



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analysis on expression controlling mechanism of AVR-Pia, an avirulence effector in Magnaporthe oryzae [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Worawan, Sornkom
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12432号
Issue Date	2016-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63770
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Sornkom_Worawan_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（農学）	氏 名	Worawan Sornkom
審査担当者	主査	教授	曾根輝雄
	副査	教授	増田 税
	副査	客員教授	鎌形洋一
	副査	客員准教授	菊池義智

学位論文題名

Analysis on expression controlling mechanism of AVR-Pia, an avirulence effector in *Magnaporthe oryzae*
(イネいもち病菌の非病原性エフェクターAVR-Pia の発現制御メカニズムの解析)

本論文は英文 115 頁，図 37，表 27，6 章からなり，参考論文 2 編が付されている。

糸状菌 *Magnaporthe oryzae*（イネいもち病菌）が引き起こすいもち病は全世界で発生するイネの最重要病害である。本病害の防除にはいもち病抵抗性イネ品種が使われるが，いもち病抵抗性を打破する病原菌が出現するなど，その管理は農業上重要な問題となっている。イネのいもち病抵抗性は，いもち病抵抗性遺伝子（R 遺伝子）産物により，いもち病菌由来の非病原性エフェクターが認識されることにより誘導される。そのため，非病原性エフェクターはいもち病防除の鍵であり，その遺伝子（AVR 遺伝子）の発現制御に関する知見は抵抗性イネ品種の持続性を高める上で重要である。本研究ではイネいもち病菌の非病原性エフェクターAVR-Pia の発現制御メカニズムの解明を目的として行われ，以下の 4 点についての知見を得た。

1) 蛍光レポーターによる AVR-Pia 発現解析システムの構築

AVR-Pia の発現を解析するため，*AVR-Pia* 遺伝子上流の推定プロモーター領域に *eGFP* 遺伝子を連結した。この構造を AVR-Pia を持たない Ina168m95-1 株に導入し，イネ葉鞘に接種後蛍光顕微鏡で観察したところ，感染時に形成される付着器及びイネ細胞内の侵入菌糸で *eGFP* の蛍光が観察された。以上のことから，AVR-Pia の発現はイネいもち病菌の感染行動中，付着器分化時に誘導されることがわかった。また，同様の解析をタマネギ表皮細胞を用いて行ったところ同様の結果が得られたため，タマネギ表皮細胞は AVR-Pia 発現解析のためのイネ葉鞘に変わる簡便な材料であることを発見した。

2) AVR-Pia 発現と宿主への侵入の関係の解析

付着器分化は容易に顕微鏡で確認出来るが，その後の宿主細胞への侵入は付着器直下で起こるため，その有無に関しては判別が困難であった。そこで，イネいもち病菌の宿主侵入不全変異株 *Δpls1* を用いて，AVR-Pia 発現と宿主への侵入の関係を解析した。前項の蛍光レポーターシステムにより解析したところ，*Δpls1* におい

でも AVR-Pia の発現が起こることが示唆された。また、AVR-Pia::eGFP 融合タンパク質を発現させた場合でも同様の結果が得られたことから、AVR-Pia の発現には宿主への侵入は必要ないこと、さらに侵入前に付着器内で AVR-Pia へと翻訳されることが明らかとなった。

3) AVR-Pia 遺伝子の発現のためのシスエレメントの同定

AVR-Pia 遺伝子の発現制御に関わるシスエレメントの同定のために、PPR の段階的欠失変異体を作成し、それぞれ蛍光レポーターシステムに導入し、解析を行った。その結果、変異体 PDL3 において eGFP 蛍光の発現低下が認められ、同様の結果が RT-PCR によっても確認された。一方で、PDL3 よりもさらに欠失させた PDL3-1 では eGFP の発現は回復した。以上のことから、AVR-Pia 遺伝子の上流 286-277 塩基、上流 277-261 塩基にそれぞれ転写調節因子が結合するエンハンサー配列及びサイレンサー配列が存在することが示唆された。

4) AVR-Pia 発現におけるグローバル転写制御因子 LaeA の役割

これまでに糸状菌の複数の 2 次代謝産物生産を制御する因子として LaeA があることが知られている。イネいもち病菌の非病原性エフェクター ACE1 は 2 次代謝産物と考えられる一方で、AVR-Pia と同様の発現制御を受けていると考えられる。そこで、イネいもち病菌から LaeA ホモログ遺伝子を見つけ出し、その欠失変異株を作成し、蛍光レポーターシステムを導入することで、AVR-Pia の発現に LaeA が関与するかを明らかにしようと試みた。その結果、LaeA ホモログ欠損株において eGFP 蛍光の発現する割合が低下することが認められ、LaeA ホモログがイネいもち病菌に於いて AVR-Pia の発現の制御に関わる可能性が示された。

以上、本研究では eGFP 蛍光レポーターを用いた解析により、イネいもち病菌の非病原性エフェクターの発現制御機構に関する新たな知見を得ることができた。以上の成果は、抵抗性イネ品種を用いたイネいもち病の持続的制御の実現に大きく寄与するものである。

よって審査員一同は、Worawan Sornkom が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。