

## イネごま葉枯病菌のDHQS遺伝子の解析

木原淳一

## 目 的

イネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) の孢子形成は、近紫外線 (300-400nm) 照射によって誘導される。これまでに、近紫外線照射によって発現が増加する遺伝子の探索を行なった結果、3-dehydroquinate synthase (以下DHQS) と相同な遺伝子断片を明らかにした。DHQSは、芳香族アミノ酸の合成に関わるシキミ酸経路における重要な酵素であるが (Weaver and Herrmann, 1997)、植物病原糸状菌での研究例は少ない。本研究では、イネごま葉枯病菌のDHQS遺伝子のクローニングと発現解析を行なった。

## 方 法

PDA培地で4日間、暗黒下で培養したイネごま葉枯病菌に近紫外線 (National FL20S・BL-B) を1時間照射した菌体からtotal RNAを抽出し、GeneRacer Kit (Invitrogen) を用いて5'-RACE及び3'-RACEを行なった。シーケンシスは、Big Dye Terminator Cycle Sequencing KitとABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行なった。BLAST解析は、DNA Data Bank of JapanのWebサイト (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) で行なった。定量PCRによる発現解析は、Thermal Cycler Dice Real Time PCR System (TaKaRa) を用いて行なった。

## 結果と考察

5'-RACE及び3'-RACE法によって、DHQS遺伝子mRNAの5'末端及び3'末端を同定した。DHQS遺伝子は、3つのイントロンと4つのエキソンで構成され、推定461アミノ酸をコードするORFを有していた (data not shown)。このDHQS遺伝子の推定アミノ配列を用いて、BLAST解析を行なった結果、他の糸状菌のDHQS遺伝子と78-95%の高い相同性が示された (Fig. 1)。

次に、定量PCRによるDHQS遺伝子の発現解析を行なった。暗黒下での発現を1とした場合、1時間の近紫外線照射によってDHQS遺伝子の発現量は10倍以上に増加し、そのDHQS遺伝子の発現量の増加の程度は、近紫外線照射時間に比例した。各種蛍光灯を用いた実験から、DHQS遺伝子の発現増加は近紫外線で最も高く、赤色光はあまり影響しなかった。さらに、BLR1遺伝子破壊株を用いた実験から、DHQS遺伝子の近紫外線照射による発現量増

加には青色光受容体BLR1は関与しないと考えられた。

これまでに、トマトにおいて、DHQS遺伝子の発現がエリシター処理によって増加した報告があるが (Bischoff et al., 1996)、糸状菌においてDHQS遺伝子の発現が近紫外線照射によって増加した報告は今回が最初である。今後、イネごま葉枯病菌のDHQS遺伝子の機能解析を行なうことで、DHQS遺伝子をターゲットとした新しい植物病害防除技術の開発につながる事が期待される。

Bo	1	MSDLKASVVTQNGFHVVEGYEKIEYDFTFDVGDFNPANNLAKCYERWGRCLAVMDLNI	60
Ac	1	MSDLKATVSETIDGFHVVEGYEKIEYDFTFDVGDFNPQNLNLYERWGRCLAVMDRNIY	60
Pt	1	MSDLKASVVTKNGFHVVEGYEKIEYDFTFDVGDFNPANNLAQCYERWGRCLAVMDLNIY	60
		*****	
Bo	60	NIYGDQMCKYFDHYNLPLTIHKTMIGEKAQSMETLLSIVDSMTDFGIIRKPEVLVVGGL	120
Ac	60	VLYGDRMCKYFDHGLLELKIHQTMIGEKAQSMETLLSIVDSMTDFGIIRKPEVLVVGGL	120
Pt	60	NIYGDQMCKYFDHYNLPLTIHKTMIGEKAQSMETLLSIVDSMTDFGIIRKPEVLVVGGL	120
		*****	
Bo	120	VTDVAGFACAAYRRNTNFIRIPTTVIIGLIDASVSIKVAVNYGNYKRLGAYHAPMHTFLD	180
Ac	120	VTDVAGFACAAYRRNTNFIRIPTTVIIGLIDASVSIKVAVNYGNYKRLGAYHAPMHTFLD	180
Pt	120	VTDVAGFACAAYRRNTNFIRIPTTVIIGLIDASVSIKVAVNYGNYKRLGAYHAPMHTFLD	180
		*****	
Bo	180	FSFLKTLPEGVQRNGFAELIKISTCAHKPTFDLLDKYCEKLTISRLGREGDDK-EVLQAA	239
Ac	180	FGFLRLTPEAQVRNGFAELIKISSCAHRLTFDLDLDFCERLIATKFRGRTDDKGEVKKAA	240
Pt	180	FSFLKTLPEGVQRNGFAELIKISTCAHKPTFDLLDKYCEKLTISRLGREGDDK-EVLQAA	239
		*****	
Bo	239	DEINRAGIHEMLKLETPNLHEIIGLDRVIAVGHVTSPLHELSPKVPVLRHGHASIDMAYSA	299
Ac	240	DEINRAGIHEMLKLETPNLHEIIGLDRVIAVGHVTSPLHELTPVPLRHRGHASIDMAYSA	300
Pt	239	DEINRAGIHEMLKLETPNLHEIIGLDRVIAVGHVTSPLHELSPKVPVLRHGHASIDMAYSA	299
		*****	
Bo	299	TLANERGLLSDEEHRLLNLF SRAGLSMDHDLFDEEMLDKATKAILKTRDGLLRAAVPNP	359
Ac	300	TLANRGLLSDEEHRLLNLF SRAGLSMDHDLFNEEILDKATQAILKTRDGLLRAAVPNP	360
Pt	299	TLANRGLLSDEEHRLLNLF SRAGLSMDHDLFDEEMLDKATKAILKTRDGLLRAAVPNP	359
		*****	
Bo	359	IGTCVFLNDVSAEEMNKALRRHKELMKEYPRQAGLDAYVDASDTGYTVNDKPIEEAMNE	419
Ac	360	LGSKCFLNDVTNEEMFAALRRHKELMKEYPRVAGVEAYVDASDTGYTINNKPVD-PQTH	419
Pt	359	IGTCVFLNDVSAEEMNKALRRHKELMKEYPRDAGLDAYVDASDTGYTMDNKPVEDAMRD	419
		*****	
Bo	419	SKVMNGLSNGAVNGTAKGHANGIPQGLQEVVMVNGYENGYKN	461
Ac	419	AQKLVGTGI---DGKKEKSVFSDGILNGFREIAVNGYENGLRN	458 (78%)
Pt	419	SKVMNGLSNGAVNDTANGHANGFPKGLQEVVMVNGYENGYKN	461 (95%)
		*****	

**Fig. 1.** Comparison of the deduced amino acid sequence of the *B. oryzae* DHQS gene with those of two fungal putative 3-dehydroquinate synthase genes. Perfect conserved and well-conserved positions in the alignment are indicated as asterisk (\*) and dot (.), respectively.

Bo, *Bipolaris oryzae* (in this study)

Ac, *Aspergillus clavatus* (EMBL: DS027048; ORF name: ACLA\_055850)

Pt, *Pyrenophora tritici-repentis* (EMBL: DS231616; ORF name: PTRG\_02787)

## 引用文献

- Bischoff M, Rösler J, Raesecke H, Görlach J, Amrherin N, and Schmid J (1996) Cloning of a cDNA encoding a 3-dehydroquinate synthase from a higher plant, and analysis of the organ-specific and elicitor-induced expression of the corresponding gene. *Plant Molecular Biology* 31: 69-76.
- Weaver LM and Herrmann KM (1997) Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science* 2: 346-351.