



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Mitochondrial Visualization in Rice Blast Fungus and its Application to 3D Observation, Quantification, and Distribution Analysis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Muhammad Akhid Syib' li
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13919号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77945
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Muhammad_Akhid_Syib' li_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 Muhammad Akhid Syib'li

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	助 教	マリア ステファニ ドウイヤンティ

学位論文題名

Mitochondrial visualization in rice blast fungus and its application to 3D observation, quantification, and distribution analysis

（イネいもち病菌のミトコンドリアの可視化とその3次元観察，定量及び分配解析への応用）

本論文は英文 111 頁，図 28，表 1，5 章からなり，参考論文 1 編が付されている。

イネいもち病菌はイネの最重要病害いもち病菌の病原菌である。近年，殺菌剤である QoI 剤耐性がいもち病菌をはじめ様々な植物病原菌で問題となっている。QoI 剤はミトコンドリアをターゲットとした薬剤であり，呼吸阻害により殺菌作用を示す。QoI 剤耐性はミトコンドリア DNA の *cytb* 遺伝子における 1 塩基置換により引き起こされる。一方イネいもち病菌の分生子はイネいもち病の蔓延に重要な役割を果たしており，それ故自然界における QoI 耐性の急速な蔓延の過程を理解するには分生子形成時におけるミトコンドリアの動態の解析が不可欠である。本研究は緑色蛍光タンパク質を用いたミトコンドリアの可視化，さらにその 3 次元観察，定量，分生子への分配の解析へと応用した。

1. クエン酸合成酵素-GFP 融合タンパク質によるイネいもち病菌の分生子形成時のミトコンドリアの可視化

クエン酸合成酵素は染色体にコードされるが，細胞質で生産された同タンパクはミトコンドリアに運ばれ機能する。そこで本研究では，クエン酸合成酵素-GFP 融合タンパク質をコードする遺伝子を核内の染色体に導入することにより，ミトコンドリアを可視化することを試みた。形質転換の結果，分生子内に緑色の蛍光が観察され，ミトコンドリア特異的蛍光色素である Mitotracker Red 蛍光との共局在が確認され，GFP をミトコンドリアに局在させることに成功したと判断した。一方，形成過程の異なる分生子を得るために，形質転換体をオートミールアガー上で 36 時間培養した。得られた分生子をレーザー走査型共焦点顕微鏡で観察し，3 次元画像を再構築した。その結果，イネいもち病菌の分生子内のミトコンドリアは点状，管状，網状など様々な形態をとることがわかった。また，菌糸先端でも点状のミトコンドリアが見られた。以上のことから，形成初期の 1 細胞の分生子には点状の分生子が

分布し、それが形成過程の進行と共に網状となることが示唆された。

2. MitoGraph ソフトウェアを利用した分生子内ミトコンドリアの定量

MitoGraph は 3 次元画像から生細胞内のミトコンドリアの体積を計算するためのソフトウェアである。本研究では本ソフトウェアを初めてイネいもち病菌に応用した。様々な分生子の細胞数、分生子長、及びミトコンドリア体積のデータを得、ミトコンドリアの発達過程との関係について解析した。その結果、分生子長とミトコンドリア体積との間には強い相関は認められず、出芽酵母を用いた先行研究とは異なる結果となった。分生子のミトコンドリアの成長は同期性が無い可能性が考えられたが、実際の成長過程の直接観察を行う必要性が示唆された。

3. スライド培養—共焦点観察による分生子形成時にミトコンドリア動態の可視化

カバーガラス下のろ紙上でイネいもち病菌の分生子形成を行う、スライド培養法を確立した。4 日培養後、通常の顕微鏡下で分生子形成が観察され、分生子柄から分生子形成が完了するまでには 2.5 時間程度の時間がかかることがわかった。同様の方法を共焦点顕微鏡によるタイムラプス観察に応用することにより、分生子形成の全てのステージにおける連続的なミトコンドリアの定量が可能となった。2 例の分生子形成過程の観察を行った結果、形成初期にはミトコンドリア量の減少がみられ、その後一定の増減を繰り返すことが観察された。

以上、本研究ではイネいもち病菌の生細胞内でのミトコンドリアの可視化および 3 次元観察法を確立した。本法によりイネいもち病菌の菌糸及び分生子におけるミトコンドリア動態の基礎的知見を得ること出来た。ことに、ごく限られた数のミトコンドリアが分生子に分配されることは、急速な QoI 耐性の蔓延のメカニズムを説明できる可能性がある。これらの知見は QoI 耐性の蔓延の防止の為に重要であるミトコンドリアの分配や遺伝の理解に寄与することが期待される。

よって審査員一同は、Muhammad Akhid Syib'li 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。