



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Analysis of the DNA damage signal transducer ortholog Mop53BP1 in <i>Pyricularia oryzae</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | Ohara, Andre; Ohara, André                                                                                                                                     |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                          |
| Degree Name         | 博士(農学)                                                                                                                                                         |
| Dissertation Number | 甲第13141号                                                                                                                                                       |
| Issue Date          | 2018-03-22                                                                                                                                                     |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/70184">https://hdl.handle.net/2115/70184</a>                                                                              |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/</a>                                            |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                |
| File Information    | Andre_Ohara_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   | André Ohara |
| 審査担当者      | 主査     | 教授    | 曾根輝雄        |
|            | 副査     | 教授    | 近藤則夫        |
|            | 副査     | 客員准教授 | 菊池義智        |
|            | 副査     | 講師    | 吹谷 智        |

## 学位論文題名

### **Analysis of the DNA damage signal transducer ortholog *Mop53BP1* in *Pyricularia oryzae***

（イネいもち病菌の DNA 損傷トランスデューサーオーソログ Mop53BP1 の解析）

本論文は英文 91 頁，図 25，表 3，6 章からなり，参考論文 1 編が付されている．

いもち病はイネの最重要病害であり，イネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* (完全世代名: *Magnaporthe oryzae*) がその原因菌である．本菌の宿主への侵入に必須である付着器の形成は，病原性の発露に重要なステップである．近年，いもち病菌の付着器形成と細胞周期の間に密接な関係があることが見出されている．高等生物の細胞周期の G2-M チェックポイントにおいて機能するシグナルトランスデューサーである p53BP1 のオーソログ遺伝子 *Mop53BP1* が，いもち病菌のゲノムから発見され，その欠失変異株は 1 つの分生子から複数の付着器を形成する異常な表現型を示し，病原性を低下させることがわかっている．本研究では，遺伝子発現解析や，その他の細胞周期関連タンパクとの関係を解析することで，*Mop53BP1* の付着器形成における重要性を明らかにすることを目的とした．

#### **1) DNA 損傷条件下における *Mop53BP1* の発現解析**

*Mop53BP1* の DNA 損傷条件への反応と生理機能を解析するため，イネいもち病菌野生株を液体培養し，複数の異なる DNA 損傷処理を与えた後 RNA を抽出し，定量的 RT-PCR によって *Mop53BP1* 遺伝子の発現を解析した．その結果，いずれの処理においても *Mop53BP1* の発現の上昇は確認されなかったため，*Mop53BP1* は栄養成長や DNA 二重鎖切断修復における役割を有していないことが示唆された．

#### **2) いもち病菌細胞における *Mop53BP1* の発現と局在**

*Mop53BP1* タンパク質の付着器形成時における発現と細胞内局在を可視化するため，緑色蛍光タンパク質（GFP）を *Mop53BP1* に融合させた遺伝子をイネいもち病菌に導入し，付着器形成の段階ごとに顕微鏡観察を行った．その結果，分生子と，分生子からの発芽時のみに核に強い蛍光が観察された．また，定量的 RT-PCR 解析においても，付着器形成の開始時に最も強く転写され，時間経過に従い減少していくこと示された．以上のことから，*Mop53BP1* は付着器形成のごく初期にのみ

発現し、核に局在することが示唆された。

### 3) *Mop53BP1* の過剰発現

付着器形成時の *Mop53BP1* の過剰発現の影響について調べるため、*GFP:Mop53BP1* 遺伝子のプロモーターを恒常強発現性の *TEF* プロモーターに置き換え、付着器形成時の発現を観察した。その結果、付着器形成の全ての段階において強い緑色蛍光シグナルが核に観察された。過剰発現株において正常の付着器形成と侵入菌糸がみられたことから、*Mop53BP1* の過剰発現は付着器形成に影響しないことが明らかとなった。

### 4) *Mop53BP1* の細胞周期制御における役割

*Mop53BP1* が細胞周期チェックポイントに関連する機能を持つかどうかを明らかにするため、野生株、*Mop53BP1* 欠損株、*Mop53BP1* 過剰発現株について、DNA 合成阻害剤であるオキシ尿素 (*hydroxyurea*、HU) および微小管阻害剤ベノミルの存在下での付着器形成を試みた。HU 存在下では、全ての株において同様に発芽管において細胞周期の遅滞が見られ、*Mop53BP1* が DNA 合成チェックポイントには関与しないことが示唆された。それに対し、野生株には影響を与えない低濃度のベノミル存在下で *Mop53BP1* 欠損株が発芽しないという過剰な感受性を示した一方で、過剰発現株は野生株が付着器形成異常を起こす高濃度のベノミル存在下でも付着器を形成し、ベノミル耐性があることが明らかとなった。以上のことから、*Mop53BP1* と微小管との強い関連性が示唆された。

以上、本研究は *Mop53BP1* が微小管との相互作用を通じてイネいもち病菌の核の分裂や分配に重要な役割を持っていることを示した。加えて、本論文は同菌において微小管の付着器形成初期の役割を初めて明らかにした。これらの知見はイネいもち病防除における重要なターゲットである病原菌の付着器形成過程の深い理解に貢献することが期待される。

よって審査員一同は、André Ohara 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。