること及びpMG6015の有用性が示された。系統学的解析の結果、すべての菌株は5種の系統（JBLA-INA, JBLA-K04, JBLB-K33, JBLB-HK1, JBLC-P2B）に分けられた。このうち、JBLA-INA, JBLA-K04, JBLB-K33は複数の菌株よりなっていた。ことに、系統JBLA-K04には、すべての圃場分離株が属しており、同一系統内でのレースの分化が見られた。電気泳動核型解析により、いもち病菌の核型が同一系統内でも多様であり、同じレースの菌株ごとに特徴があることが示された。以上のことにより、現在の圃場におけるいもち病菌の大部分が、JBLA-K04に属し、多様にレースを分化させていること、レース分化に、染色体長の変化が関与している可能性が示された。

Table 3-1. Restriction endonucleases for restriction mapping of pMG6015.

Enzyme (Manufacturer) ^{a)}	Recog. seq.	Enzyme (Manufacturer)	Recog. Seq.
<i>EcoRI</i> (TAKARA)	G ↓ AATTC	<i>KpnI</i> (TAKARA)	GGTAC ↓ G
<i>HindIII</i> (TAKARA)	A ↓ AGCTT	<i>XbaI</i> (TOYOBO)	T ↓ CTAGA
<i>Pst I</i> (TAKARA)	CTGCA ↓ G	<i>Sty I</i> (GIBCO)	C ↓ CAA(TT)GG
<i>SalI</i> (TAKARA)	G ↓ TCGAC	<i>Sac I</i> (TAKARA)	GAGCT ↓ C
<i>Xho I</i> (TAKARA)	C ↓ TCGAG	<i>Sma I</i> (TAKARA)	CCC ↓ GGG
<i>Sph I</i> (TAKARA)	GCATG ↓ C	<i>Bam HI</i> (TAKARA)	G ↓ GATCC

^{a)}TAKARA: Takara Shuzo Co. Ltd., Otsu, TOYOBO: TOYOBO CO. LTD, Osaka, GIBCO: LIFE TECHNOLOGIES, MD, USA

Table 3-2. *M. grisea* isolates used in the study.

Group	Race a), b)	Isolate	Isolated at
-	031.1	Ina 72	Dif. strain
-	101.1	Ina 168 c)	Dif. strain
001	001.0	Kitaibaragi 4	Ibaragi, 1988
		Nakayama 1-9	Ibaragi, 1988
		Hitachiohta II-9	Ibaragi, 1988
		Nakayama 3-3	Ibaragi, 1989
		Shimone 7	Ibaragi, 1989
		Hanawa 2	Fukushima, 1988
003	003.0	Ken 54-20	Dif. strain
		Ken 54-04	Dif. strain
		Hanawa 4	Fukushima, 1988
	003.2	Dai 74-03	Ohita, 1974
		Ena 3	Gifu, 1991
007	007.0	Hoku 1	Dif. strain
		Nakayama 3	Ibaragi, 1988
		Nakayama 10	Ibaragi, 1988
137	137.1	Ken 53-33	Dif. strain
	133.1	Kitaibaragi 9	Ibaragi, 1988
	037.1	Shimomurogashima 3	Fukushima, 1988
303	303.1	P-2b	Dif. strain
	303.0	Ena 9	Gifu, 1991
		Kamisato 13	Nagano, 1991
337	337.3	Fuku 5-2	Fukushima, 1985
		Ao 14-20	Aomori, 1982

a) Kiyosawa, S.(1984) : *Rice Genet. Newsl.* 1: 95-97.

b) These data were obtained from Kiyosawa (unpublished data), except Japanese differential strains.

c) Ina 168 was known as race 101.0. This isolate was considered as a spontaneous mutant.

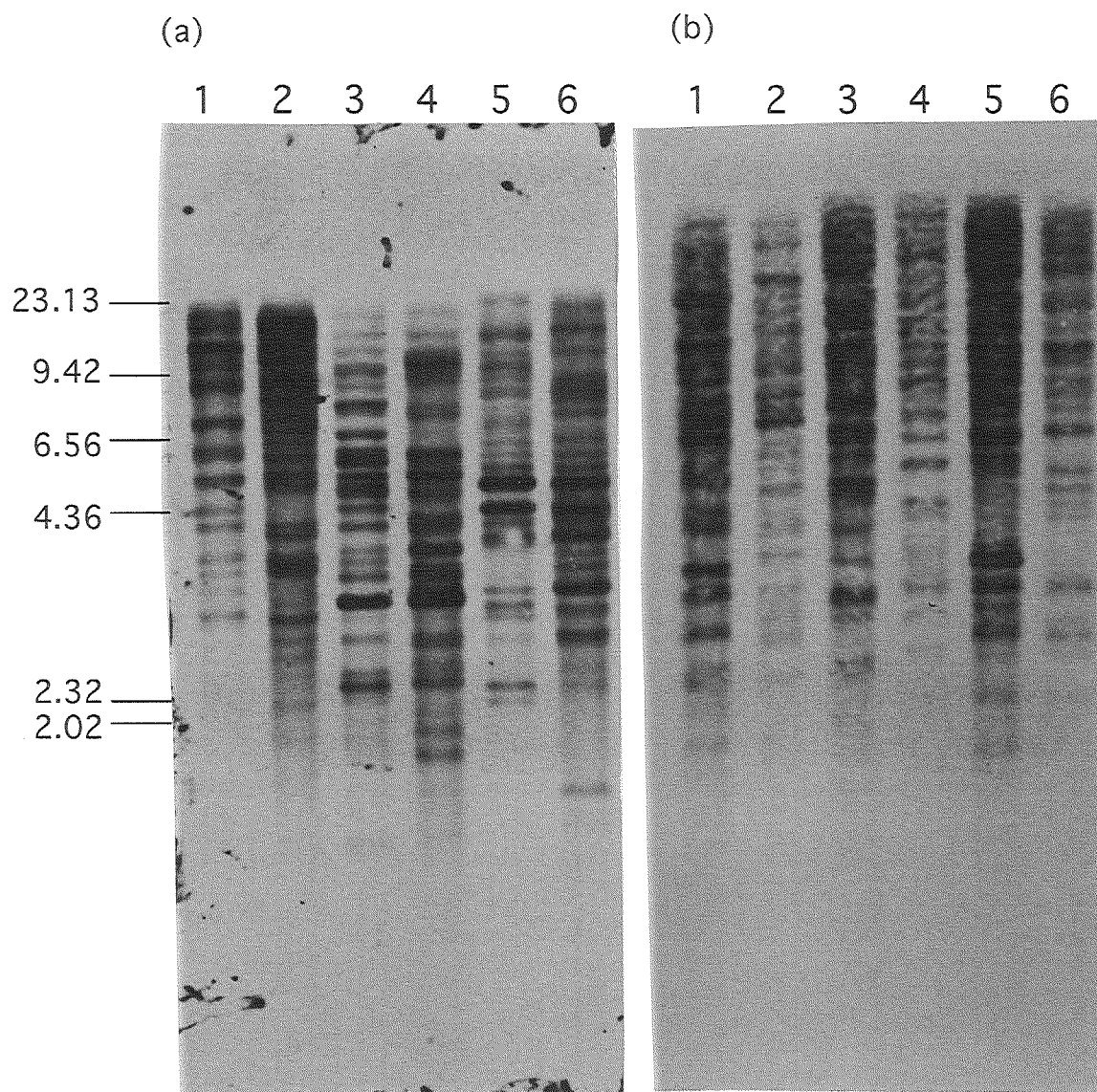


Fig. 3-1. Repetitive sequence probe pMG6015 and pMG6019.

M. grisea genomic DNA of strain Ina 72(odd lanes) and Guy11 (even lanes) were digested with *Bam*HI(lanes 1 and 2), *Eco*RI (lanes 3 and 4) and *Hind*III(lanes 5 and 6), electrophoresed, and transfered onto nylon membrane. Hybridization with pMG6015 (a) and pMG6019 (b) were performed with ECL direct nucleotide labelling / detection system.

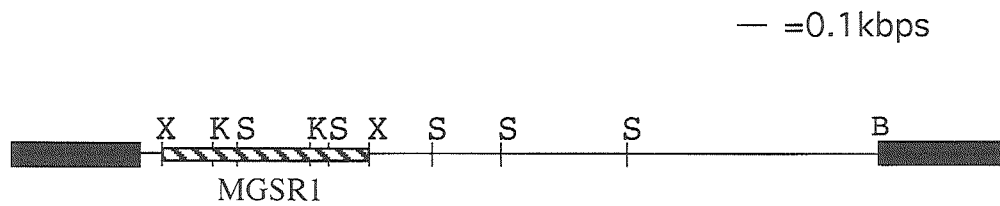


Fig. 3-2. Restriction map of pMG6015.

M. grisea genomic insert (2.7 kbp) was ligated in BamHI site in pUC19. One BamHI site of pUC19 was disturbed by ligation with Sau3AI digested genomic DNA. Restriction sites are indicated by letters; B = *Bam*HI, K = *Kpn*I, S = *Sma*I, X = *Xho*I. Restriction endonucleases *Eco*RI, *Sac*I, *Sma*I, *Xba*I, *Sal*I, *Pst*I, *Sph*I, and *Hind*III were revealed to have no digestion site in the insert. Shaded bars indicate the plasmid vector pUC19. A striped bar indicates the SINEs-like element MGSRI(Chapter 4).

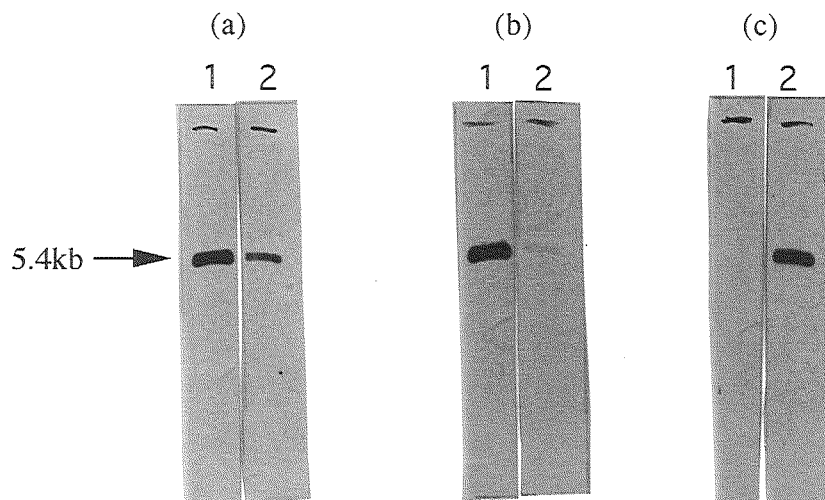


Fig. 3-3. Cross hybridization analysis.

pMG6015(lane 1) and pCB586(lane 2) were electrophoresed, blotted to a Nylon membrane and hybridized with pUC19 (a) , pMG6015 (b) and pCB586 (c).

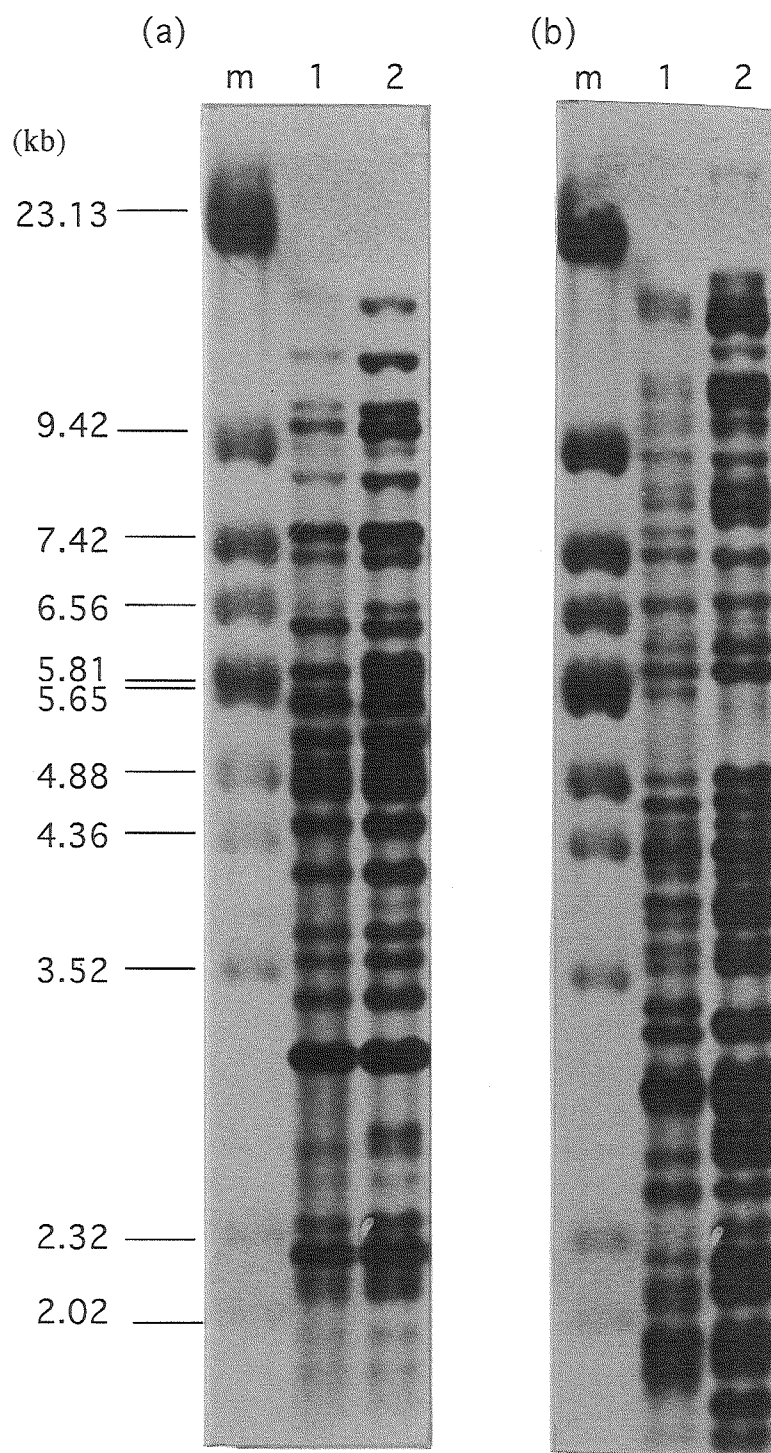


Fig.3-4. Patterns of DNA fingerprint derived with pMG6015 (a) and pCB586(b).

M. grisea strain Ina72 (lane 1) and Ina168 (lane 2) genomic DNA were digested with EcoRI, electrophoresed and blotted onto Nylon Membrane. Probe DNA were purified by recovering from agarose gel.

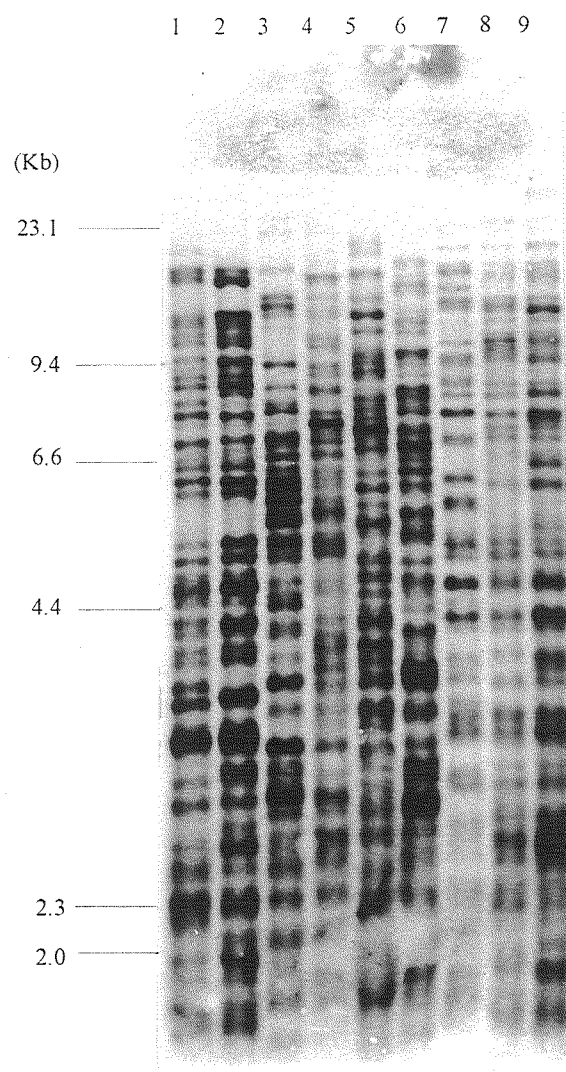


Fig. 3-5. DNA-fingerprinting of Japanese isolates.

Preliminary analysis with limited number of isolates using MGR586 as a probe. 1, Ina 72; 2, Ina 168; 3, Ken 53-33; 4, Ken 54-20; 5, Hoku 1; 6, P-2b; 7, Ken 54-04; 8, Fuku 5-2; 9, Nakayama 3-3.

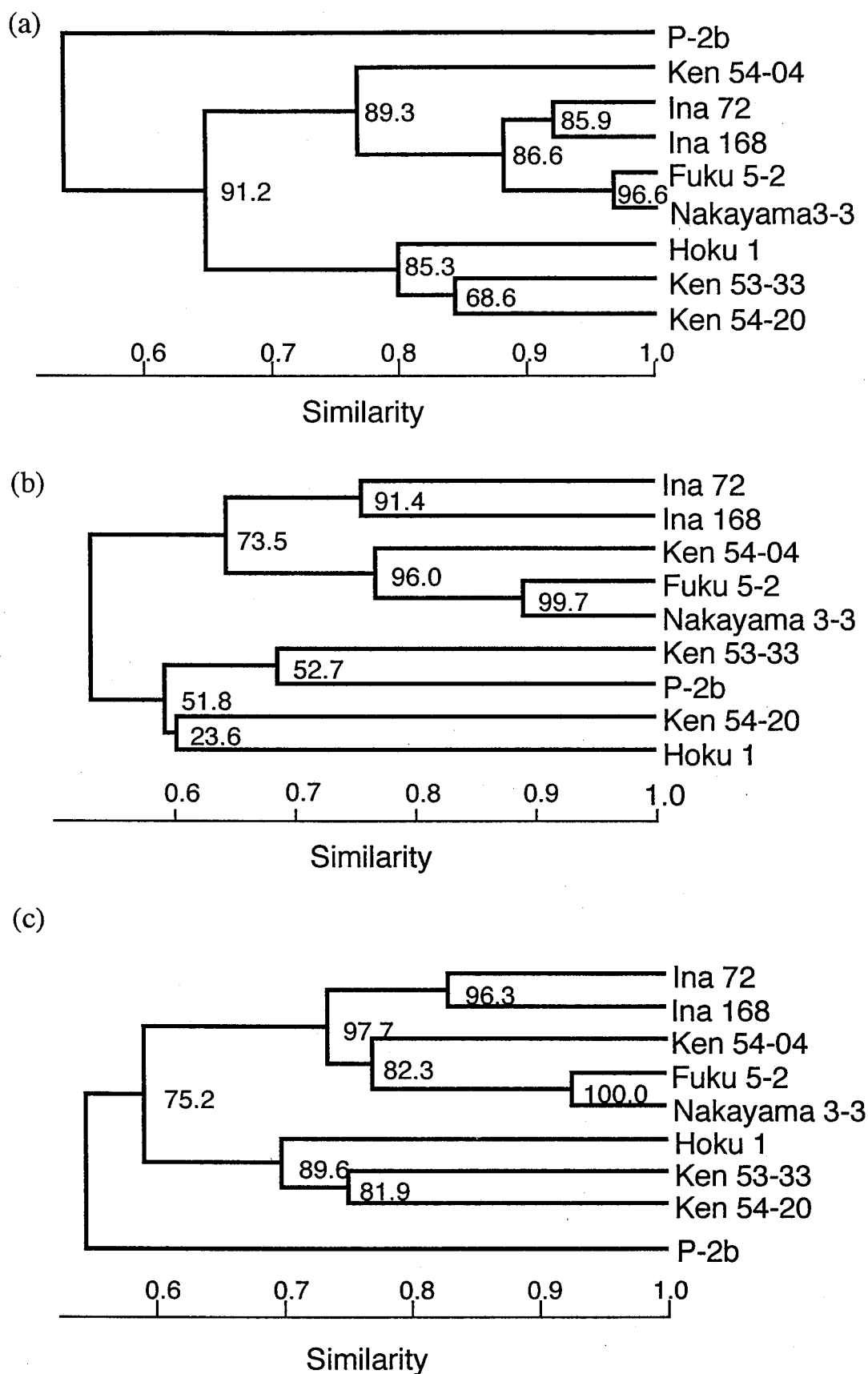


Fig. 3-6. UPGMA Dendrograms of Japanese isolates based upon (a) pMG6015, (b) MGR586 and (c) both DNA fingerprint(s).

Values on the branches of the cluster indicate the results of the bootstrap analysis.

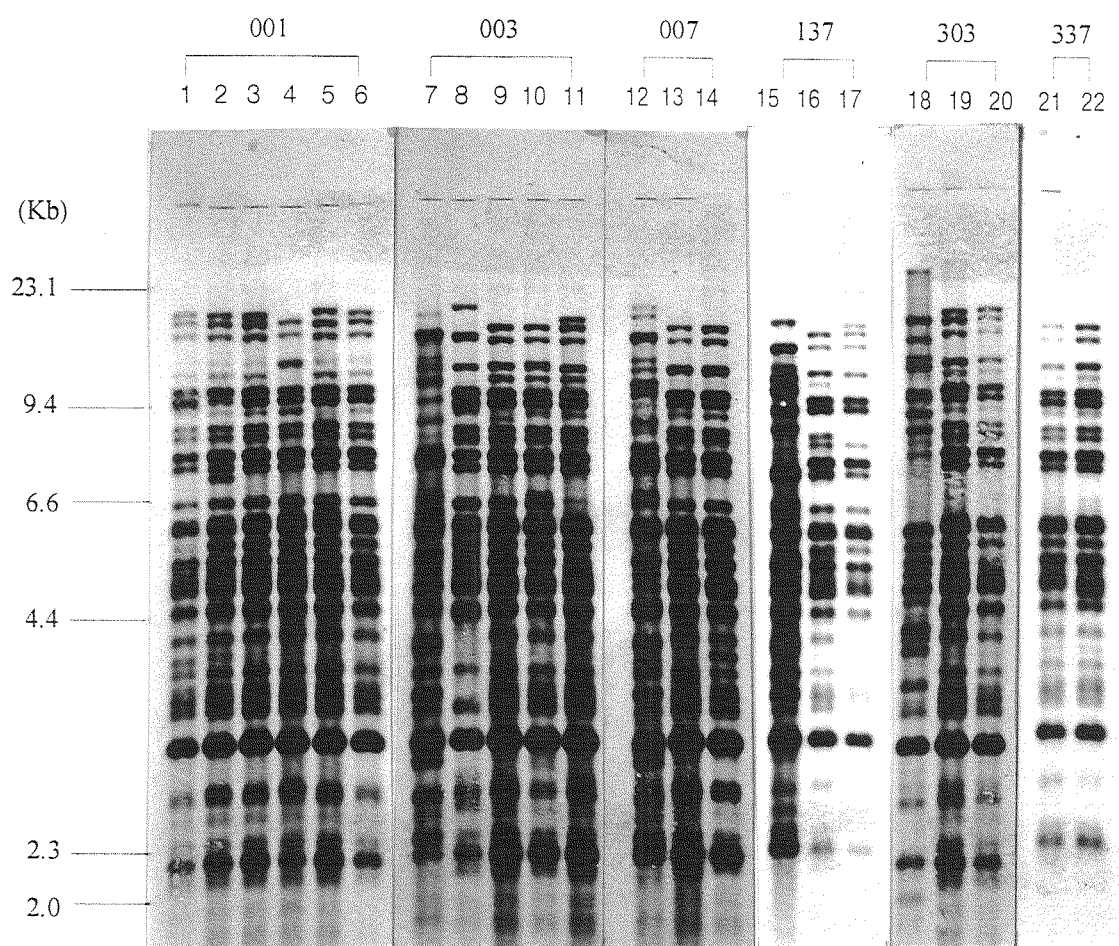


Fig. 3-7. DNA-fingerprinting of Japanese isolates.

pMG6015-fingerprint of isolates grouped based upon pathogenicity. Numbers above the lanes represent pathogenicity groups. 1, Kitaibaragi 4; 2, Nakayama 1-9; 3, Hitachiohta II-9; 4, Nakayama 3-3; 5, Shimone 7; 6, Hanawa 2; 7, Ken 54-20; 8, Ken 54-04; 9, Hanawa 4; 10, Dai 74-03; 11, Ena 3; 12, Hoku 1; 13, Nakayama 3; 14, Nakayama 10; 15, Ken 53-33; 16, Kitaibaragi 9; 17, Shimomurogashima 3; 18, P-2b; 19, Ena 9; 20, Kamisato 13; 21, Fuku 5-2; 22, Ao 14-20.

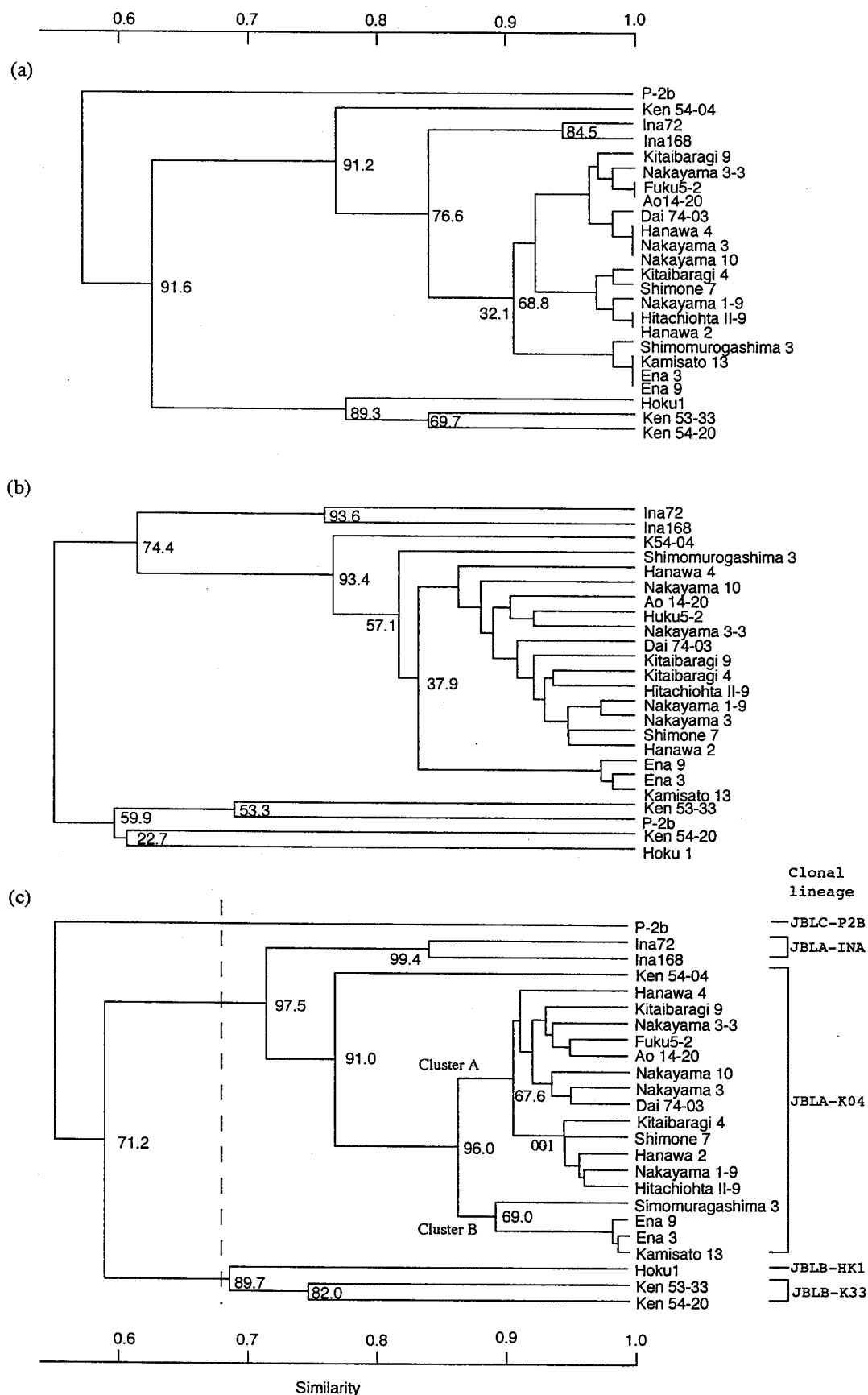


Fig. 3-8 UPGMA Dendrograms of Japanese isolates based upon (a) pMG6015, (b) MGR586 and (c) both DNA fingerprint(s). Values on the branches of the cluster indicate the results of the bootstrap analysis. A criterion for the clonal lineage assignment (a point of 0.65 similarity) is indicated with a broken line (---). Clonal lineages are indicated in the right side of the isolate name. Clusters A, B and a subcluster which contains isolates of race 001 are indicated.

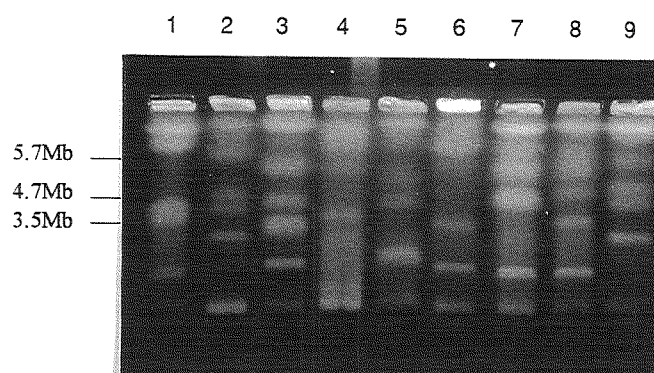


Fig. 3-9. Electrophoretic karyotyping of Japanese isolates.

Preliminary analysis with limited number of isolates. 1, Ina72; 2, Ina 168; 3, Ken 53-33; 4, Ken 54-20; 5, Hoku 1; 6, Ken 54-04; 7, Fuku 5-2; 8, Nakayama 3-3; 9, P-2b.

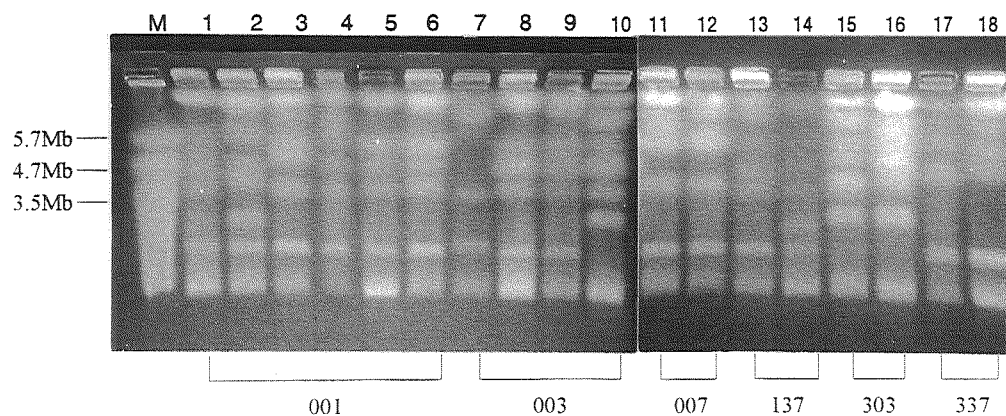


Fig. 3-10. Electrophoretic karyotyping of field isolates of lineage JBLA-K04.

Pathogenicity groups are indicated. M, size marker *S. pombe* (FMC BioProducts, ME, USA); 1, Kitaibaragi 4; 2, Nakayama 1-9; 3, Hitachiohta II-9; 4, Nakayama 3-3; 5, Shimone 7; 6, Hanawa 2; 7, Ken54-04; 8, Hanawa 4; 9, Dai 74-03; 10, Ena 3; 11, Nakayama 3; 12, Nakayama 10; 13, Kitaibaragi 9; 14, Shimomurogashima 3; 15, Kamisato 13; 16, Ena 9; 17, Fuku 5-2; 18, Ao 14-20.

第4章 RFLPプローブpMG6015の塩基配列解析

はじめに

第2章で、本邦産のいもち病菌菌株が系統内で病原性レースを多様化してことが示された。また、核型も非常に多様であった。この多様性をもたらすものとして、現在もっとも研究されているのが、本菌のゲノム中に存在するトランスポゾン様因子であり、現在までに7種のトランスポゾンが発見されている(Table 1-2)。DNAフィンガープリンティングのプローブであるMGR586にも、トランスポゾンの1部が含まれている³⁰⁾。そこで本章では、我々のプローブpMG6015の分子的解析を行い、その中に含まれる反復性配列の構造について考察した。

第1節 MGSR1の発見

pMG 6015はインサートの全長が2.7kbであるので(第3章第1節)，その反復配列の全体が含まれているとは限らない。そこで、これをプローブとしてλEMBL3によるゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、同様の配列を含む長い(約10kb) DNAを解析して、反復配列の主要な部分を検索した。

4-1-1 材料及び方法

使用菌株	イネいもち病菌Ina72 <i>Escherichia coli</i> P2392, <i>E.coli</i> LE392 (λファージの宿主として) λEMBL3
プローブ	pMG6015

培地、試薬

NZY培地：NaCl 5 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 2 g/l, 酵母エキス（オリエンタル酵母工業株式会社）5 g/l, NZアミン（和光純薬工業株式会社）10 g/l. pHは2N NaOHを用いて7.5とした。オートクレーブ滅菌（121℃, 10分）した。寒天を加える場合には寒天末（ナカライテスク）を15 g/lの割合で加えて調製した。

トップアガロース：NZY 培地にアガロース（宝酒造株式会社）を5 g/lの割合で加えて調製した。

トップアガー：NZY 培地に寒天末（ナカライテスク株式会社）を5 g/lの割合で加えて調製した。

TB培地：NaCl 5 g/l, バクトートリプトン (DIFCO LABORATORIES, MI, USA) 10 g/l. pHはNaOHを用いて7.5とした。オートクレーブ滅菌 (121 °C, 10分) 後、あらかじめ滅菌した1 MのMgSO₄ · 7H₂Oを10 ml/l添加した。あらかじめ滅菌した20 %マルトース水溶液を10 ml/l添加した。

SM(phage dilution 緩衝液)：NaCl 5.8 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 2.0 g/l, 1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 50 ml/l, 2%ゼラチン溶液 5 ml/l. オートクレーブ滅菌 (121 °C, 10分) した。

RNase A 溶液：第2章第2節参照。

DNase I 溶液：DNase I (GRADE III, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)を1mg/mlとして使用した。

プロテイナーゼK 溶液：プロテイナーゼK (トリチラキウム属製, 和光純薬工業株式会社, 生化学用) を20 mg/mlとして使用した。

クロロホルム：ファージ調製用には, NaHCO₃ と混合, 攪拌後の上清を用いた。

DNA調製用には, クロロホルム：イソアミルアルコール = 24:1の混液を用いた。

0.5M EDTA (pH 8.0), フェノール, TE緩衝液：第2章第2節参照。

50×TAE：242 g/l トリス (ヒドロキシアミノメタン), 57.1ml/l 氷酢酸, 100 ml/l 0.5M EDTA (pH8.0). 使用時には50倍に希釈した。

方法

1. Ina72 · λ EMBL3ゲノムDNAライブラリーの作成

UNDIGESTED EMBL3 CLONING KIT (STRATAGENE, CA, USA), GIGAPACK II PLUS PACKAGING EXTRACT (STRATAGENE CLONING SYSTEMS), DNA LIGATION KIT (宝酒造株式会社)を用いて, そのプロトコールに従って作成された。

2. プラークハイブリダイゼーション

Molecular Cloningに従って実験した。

1) 宿主細胞の調製

E. coli P2392をグリセロールストックからNZY寒天平板培地に接種し, 37 °Cで48時間培養した。平板培養から単一コロニーを15 mlのTB培地 (試験管 21×200 mm) に接種し, 37 °Cで4～6時間振盪培養(23 mm, 160 rpm)しながら, コールマン式吸光度計でOD₅₉₀を経時的に測定した。対数増殖期後期～定常期 (4時間30分後) の培養を, 2000rpm, 4 °Cで10分間遠心分離し, 菌体を沈殿させ, 上清を捨てた。培養に用いたTBの半分の容量の, 滅菌した 10 mM MgSO₄ · 7H₂Oに菌体を再懸濁さ

せ、細胞液を 10 mM MgSO₄ で OD₅₉₀ = 0.5 に希釈した。調製した宿主細胞液は 4 °C で保存し、48 時間以内に使用した。

2) メンブランの作成

10 μ l のパッケージングリアクションミクスチュア (約 360 pfu) と 0.1 ml の宿主細菌液を混合し、37 °C で 20 分ファージを吸着させた。2.5 ml トップ・アガロースを混合し、NZY 平板にまき、プラークの直径が 1.5 mm になるまで (10~12 時間) 37 °C で培養した。その後少なくとも 1 時間 4 °C に放置し、トップ・アガロースを固化させた。ナイロンメンブラン (Hybond-N⁺, Amersham, Buckinghamshire, UK) にボールペンで印をつけ、泡をつくらないように平板上に置いた。1~5 分置き、この間に平板の裏側にも印をつけた。メンブランを剥がし、プラーク側を上にして 0.5M NaOH に浸した 2 枚の Whatmann 3MM paper の上に置き、5 分以内に 5×SSC で 2 回、1 分間すすいだ後、Whatmann 3MM paper の上で乾燥させた。

3) ハイブリダイゼーション 及びディテクション

ECL direct nucleic acid labelling/detection system を用い、第 2 章第 2 節のサザンハイブリダイゼーションと同様に行った。ただし、ハイブリダイゼーション時間は 4 時間とした。得られたポジティブのプラークを、パストゥールピペットで吸い取り、1 ml の SM 中に保存した。

3. ファージ DNA の調製

Sambrook らの方法⁵⁰⁾に従った。

1) プレートライゼートストックの調製

ファージは使用する前に得られたファージ液を用いて再度プラークハイブリダイゼーションし、シングルプラーク由来のファージ液を調製した。宿主懸濁液 0.2 ml と 18000 pfu のファージ液を混ぜ、37 °C で 15 分間保持して吸着させた。48 °C に温めておいたトップアガー 3 ml と混ぜ、あらかじめ 37 °C に温めておいた NZY 寒天平板培地にまいた。37 °C で、プラークが大きくなり過ぎないように注意しながら 6~8 時間培養した。SM 緩衝液 3.5 ml を入れて、平板全体に均一に広げ、少し揺らした後、パラフィルムで蓋をしっかりと止め、4 °C で一夜置いた。平板を傾け、トップアガーを吸い込まないように注意しながらパストゥールピペットで SM 緩衝液を吸いとり、テフロン遠心管 (50 ml) に移した。平板にさらに SM 緩衝液 0.72 ml を入れ、全面に広げてすすいだ。試験管立ての下の方などに平板の端をかけて斜めにし、そのまま 5 分置いた。先に SM 緩衝液を集めたものと同じ遠心管に SM 緩衝液を集めた。クロロホルム 0.2 ml を遠心管に加え、よく振り混ぜた。室温で 15 分間静置後、2000×g, 4000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心分離して宿主由来の細胞片を沈澱させた。沈澱を吸い込まないように気を付けながら、上層をパストゥールピペットでファルコン 2070 遠心管に移した。クロロホルムを

0.3%になるように加え、4℃で保存した。

2) ファージの純化

試験管 (21×200mm) にNZY培地10 mlを入れ、LE392の単一コロニーを接種した。27℃で、激しく振とうしながら (300 rpm, 30 mm) 一夜培養 (12~15時間) した。終夜培養液0.2 mlを、あらかじめ37℃に温めておいたNZY培地100mlに接種した。37℃, 130 rpmで振とうしながら、培養液のOD₆₀₀が0.5になるまで培養した (約4時間)。次に、100 mlの培養液にそれぞれ約1000 pfuのファージを接種し、12時間同様に振とう培養した。培養液100 mlにクロロホルム2 mlを加え、さらに10分間、同様に振とうした。

溶菌した培養液を室温にもどした。DNase I溶液 (1 mg/ml) およびRNase A溶液 (1 mg/ml) をそれぞれ最終濃度が1 μg/mlになるようにそれぞれ加え (0.1 ml/培養液100 ml), 混合した。室温で30分間静置後、固体のNaClを最終濃度が1Mになるように加え (5.84 g/培養液100 ml), 渦を巻くように振り混ぜて溶かした。氷上で1時間静置後、テフロン遠心管 (50 ml) に移し、冷たいうちに11000 ×g, 4℃で10分間遠心分離して破片を沈澱させた。遠心後ただちに上澄みを、デカンテーションで、回転子を入れて滅菌した500 ml三角フラスコに集めた。固体のポリエチレングリコール (PEG6000) を最終濃度が10 % (w/v) になるように加え、室温で、マグネチックスターラーでゆっくりかき混ぜて溶解させた。氷水中で冷却し、そのまま氷上で少なくとも1時間静置し、ファージ粒を沈澱させた。スターラーで攪拌して沈澱を再懸濁したものを、テフロン遠心管 (50 ml容) に移し、冷たいうちに11000 ×g, 4℃で10分間遠心分離し、沈澱したファージ粒を得た。遠心後ただちにデカンテーションで上澄みを捨てた。さらに遠心管を傾けて5分間立てておき、残った液体をベレットから排水させ、それをバストゥールピペットで取り除いた。SM緩衝液を上澄み100 mlに対し1.6 ml加え、スポイトをつけた3 mlピペットを用いて、ファージベレットを静かに再懸濁させ、器壁を完全に洗った。ファージ懸濁液と等量のクロロホルムを加え、30秒間激しく攪拌して、ファージ懸濁液からポリエチレングリコールと細胞片を抽出した。3000×g (5000 rpm), 4℃で15分間遠心分離して、有機層と水層を分けた。ファージ粒を含む水層4mlを、超遠心チューブ (ultra clear, Beckman Instruments, Inc., CA, USA) に回収した。超遠心機 (L8-80M, Beckman Instruments) で、110000×g, 4℃で2時間遠心分離し、ファージ粒を沈澱させた。遠心後ただちにデカンテーションで上澄みを捨てた。超遠心チューブにSM緩衝液 200 μlを入れ、ファージを懸濁させた。4℃で一夜静置後、ピペットで溶液を静かに上下させ、全てのファージ粒を確実に再懸濁し、マイクロチューブに移した。以上の操作で得られたファージ液を次のλ DNAの抽出実験に用いた。

6) ファージλ DNAの抽出

前の段階で調製したファージ液に、0.5 M EDTA (pH 8.0) を、最終濃度が20 mMになるように加えた (8 μl/ファージ液200 μl)。次に、プロテイナーゼ Kを最終濃度が50 μg/mlになるように加えた (0.5 μl/反応液200 μl)。さらに、10 % (w/v) SDSを、最終濃度が0.5 %になるように加えた (10 μ

1/反応液200 μ l). チューブを何度か逆さにして混合した後, 56 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ, 反応液を室温まで冷却した. 次に等量のフェノールを加え, 完全な乳濁液になるまで, 何回もチューブを逆さにして混合した. 3000 $\times$ gで, 室温で5分間遠心分離して二層に分けた. パストゥールピペットを用いて, 水層をきれいなマイクロチューブに移した. この水層に, 等量の平衡化したフェノールとクロロホルムの50:50の混合液を加え, 遠心分離(7000rpm, 室温, 5分)した. 上記の方法で水層を回収し, 等量のクロロホルムを加え, 遠心分離(7000rpm, 室温, 5分)した. 水層を回収し, 3M酢酸ナトリウム溶液(pH 7.0)を, 最終濃度が0.3Mになるように加え (20 μ l/反応液200 μ l), よく混合した. 2倍量のエタノールを加え, 混合した. (この段階で λ DNAは, 白い綿糸のような沈澱となって見えた.) 室温で30分間静置後, パストゥールピペットの外側にDNAの沈澱を付着させ溶液から取り出し, 70 %エタノール 200 μ lの入ったマイクロチューブに移した. 12000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ Cで2分間遠心分離し, DNAを沈澱させた. 上澄みを注意深く捨て, DNAのペレットを室温で減圧乾燥させた. 200 μ lのTE(pH 8.0)にDNAを再溶解した. 得られたDNA溶液は濃度を測定し, -20 $^{\circ}$ Cで凍結保存した.

4. ファージDNAの解析

(1) 制限酵素地図の作成

従来どうり各クローンを適当な制限酵素で消化し, アガロースゲル電気泳動し, 各断片の長さから推測した. 制限酵素は*Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Xho*I, *Sac*I (全て宝酒造株式会社製)の中から, 適当なものを組み合わせて使用した.

(2) ハイブリダイゼーション

第2章第2節に準じて行った. 電気泳動したゲルからDNA断片を回収し, プローブとして実験した.

4-1-2 結果及び考察

1. プラークハイブリダイゼーション及びDNA抽出

pMG6015をプローブとしてIna72のゲノムライブラリーの1745のプラークをスクリーニングした結果, 46のポジティブのプラークを得た. 全体のプラークに占めるポジティブのプラークの割合は2.63%であり, この配列のコピー数の多さを反映していた. これらのファージを, ϕ MG6015-1~46とした. このうち, ϕ MG6015-1~6より, DNAを抽出した.

2. ファージDNAの解析

pMG6015との相同性を確かめるため, 制限酵素*Sa*Iで消化したファージDNAとpMG6015とのハイブリダイゼーションを行った (Fig. 4-1). その結果, ϕ MG6015-4以外には強いシグナルが現れ, 相同性が確認された. また, それぞれ異なる長さのバンドにハイブリダイズし, これらのクローンがゲノム上の別々な位置に由来することが示唆された.

pMG6015との相同性が見られたクローンの制限酵素地図をFig. 4-2に示す。この過程で、各クローンを制限酵素Xho Iで消化したところ、全てのクローンに共通な0.8kbの断片があった。この断片はpMG6015にも含まれていた (Fig. 4-3)。この断片がpMG6015の中心的配列であることが期待された。

このうち、pMG6015と相同な配列がクローンの中程にある ϕ MG6015-3から、断片を回収し、それを用いてDNAフィンガープリンティングを行った。その結果をFig. 4-4に示す。pMG6015のパターンに比べて、バンドは減少していたが、ほぼ同様のパターンを示していた。従ってこの配列がpMG6015の反復配列の主要部分だと考えられ、MGSR1と命名された。

第2節 MGSR1の塩基配列の解析

前節で得たMGSR1の塩基配列を決定し、その特徴を解析した。

4-2-1 材料及び方法

菌株 *Escherichia coli* JM109
 プラスミドpUC19
 ϕ MG6015-3

培地, 試薬

SOB培地, SOC培地, LB培地, LB寒天培地, 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド (X-gal), イソプロピル- β -D-チオ-ガラクトシド(IPTG), TAE緩衝液, 臭化エチジウム水溶液, TE緩衝液, フェノール, クロロホルム, TBE緩衝液: 第2章第2節を参照。

ホルムアミドゲルローディングバッファー: ホルムアミドに下記成分を溶解し調製した。

10 mM EDTA (pH 8.0), キシレンシアノールFF 0.025 %, プロモフェノールブルー0.025 %。

20 %アクリルアミドゲル: 20 %アクリルアミド溶液 10mlに200 μ lの10 %APS, 3 μ lのTEMEDを溶解した。

10 %APS: 0.1 g/ml 過硫酸アンモニウム 溶液

TNE: 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5), 100 mM 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA (pH 8.0).

1.5 M NaCl-10 mM Tris 溶液: 1.5 M 塩化ナトリウム, 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5).

1 N NaOH-1 mM EDTA 溶液: 1 N 水酸化ナトリウム, 1 mM EDTA (pH 8.0).

10 mM Tris: トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 10 mM

40 % アクリルアミド溶液: 38 g のアクリルアミド (電気泳動用, ナカライテスク株式会社) と 2 g の N', N'-メチレンビスアクリルアミド (電気泳動用, ナカライテスク) をイオン交換水に溶解し, 全量を 100 ml にした. 遮光して 4 °C で保存した.

6 % アクリルアミドゲル: 9 ml の 40 % アクリルアミド溶液 と 12 ml の 5×TBE, 25.2 g の尿素 (生化学用, キシダ化学株式会社) をイオン交換水に溶解し, 全量を 60 ml にした. ここに 300 μ l の 10 % APS 溶液 と 60 μ l の TEMED (電気泳動用, ナカライテスク株式会社) を加え, ガラス板の間に流し込み, 固化させた.

方法

1. MGSRI のサブクローニング

(1) MGSRI DNA の回収

ϕ MG6015-3 DNA を, 制限酵素 *Xho*I で消化し, アガロースゲル電気泳動した. その後, 染色したゲルから目的の DNA のバンドを切り出し, フィルター付き遠心チューブ (SUPREC-01, 宝酒造株式会社) に入れ, -20 °C で凍結し, 次いで 37 °C で 5 分間解凍した. 10000 rpm, 4 °C で 10 分間遠心分離し, カップに TE 緩衝液を 100 μ l 入れ, 同様に遠心分離した. カップを取り外し, 得られた DNA 溶液をフェノール・クロロホルム抽出した. この溶液を 1-ブタノールで約 50 μ l に濃縮し, エタ沈メイト (ニッポンジーン) をキャリアーとしてエタノール沈澱し得られたペレットを適量の TE 緩衝液に溶解し, ライゲーション反応にもちいた.

(2) pUC19 の消化と脱リン酸化

5 μ g の pUC19 DNA を制限酵素 *Sa*I (宝酒造株式会社) で消化し, エタノール沈澱した. この DNA のペレットを 1 M Tris (pH 8.0) に溶解し, バクテリアルアルカリリンフォスファターゼ (宝酒造株式会社) 1 U を加えて 65 °C, 30 分間反応させた. この反応液を, フェノール抽出を 3 回行い, フェノール・クロロホルム, クロロホルム抽出し, エタノール沈澱して DNA を回収した.

(3) ライゲーション

上記(1), (2)で得られた溶液を挿入断片:ベクターDNA=3:1(モル比)になるように反応系を調整し, T4DNAリガーゼ(東洋紡株式会社)で16℃, 12時間反応させ, ライゲーションした。

(4) 形質転換

上記(3)の反応液を*E.coli* JM109のコンピテント細胞溶液(200 μ l)に加え, 氷中で30分保持した。これを42℃で90秒間ヒートショックをかけ, 800 μ lのSOC培地に加え, 37℃で30分間振とう培養した(回復培養)。この培養液をX-gal・IPTG・アンピシリン添加LB寒天培地に塗り付け, 37℃で1晩静置培養し白色コロニーを釣菌した。

(5) プラスミド抽出

第2章第2節参照。

2. 塩基配列の決定

(1) サブクローニング

5 μ gのpMGT6-1DNAを制限酵素*Kpn*Iで消化しアガロースゲル電気泳動した。緩衝液は1×TAE, ゲルは低融点アガロース(Sea Plaque GTG, FMC BioProducts, MI, USA)を1%の濃度で用いた。電気泳動終了後, ゲルから0.3 kb付近のバンド, 3.0 kb付近のバンドをそれぞれ切り出し, マイクロチューブにいった。ゲルの入ったマイクロチューブを, 70℃で15分間保持し, ゲルを溶解させた。等量のTE緩衝液を加え, さらに70℃で5分間保温した。このチューブに, 等量のフェノールを加え攪拌し, 室温で3分間遠心分離し, 上層を別のマイクロチューブにとった。さらに上層と等量のフェノールを加え, 同様の操作を繰り返した。同様にフェノール・クロロホルム混液, 次いでクロロホルムで抽出し, 1-ブタノールで濃縮し, エタ沈メイト(株式会社ニッポンジーン)をキャリアーとしてエタノール沈澱しDNAを回収した。

0.3 kb付近のバンドから回収したDNAは*Kpn*Iで消化, 脱リン酸化したpUC19DNAとリガーゼを用いてライゲーションさせた。3.0 kb付近のバンドはそのままT4DNAリガーゼを用いてライゲーションさせた。それぞれのDNA溶液は第2章第2節に準じて形質転換に供した。それぞれいくつかのコロニーからプラスミドを抽出した。

抽出したプラスミドは制限酵素で消化し, アガロースゲル電気泳動して, 断片の種類, あるいは方向性を判断した。各サブクローンDNAは第2章第2節に従って塩化セシウム密度勾配法で精製した。

(2) オリゴヌクレオチドプライマーの作成

DNA合成機(Model 380B, Applied Biosystems)で合成したDNA溶液を, Falcon2070遠心管に入れ, 55℃で一晩保持し, 保護基を除去した。この溶液を遠心濃縮機を用いて乾固させ, ホルムアミ

ドゲルローディングバッファー13.4 μ lに懸濁し、100 $^{\circ}$ Cで5分間変性し、直ちに氷中で冷却した後、20 %アクリルアミドゲル中を電気泳動 (1 $\times$ TBE, 20 mA定電流, 1時間) した。ゲルより目的のオリゴヌクレオチドのある部分を切り出し、短冊状に切り、1 mlのシリンジ (テルモ株式会社) に入れ、Falcon2070遠心管 (Becton Dickinson and Co., NJ, USA) に絞り出した。ここに5 mlのTNEを加えて一晩緩やかに振とうし、オリゴヌクレオチドを溶出させた。これをさらに100 $^{\circ}$ C, 10分間加熱し、ゲルに付着したものを溶出した。3000 rpm, 10分間遠心分離し、上清を得た。

ピペットマンP5000用のチップの先に滅菌した脱脂綿を少量つまみ、その上にDEAE-Sephadex A-50 250 μ lを流し込み、TNEで3回洗浄しカラムを作成した。このカラムに上記の上清を3回吸着させた。ここにまず150 μ lの1.5M NaCl-10 mM Tris溶液を、次いで200 μ lの0.1N NaOH-1 mM EDTA溶液を、最後に50 μ lの10 mM Trisを流し、溶出した液を50 μ lの1 M Trisが入ったマイクロチューブに受けた。ここにエタノールを加えて液量を1.5 mlとし、-20 $^{\circ}$ Cで一晩冷却した後、15000 rpm, 4 $^{\circ}$ Cで20分間遠心分離し、ペレットを70 %エタノールでリンスした後減圧乾固した。これを25 μ lの10 mM Trisに溶解し、濃度を測定した。

(3) 鋳型DNAの調製

DNA塩基配列決定には鋳型となる1本鎖DNAを調製しなければならない。今回は2本鎖プラスミドDNAをアルカリで変性して1本鎖化して用いる事にした。まず目的のプラスミドDNA 2 μ g, 2 mM EDTA溶液 2 μ l, 2N NaOH溶液をマイクロチューブにとり、滅菌水で全量を20 μ lとした。室温で5分間放置し、DNAを変性させた。ここに8 μ lの5 M酢酸アンモニウム溶液を加え、混和し、100 μ lのエタノールを加え混和した。-80 $^{\circ}$ Cのフリーザーで5分間冷却し、直ちに15000 rpm, 4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心分離し、上清を捨て、DNAのペレットを得た。このペレットを70 %エタノールで洗い、再度遠心分離して得たペレットを減圧乾燥した。

(4) シーケンシング反応

Sequenase ver. 2.0 (United States Biochemical Corp. Cleveland, USA) を用い、そのマニュアルに従って実験した。

(5) 電気泳動

スラブゲル電気泳動装置 (マリソル) を用いて、1 $\times$ TBE, 40 W定電力で泳動した。泳動終了後、ゲルはゲル乾燥機 (バイオラッド) を用いて乾燥し、オートラジオグラフィーに供した。

(6) 解析

DNASIS version 7.00 (日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社) を用いて解析した。

4-2-2 結果

MGSR1の断片をpUC19にサブクローニングし、pMGT6-1とした。pMGT6-1のいもち病菌由来のDNAは0.8 kbであるので、1度のシーケンシング反応では全ての塩基配列が決定できない。そこで、Fig. 4-5に示すようなストラテジーを考案した。まず、pMGT6-1を制限酵素*KpnI*で消化し、それぞれサブクローニングしpMGT6-1s1, s2, s3を作成した。これらのプラスミドに挿入されているいもち病菌ゲノム由来の部分の塩基配列を2種のユニバーサルプライマーを用いて決定した。さらにこの結果をもとにそれぞれのサブクローンの断片をつなぐ部分の配列を、pMGT6-1を鋳型として、4種のプライマー (Table 4-1) を作成して決定した。このようにして決定された全塩基配列をFig. 4-6に示した。

全塩基配列は760塩基対からなっていた。DNASISによる解析の結果、この配列にはORFは存在しなかった。また、核酸データベース (GenBank, R71.0 March, 1992) 検索の結果、特に高い相同性を示すものは見つからなかった。しかし、その内部にRNAポリメラーゼIIIのプロモーターである” A- box ” と” B-box ” があり、その3' 末端側にポリ (T) と考えられる配列があり、挿入の痕跡と考えられる8塩基の2回反復が存在する事が示され、RNAポリメラーゼIIIプロモーターを持つレトロポゾンであろうと思われた。

4-2-3 考察

MGSR1の塩基配列を決定したところ、RNAポリメラーゼIIIプロモーターを持つレトロポゾンの特徴を示した。一般に、このような特徴を持つものはSINEs (short interspersed elements) と考えられている。SINEsとは高等真核生物のゲノムに存在する転移因子のファミリーであり⁵⁸⁾、構造的特徴としては3' 末端側のオリゴ (T) またはオリゴ (T) , 7~21塩基の直列反復、RNAポリメラーゼIIIのプロモーターが挙げられる。また、いくつかのほ乳動物のSINEsの中には、ある種のtRNAに高い相同性を示すものがある事が知られている。MGSR1もポリ (T) と直列反復配列を持っているが、それらはSINEsとは異なるものであった。それは、現在までに知られている全てのSINEsでは直列反復はポリ (T) の下流に存在するが、MGSR1では逆になっているのである。また、核酸配列データベースの検索の結果、MGSR1に相同性を示すtRNAあるいはSINEsが無かったことから、MGSR1をSINEsと結論づけるにはさらに詳細な解析が必要であろうと思われた。

第3節 MGSR1のゲノムにおける分散性

MGSR1が各染色体に分散して存在している事をパルスフィールド電気泳動法を用いたサザンハイブリダイゼーションによって確認した。

4-3-1 材料及び方法

使用菌株 イネいもち病菌Ina72, Guy11

使用プローブ pMGT6-1

方法

1. パルスフィールド電気泳動用サンプル調製及び電気泳動：第3章第3節参照。

2. プロッティングとハイブリダイゼーション

泳動後、染色、撮影したゲルをUVクロスリンカー (SPECTRONICS, SPECTROLINKER XL-100) で1分間UV (254nm) を照射し、ゲル中のDNAを分断した。その後は第2章第2節に従い、アルカリ変性、中和、プロッティングを行った。ハイブリダイゼーションも第2章第2節に準じて行った。

4-3-2 結果及び考察

パルスフィールド電気泳動及びのサザンハイブリダイゼーション結果をFig. 4-7 に示した。pMGT6-1, つまりMGSR1が全ての染色体に存在している事がわかり、MGSR1が”動く遺伝子”である可能性を示している。

第4節 小括

反復性DNAフィンガープリンティングプローブであるpMG6015の分子的解析を行ったところ、このプローブの中心的配列として0.7kbの、*Xho*I断片があることが示され、MGSR1と命名された。

MGSR1の全塩基配列は760塩基対であり、その内部にRNAポリメラーゼIIIのプロモーターである”A-box”と”B-box”があり、その3'末端側にポリ(T)と考えられる配列があり、挿入の痕跡と考えられる8塩基の2回反復が存在する事が示され、レトロポゾンであるSINEsの特徴を備えている。また、パルスフィールド電気泳動法により各染色体に分散していることが確認された。

いもち病菌ゲノム中の転移因子としてはMGSR1以外にも6種類が見つかった(Table 1-2)。これらのうち5つはいわゆるLINEs (Long Interspersed Elements) に属するもの、トランスポゾンあるいはウイルス様因子であり、内部にORFを持つ大きなものである。今回の実験で見つけたのはこれらに対して比較的短いものである。最近、いもち病菌ゲノムからSINEs様因子であるMG-SINE1が発見されたが、その配列はMGSR1とは異なったものであった⁴⁵⁾。Farmanらは、最近、非病原性遺伝子AVR2-YAMOの突然変異の原因として転移因子の挿入があったことを報告している³⁰⁾。MGSR1も含めてこのような反復配列がいもち病菌のゲノムの多様性に何らかの役割を担っていることは明らかである。

Table 4-1. Synthetic oligonucleotide primers.

Primer name	Sequence(5'→3')
61S1FOR	5'-CAACCAATCAATCCT-3'
61S1REV	5'-GTGTAACCTTCGTTGG-3'
61S2FOR	5'-CACTTGAAGCATTG-3'
61S2REV	5'-ACCAGCAACTACGGC-3'
61S3FOR	5'-TGATGGCAAGTTCGA-3'
61S3REV	5'-CCCCCAACCCATATA-3'

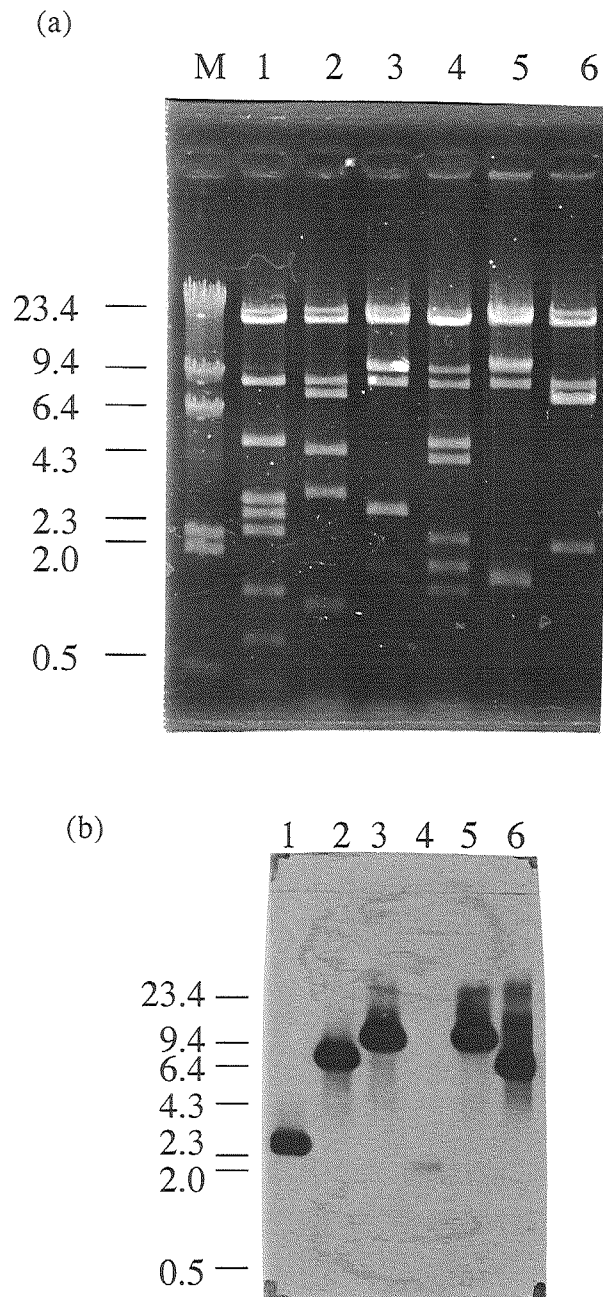


Fig. 4-1. ϕ MG6015 clones contain homologous DNA to pMG6015.

DNAs were digested with *Sal* I, electrophoresed (a), blotted to nylon membrane, and hybridized with pMG6015 labelled with ECL system (b). Sizes are given in kb. Lane M: λ DNA/*Hin* dIII digest, 1 to 6: ϕ MG6015-1 to ϕ MG6015-6.

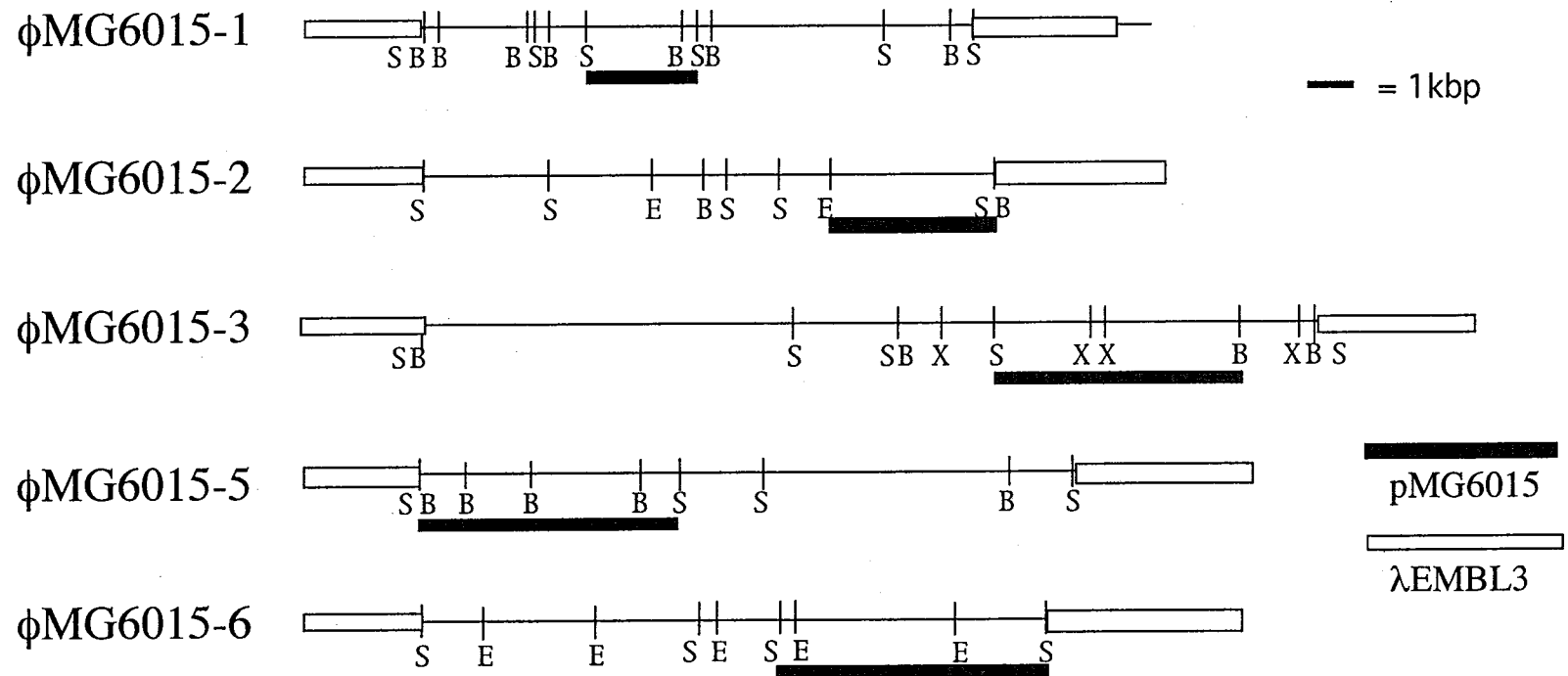


Fig. 4-2. Restriction map of ϕ MG6015 clones.

Abbreviations; B:*Bam*HI, E:*Eco*RI, S:*Sal*I, X:*Xho*I
 Bars indicate vector arm or its hybridizing fragment.

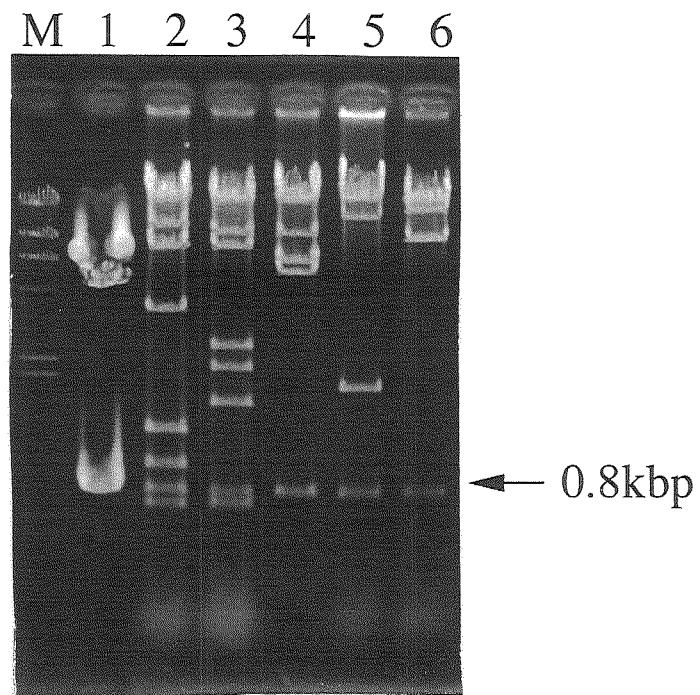


Fig. 4-3. Conservation of 0.8kbp *Xho*I fragment in ϕ MG6015 clones.

pMG6015 and phage DNA were digested with *Xho*I, and electrophoresed in a 0.7% agarose gel. Lane M: λ -*Hin* dIII size marker, 1:pMG6015, 2 to 6: ϕ MG6015 clones.

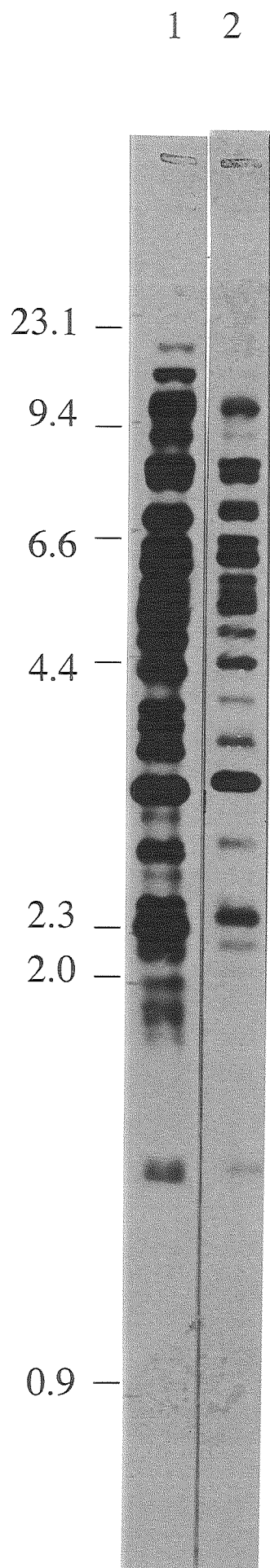


Fig. 4-4. Similarity of hybridizing pattern between two probe, pMG6015 and pMGT6-1.

M. grisea Ina72 DNA was digested with *Eco*RI electrophoresed, and blotted. Lane 1: probed with pMG6015 , 2: probed with pMGT6-1.

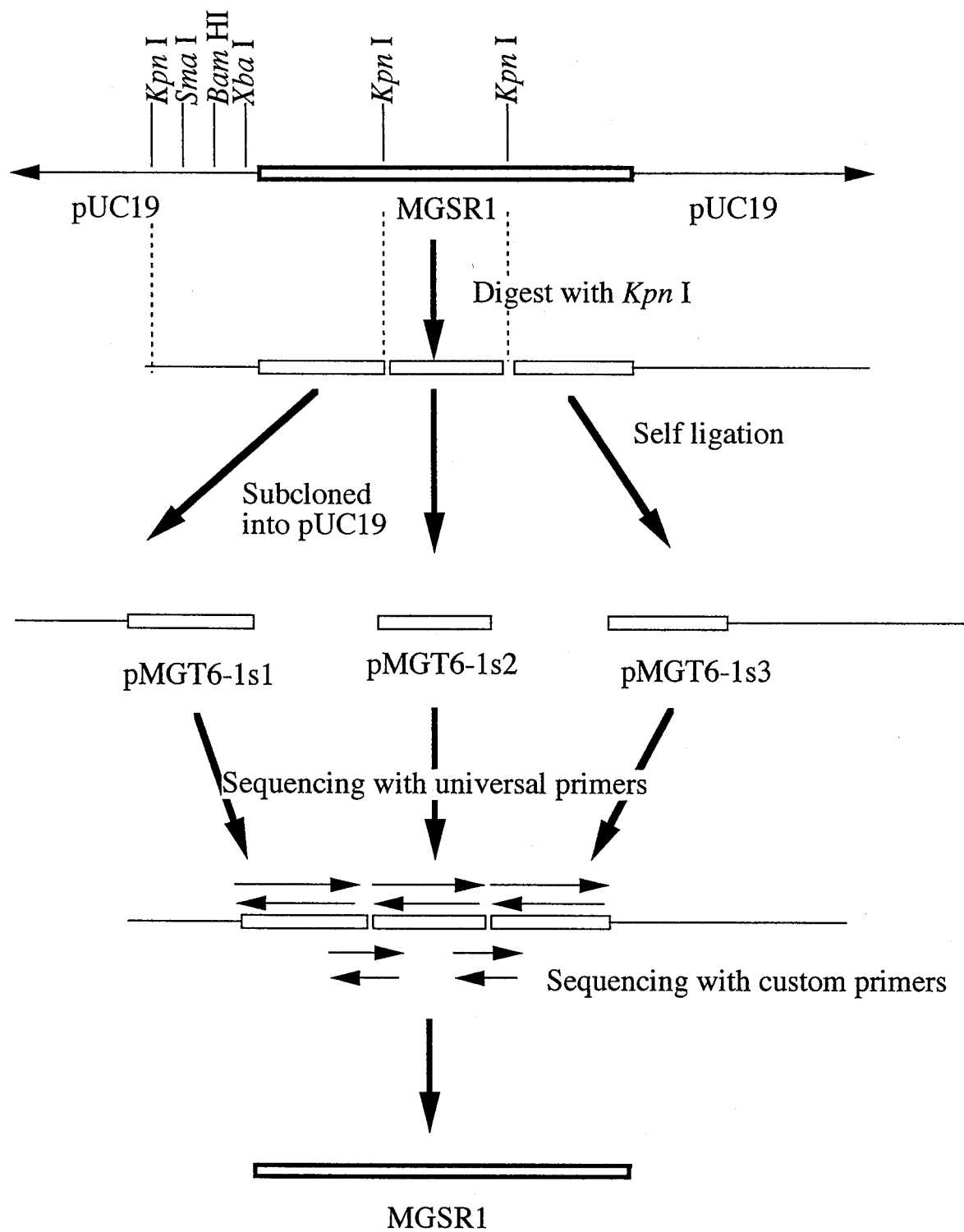


Fig. 4-5. Strategies for sequencing MGSR1.

```

5'  CTCGAGGGCATGATCTCTTCCTCGCTGGACTCTTTCTCGGAATCCTCGCT  50
      >>>>>>
      XhoI
      TAATTCTTCTGTTGAGGATTGATTGGTTGTCCTAATGTGGTGGGTTTGTC  100

      CCAAAGGTTTCCTCATCCGATTCTCCGAGCATCCGAGTCCGTGAGTTCGG  150
      TGGC

      GTAGTTGGGTCTCTTATCGGTGTAACCTTCGTTGGTTGTCCTGTCCTAGG  200
      NNAGTNGG
      A-box                               StyI

      GGTACTCGGTTTCCTACTGCTAGGGTTCGAGTGCCTCGGGGCTTCTGTGG  250
      GGTTCGANNCC
      B-box                               KpnI

      GTACCATCCTGCGTCGTTTTTGGAGCTATTGTGTACCATGCAATTGTCA  300

      CGTAGCAGGTGGTCCAGCTTATCGTGCTGTGTTGGTCAGGCCGTAGTTGC  350

      TGGTGATTGGTGGCATTAAATCCTCGTGGTTTTTTCGGTCTTGCCCCCTAAA  400
      >>>>>> poly(T)

      AATCAAGGGAATAATTTTCCTGGAATTTTTTGGGCAGTTTCTGGCGATGT  450
      poly(T)

      GCCCTGTCTTGTGCGCACTTGAAGCATTTGCCACTTTTGGGGTCTTTACGG  500

      GGCTTCTTGTGTTGTGTGGCTCTGAGGTCCATGGGTCCACTATGGGTACC  550
      StyI                               KpnI

      ATAAGCTGTATTGTAGGTCTGGGGTGCCGTGTGACGGGGCTGCTGCCATC  600

      CACCATTGTTTCTGTGGTATATGGGTTGGGGGTGTTGGTATTTGCGTCCC  650

      GTGTTGGCTTGTGGAATTGAGGTGACGAACATTCGCTGTCCGCCTTGTTT  700

      TTCCTGTCGGCGTTCGTAAATCCGGTTGTCAAGTTTGATGGCAAGTTCGA  750

      CGTACTCGAG 3' 760
      XhoI

```

Fig. 4-6. Nucleotide sequence of MGSRI.

Two internal RNA polymerase III promoters; A-box and B-box, 3'-poly (T), 8bp-direct repeat (>) and 5' ends of restriction sites (^) are indicated.

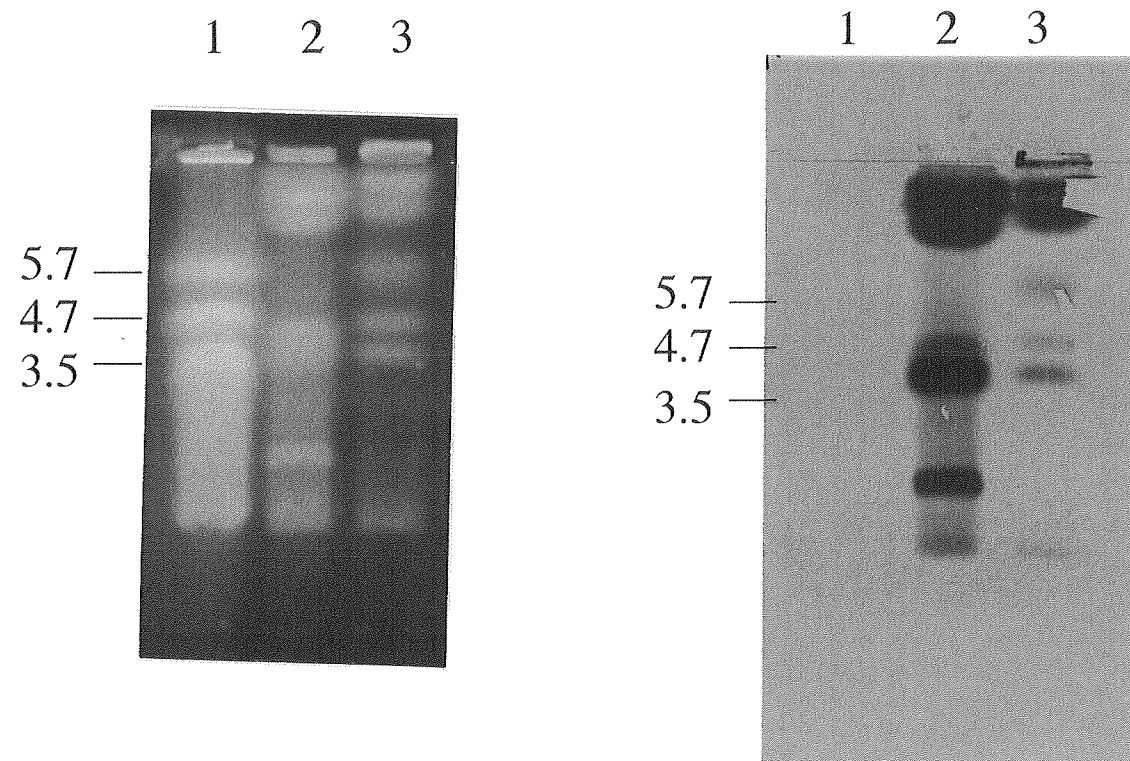


Fig. 4-7. pMGT6-1 exists in all chromosomes.

Chromosomal sized DNA were prepared and electrophoresed according to material and methods.
 pMGT6-1 was labelled and detected with ECL sysyem.
 Lane 1 : *S. pombe* (FMC Bioproducts, MI, USA), 2: Ina72, 3: Guy11

第5章 いもち病菌Ina168の染色体長変異の解析

はじめに

第3章でいもち病菌の染色体レベルの変異がその遺伝的多様性に関与している可能性が示された。しかし、これまでにいもち病菌の染色体レベルの変異を直接検出した例はない。圃場分離株の染色体の多様性から予想されているだけである。直接検出できると、その変異のメカニズムを解析することにより、本菌のレースの変異機構に関する重要な知見が得られることが期待される。筆者は、イネいもち病菌Ina168の保存菌株に2種類の核型があり、これが染色体長変異であることを発見した。本章では、その変異の発見及びその基本的特徴付けを行ったので報告する。

第1節 保存菌株の核型変化の発見

イネいもち病菌Ina168の核型は第3章で解析した。しかし、本菌の染色体DNAのサンプルを再度調整したところ、これまでと異なった分離パターンを示した。

5-1-1 材料及び方法

菌株 稲いもち病菌Ina168, Guy11

プローブ pMG6015, MGR586

ブルーニアガー培地：第2章第2節参照

3%水寒天：寒天末（細菌培地用，和光純薬）3gを100mlのRO水に加え，オートクレーブ滅菌（121℃，10分間）した。

方法

染色体DNAのサンプル調製，及びパルスフィールドゲル電気泳動法は，第3章第3節に従った。

1. 単孢子分離

第2章第1節に従った。

2. DNAフィンガープリンティング解析

第3章第2節に従った。

3. 病原性レース検定

胞子形成用オートミールアガーにいもち病菌を接種し、27度で2週間培養した。スライドグラスを使って表面上の気菌糸を取り除き、蛍光灯下でさらに3日培養を続けた。10 mlのイオン交換水を加え、表面の分生子を懸濁して、ガーゼで濾過した。濾液中の分生子濃度を血球計算板を用いて計測し、 10^5 /ml に調製した。ここにTween20を0.02 % の濃度になるように加えて胞子溶液とした。この胞子溶液を日本判別品種に噴霧法で接種した。接種後1週間で病原性を判定した。

4. 交配能の検定

交配能は子のうの発芽率を指標とした。第2章第1節に準じて供試菌とGuy11の交配を行った。これより子のう殻を摘出し、3 % 水寒天においた数滴の滅菌水に浮かべた。柄付き針を使って子のう殻を破壊し、子のうを水中に放出させた。これをスプレッターで広げ、27度で1晩培養し、子のう胞子を発芽させた。全子のうに対する発芽した子のう胞子を含む子のうの割合を子のうの発芽率とした。

5-1-2 結果及び考察

最初に調製されたサンプルは6本のバンドを示したが、その数カ月後に調製したサンプルでは6本のバンドに約5.7Mbのバンドが加わった7本のバンドが観察された (Fig. 5-1)。これがコンタミネーションであるか、染色体長変異であるかを確認するために、単胞子分離を行い、Ina168SA1 ~ 25の25株を得た。

これらの菌株の核型を解析した結果、25株中7株が7本のバンドを示した。従って、この2つの核型はIna168の保存菌株中に表れたIna168の2つの核型であることが示唆され、6本のバンドの核型を α 、7本のバンドの核型を α' とし、7本の核型に特有の染色体を ν 染色体とした。単胞子分離株のうち、Ina168SA20とIna168 SA6を、それぞれ α と α' の代表株として選択し (Fig.5-1)、DNAフィンガープリンティングと病原性レース、Guy11との交配能の検定を行った。

DNAフィンガープリンティングの結果をFig.5-2に示す。pMG6015では全く同じパターンを、MGR586でも1つのバンドを除いて全く同じパターンであった。病原性検定の結果をTable5-1に示す。全ての菌株はレース101と判定された。交配能の検定の結果をTable5-2に示す。子のうの発芽率はいずれも2 ~ 7 % で明確な差は見られなかった。これらの結果はIna168, Ina168SA20とIna168SA6が、非常に密接に関連していることを示している。従って、保存菌株中の新しい核型は、Ina168の染色体が変異して生じたものであることを示唆した。また、この染色体長変異は、DNAフィンガープリンティングのパターン、病原性レース、交配能に影響を与えないことが示唆された。

第2節 核型変異の方向性

α と α' の2つの核型は一方の核型が染色体再編成を起こして他方の核型を示す株になったと考えられる。ではどちらがどの頻度で変化しているのか、またその方向性はどうであろうか。一連の単胞子分離実験により検討した。

5-2-1 材料及び方法

菌株 Ina168SA20, Ina168SA6

方法

まず上記2菌株それぞれから20の単胞子分離株を分離した。これらの核型を第3章第3節の方法に従い、核型を解析した。これより α と α' のそれぞれの株を選択し、新たな親株とした。これを数世代繰り返した。

5-2-2 結果及び考察

一連の単胞子分離実験の流れをFig. 5-3 にまとめた。まず、 α 型の菌株からの2つの世代では α' 型が出現している。 α 型からの2世代を平均して12.5 %の頻度で α' 型が出現した。また、 α' 型からの世代で出現したのは全て α' 型の菌であった。また、 α' の単胞子分離株間でv染色体の長さに多型が見られた。このことから、この染色体長変異は、 α から α' の方向にのみ12.5%という高頻度で起こること、また、v染色体の長さが不安定である (Fig. 5-4) ことから、その染色体上に不安定な部位があることが予想された。

第3節 v染色体の由来

$\alpha \rightarrow \alpha'$ の染色体再編成では、v染色体の出現がもっとも明確な特徴といえる。このv染色体の出現の過程についてハイブリダイゼーションを用いて解析した。

5-3-1 材料及び方法

菌株 Ina168SA20, Ina168SA6

プローブ pMG6015, MGR586

試薬

Hybridization buffer : 5 × SSC, 0.1 % SDS, 5 % Dextran Sulfate, 5 % Liquid blocking agent

Primary wash buffer : 1 × SSC, 0.1 % SDS

Secondary wash buffer : 0.5 × SSC, 0.1 % SDS

Diluent buffer : 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) , 0.3M NaCl オートクレーブ滅菌 (121 °C, 15 分間) した.

Blocking buffer : Liquid blocking agent を Diluent buffer で 10 倍に希釈した.

AP conjugate buffer : Diluent buffer に Bovine serum albumin (ALBUMIN, BOVINE, A-4503; SIGMA CHEMICAL COMPANY, MO, USA) を 5 % (w / v) となるように溶解し, 1/5000 量の Anti-fluorescein alkaline phosphatase conjugate を加えた.

Tween-20 buffer : Diluent buffer に Tween-20 (和光純薬) を 0.3 % (v / v) となるように加えた.

制限酵素バッファー : 1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に NaCl 2.9 g を溶解し オートクレーブ (121 °C, 10 分間) した. 別に オートクレーブ滅菌 (121 °C, 10 分間) した 0.5 M MgCl₂ 10 ml と混合し, Dithithreitol 71 mg を加えた. 滅菌水で 50 ml に定容した.

方法

1. キャピラリーブロッティング

第 4 章第 3 節を参照.

2. パルスフィールドゲルからの DNA の回収

第 3 章第 3 節に従い, 染色体 DNA のサンプルを調製した. ただし, スフェロプラスト濃度は 2×10^8 /ml とした. 同節と同じ条件で, パルスフィールドゲル電気泳動した後, 目的のバンドをゲルから切

り出し、0.5×modifiedTBEで満たした透析チューブ (Seamless Cellulose Tubing, Viskase corp., IL, USA) に入れた。このチューブをCHEF型泳動槽 (CHEF-DRII, Bio-Rad, CA, USA) に固定し、0.5×modified TBE, 50 V, 14 °C, パルスタイム60分で17時間泳動した。完全に溶出されているのを確認したあと、Mupid-2 (コスモ・バイオ株式会社) にいれ、逆方向に電気泳動した (0.5×modifiedTBE, 50V, 2分)。透析チューブ中のバッファーはマイクロ遠沈管に入れ、1-Butanolで500 μ lまで濃縮した。フェノール・クロロホルム抽出した後、再度1-Butanolで濃縮し、エタ沈メイト (ニッポンジーン) をキャリアーとしてエタノール沈殿を行い、DNAのペレットを得た。このペレットは70 % エタノールで2回洗浄し減圧乾燥した。これを10 μ lの滅菌水に溶解した。

3. プローブDNAの標識

Fluorescein Gene Images™ -random prime module (Amersham, Buckinghamshire, UK) をもちい、そのプロトコールに従って実験した。すなわち、滅菌水20 μ lにプローブDNA500 ng分を溶解した。沸騰水中で5分間変性させ、直ちに氷中で5分間冷却したあと、Table 5-3の反応系で標識を行った。37 °Cで一晩反応を行い、-20 °Cで保存した。

4. ハイブリダイゼーション

Fluorescein Gene Images™-dioxetane detection module (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用いた。ハイブリダイゼーション・バッグ (ハイブリ・バッグ, コスモ・バイオ) にメンブランをいれ、0.3 ml/cm²メンブランの割合でHybridization bufferを加えた。バッグから気泡を取り除き、ポリシーラーを用いてシールした後、60 °C, 60 rpmで1時間プレ・ハイブリダイズさせた。プローブDNAを必要量 (10 ng/ml Hybridization buffer) だけマイクロチューブに取り滅菌水を加え、容量を20 μ l以上とした。これを沸騰水中で5分間変性させ、直ちに氷冷した。これをHybridization bufferに加え、60 °C, 60 rpmで16時間ハイブリダイゼーションを行った。メンブランをバッグから取り出しPrimary wash bufferに浸し60 °Cで15分間振とう (約40rpm) し、さらにSecondary wash bufferで同様に振とうした。メンブランをDiluent bufferで軽くリンスし、Blocking buffer (0.7~1.0 ml/cm²)に浸し室温で1時間振とうした。Diluent bufferで軽くリンスした後、ハイブリダイゼーション・バッグにメンブランをいれ、0.3 ml/cm²メンブランの割合でAP conjugate bufferを加えた。バッグから気泡を注意深く取り除き、ポリシーラーを用いてシールした後、室温, 60 rpmで1時間インキュベートした。Tween-20 bufferに浸し室温で10分間振とうする事を3回行った。Diluent bufferで軽くリンスした後、できるだけメンブラン上の液を取り除いてから適当に切ったハイブリダイゼーション・バッグに移した。メンブ

ランのDNA面にDioxetane detection reagent をスプレーし (14 cm²/回) , 液を全面に行き渡らせた。メンブランを新しいハイブリダイゼーション・バッグに移し, ポリシーラーでシールした。一晚暗所に室温で放置した後X線フィルム (フジフィルム, NIFRX100) に1分間~数時間室温で感光させた。

5. 2次元ゲル電気泳動法

"Pulsed Field Gel electrophoresis, A Practical guide" 59)に従って実験した。第3章第3節の通りに染色体DNAサンプルを調製した。ただしスフェロプラスと濃度は10⁹/mlとした。このサンプルと、通常の濃度のサンプルを1つのゲルでパルスフィールドゲル電気泳動を行い、10倍濃度のサンプルのレーンをゲルから切り出し、通常の濃度の部分のみ染色した。切り出したレーンは4mm幅にスライスし、コニカルチューブ(15ml, Falcon 2096, Becton Dickinson, Inc., NJ, USA) に入れた。10mlの制限酵素バッファを加え4℃で2時間振とうする事を3回行い、平衡化した。Bovine serum albumin (SIGMA CHEMICAL COMPANY, MO, USA) 100 ng/mlを加えた制限酵素バッファ 10mlを加え、制限酵素 *EcoRI* を2000 U添加した。37℃で一晩反応させた後、酵素液を捨て0.5×TBEバッファ 10 mlを加え4℃で30分間振とうした。2次元目の電気泳動用のゲルを溶解し (0.6% Seakem GTG Agarose, FMC Bioproducts, MI, USA), 50℃に保温した。制限酵素処理したゲル断片をゲル作成用のプラットフォームの泳動開始位置に固定した。ここに溶解したゲルを流し込み固化させた。マーカーとして第2章第3節に従って*EcoRI*で完全消化したゲノムDNAとともに25 Vで40時間電気泳動した (ゲルサイズ12.5 cm×21 cm, HE-14, 宝酒造株式会社)。このゲルを第3章第2節の方法に従ってキャピラリープロットングを行い、ナイロンメンブラン (Hybond-N+, Amersham) に固定した。第3章第2節の方法に従い、DNAフィンガープリンティングと同じ要領でこのメンブランを用いてハイブリダイゼーションを行った。またこの方法の模式図をFig. 5-6に示した。

5-3-2 結果

前節までに α' 型は、 α 型にv染色体が加わった形であることが分かっている。本節では、v染色体がどこに由来するのかをハイブリダイゼーション法によって解析した。まず、パルスフィールドゲル電気泳動法により分離したゲルから、v染色体のバンドを切り出し、DNAを回収し、同じく電気泳動したゲルより作成したプロットとハイブリダイゼーションを行った。結果をFig. 5-5に示す。プローブはIna168とIna168SA20のバンドIII, Ina168SA6のv染色体に強くハイブリダイズした。これは、v染色体が α 型のバンドIIIに由来することを示している。しかし、 α' 型の核型にもバンドIIIは存在する。さらに、バンドIIIとv染色体の分子量はそれぞれ約5.7, 4.7Mbなので、両者の間には1Mbの差がある。従って、v染色体がバンドIIIから由来したとすれば、1Mb分のDNAのバンド、あるいは他の染色体のサイズ変化が認められるはずであるが、見つけることができなかった。そこで、2次元ゲ

ル電気泳動法を行い、染色体1つ1つのバンドを反復配列で特徴づけた。

2次元ゲル電気泳動は2回の電気泳動と1回のハイブリダイゼーションからなっている(Fig. 5-6)。最初に、染色体DNAのサンプルはパルスフィールドゲル電気泳動により分離される。このゲルを切り出し、適当な制限酵素（本論文ではEcoRI）で消化する。このゲルブロックを別なゲルに泳動方向に対して垂直に埋め込み、DNAフィンガープリンティングと同様の電気泳動及びDNAフィンガープリンティングのプロープを使ったハイブリダイゼーションを行う。従って各染色体DNAのバンドは反復配列のバンドによって特徴づけられる。

この方法で、Ina168SA20とIna168SA6の2菌株を、pMG6015及びMGR586の2種のプロープで解析した。Fig. 5-7にpMG6015をプロープとしたときの結果を示す。バンドIIIは、pMG6015の11のバンドからなっていた。このうち、バンド2, 4, 7がIna168SA20ではバンドIIIに、Ina168SA6ではv染色体の位置にあり、シフトしていることが分かる。残りのバンドは両者で共通にバンドIIIの位置にある。MGR586による解析でも、2つのバンドがバンドIIIからv染色体にシフトしていたが、そのほかのバンドは共通であった。このことは、2つのことを示唆する。まず、核型 α のバンドIIIは2本の染色体よりなっていることである。つまり、シフトしたバンドによる染色体と、シフトしなかったバンドによる染色体の2つがある。これらをバンドIIIa（シフトしなかったもの）とバンドIIIb（シフトしたもの）と呼ぶことにする。さらに、シフトしたバンドの1次元目の電気泳動における移動度（左→右方向）がシフトしなかったものと比べて大きいので、バンドIIIbはバンドIIIaよりも若干分子量が小さいものと考えられる。またこの結果からv染色体がバンドIIIbから由来することが明らかになり、前項の結果と一致した。しかしバンドIIIbの位置にある反復配列のバンドで、v染色体以外の染色体にシフトしたバンドが無いこと、また消失したバンドがないことから、バンドIIIbからv染色体への再編成の過程で生ずるはずの1MbのDNAについては、不明であった。

さらに、バンドIIIbをプロープとしてハイブリダイゼーションを行った。バンドIIIbのゲルからの切り出しは、バンドIIIの下部分を注意深く切り出すことにより行った。上記と同じ2菌株について解析した(Fig. 5-8)。強いシグナルはIna168SA20のバンドIIIbとIna168SA6のv染色体のバンドから検出された。この結果より、v染色体はバンドIIIbから生じたことが再確認された。しかし、Ina168SA6の他のバンドからは検出されなかった。Fig5-8では、Ina168SA20のバンドI, バンドII, バンドIIIaにも弱いシグナルが見られたが、これは染色体上の反復配列か、あるいはゲル上で分離されなかった。バンドIIIbの痕跡によるものであろう。したがって、1MbのDNAは、染色体再編成の過程で欠失したものと思われた。

5-3-3 考察

一連のハイブリダイゼーション実験により、v染色体の生成過程についていくらかの知見が得られた。まず、核型 α のバンドIIIは、バンドIIIaとバンドIIIbの2本の染色体からなっており、そのうちのバンドIIIbが、再編成を受けて、v染色体となる。そしてその再編成はおそらく欠失によるものだ

と思われた。しかし、欠失したDNAの部分が得られたわけではなく、あくまで推測にすぎない。

染色体再編成の分子機構について最もよく調べられているものの1つにCandidaがあるが、もっとも再編成を受けやすい染色体はrDNA（リボゾームDNA）遺伝子がある染色体だとされている^{60, 61}。真核生物では、rDNAはいくつものコピーがタンデムに連なって反復して存在している。従ってそのコピー間の組み換えが非常に起こりやすい。またその他のタンデムの反復配列が同様の再編成に関与しているという報告もある。したがって、我々の発見した染色体再編成も、rDNAによるものか、確認する必要がある。

第4節 rDNAの染色体長変異への関与

rDNAが染色体再編成に関与している可能性が大きいことは前にも述べた。本説ではPCR法によりrDNAの部分を増幅し、プローブとしてパルスフィールドゲルとのサザンハイブリダイゼーション解析を行った。

5-4-1 材料及び方法

菌株 Ina168SA20

方法

1. プライマーの合成及び精製

White et al.⁶²の示す18S rDNA に特異的なプライマー 6 種 (Table 5-4) を合成した。これらのプライマーはFig. 5-9に示すrDNA上の位置に対応している。プライマーは第4章第2節の方法に従って合成した。合成したDNAはOPC（オリゴヌクレオチド精製用カートリッジ）（Applied Biosystems）を使い、そのマニュアルに従って精製した。

2. PCR反応

PCR反応は、Table 5-5の反応液組成及びTable 5-6の増幅条件に従って行った。10本分反応し、反応液の1部は1.5 % アガロース、TBEバッファー、100 Vでゲル電気泳動した。残りは、フェノール・クロロホルム処理の後、1-ブタノールで濃縮し、エタノール沈殿しPCR産物を回収した。

2. プロッティング

Ina168SA20及びIna168SA6を用いて、第3節の方法に従って行った。

3. プロープの標識, ハイブリダイゼーション

第3節の方法に従って行った.

5-4-2 結果および考察

各プライマーを用いてPCRによる増幅を行った (Fig. 5-10). 各反応産物は, Table5-4に示したものとほぼ同じ分子量であり, 正しく増幅できたものと判断した. 各PCR産物はそのままプローブとして用いられた. ハイブリダイゼーションの結果をFig. 5-11に示す. ここでは, NS1とNS2の増幅産物による結果しか示していないが, 各プローブともに, Ina168SA20ではバンドIIIに, Ina168SA6ではv染色体にハイブリダイズした. 従って, rDNAがバンドIII上に位置することが示唆された. さらに, どちらの染色体のバンドにも強くハイブリダイズし, rDNAがタンデムに反復していることを示しているものと思われる.

以上の結果より, v染色体の生成にrDNAが関与している可能性が示唆されるが, *Candida*の場合といくつかの相違点がある. まず1つは, rDNAによる染色体長変異の場合, 染色体長の変異は様々で, より長く場合も存在する⁶³⁾のに対して, 我々の場合, 一方向に, 一定の長さでしか変異しないことである. さらに, *Candida*でrDNAの欠失が起こった場合, rDNAのハイブリダイゼーションのシグナルが弱くなることが多い⁶³⁾が, 我々の場合, それが見られないこと. もし我々のケースが, rDNAの欠失のみによるものであれば, 1MbのDNAが失われていることになり, シグナルが弱くなる可能性は十分にある. したがって, 現段階では, v染色体生成へのrDNAの関与は, 断定できない. *Candida*においても, rDNAの座乗する染色体長の変化で, rDNAの変化が関与していない例⁶⁴⁾もあり, 別の要因による場合も十分に考えられる.

第5節 小括

いもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) Ina168の核型変異株を取得した。パルスフィールドゲル電気泳動による解析においてこの変異株は親株よりも1本多い7本のバンドからなる核型を示した。親株の核型を α 、変異株の核型を α' とし、変異株に現れた新たな約5Mbの長さの染色体を染色体 v とした。この変異はDNAフィンガープリントのパターンや品種特異的病原性、交配能に影響を与えなかった。一連の単胞子分離実験により、この変異が1回の単胞子分離において12.5%の高頻度でしかも $\alpha \rightarrow \alpha'$ の方向にしか起こらないことが示された。サザンブロット及び2次元ゲル電気泳動解析により、染色体 v は核型 α のバンドIIIbの一部が欠失することにより生じたことが示唆された。また、rDNAがバンドIIIb及び v 染色体上にあることが示され、この染色体再編成への関与の可能性が示された。

Talbotら²⁷⁾、Orbach²⁸⁾ら、また本論文第3章により、いもち病菌の核型が非常に多様性に富んでいることが明らかにされている。本章では、核型変異株によりいもち病菌の染色体長変異を直接的に観察することに初めて成功した。

今回の結果により、いもち病菌のゲノムには染色体再編成のホットスポットがあることが明らかとなった。菌株Ina168において、バンドIIIbの染色体は、1回の単胞子分離で平均12.5%の高率で、1部欠失をおこし、 v 染色体を生ずるのである。従って、バンドIIIbのある場所には非常に再編成を受けやすい場所があることが示唆される。染色体の1部欠失については、*Candida*で報告されており、rDNAが関与していることが明らかとなっている⁶¹⁾。本実験でも、rDNAが関与している可能性が示された。しかしその他の因子が関与している可能性もある。

今回の発見した染色体長変異はいもち病菌の病原性レースの多様化には関与していないことが明らかである。しかし、この様なすべての染色体再編成がレースの多様化に関与していないと結論する事はできない。Valentらは、非病原性遺伝子AVR2-YAMOが染色体上のテロメア近傍に位置し、それがその不安定性に関与しているとしている¹⁸⁾。第4章でも述べたように、いもち病菌には多数の反復配列が存在し、これらが染色体の多様化に関与している可能性がある。

今回発見した染色体長変異は染色体再編成のモデル系として使用できる可能性がある。つまり、この変異は非常に高頻度で起こるので、1回の実験を最小のサンプルで行うことができる。従って、染色体再編成に影響を与える因子の解析、あるいは染色体再編成の分子機構解明に大きく寄与できるものである。

Table 5-1. Pathogenicity test of karyotype mutants of Ina168.

Cultivar	Ina168	Reaction	
		Ina168SA20(α)	Ina168SA6 (α')
Shin 2	S	S	S
Aichiasahi	R	R	R
Fujisaka 5	R	R	R
Kusabue	R	R	R
Tsuyuake	R	R	R
Fukunishiki	R	R	R
K1	S	S	S
Pi No.4	R	R	R
Toride 1	R	R	R
Race No.	101	101	101

Table 5-2. Rate of germinated asci in crosses between karyotype mutants of Ina168

Cross	%Germination (Germinated Asci/Total Asci)
Ina168 x Guy11(1)	3.4 (88/2588)
Ina168 x Guy11(2)	7.6 (77/1012)
Ina168SA6 x Guy11(1)	2.1 (9/417)
Ina168SA6 x Guy11(2)	6.2 (79/1271)
Ina168SA20 x Guy11(1)	4.0 (68/1686)
Ina168SA20 x Guy11(2)	2.1 (34/1592)

Table5-3 Composition of Probe Labelling Mixture.

Reagent	Volume
Water	14 μ l
Nucleotide Mix	10 μ l
Primers	5 μ l
Denatured DNA	20 μ l
Enzyme	1 μ l
Total volume	50 μ l

Table 5-4. Primers for amplification of rDNA

Primer Name ^a	Sequence (5' → 3')	Product Size (bp) ^b	T _m (°C)
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	555	56
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC		68
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	597	68
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG		56
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	310	57
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC		65

^a All-odd-numbered primers are 5' primers; even numbers indicate 3' primers.

^bProduct sizes are approximate based on the rRNA genes of *S. cerevisiae*.

Table 5-5. Composition of amplification mixture

Reagent	Final concentration
10× PCR Buffer	
200mM Tris-HCl(pH8.4)	20mM
500mM KCl	50mM
50mM MgCl ₂	1.5mM
1.25mM dNTP mixture	0.2mM
Primer	1 μM for each
5U/μl Taq DNA Polymerase (Amplitaq DNA polymerase, Perkin-Elmer,)	2.5U
template DNA	0.5ng
final volume	50μl

Table 5-6. Condition of polymerase chain reaction.

Step	Reaction	Temperature	Time
Step 1.	Denaturation	95°C	30sec
Step 2.	Annealing	50°C	30sec
Step 3.	Polymerisation	72°C	1min.
Numbers of cycle	40 cycles		

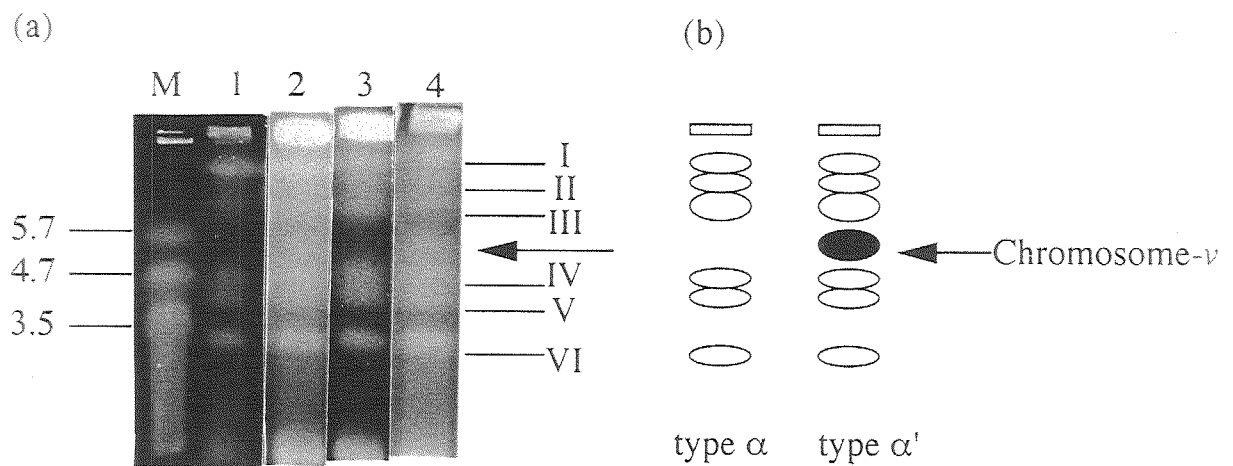


Fig. 5-1 Two distinct karyotypes α and α' of the isolate Ina168.

(a) Chromosomal DNA was separated with CHEF-electrophoresis (see Materials and Methods). Samples in each lane are, M: molecular size marker (*S. pombe*, FMC Bioproducts, ME, USA), 1: Ina168 (first preparation), 2: Ina168 (second preparation), 3: Ina168SA20, 4: Ina168SA6. An arrow indicates extra chromosomal band. Sizes are given in Mb. (b) Illustrated diagram of karyotype α and α' , with chromosome-v.

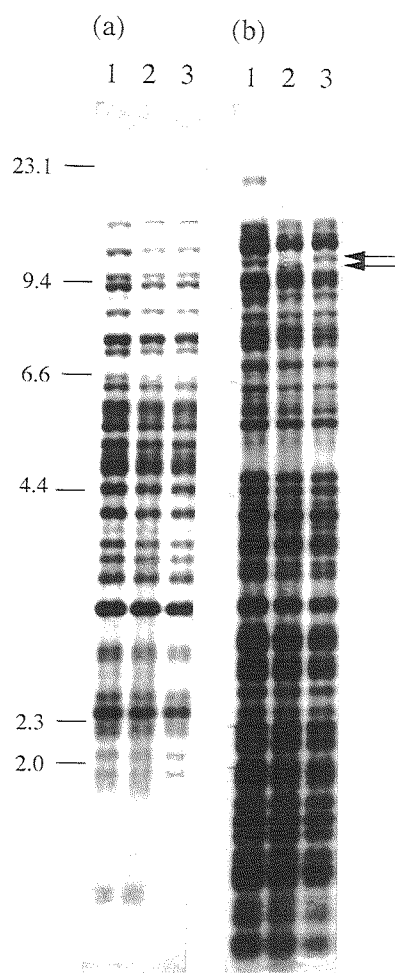


Fig. 5-2. DNA fingerprinting of isolates originated from single spore.

Patterns were generated in the hybridization with pMG6015(a) and MGR586(b). Lanes and samples are, 1: Ina168, 2: Ina168SA20, 3: Ina168SA6. Arrows indicate polymorphic bands between patterns.

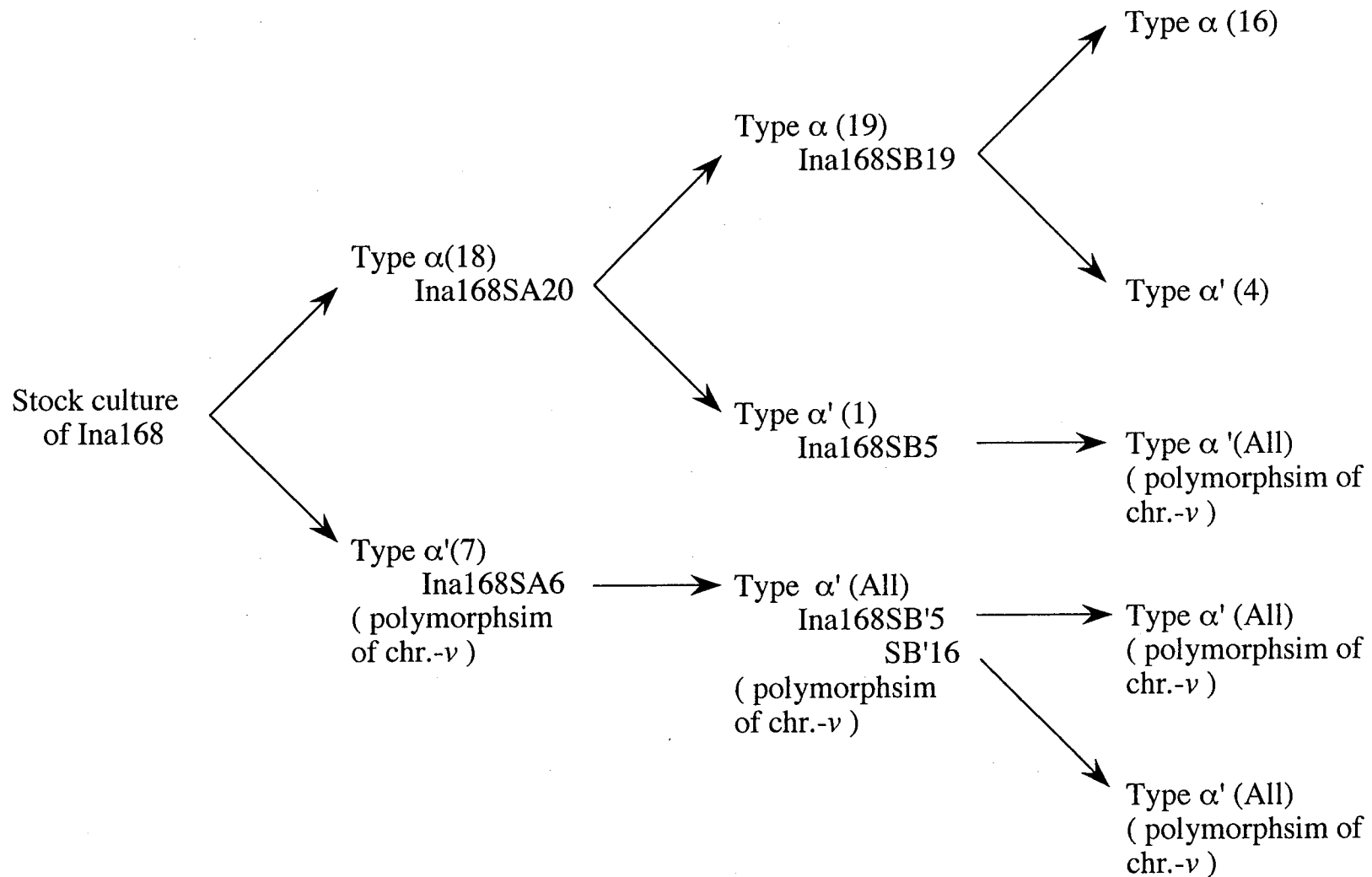


Fig. 5-3. Schematic diagram of series of single spore isolation.

A branched arrow indicates that the isolation yields two karyotypes. Arrow means that isolated spores showed all α' karyotype. Numbers in parenthesis represents numbers of isolates exhibiting the karyotype. Isolate names listed below the karyotypes are names of isolates used as parents for the next generation.

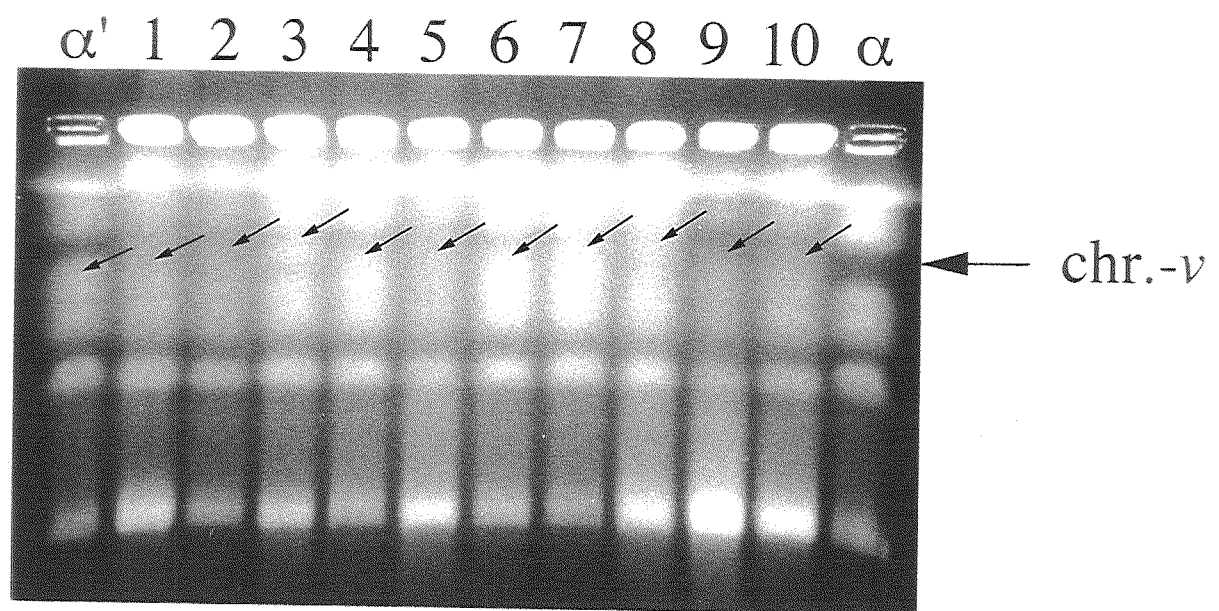


Fig. 5-4. Polymorphism of chromosome-*v*.

The length of chromosome-*v* in isolates of karyotype α' is variable in the range between five and seven Mb. Lanes α and α' are Ina168SA20 and Ina168SA6, respectively. Lanes 1 to 10: single-spore isolates originated from Ina168SB'5. A large arrow indicates approximate molecular weight of chromosome-*v*. Small arrows indicate chromosome-*v* in each lane. For example, chromosome-*v* in lane 8 is larger than that in lane 7 or lane 9.

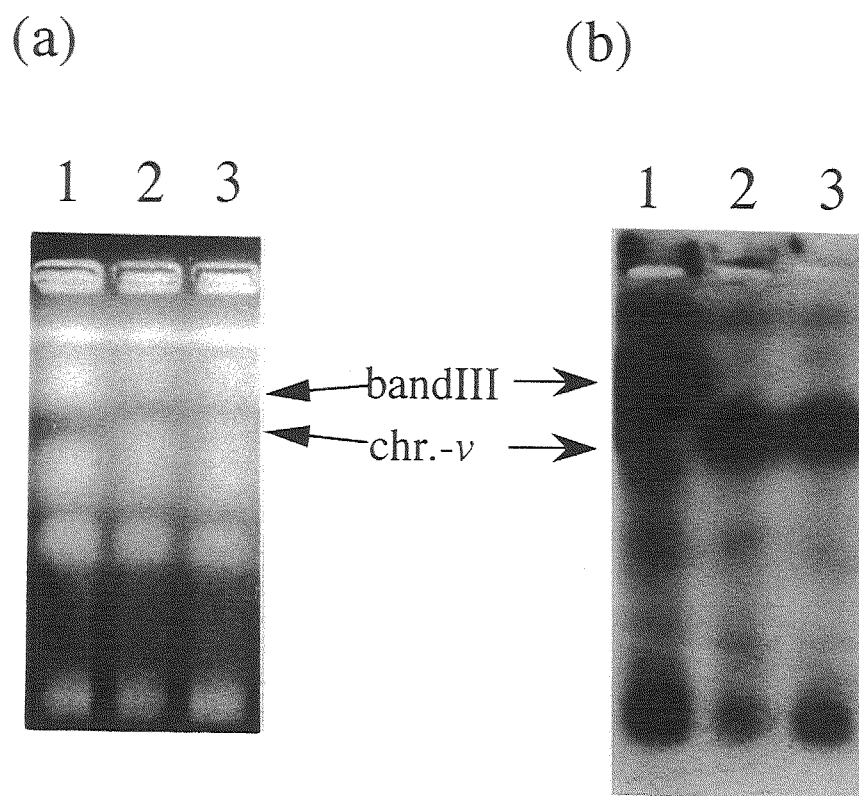


Fig. 5-5. Hybridization analysis of chromosome- v .

CHEF-electrophoresis pattern (a) and hybridization pattern of chromosome- v probe (b) are presented. Chromosome- v probe was prepared by electro-elution (see Materials and Methods). Samples and its karyotypes in each lane are, lane 1: Ina168SA20 (α), 2: Ina168SA6 (α'), 3: Ina168SB5 (α'). Band III and chromosome- v are indicated by arrows.

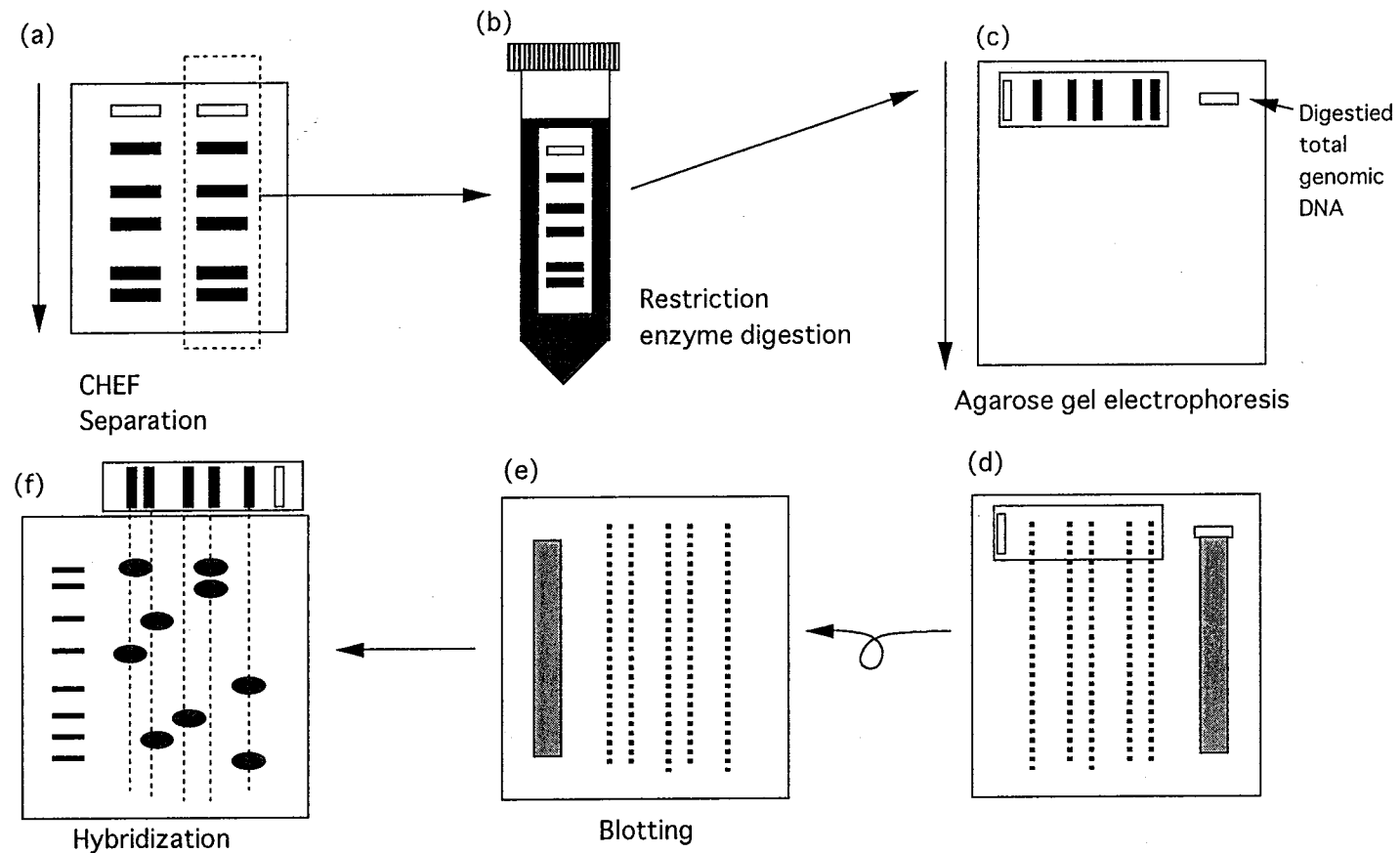


Fig. 5-6. The two-dimensional analysis.

The analysis consisted of two-dimensional electrophoresis and hybridization. First, a chromosomal DNA sample was separated in the CHEF gel, and the same lane was excised(a). DNAs in the gel were then digested with the restriction enzyme *EcoRI*(b), and the gel block was put on another gel for the second electrophoretic separation, vertical to the direction of the first electrophoresis(c). The second separation was the same as that of DNA fingerprinting, i. e. "normal" agarose gel electrophoresis(d). Finally DNAs were blotted onto a nylon membrane (e) and hybridized with DNA fingerprinting probes, which were dispersed all over the genome. As the results of the analyses, each chromosomal band in the CHEF separation was characterized by the set of bands appeared in DNA fingerprints (e).

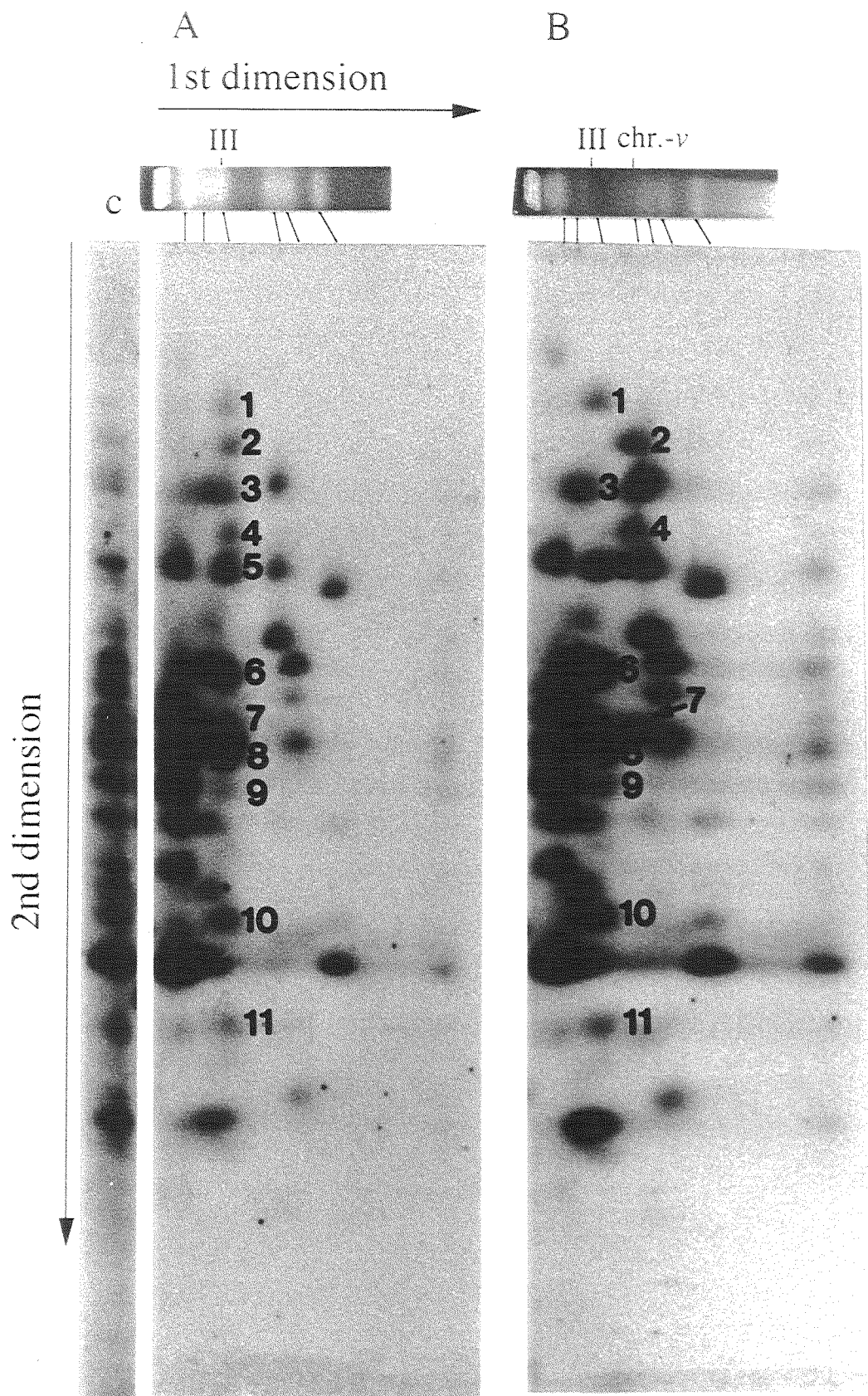


Fig. 5-7. Two-dimensional analysis of two karyotype.

Ina168SA20 (A) and Ina168SA6 (B) chromosomal DNAs were CHEF-separated, *Eco*RI digested, and electrophoresed vertically to the first dimension, and hybridized with pMG6015 (see Materials and Methods for details). Photographs in the upper part are the results of the first separation. (c) indicates the result of pMG6015-DNA fingerprint of Ina168SA20. Numbers indicate bands originated from band III of karyotype α . Bands 2, 4, 7 shifted in (B) to the position of chromosome-v.

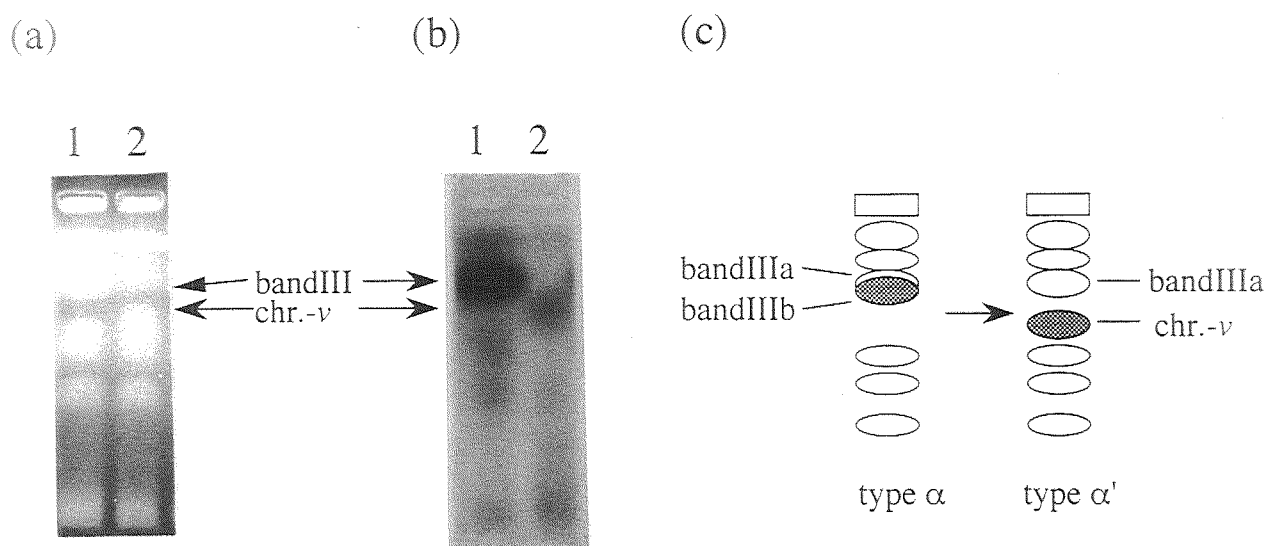


Fig. 5-8. Hybridization analysis of band IIIb.

CHEF-electrophoresis pattern (a) and hybridization pattern of band IIIb probe (b) of Ina168SA20 (lane 1) and Ina168SA6 (lane 2) are presented. Band IIIb probe was prepared in the same way as Fig. 6. Band IIIb and chromosome- v are indicated by arrows. (c) illustrated diagram of the karyotypic mutation.

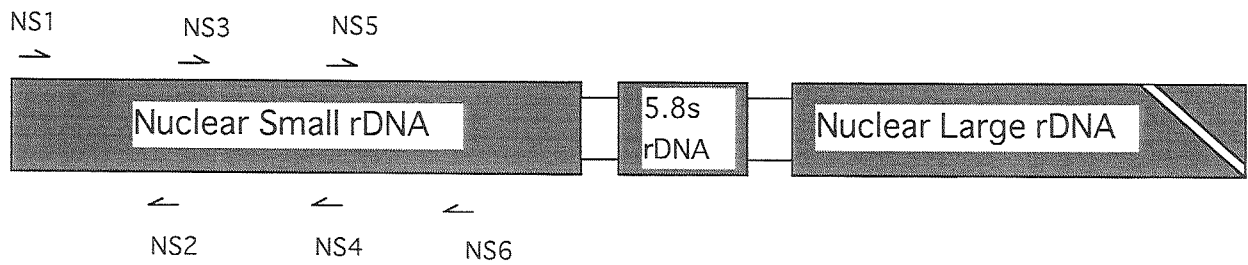


Fig. 5-9. Locations of PCR primers on nuclear rDNA.

The arrowheads represent the 3' end of the primer.

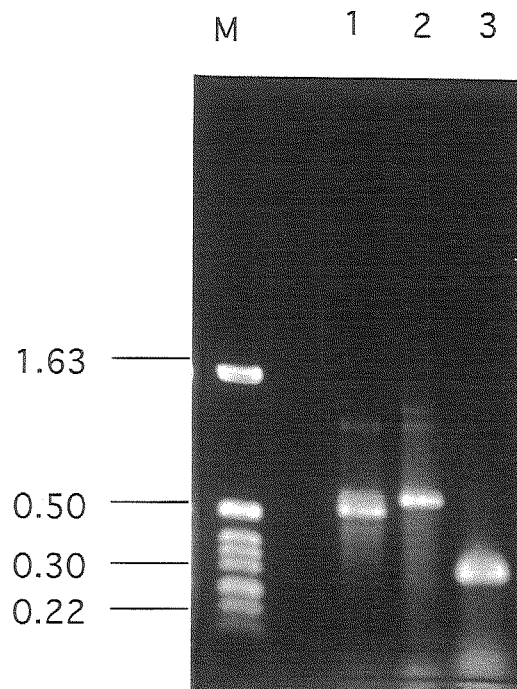


Fig. 5-10. PCR amplification of rDNA probes.

Ina168SA20 genomic DNA is amplified with primers NS1 and NS2 (lane 1), NS3 and NS4 (lane 2), and NS5 and NS6 (lane 3). Lane M; size marker pBR322 / *Hinf*I. Sizes are given in kb.

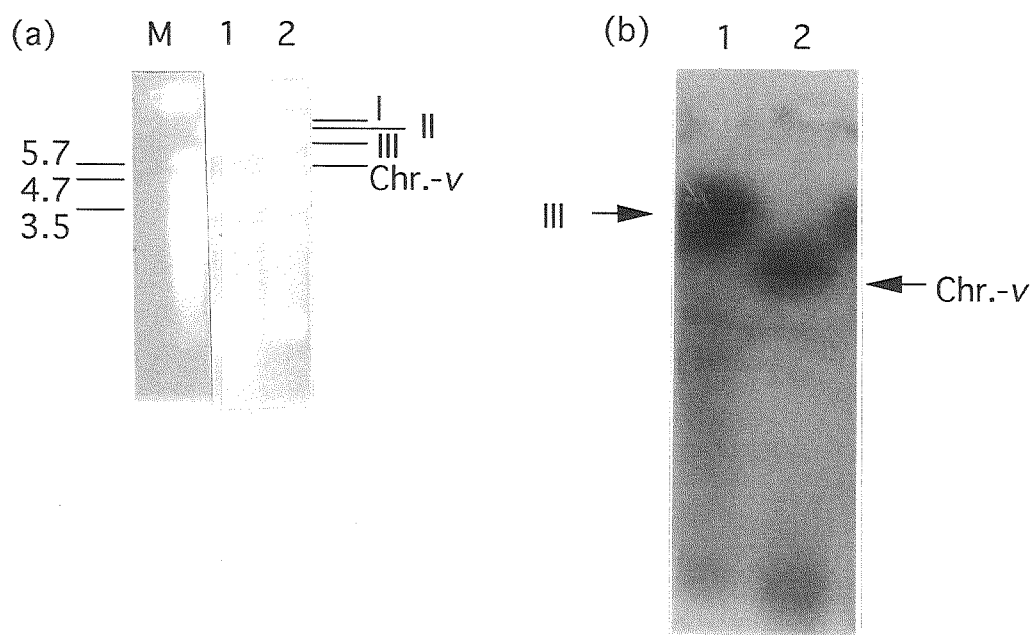


Fig. 5-11. Chromosomal location of rDNA in karyotypes α and α' .

Ina168 SA20 (lane 1, α) and Ina168 SA6 (lane 2, α') chromosomal sized DNA were electrophoresed in a CHEF gel (a), blotted and hybridized with a PCR product with primers NS1NS2 (b). Lane M; size marker *S. pombe* chromosomal DNA. Sizes are given in Mb.

第6章 総括

本研究は、日本のいもち病菌を用いた病原性レース変異機構の解明の為の遺伝子解析系の確立を目的として、交配実験系の確立、分子遺伝学的解析法による集団遺伝学的解析、あるいはいもち病菌のゲノムの多様性に関与している因子の解析を試みたものである。

まず第2章では日本産いもち病菌株による交配実験系の確立を試みた。まず、雌性機能のあるイネいもち病菌Guy11と交配可能である菌株を検索した。その結果、Ina168との交配で、36株の交配後代を得ることができた。この交配をcross2107とした。次にこの交配を使ってカスガマイシン耐性遺伝子をモデルとした遺伝解析を行い、カスガマイシン耐性はcross2107で1:1に分離し、1つの遺伝子 $ksr-1$ によって支配されており、またBulked Segregant Analysisにより得た2つの $ksr-1$ に密接に連鎖したRAPDマーカーOPA-11, OPG-06の解析の結果、 $ksr-1$ の遺伝子地図をつくることができたが、RFLPマーカーの分離比から、この交配が地図作成には不適當であることが示された。そこで、交配の稔性を高めるためにcross2107交配後代のGuy11への戻し交配を行った。その結果、65株の後代からなる2107-33とGuy11の交配cross5307が得られ、 $ksr-1$ の遺伝子地図を作成した。日本菌系を用いた交配実験が十分に可能であることを示した。

第3章では日本産イネいもち病菌のDNAフィンガープリント解析とパルスフィールドゲル電気泳動法による特徴付けを行った。まず菌株Ina72のゲノムDNAライブラリーからプローブpMG6015を得た。このプローブはMGR586とは別の反復配列を含んでいた。7種の日本判別菌系と17株の圃場分離株をpMG6015とMGR586をDNAフィンガープリント解析のプローブとして解析した。UPGMA法により作成した系統樹のブートストラップ解析により、2種のプローブによるDNAフィンガープリントに基づく系統樹が、いもち病菌系統の判定に適當であること及びpMG6015の有用性が示された。系統学的解析の結果、すべての菌株は5種の系統(JBLA-INA, JBLA-K04, JBLB-K33, JBLB-HK1, JBLC-P2B)に分けられた。ことに、系統JBLA-K04には、すべての圃場分離株が属しており、同一系統内でのレースの分化が見られた。電気泳動核型解析により、いもち病菌の核型が同一系統内でも多様であり、同じレースの菌株ごとに特徴があることが示された。以上のことにより、現在の圃場におけるいもち病菌の大部分が、JBLA-K04に属し、多様にレースを分化させていること、レース分化に、染色体長の変化が関与している可能性が示された。

第4章ではDNAフィンガープリンティングのプローブpMG6015の反復配列の解析を行った。pMG6015と同様の配列を持つクローンを、イネいもち病菌Ina72の λ EMBL3ライブラリーよりスクリーニングし、解析したところ、この反復配列の中心的配列であると思われる0.7kbの反復配列が発見され、MGSR1とした。MGSR1の塩基配列を決定したところ、RNAポリメラーゼIIIプロモーターを持つレトロボゾンの特徴を示した。また、MGSR1は全ての染色体上に存在していることが示された。MGSR1を含めてこれらレトロボゾン等の転移因子は、いもち病菌の遺伝子の不安定性あるいは易変異

性，ゲノムの多様性に関与していることが期待される。

第5章ではいもち病菌Ina168の染色体長変異の解析を行った。パルスフィールドゲル電気泳動による解析において変異株は親株よりも1本多い7本のバンドからなる核型を示した。親株の核型を α ，変異株の核型を α' とし，変異株に現れた新たな約5Mbの長さの染色体を v 染色体とした。この変異はDNAフィンガープリントのパターンや品種特異的病原性，交配能に影響を与えなかった。一連の単胞子分離実験により，この変異が1回の単胞子分離において12.5%の高頻度で $\alpha \rightarrow \alpha'$ の方向にしか起こらないことが示された。サザンブロット及び2次元ゲル電気泳動解析により， v 染色体は核型 α のバンドIIIbの一部が欠失することにより生じたことが示唆された。また，rDNAがこの染色体再編成に関与している可能性が示された。

以上の結果から言えることは，日本のイネいもち病菌が，非常に興味深い研究材料であることである。まず，日本菌系は，日本のイネいもち病菌抵抗性遺伝子に対応した非病原性遺伝子の遺伝資源として非常に重要である。今回得られた交配は，日本判別菌系の1つであるIna168を使って，稔性は低いが遺伝子解析可能な交配系が得られたことで，以降の非病原性遺伝子の解析に期待がもたれる。また，DNAフィンガープリンティングあるいはパルスフィールドゲル電気泳動による日本菌株の解析は日本の菌株が病原性レース変異機構の研究材料としても好適であることを示している。日本の稲作は外国に比べ非常に集約的であり，いもち病抵抗性品種，あるいは農業等が1960年代から導入されている。また島国であるわが国では外国菌系の伝播は容易ではなく，自然と圃場におけるいもち病菌集団はその様な防除法に対し，抵抗するような独自の進化を遂げてきていることが期待される。その進化の過程で，いもち病菌の系統の単純化，そして系統内での病原性レースの多様化が起こったことが今回の実験より示唆された。また，その要因として染色体レベルでの遺伝子の変化が関与していることも示唆された。このような解析は圃場分離株における病原性レースの多様性に富んでいる日本のいもち病菌を材料として選んだ為に可能になったのである。

その様な圃場での遺伝子の多様化をもたらしものとして，トランスポゾン是非常に重要である。それらが直接遺伝子に挿入され不活化するだけでなく，散在するコピー間での組み換えの起点となりうるからである。本研究で，MGSR1というレトロポゾン様因子が発見されたことは，本邦産のいもち病菌の多様化を考える上で評価できる。この配列はいもち病菌の進化の早い時期に増幅が起こったと予想され，現在も転移する活性があるとは考えにくい，同様の戦略によりさらに多くの因子が発見できる可能性がある。また，外部からのストレスでトランスポゾンの転写が活性化することが示されてきているので³¹⁾，その様な因子の日本菌系の病原性レース多様化への関与の解析に期待がもたれる。また，染色体レベルでの遺伝子の変化については，染色体長変異株をいもち病菌Ina168より得て，それにより重要なデータを得ることができた。いもち病菌において，このような染色体長変異が直接観察されたのは初めてである。この変異株を用いることにより，いもち病菌の染色体再編成の機構を解明する手がかりが得られるものと考えられる。

これらの結果は，日本のいもち病菌が興味深い研究材料であることを示すだけでなく，いも

ち病菌の研究全体から考えても重要な知見を与えるものとして評価できる。例えば圃場における系統の単純化と抵抗性イネ品種の崩壊と関係づけたものは、本研究が最初である。また、染色体再編成を、変異株により直接観察した例も初めてのものである。さらに、今回確立された実験系を用いれば、より多くの新たな知見が得られることが期待される。得られた交配系による非病原性遺伝子の解析はすでに始まっている。また、現在でも新品種の圃場への導入は行われており、各稲作地域の農業試験場等と協力し新品種の導入後の圃場におけるいもち病菌集団の病原性レース変化とDNAフィンガープリンティングによる系統の動向の詳細な解析が可能である。また新たなトランスポゾン様因子の探索、その遺伝子の多様性への関与の検証も興味深い。さらに染色体再編成機構の解明などにも応用できるのである。その意味からいえば、本研究は将来への基礎を築いた点でも評価できるものである。

CHAPTER 7 : English Abstracts

Magnaporthe grisea is a fungal pathogen responsible for the rice blast, which is one of the most damaging disease of the rice crop. The most troublesome feature of the fungus in the control of the disease is instability, particularly in the cultivar specificity which is represented by pathogenic race. Many blast resistant cultivars had been introduced into the field but they were short-lived by novel pathogenic race, caused by the instability.

In order to analyze the instability of the pathogenic race, genetic analyses of host specificity or other factors for the diversity of the genome are essential. The fungus is an ascomycete but the perfect stage has not been found in the field¹⁾. Thus classical genetic analysis is available but most rice pathogenic field isolates are not fertile except Guy11, a field isolate from French Guyana¹³⁾. In order to obtain a fertile cross of rice pathogenic isolates, intercross with Guy11 or sib cross of its progeny of field isolates have been tried¹⁵⁾.

Population genetic analysis of field isolates of the fungus is very useful to characterize the relationship between pathogenic race and genetic background. DNA fingerprinting using MGR586²¹⁾ is widely used for population genetics or phylogenetic analysis. Field isolates from USA^{22, 23)}, Colombia²⁴⁾ and Philippines²⁵⁾ were analyzed to define many distinct clonal lineages and relationships with host specificity were discussed. From those analysis, variability of host specificity in a clonal lineage was detected. Particularly in Philippines²⁵⁾, based on the knowledge of clonal lineage, a new system of blast control was proposed.

From the points discussed above, it is strongly indicated that the genetic variability is one of the most important feature in the fungi. However, a limited amount of knowledge is available for the factor which provides the variability of the genome. Seven transposable elements had been isolated from the genome of the organism (Table 1-2). One of those, MGR586 transposon was reported to be responsible for inactivation of a host-specificity gene, *AVR2-YAMO*.³⁰⁾

Chromosomal length polymorphism is another interesting feature and a candidate for genomic variation of the fungi. *AVR2-YAMO* was also reported to be unstable due to the chromosomal locus, near the telomere¹⁹⁾. It is easily considered that a particular loci of the chromosome like telomere will be sensitive to chromosomal rearrangement.

Japanese isolates are expected to be appropriate materials for analyses of genomic variability. First, blast resistant breeding of rice cultivars are progressed and many resistant cultivars are introduced into fields.

Thus Japanese isolates are good materials for host specificity genes responsible for resistance genes. Secondary, they are good materials for spontaneous mutants of host specificity, because breakdown of resistance of those cultivars had been occurred many times and Japan has a unique geographic circumstances as islands which prevent free distribution of genetic sources from other countries. However, only a limited reports of genetic analyses of genomic variability of Japanese isolates have been published. In this report, the author tried to establish a genetic analyzing system of *M. grisea* of Japanese isolates, using crossing, DNA fingerprinting, electrophoretic karyotyping and other molecular genetic methods.

1. Establishment of a cross system of Japanese isolates of *M. grisea*

First, the author tried to obtain a new cross of *Magnaporthe grisea* rice pathogens. The cross named cross2107 (Ina168 x Guy11) had 36 progenies, but abnormal morphology was observed in ascospores. Segregation analyses in cross2107 revealed its less relevance for genetic analysis in terms of its abnormal segregation of RFLP markers. Backcrosses of cross2107 progenies with Guy11 produced another cross named cross5307. Cross5307 (2107-33 x Guy11) had 65 progenies and was revealed to be more relevant for genetic analysis than cross2107.

A genetic analysis aimed at identification of *ksr-I*(one), a gene controlling kasugamycin resistance, was conducted with cross5307. Bulk segregant analysis was used in order to concentrate RAPD markers for mapping of the gene. Then 3 markers linked to *ksr-I* were obtained and genetic map around the *ksr-I* was constructed.

2. DNA fingerprinting and electrophoretic karyotyping of Japanese isolates of rice blast fungus³⁵⁾

Twenty-four Japanese isolates of *Magnaporthe grisea* were characterized by DNA-fingerprinting and electrophoretic karyotyping. These isolates consisted of seven Japanese differential strains and field isolates of various pathogenic races which were collected from all over Japan. A DNA fingerprinting probe pMG6015, was isolated from the genome of a Japanese strain Ina72. MGR586 and pMG6015 were used as DNA-fingerprinting probes. Bootstrapping analysis revealed that pMG6015 was effective to construct a robust phylogenetic tree. Five clonal lineages are found in the phylogenetic analysis. It was revealed that all field isolates were derived from a clonal lineage JBLA-K04. A high level of variability of pathogenic race in

the lineage JBLA-K04 was detected. Electrophoretic karyotype of isolates in the lineage JBLA-K04 were polymorphic, but some similarity of karyotype were observed among isolates of similar pathogenic races. These aspects indicated that field isolates of *M. grisea* were derived from a limited number of clonal lineage and had diverged their host-cultivar specificity, and that chromosomal level variation has a relationship to pathogenic race variation in the clonal lineage JBLA-K04.

3. Characterization of DNA fingerprinting probe pMG6015³⁶⁾

In this chapter, a repetitive element in the genomic insert of DNA fingerprinting probe pMG6015 was characterized. As it was 0.8kb in length and dispersed in the genome, it was named MGSR1 (for *Magnaporthe grisea* short repeat 1). The nucleotide sequence revealed an internal promoter of RNA polymerase III, 3'-poly(T), and 8 bp-direct repeat in it. These results suggest MGSR1 resembles SINEs (short interspersed elements), a repetitive DNA family in the genome of higher eukaryotes.

4. Identification and Characterization of a karyotypic mutation in *Magnaporthe grisea* strain Ina168³⁷⁾

Karyotypic mutants of *Magnaporthe grisea* isolate Ina168 were identified. The mutants have a karyotype with an extra band of chromosome- ν in addition to six bands of the normal karyotype in contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) electrophoresis. A karyotype of the original isolate was named as α and that of mutants as α' . The mutation has not affected the DNA fingerprint pattern, host specific pathogenicity (pathogenic race), or crossing abilities with the isolate Guy11. Karyotypic analyses of isolates from a repetitive single-spore isolation indicated that the frequency of mutation was 12.5% and that the mutation was limited in the manner of α to α' , and never reverted. Hybridization analyses showed that chromosome- ν originated from the chromosome in band IIIb of type α and might be produced by deletion.

The results obtained in analysis above indicated that Japanese isolates were very important materials. First, a cross system obtained in this report have a Ina168 as a start point. It is expected to be a genetic

source of host specificity because Ina168 is one of Japanese differential strains which used as reference strains in the most of blast resistant breeding experiment in Japan⁵⁾. Secondary, DNA fingerprinting and electrophoretic karyotyping revealed that Japanese isolates of the fungus were appropriate materials for the analysis of pathogenic race variation. As discussed above, the rice cultivation in Japan has a specific geographical and agricultural circumstances. This study revealed that simplification of clonal lineage, and diversification of pathogenic race and karyotype in a clonal lineage had been occurred in the same period of breakdown of blast resistant cultivars. The specific circumstances of Japanese blast fungus may enabled to analyze these relationship.

As factors for the diversity of the genome, transposons are very important because they can mutate genes not only directly by the insertion but also as a point for recombination between copies. In this study, a SINEs - like element MGSR1 was found in the genome of Ina72. Although transposable activity of the element would be lost now because this element was considered to be amplified in the early stage of the evolution, other active transposable elements will be found by the same strategy. Further, transcription activity of a transposable element named MAGGY is reported to be activated by heat-shock³¹⁾. These transposable elements are expected to be a factor for pathogenic race variation. A genetic variation at chromosomal level is also found in this report.

This report contains some findings which are appreciable for providing important knowledge not only in the genetical study of Japanese isolates but also in the study of blast fungus generally. This is the first report of relationship between clonal lineage simplification and pathogenic race variation, and direct analysis of chromosomal length mutation in the fungi. Also this report will contribute to future study such as genetic analysis of host specificity of cross 5307, pathogenic race variation in the field where new blast resistant cultivars are introduced, or transposons and molecular characterization chromosomal rearrangements.

第8章 謝辞

本研究論文をまとめるにあたり、終始直接御教示御鞭撻を賜りました北海道大学農学部生物機能化学科応用菌学講座 富田房男教授、また、御校閲及び御指導を賜りました同応用生命科学科 分子生物学講座 内藤 哲教授、同生物資源科学科 植物ウイルス病学・菌学講座 上田一郎教授、同生物機能化学科 応用菌学講座 横田 篤助教授、いもち病菌の病原性検定に協力していただいた同応用生命科学科 植物育種学講座 犬飼 剛助手、ならびに直接実験上の御指導を賜りました同生物機能化学科 応用菌学講座 須藤 学助手、に厚く御礼申し上げます。

元国際協力事業団(JAICA)国際農業研修センター 清沢茂久博士には多くの菌株と助言を、農林水産省農業技術研究所 八重樫博志博士、同北陸農業試験場 藤田佳克博士には貴重な菌株と助言を賜り、深く感謝いたします。

Dr. Jean Loop Notteghem (CIRAD-CA, Montpellier, France)には菌株Guy11を、Dr. Barbara Valent (The DuPont Company, Wilmington, DE, USA)にはRFLPプローブMGR586を、Dr. Rebecca J. Nelson (IRRI, Manila, Philippines) には、プログラムWinbootを御分譲頂きました。またDr. Anthony J. F. Griffiths (University of British Columbia, Vancouver, B. C., Canada)には交配実験における貴重なご助言を賜りました。ここに感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、応用菌学講座 東山耕子教務職員、阿部 歩技官、大崎義徳元技官、岩田ひで元技官には、実験技術の習得、さらに物質的にも精神的にもよりよい研究環境を提供して頂きました。御礼申し上げます。

応用菌学講座 学生山崎彰子さん、吉田奈美さん、佐藤順子さん、大学院生 阿部卓巳君（現雪印乳業（株））、吹谷 智君、児玉 恵さんには共同研究者として、直接多くの助力を賜りました。また応用菌学講座先輩学友諸氏にも貴重な助言等を頂きました。ここに感謝いたします。

最後に、本研究論文をまとめることができた背景には、妻 絹代の昼夜を問わぬ協力があったことをここに記し、感謝の意を表します。

1997年1月

曾根 輝雄

第9章 参考文献

- 1) Rossman, A. Y., Howard, R. J. and Valent, B. *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast fungus. *Mycologia* 82, 509-512 (1990).
- 2) Hebert, T. T. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathol.* 61, 83~87 (1971)
- 3) 林 長生, 李 成雲, 李 家瑞, 内藤秀樹 中国雲南省産陸稻イネいもち病菌の交配能力 (講演要旨) 日本植物病理学会報 62, 268 (1996).
- 4) 八重樫 博志 『稲いもち病』 山中 達, 山口富夫 編著, 養賢堂 (1987) pp. 22-33.
- 5) 山崎義人, 清沢茂久 イネのいもち病抵抗性の遺伝に関する研究 第I報 いもち病菌の数種の系統に対する日本稲品種の抵抗性の遺伝. 農業技術研究所報告 D 第14号 39-69 (1966).
- 6) Yamada, M., Kiyosawa, S., Yamaguchi, T., Hirano, T., Kobayashi, T., Kushibuchi, K. and Watanabe, S. Proposal of a new method for differentiating races of *Pyricularia oryzae* Cavara in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 42, 216-219 (1976).
- 7) Flor, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275~296 (1971).
- 8) Nagakubo, T., Taga, M., Tsuda, M., and Ueda, A. Genetic linkage relationships in *Pyricularia oryzae*. *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* 122, 75-83 (1983).
- 9) Taga, M., Nakagawa, H., Tsuda, M. and Ueyama, A. Ascospore analysis of kasugamycin resistance in the perfect stage of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 68, 815-817 (1978).
- 10) Taga, M., Nakagawa, H., Tsuda, M. and Ueyama, A. Identification of three different loci controlling kasugamycin resistance in *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 69, 463-466 (1979).
- 11) Taga, M., Waki, T., Tsuda, M. and Ueyama, A. Fungicide sensitivity and genetics of IBP-resistant mutants of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 72, 905-908 (1982).
- 12) Valent, B., Farrall, L., and Chumley, F. G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence

identified through a series of backcrosses. *Genetics* 127, 87-101 (1991).

13) Leung, H., Borromeo, E. S., Bernardo, M. A. and Notteghem, J. L. genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 78, 1227-1233 (1988).

14) Hayashi, N. and Naito, H. Genomic Mapping of *Magnaporthe grisea*. in: Rice Blast Disease, Zeigler, R. S., Leong, S. and Teng P. S. (eds.) pp.590, CAB International (1994).

15) Notteghem, J. L., Tharreau, D., Silue, D., and Roumen, E. Present knowledge of rice resistance genetics and strategies for *Magnaporthe grisea* pathogenicity and avirulence gene analysis. in: Rice Blast Disease, Zeigler, R. S., Leong, S. and Teng P. S. (eds.) pp.155~165, CAB International (1994).

16) Sweigard, J. A., Valent, B., Orbach, M. J., Walter, A. M., Rafalski, A. and Chumley, F. G., in: Genetic Maps 6th ed. O'brien, S. J., (ed), p.3.112~3.117, Cold Spring Harbor Laboratory (1993).

17) Budde, A. D., Smith, J. R., Farman, M. L., Skinner, D. Z. and Leong, S. A. in: Genetic Maps 6th ed. O'brien, S. J. (ed.), pp.3.110~3.111, Cold Spring Harbor Laboratory (1993).

18) 林 長生, 李 成雲, 李 家瑞, 内藤秀樹, 岸本直巳『植物疾病における「Gene-for-Gene」説の分子的基盤』, p. 14~20, 日本植物病理学会 (1994).

19) Valent, B. and Chumley, F. G. Avirulence genes and mechanisms of genetic instability in the rice blast fungus. in: Rice Blast Disease, Zeigler, R. S., Leong, S. and Teng P. S. (eds.) pp.111~134, CAB International (1994).

20) Sweigard, J. A., Carroll, A. M., Kang, S., Farrall, L., Chumley, F. G., and Valent, B. Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *The Plant Cell* 7, 1221-1233 (1995).

21) Hamer, J. E., Farrall, L., Orbach, M. J., Valent, B. and Chumley, F. G. Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9981-9985 (1989).

22) Levy, M., Romao, J., Marchetti, M. A., and Hamer, J. E. DNA fingerprinting with a dispersed repeated

sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *The Plant Cell* 3, 95-102 (1991).

23) Xia, J. Q., Correll, J. C., Lee, F. N., Marchetti, M. A. and Rhoads, D. D. DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in the *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) population in two rice fields in Arkansas. *Phytopathology* 83, 1029-1035 (1993).

24) Levy, M., Correa-Victoria, F. J., Zeigler, R. S., Xu, S. and Hamer, J. E. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology* 83, 1427-1433 (1989).

25) Zeigler R. S., Cuoc, L. X., Scott, R. P., Bernardo, M. A., Chen, D. H., Valent, B. and Nelson, R. J. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. *Phytopathology* 85, 443-451 (1995).

26) Schwartz, D. C., and Cantor, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37, 67-75 (1984).

27) Talbot, N. J., Salch, Y. P., Ma, M. and Hamer, J. E. Karyotypic variation within clonal lineages of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 585-593 (1993).

28) Orbach, M. J., Chumley, F. G. and Valent, B. Electrophoretic karyotypes of *Magnaporthe grisea* pathogens of diverse grasses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 261-271 (1996).

29) Jones, R. N. "B chromosomes" pp.1-17, Academic Press, San Diego, CA, USA (1982).

30) Farman, M. L., Taura, S., and Leong, S. A. The *Magnaporthe grisea* DNA fingerprinting probe MGR586 contains the 3' end of an inverted repeat transposon. *Mol. Gen. Genet.* 251, 675-681 (1996).

31) 中屋敷均, 土佐幸雄, 西本夏佳, 高木真理子, 加藤肇, 眞山滋志 キビいもち病菌ゲノムに存在するレトロトランスポゾン様配列の転移の活性化 (講演要旨) 日本植物病理学会報 62, 293 (1996).

32) 渡辺進二 『イネのいもち病と抵抗性育種』山崎義人, 高坂倬爾 編著, pp.34-46, 博友社 (1980).

- 33) 曾根輝雄, 吹谷 智, 阿部卓巳, 吉田奈美, 児玉 恵, 須藤 学, 富田房男. イネいもち病菌による交配実験系の確立. 1995年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 273 (1995).
- 34) 曾根輝雄, 吹谷 智, 阿部卓巳, 児玉 恵, 須藤 学, 富田房男. いもち病菌の高稔性交配系を用いた遺伝子解析. 1996年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 117 (1996).
- 35) Sone, T., Yoshida, N., Suto, M. and Tomita, F. DNA fingerprinting and electrophoretic karyotyping of Japanese isolates of rice blast fungus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* (submitted).
- 36) Sone, T., Suto, M. and Tomita, F. Host species-specific repetitive DNA sequence in the genome of *Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1128-1230 (1993).
- 37) Sone, T., Abe, T., Suto, M. and Tomita, F. Identification and characterization of a karyotypic mutation in *Magnaporthe grisea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 81-86 (1997).
- 38) 曾根輝雄, 富田房男. いもち病菌の遺伝子解析法の確立と日本菌系への応用. バイオサイエンスとインダストリー 54, 327-332 (1996).
- 39) 曾根輝雄, 富田房男. いもち病菌の生物学的多様性, 化学と生物 34, 676-682 (1996).
- 40) Kachroo, P., Leong, S. A. and Chattoo, B. B. *Pot2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Gen. Genet.* 245, 339-348 (1994).
- 41) Valent, B. and Chumley, F. G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 443-467 (1991).
- 42) Farman, M. L., Tosa, Y., Nitta, N. and Leong, S. A. MAGGY, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Gen. Genet.* 251, 665-674 (1996).
- 43) Shull, V. and Hamer, J. E. Genomic structure and variability in *Pyricularia grisea*. in: Rice Blast Disease, Zeigler, R. S., Leong, S. and Teng P. S. (eds.) pp.65-86, CAB International (1994).
- 44) Dobinson, K. F., Harris, R. E. and Hamer, J. E. *Grasshopper*, a long terminal repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 114-126 (1993).

- 45) Kachroo, P. K., Leong, S. A., and Chattoo, B. B. Mg-SINE: A short interspersed nuclear element from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11125-11129 (1995).
- 46) Williams, J. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski J. A. and Tingey, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.
- 47) Valent, B., Crawford M. S., Weaver, C. G. and Chumley, F. G. Genetic studies of fertility and pathogenicity in *Magnaporthe grisea* (*pyricularia oryzae*). *Iowa State Journal of Research* 60, 569-594 (1986).
- 48) 八重樫博志 いもち病菌の完全世代に関する研究. 東北農試研報 63, 49-125 (1981).
- 49) Raeder, U. and Broda, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters Appl. Microbiol.* 1, 17-20 (1985).
- 50) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989).
- 51) Hanahan, D. Techniques for transformation of *E. coli*. in: DNA cloning Vol. I, ed. by Glover, D. M., pp. 109-135, IRL Press, Oxford (1985).
- 52) Hamada, M., Hashimoto T., Takahashi, T., Yokoyama, S., Miyake, M., Takeuchi, T., Okami, Y. and Umezawa, H. Antimicrobial activity of kasugamycin. *J. Antibiotics* 18, 104-106 (1965).
- 53) Michelmore, R. W., Paran, I. and Kesseli, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9828-9832 (1991).
- 54) Manly, K. F. a Macintosh program for storage and analysis of experimental genetic mapping data. *Mammalian Genome* 4, 303-313 (1993).
- 55) Yap, I. and Nelson, R. J. *Winboot*: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IRRI Discussion Paper Series No. 14. International Rice Research Institute, P. O. Box 933, Manila, Philippines (1996).

- 56) Rohlf, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 1.80. Exeter Publishing Co. Ltd., Setauket, NY (1995).
- 57) Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791 (1985).
- 58) Deininger, P. L. SINEs: Short interspersed repeated DNA elements in higher eucaryotes. in: *Mobile DNA*, Berg, D. E. and Howe, M. M. (eds.) pp. 619-636. American Society for Microbiology, Washington D. C., USA (1989).
- 59) Birren, B. and Lai, E. in: Pulsed Field Gel electrophoresis: A Practical Guide, pp. 158-163, Academic Press, San Diego, CA, USA (1993).
- 60) Zolan, M. E. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol. Rev.* 59, 686-698 (1995).
- 61) 田中健治 カンジダ酵母の核型の多型性 日本農芸化学会誌 68, 1138-1141 (1994).
- 62) White T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in: *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*, Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sinsky, J. J. and White T. J. (eds.), pp. 315-325, Academic Press San Diego, CA, USA (1990).
- 63) Iwaguchi, S., Homma, M. and Tanaka, K. Clonal variation of chromosome size derived from the rDNA cluster region in *Candida albicans*. *J. Gen. Microb.*, 138, 1177-1184 (1992).
- 64) Rustchenko, E. P., Curran, T. M. and Sherman, F. Variations in the number of ribosomal DNA units in morphological mutants and normal strains of *Candida albicans* and in normal strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 175, 7189-7199 (1993).