

イネごま葉枯病菌におけるルシフェラーゼレポーターシステムを用いたメラニン合成遺伝子の発現解析系の構築

木原淳一

目 的

紫外線や青色光といった短波長の光は、植物病原糸状菌の生長や有性・無性孢子の形成並びに色素合成といった種々の発育・分化過程を調節することが知られている (Kumagai, 1991)。しかしながら、その分子機構についてはほとんど明らかにされていない。分生孢子形成が近紫外光照射 (波長 300-400nm) によって誘導されるイネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) を用いたこれまでの研究により、2つのメラニン合成遺伝子の発現が近紫外光照射特異的に増加することが明らかとなっている (Kihara et al., 2004a; 2004b)。従来の遺伝子の発現解析には、mRNA のハイブリダイゼーションによるノーザン解析法あるいはリアルタイム PCR 法が用いられてきたが、解析に RNA を用いるため RNA が分解しやすく、さらに、解析に時間がかかる欠点があった。そこで、これら遺伝子の発現解析を簡便に行なうために、イネごま葉枯病菌におけるルシフェラーゼレポーターシステムを用いた発現解析系の構築及び検討を行なった。

材料及び方法

供試菌として、イネごま葉枯病菌 (D9/F6-69 株) を用いた。供試菌の培養及び形質転換は、Kihara et al. (2004 a) の方法に従った。メラニン合成系遺伝子のひとつであるシタロン脱水酵素遺伝子 (*SCD 1*) (Kihara et al., 2004 b) の上流約 1kb の DNA 断片とホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結した遺伝子断片を、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む糸状菌形質転換ベクター pII99 へ導入し、ルシフェラーゼ発現ベクター pSPlucPs0 を作成した。そして、本ベクターを用いて供試菌の形質転換を行なった。ルシフェラーゼ活性の測定には、発光検出試薬として Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用い、冷却 CCD (FAS-1000, TOYOBO) またはルミノメーター (VS500, YAMATO) により発光の観察・定量を行なった。

結果及び考察

ルシフェラーゼ発現ベクター pSPlucPs0 を用いてイネごま葉枯病菌の形質転換を行なった結果、複数の形質転換が得られた。はじめに、これら形質転換体のサザン解析を行なった結果、ルシフェラーゼ遺伝子の 1 コピー挿入

が確認された。そこで、野性株と形質転換体のルシフェラーゼ活性の測定を行なった結果、野生株ではルシフェラーゼ活性がまったく認められなかったが、ルシフェラーゼ形質転換体では、高いルシフェラーゼ活性が認められた。次に、培養した形質転換体のコロニーに、近紫外光を 1 時間照射し、冷却 CCD を用いてコロニーの発光を観察した。その結果、これまでのノーザン解析の結果と同様に、暗黒下で培養したコントロールと比較して、ルシフェラーゼ活性の顕著な増加が認められた。また、その発光程度はコロニー周辺部でより高かったことから、生育初期の若い菌糸での光応答性が高いことが示唆された。さらに、単色光を照射した少量の菌叢片を用いて、ルミノメーターによる活性測定を行なった。その結果、青色光領域よりも紫外線領域の単色光照射で活性が高かったことから、*SCD 1* 遺伝子の発現量増加には紫外線領域の光が特に有効である可能性が示された。

今回構築した発現解析系は、従来のノーザン解析法あるいはリアルタイム PCR 法と比較して、短時間、少量のサンプル、さらに、多サンプルでの解析が可能であり、イネごま葉枯病菌のメラニン合成系遺伝子の発現解析に有効であることが示された。今後、本発現解析系をさらに改良し、詳細なプロモーター解析、あるいは、光受容体同定のための作用スペクトルの解析が進むことが期待される。

引用文献

- Kihara, J., Moriwaki, A., Ito, M., Arase, S., and Honda, Y. (2004a) Expression of *THR 1*, a 1,3,8-THN reductase gene involved in melanin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*, is enhanced by near-ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res.* 17: 15-23.
- Kihara, J., Moriwaki, A., Ueno, M., Tokunaga, T., Arase, A., and Honda, Y. (2004b) Cloning, functional analysis and expression of a scytalone dehydratase gene (*SCD 1*) involved in melanin biosynthesis of the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *Curr. Genet.* 45: 197-204.
- Kumagai, T. (1991) Photomorphogenesis in fungi, with special reference to photosporulation. *Trends. Photochem. Photobiol.* 2: 181-198.