



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the dynamics and inheritance of mitochondria during conidiation in <i>Pyricularia oryzae</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Balagalle Rajapaksha Mudiyanse Lage Gonigoda Walauwe, Dineesha Nipuni Balagalla
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14651号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83132
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	ineesha_nipuni_balagalla_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 Balagalle Rajapaksha Mudiyanseelage
Gonigoda Walauwe Dineesha Nipuni
Balagalla

審査担当者	主査	教授	曾根輝雄 (国際食資源学院)
	副査	教授	近藤則夫
	副査	講師	中原健二
	副査	助教	マリア ステファニ ドゥイヤンティ

学位論文題名

Study on the dynamics and inheritance of mitochondria during conidiation in *Pyricularia oryzae*

(イネいもち病菌の分生子形成時のミトコンドリアの動態と伝搬に関する研究)

本論文は英文 68 頁, 図 14, 表 12, 5 章からなり, 参考論文 1 編が付されている.

イネいもち病の病原菌である *Pyricularia oryzae* は子のう菌類の糸状菌である. QoI (quinone – outside inhibitors) 剤はいもち病の防除に用いられる主な薬剤の一つであり, ミトコンドリア内膜のシトクロム bc1 酵素複合体に結合し, 電子伝達系を阻害する事により ATP 産生を減少させ, 死に至らしめる. 近年, QoI 剤に対する耐性菌が発生し, それらはミトコンドリア DNA の *Cytb* 遺伝子の点突然変異によるものであることが知られている. 耐性菌の発生や伝搬機構の理解のために, 病原菌のミトコンドリアの動態の解析が重要である. 本研究では, GFP で可視化したミトコンドリアを用いてイネいもち病菌の分生子形成の初期におけるミトコンドリアの形態と動態について解析を行うとともに, 定量的 PCR(qPCR)を用いて野生型と変異型のミトコンドリアを定量し, 分生子形成時のホモプラスミー化の解析を行った.

1. 分生子形成初期のミトコンドリアの形態と動態の観察

クエン酸合成酵素の N 末端と GFP を融合させた CitA-GFP 遺伝子を持つイネいもち病菌 Ina86-137 CitA-GFP を用いて, 分生子形成初期のミトコンドリアの形態と動態を観察した. スライドグラス上の培地を染みこませたろ紙に菌を接種し, 25°C で 30 時間以上培養することで分生子を形成させ, 経時的にその過程を観察した. その結果, 分生子形成初期には分生子柄から分生子に向かってミトコンドリアが連続的に送り込まれる様子が観察された. ミトコンドリアの形態は初期には管状であったが, 観察開始後 100~120 分後には点状へと変化し, ミトコンドリアの流れが停止した. また, 同時に分生子基部の隔壁の形成も認められ, ミトコンドリアの動態と分生子形成に連動性があることが示唆された.

2. qPCRによるミトコンドリア DNA *Cytb* 遺伝子のアレル別定量系の開発

QoI 耐性をもたらす Cytochrome b (*Cytb*) 遺伝子の点突然変異について、変異型配列と野生型配列を別々に定量し、それぞれの配列の比率を求めるための qPCR の系を開発した。それぞれの標準クローンをを用い、 10^8 - 10^4 コピーの範囲で直線性を持つ検量線を描くことが出来た。この系を用いて、兵庫県と秋田県からそれぞれ分離された QoI 耐性株と感受性株について定量を行ったところ、QoI 耐性株では耐性型の配列が、感受性株では野生型の配列がより多く含まれている事が明らかとなった。

3. 分生子形成とホモプラスミー化の關係の解析

細胞の中のミトコンドリアに突然変異が起ると、細胞内のミトコンドリアが不均一な状態、ヘテロプラスミーとなる。ヘテロプラスミーは通常不安定で、細胞内のミトコンドリアが均一なホモプラスミーと呼ばれる状態へと戻ることが知られている。圃場では、薬剤散布による QoI 耐性の伝搬と、薬剤使用の中止による QoI 耐性の減少のいずれも迅速に起こるため、いもち病菌の感染の起点である分生子形成とホモプラスミー化との関連性が疑われた。この解析のため、まず QoI 感受性株と QoI 耐性株のプロトプラスト融合によるヘテロプラスミー株を作成した。このヘテロプラスミー株を一方は分生子形成後に単コロニー分離、一方は分生子形成をさせずにプロトプラスト化・再生させ単コロニー分離を行い、それぞれの株のミトコンドリア DNA のタイプを qPCR で定量した。プロトプラスト融合により作成したヘテロプラスミー株の野生型：変異型の比がほぼ 1 : 1 を示した一方、同菌株から分生子形成をさせた場合には野生型：変異型の比が $1 : 10^{-5}$ ~ $1 : 10^{-7}$ を示し、プロトプラストから再生させたコロニーは野生型：変異型の比が $1:10^2$ ~ $1:10^4$ 程度と、分生子形成の有無で比率は大きく異なった。特に分生子形成で観察された顕著な比率の変化は、ホモプラスミー化を示唆しており、分生子形成とホモプラスミー化の関連性が明らかとなった。

以上、本研究ではイネいもち病菌が感染を開始することが出来る唯一の細胞形態である分生子を形成する過程が、QoI 耐性の伝搬にも重要な役割を果たしていることを示した。本研究で確立した qPCR 系やミトコンドリアの蛍光顕微鏡観察を用いたさらなる解析により、QoI 耐性の発生を抑制する技術などのイネいもち病の防除技術開発につながる事が期待される。

よって審査員一同は、Balagalle Rajapaksha Mudiyanseelage Gonigoda Walauwe Dineesha Nipuni Balagalla 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。