

イネいもち病菌ゲノムへのDNA二本鎖切断導入と体細胞相同組換えに関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2014-09-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 荒添, 貴之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/16725

明治大学大学院農学研究科

2013 年度

博士学位請求論文

論文題名

イネいもち病菌ゲノムへの DNA 二本鎖切断導入と体細胞相同組
換えに関する研究

英語論文題名

Studies on artificial DNA double-strand breaks and somatic homologous
recombination repair in the genome of the rice blast fungus

明治大学大学院農学研究科

生命科学専攻

氏名 荒添 貴之

「イネいもち病菌ゲノムへの DNA 二本鎖切断導入と体細胞相同組換えに関する研究」

緒論	1
----	---

第一章 イネいもち病菌の体細胞相同組換えの検出と特性

I. 緒言	6
II. 実験材料および方法	
1. イネいもち病菌ならびにイネ品種	8
2. 一般遺伝子操作	8
3. 顕微鏡観察	12
4. イネいもち病菌のゲノム抽出	12
5. イネいもち病菌のプロトプラスト作製	15
6. PEG 法によるイネいもち病菌の形質転換	15
7. 簡易ゲノム DNA 抽出と PCR	15
8. 化学ストレス処理	15
9. 接種試験	16
10. 体細胞相同組換え検出マーカー遺伝子の構築	16
11. 機能欠失型 <i>Avr-Pita</i> ホモログ (<i>RS-Avr-Pita</i>) の構築	17
12. PCR-RFLP	17
III. 結果	
1. イネいもち病菌ゲノムにおける体細胞相同組換え	19
a. 体細胞相同組換え検出・選抜系の構築	
b. マーカー導入系統における体細胞相同組換え頻度と生育速度	
c. 化学ストレス処理と体細胞相同組換え頻度	
2. 体細胞相同組換えによる病原性変異	32
a. 非機能型 <i>Avr-Pita</i> ホモログの構築と非機能型ホモログ導入系統の作出	
b. <i>Avr-Pita</i> 遺伝子領域において生じる体細胞相同組換えと病原性変異	
IV. 考察	36

第二章 イネいもち病菌の DNA 二本鎖切断修復

I. 緒言	40
II. 実験材料および方法	

1. 供試イネいもち病菌	44
2. DNA 二本鎖切断検出・選抜マーカー遺伝子の構築	44
3. I-SceI 発現ベクターの構築	44
4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediated-transformation (ATMT) ベクターの構築	45
5. RS- <i>YFP::BSD</i> への silent mutation の導入と相同組換え領域の短縮化	45
6. マーカー遺伝子を用いたターゲッティング評価系ベクターの構築	46
7. ATMT 法	48
III. 結果	
1. DNA 二本鎖切断の人為的導入と相同組換え修復	50
a. I-SceI 認識配列を導入した体細胞相同組換え検出マーカー系の構築	
b. I-SceI 発現によるイネいもち病菌の表現型への影響	
c. DNA 二本鎖切断導入により誘導されるイネいもち病菌の体細胞相同組換え	
d. DNA 二本鎖切断によって誘導される外来相同 DNA を鋳型とした相同組換え修復	
2. イネいもち病菌における DNA 二本鎖切断修復様式の解析	58
a. 非同末端結合 (NHEJ) による修復様式の解析	
b. 相同組換え修復様式の解析	
c. 相同組換えに必要な相同領域長の解析	
3. 遺伝子ターゲッティング法への応用	68
IV. 考察	72

第三章 イネいもち病菌ゲノムへの人工ヌクレアーゼによる DNA 二本鎖切断

I. 諸言	75
II. 実験材料および方法	
1. 供試イネいもち病菌およびプライマー	78
2. DNA 二本鎖切断検出・選抜マーカー遺伝子の構築	78
3. 2A ペプチド連結バイシストロン性ベクターの構築	78
4. コロニーPCR	78
5. イネいもち病菌用 TALEN tool box kit の構築	78
6. イネいもち病菌用 Platinum Gate TALEN kit の構築	81
7. <i>Scytalone dehydratase (SDH)</i> 破壊ベクターの構築	82
III. 結果	
1. イネいもち病菌用 TALEN tool kit を用いた DNA 二本鎖切断導入	85
a. TG- <i>YFSCEEBT::BSD</i> 導入系統の作出	

b. TALEN の構築	
c. TALEN の活性調査	
2. イネいもち病菌用 Platinum TALEN kit の構築と DNA 二本鎖切断導入	93
a. Platinum TALEN の構築	
b. Platinum TALEN の活性調査	
c. Platinum TALEN の導入方法の検討	
3. 内生遺伝子 <i>SDH</i> をターゲットとした DNA 二本鎖切断導入	
a. Platinum TALEN の構築	
b. Platinum TALEN を用いた <i>SDH</i> 遺伝子のターゲッティング	
IV. 考察	104
総合考察	108
摘要	111
謝辞	115
引用文献	116

緒論

地球上に生息する全ての生物は、他の生物種への依存や敵対といった相互作用によって複雑かつ高度な生物多様性を創成してきた。特に、病原体とその宿主生物のように異なる種間において競うように繰り広げられてきた共進化プロセスは、軍拡競争的な共進化 (Arms race co-evolution) をもたらし、相互の生物の進化や種の分化への強力な駆動力となることが考えられている (Bush et al., 2001)。今日まで、宿主生物は抗原-抗体反応などを担う免疫系や生体防御系を進化させ、一方、寄生生物は宿主生物の防御機構をかいくぐるために巧妙な感染戦略を進化させ続けている。

このような宿主生物と寄生生物間における共進化プロセスは植物病理学の分野においても例外ではない。植物は病原菌の侵入に対して主に 2 つの認識機構を通じて病原菌を排除する防御応答を備えている。1 つはキチンや β グルカンといった病原性には関係なく、微生物が持つ共通の分子パターン (microbe/pathogen-associated molecular patterns: MAMPs/PAMPs) を認識して誘導される基礎的抵抗性である (Kaku et al., 2006; Kishimoto et al., 2010; Nurnberger et al., 2004; Shibuya and Minami, 2001)。もう一方は、Flor (1959) が提唱した遺伝子対遺伝子説にもとづく真性抵抗性であり、病原菌が有する非病原性遺伝子産物 (エフェクター) を植物側の抵抗性遺伝子産物が特異的に認識することによって誘導される (Silue et al., 1992)。近年、このような植物側の基礎的抵抗性や真性抵抗性と病原菌側のエフェクターの獲得はジグザグモデルとして提唱され、植物と病原菌間の共進化によって互いにその能力を獲得してきたと考えられている (Jones et al., 2006; Chisholm et al., 2006)。ジグザグモデルでは、まず、植物が MAMPs を認識する基礎的抵抗性を発達させた。次に、一部の微生物がエフェクター分子を獲得して、エフェクター分子を植物細胞内に分泌することで基礎的抵抗性を攪乱し、感染を成立させるものが現れた。これに対して、一部の植物は病原菌の病原性因子であるエフェクタータンパク質を抵抗性遺伝子産物によって認識し、より強固な抵抗性を示すようになったのが真性抵抗性であると推察されている。今日では、病原菌は非病原性遺伝子の機能を欠失させることにより真性抵抗性を回避し、植物の品種によって病原性が異なる新たな病原菌 (レース) を多数出現させている (Dodds et al., 2006; Fudal et al., 2009; Khang et al., 2008; Orbach et al., 2000; Yoshida et al., 2009; Zhou et al., 2007)。特に、直接的な相互作用を示す抵抗性遺伝子と非病原性遺伝子では、他の遺伝子配列と比較してアミノ酸レベルでの変異頻度が高く、Arms race co-evolution の関係性を示す一指標として注目されている (Allen et al., 2004; Kanzaki et al., 2012)。

我が国の主要作物であるイネにいもち病を引き起こし、深刻な減収やコメの品質低下など甚大な被害をもたらすイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*; synonym, *Magnaporthe oryzae*) は、宿主であるイネと共に全ゲノム配列が解読されている数少ないモデル病原糸状菌である (図 1)。イネいもち病菌の特徴の一つとして、イネ品種ごとに病原性が異なるレースが他の植物病原菌と比較して数多く存在することが挙げられる (表 1)。これは、稲作技術の発達に伴い抵抗性遺伝子を有する抵抗性品種の改良や圃場への導入が盛んに行われてきたのに呼応して、イネいもち病菌が驚異的なスピードで「対抗適応」し、短期間の内に「抵抗性の崩壊現象」を繰り返し引き起こしてきたことを意味している (Kiyosawa 1982; Leach et al., 2001)。同様に化学的防除として広く用いられてきた農薬の施用においても薬剤耐性菌の出現が大きな問題となっており、好気的気象条件下でのイネいもち病発生の広域適期防除が困難であることから、イネいもち病菌は病害防除の観点からも極めて制御が難しい病原菌である。現在では、異なる真性抵抗性遺伝子を導入した品種群 (マルチライン) を混植することや (Ishizaki et al., 2005)、スペクトラムの広い圃場抵抗性を付与した品種 (Fukuoka et al., 2009) を利用することにより防除効果を挙げている例も存在するが、全ての抵抗性を打ち破るスーパーレースの出現は常に懸念され、既に圃場抵抗性品種においては既に病原性を示す菌株が発見されている。



葉いもち病



穂いもち病



分生子



分生子の発芽と付着期

図1 イネいもち病菌の病徴、分生子および付着器

表1 イネいもち病菌日本菌株のレース(Yamada et al., 1976. Table 1-1 一部改変)

Differential Varieties	Resistant gene	Code No.	Pathogenic races ^b																
			1	3	7	17	31	33	37	101	102	103	102	107	137	303	333		
Shin 2	<i>Pi-k'</i>	1	S ^a	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S	S	
Aichi-asahi	<i>Pi-a</i>	2	-	S	S	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	
Ishikari-shiroge	<i>Pi-i</i>	4	-	-	S	S	-	-	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-	
Kanto 51	<i>Pi-k</i>	10	-	-	-	S	S	S	S	-	-	-	-	-	S	-	-	S	
Tsuyuake	<i>Pi-k^m</i>	20	-	-	-	-	S	S	S	-	-	-	-	-	S	-	-	S	
Fukunishiki	<i>Pi-z</i>	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Yashiro-mochi	<i>Pi-ta</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Pi No.4	<i>Pi-ta²</i>	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S
Toride-1	<i>Pi-z^l</i>	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a S: susceptible, -: resistant

b Pathogenic race is responsible for the mass of code No. of susceptible resistance gene.

イネいもち病菌の抵抗性イネ品種への感染の可否は、遺伝子対遺伝子説にもとづいた非病原性遺伝子と抵抗性遺伝子との直接的または間接的相互作用によって決定される。そのため、非病原性遺伝子に変異が生じればイネいもち病菌はそれまで抵抗性を示していたイネ品種に対して新たな病原性を獲得することになる。これまでの研究から、複数の非病原性遺伝子が同定され、その遺伝子および周辺領域の解析から、転移因子の挿入による機能欠失、非病原性遺伝子全領域の欠失、コード領域内の点変異等が変異様式として確認されている (Bryan et al. 2000; Dai et al., 2010; De Wit et al., 2009; Kang et al 2001; Orbach et al., 2000; Takahashi et al., 2010; Zhou et al., 2007)。一方で、近年のゲノムワイドな解析によって、異なるフィールドから分離されたイネいもち病菌では、非病原性遺伝子の多重転座 (multiple translocation) に加え、染色体多型や過剰染色体の形成等の多様性が確認されており (Chuma et al., 2011a)、本菌の進化は単に非病原性遺伝子に変異するという単純な機構に留まらず、染色体レベルでの多様性を個々の細胞で独立して誘発する特性を保持していることが推測される。興味深いことに、栽培作物以外を宿主とするいもち病菌株においてはこのようなダイナミックな多様性は確認されていないことから、人為的なイネの栽培がイネいもち病菌に対して過度の選択圧を及ぼしてきた結果、イネいもち病菌のゲノム進化が促進されてきたことが示唆される。

イネいもち病菌は無性的な繁殖によって生活環を形成する (図2)。不完全世代である分生子が風や雨滴により飛散し、植物体表面に付着すると発芽管を伸長させる。植物体表面で発芽管の先端が膨張した付着器が形成され、粘着物質の分泌によって葉面に固定

されると同時に付着器の膜構造内にメラニンが蓄積する。メラニン化された付着器内にグリセロールが蓄積することで約 80 気圧に達する膨圧により菌糸がクチクラ層および植物細胞壁を貫通して表皮細胞に侵入する。侵入菌糸は植物細胞より養分を吸収しながら隣接細胞へと感染を拡大し、宿主細胞を枯死させることで病斑が形成されて発病に至る (Wilson and Talbot, 2009)。このような無性的な生活環では、染色体の交叉による遺伝的組換えが行われる有性生殖とは異なり、同一の遺伝情報をもつ細胞をクローンとして迅速に生み出すことが特徴となっている。しかしながら、イネいもち病菌が染色体レベルでの多様性を有していることは極めて奇異であり、真核生物 (植物) 対真核生物 (糸状菌) の共進化の中で獲得した独自のゲノム再編機構がイネいもち病菌には存在することが推察される。

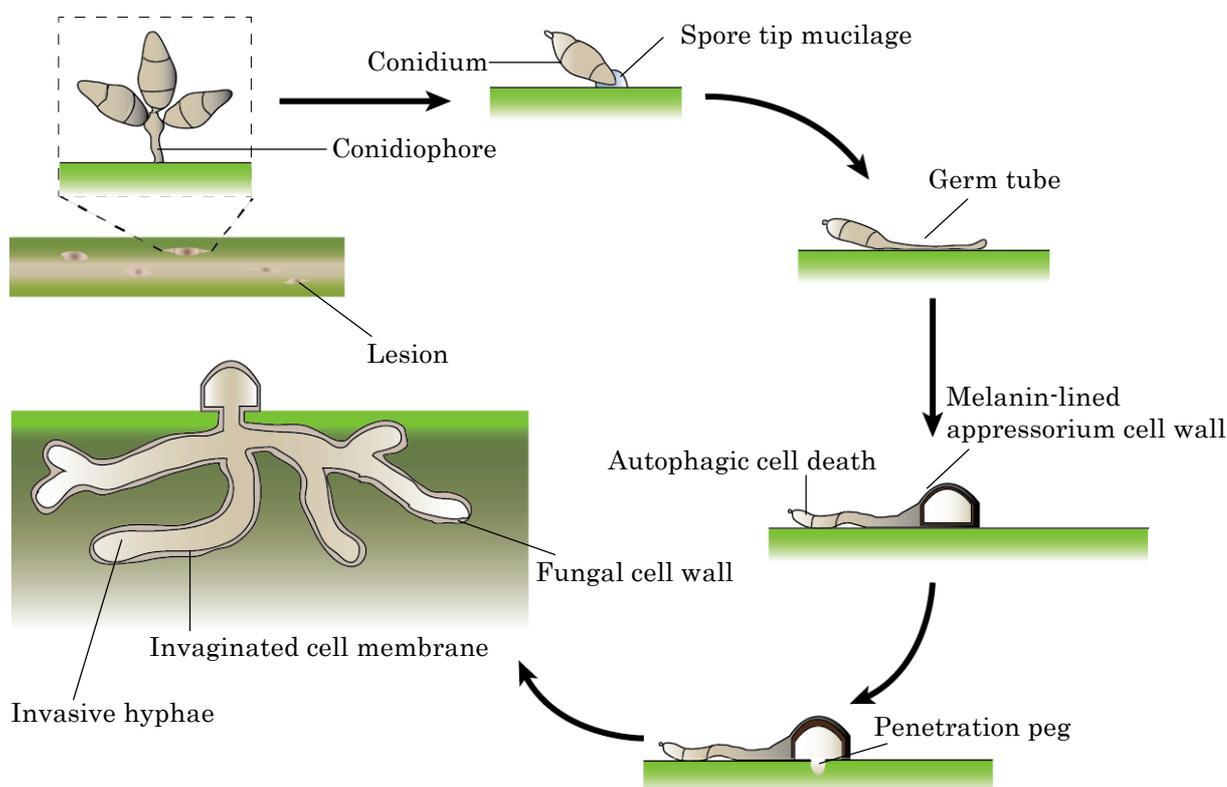


図 2 イネいもち病菌の生活環 (Wilson and Talbot, 2009 Figure 2 より一部改変)

以上より、宿主生物-寄生生物におけるパワーバランスの変化は寄生生物の驚異的なゲノム進化をもたらすはずである。イネいもち病菌は宿主であるイネ、とりわけいもち病菌真性抵抗性品種との相互作用の中でどのようにして病原性を進化させてきたのだろうか。この植物病理学における最大の疑問の一つに答えることは、植物と糸状菌における共進化の関係性と進化の過程を解き明かし、病原菌類の病原性獲得機構を明らかにすることにつながる。これまでの知見から、イネいもち病菌が有する進化機構の一つとして体細胞分裂過程で生じる相同組換えの関与が示唆されている (Chuma et al., 2011a, b; Dean et al., 2005; Miki et al., 2009; Orbach et al., 2000; Sone et al., 2013)。しかしながら、イネいもち病菌を含む糸状菌の体細胞相同組換え機構に関する知見は少なく、不明な点が多い。また、既に変異を起こしたゲノムの塩基配列から遡って変異の足跡を辿り、その変異機構を探り出すことは容易なことではない。

イネいもち病菌研究の現状を踏まえて、本論文では大きく分けて3つの課題に取り組んだ。第一章では体細胞相同組換えを検出するためのマーカー系の構築とそれらを用いたイネいもち病菌における体細胞相同組換えの検出とその特性について明らかにした。第二章では第一章において得られた知見をもとに、イネいもち病菌におけるDNA二本鎖切断修復様式機構について解析し、第三章ではイネいもち病菌に最適化した人工ヌクレアーゼの構築とその使用による任意の塩基配列へのDNA二本鎖切断導入系を確立した。これらをもとにしてイネいもち病菌のDNA二本鎖切断とその体細胞相同組換え修復がイネいもち病菌のゲノム進化と多様性の根幹であり、原動力であることを示しながら、その可能性について考察した。

第一章 イネいもち病菌の体細胞相同組換えの検出と特性

I. 緒言

DNA 鎖間での交換 (crossover) または置換 (gene conversion) が生じる相同組換えは、細菌からヒトに至る進化の過程で普遍的かつ高度に保存された機構であり、ゲノムの安定化および多様性の創出に重要な役割を担う。減数分裂期における相同組換えは染色体を正確に分離するための DNA 代謝反応の一つであり (Shinohara et al., 2003), 対立遺伝子の組み合わせを変えることによる子孫のゲノム構成の多様化にも貢献している。その開始は位置的, 時間的にプログラムされた DNA 二本鎖切断が起点となって引き起こされる。人類が農耕を開始して以来, 長年にわたり行ってきた作物や家畜の交配育種は, 配偶子形成において減数分裂期に生じる相同組換えを巧みに利用し, 作物などのゲノム進化を促進させてきた技術といえる。一方, 植物病原糸状菌の中には有性生殖を行わず, 不完全世代を維持して無性的に繁殖するものが多数存在し, 無性繁殖特有のゲノム進化によって作物の急速な変化に対応してきたことが推測される。

相同組換えは減数分裂期だけでなく体細胞分裂期においても生じることが近年明らかとなってきた。体細胞分裂期に生じる相同組換え (体細胞相同組換え) は, 紫外線や化学物質などの外的要因, 代謝の過程で副生される活性酸素や複製フォークの進行阻害などの内的要因により, ゲノム上で微量かつ慢性的に発生する DNA 損傷の修復機構として機能していることが報告されている (Daley et al., 2005; Shrivastav et al., 2008)。体細胞相同組換えによる DNA 二本鎖切断修復は, 姉妹染色分体上やその他の完全に同一な遺伝子配列を鋳型として修復すると, その切断が生じる以前の配列が完全に復元される。しかしながら, 相同性を有するものの, オリジナル配列とは異なるエクソニックな塩基配列を鋳型とした場合, 修復後の塩基配列は完全には復元されず変異として蓄積される (Fung et al., 2011)。このように, 体細胞相同組換えによる修復は遺伝情報の本体であるゲノムに対して「安定」と「変化」をもたらす両面を合わせ持っていることが考えられている。実際に, 体細胞相同組換えは高等動植物において寄生生物に対する生体防御機構として機能し, 病原体においては宿主生物の免疫機構から逃れる機構として関与する事例が報告されている。

生体防御系として働く一例としては動物の免疫細胞がある。リンパ球の一つである B 細胞の免疫グロブリン遺伝子は, 寄生生物 (抗原) の侵入に応答するために免疫グロブリンの可変領域遺伝子群間で生じる組換え [V(D)J recombination] によって, 抗原のエピトープに高い結合親和性を有する可変領域レパートリーを作り出す (Krangel,

2003)。一方、睡眠病を引き起こす病原体トリパノソーマ (*Trypanosoma brucei*) は免疫系の抗原となる細胞表層のコートタンパク質をコードする variant surface glycoprotein (VSG) をゲノム内に複数保有しており、VSG 遺伝子間において生じる組換えによりコートタンパク質をスイッチし、抗体による認識を免れる (Boothroyd et al., 2009)。

植物においては、 β -glucuronidase (GUS) 遺伝子の中央部にハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入したマーカー系を用いることで、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ゲノムで生じる体細胞相同組換えを GUS 染色により検出することに成功している (Swoboda et al., 1994)。本マーカー系を用いることで、シロイヌナズナの体細胞相同組換えは UV 等の非生物ストレス処理、病原体の感染やサリチル酸処理によって誘導されることが明らかとなり、植物における体細胞相同組換えはストレス応答機構として既にプログラムされていることが示唆された (Lucht et al., 2002)。

植物病原菌であるイネいもち病菌では、遺伝的変異によって生じる非病原性遺伝子の機能欠失が、その非病原性遺伝子に対応する抵抗遺伝子を持つイネ品種への新たな病原性の獲得に直結する。イネいもち病菌の非病原性遺伝子の中で、最も研究が進んでいる *Avr-Pita* は、イネの抵抗性遺伝子 *Pita* と直接相互作用する非病原性遺伝子であり (Orbach et al., 2000)、223 アミノ酸からなる *Avr-Pita* タンパク質は菌類の metalloprotease と相同性を有する (Bryan et al., 2000; Jia et al., 2000)。*Avr-Pita* 遺伝子においては非機能型ホモログが複数存在することが報告されており (Khang et al., 2008; Yoshida et al., 2009)、フィールドから分離された菌株では多重転座 (multiple translocation) が確認されていることから、非常に不安定な非病原性遺伝子であると考えられている (Chuma et al., 2011a)。*Avr-Pita* 遺伝子の不安定性には相同組換えが関与していることが示唆されており (Khang et al., 2008; Takahashi et al., 2010; Chuma et al., 2011a; Chuma et al., 2011b)、このような観点からイネいもち病菌においても体細胞相同組換えはゲノム進化および病原性変異の一端を担っていることが推測される。

以上より体細胞相同組換えは宿主生物および寄生生物のゲノム進化に寄与してきたことが推測されるが、糸状菌における体細胞相同組換えに関する研究の報告例は少ない。そこで、本章では簡易的かつ非破壊的に体細胞相同組換えを検出・選抜可能なマーカー系の開発を行い、それらを用いてイネいもち病菌の体細胞相同組換えの特性および病原性変異への関与について明らかにした。

II. 実験材料および方法

1. イネいもち病菌ならびにイネ品種

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) は研究室保存の北-1 菌株を供試した。イネいもち病菌 (北 1 株) の感染試験には感受性イネ品種である日本晴または抵抗性品種であるヤシロモチを使用した。イネいもち病菌の培養は 28°Cで行い, 表 2 の固形培地または液体培地を用いた。

表 2 イネいもち病菌培地組成

・ PSA 培地 (1 L 組成)	
Potato	200 g
Sucrose	20 g
Agar	15 g
蒸留水で 1 L にメスアップ	

・ Oatmeal 培地(1 L 組成)	
Oatmeal	50 g (最終濃度 0.5 M)
Sucrose	20 g (最終濃度 1.5 M)
Agar	15g
蒸留水で 1 L にメスアップ	

・ YG 培地 (1 L 組成)	
Bacto-Yeast extract	5g
D (+) - Glucose	20 g
蒸留水で 1 L にメスアップ	

2. 一般遺伝子操作

(1) プラスミドの抽出

形質転換した大腸菌 (DH5 α) は LB 培地を用い, 大腸菌からのスモールスケールのプラスミド抽出には High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) を用いた。ラージスケールのプラスミド抽出には QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を使用した。

(2) PCR

PCRは反応液 50 μL で行った。反応液には鋳型 DNA を 0.05 μg , forward および reverse プライマー (1 μM) を各 5 μL , 10 \times KOD plus neo buffer を 5 μL , 2mM dNTPs を 5 μL , KOD plus neo (TOYOBO) 1 μL をそれぞれ加えて調製した。反応条件は 94 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間熱処理後, PCR サイクルとして 98 $^{\circ}\text{C}$ で 5 秒, 60 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒, 68 $^{\circ}\text{C}$ で所定時間 (1kb あたり 30 秒) を 30 回行った。PCR 産物の精製には QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用した。PCR 産物のゲル精製には QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使用した。

(3) 塩基配列決定

プラスミドの塩基配列決定には試薬として BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) を使用した。サイクルシーケンス反応後, 未反応の蛍光標識 ddNTP の除去のため, 各サンプルに 2 倍量の BET 溶液 [エタノール (99.5%) 3.2 mL, 超純水 350 μL , テトラエチレングリコール 320 μL , Sera-Mag magnetic carboxylate-Modified Microparticles (Thermo Scientific) 100 μL] を加え, よく攪拌した後に室温で 15 分間静置した。チューブを磁石プレートにセットし, 1 分間静置した後に上清を除去した。チューブを磁石プレートから取り出し, 70%エタノール 50 μL を加えて良く混合した。再びチューブを磁石プレートにセットし, 1 分間静置後に上清を除去した。チューブを磁石プレートから取り出し, 滅菌蒸留水を各 30 μL ずつ加えて良く混合し, 10 分間静置した後にチューブを磁石プレートにセットして 1 分間静置した。上清 25 μL をシーケンス用 96 穴プレートに移し, 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によりシーケンスを行った。塩基配列データは Vector NTI (Invitrogen) を用いて解析した。

(4) サザンハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションに用いた試薬は表 3 に示した。サザンハイブリダイゼーションは Tokai ら (2005) の方法にしたがい, 一部を改変して行った。

プローブの合成には PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) を使用した。PCR 反応液は 50 μL とし, 鋳型 DNA を 10 ~ 100 ng, PCR DIG probe synthesis mix を 5 μL , PCR buffer として 10 \times conc. with MgCl_2 を 5 μL , プライマーを各 10~100 pmol, Enzyme mix Expand High Fidelity 0.75 μL をそれぞれ加えて調製した。反応条件は 95 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間熱処理後, PCR サイクルとして 95 $^{\circ}\text{C}$ で 10 秒, 60 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分を 30 回行い, 最後に 72 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間伸長させた。合成したプローブは精製後

-20°Cで保存した。

ゲノム DNA の制限酵素処理は 50 μ L の反応液で行った。ゲノム DNA 3 μ g を 10 \times 制限酵素バッファー 5 μ L と制限酵素 45 Unit を加えて調製し、一晚 37°C でインキュベートした。制限酵素処理後の DNA を 1.5 μ g/lane になるように調整し、0.8% アガロースゲルにより電圧 50V で 1 時間の電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを加水分解溶液 30 mL で 15 分間振盪した後に蒸留水で洗浄し、変性バッファー 30 mL 中に 15 分間、2 回浸漬した。ゲルを蒸留水で洗浄後に中和バッファー 30 mL 中に 15 分間、2 回浸漬し、20 \times SSC 30 mL 中に 10 分間浸漬することで平衡化させた。Turbo blotter (Schleicher & Schuell) を用いて 20 \times SSC でナイロンメンブレン NytronN (Schleicher & Schuell) にキャピラリートランスファーを 9 時間以上行った。メンブレンを 2 \times SSC に浸漬したろ紙の上に乗せて UV クロスリンカーにより λ エネルギー線量 1,200 \times 100 μ J の条件で DNA を固定化した。固定化したメンブレンは蒸留水で洗浄し、風乾させた。42°C に温めておいた DIG-Easy Hyb (Roche) 10 mL にメンブレンを浸し、30 分間振盪してプレハイブリダイゼーションを行った。その後、プローブを含むハイブリダイゼーション溶液にメンブレンを移し、約 6 時間から 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。さらに、このメンブレンを低ストリンジェンシーバッファー 30 mL 中で、2 回洗浄 (各 5 分間) した後、あらかじめ 65°C に温めておいた高ストリンジェンシーバッファー 30 mL 中で 15 分間、2 回洗浄した。洗浄後、メンブレンを洗浄バッファー 30 mL 中で 2 分間振盪し、バッファー 2 を 30 mL 加えてさらに 30 分間振盪した。メンブレンをトレイに入れ、Anti-digoxigenine-AP conjugate (Roche) をバッファー 2 で 10,000 倍希釈した溶液 10 mL を加えて 30 分間処理した。洗浄バッファー溶液で 15 分間ずつ計 3 回の洗浄後に、基質バッファー液にて 10 分間平衡化した。ペーパータオル上でバッファーを除去し、メンブレンのトランスファー面を上にしてラップフィルム上に置き Ready-to-use CDP-Star (Roche) を 1 mL 滴下した。基質溶液がメンブレン全体に広がるように、かつ気泡が入らないように注意してラップフィルムで覆い、5 分間処理した後、過剰な基質溶液を除去し、ハイブリバックに入れてシールした。その後、Image Reader LAS4000 (Fujifilm) によりメンブレンの化学発光を検出した。

表 3 サザンハイブリダイゼーションバッファー組成

• バッファー1 (2 L 組成)	
マレイン酸	23.2 g (最終濃度 0.1 M)
NaCl	17.5 g (最終濃度 0.15 M)
NaOH で pH 7.5 に調製	
蒸留水で 2 L にメスアップ	
オートクレーブ後, 室温で保存	
• 10 % Blocking ストック溶液 (100 mL 組成)	
Blocking reagent	10 g
バッファー1 に電子レンジで 2 分間加熱して溶解した	
バッファー1 で 100 ml にメスアップ	
オートクレーブ後, -20 °C で保存	
• 低ストリジェンシーバッファー (500 mL 組成)	
10% SDS	5 ml (最終濃度 0.1 %)
20 × SSC	50 ml (最終濃度 2 %)
蒸留水で 500 ml にメスアップ	
• 高ストリジェンシーバッファー (500 mL 組成)	
10 % SDS	5 ml (最終濃度 0.1 %)
20 × SSC	12.5 ml (最終濃度 0.5 %)
蒸留水で 500 ml にメスアップ	
• 洗浄バッファー (500 mL 組成)	
10 % Tween 20	15.5 ml (最終濃度 0.3 %)
バッファー1 で 500 mL にメスアップ	
• 10 % Blocking ストック溶液 (100 mL 組成)	
Blocking reagent (DIG kit)	10 g
バッファー1 に電子レンジで 2 分間加熱して溶解した	
バッファー1 で 100 mL にメスアップ	
オートクレーブ後, -20 °C で保存	
• バッファー2 (200 mL 組成)	
10 % Blocking ストック溶液	20 mL (最終濃度 1 %)
バッファー1	180 mL
使用する 1 時間前に準備	

顕微鏡観察

イネいもち病菌の菌糸や分生子の光学顕微鏡観察と蛍光顕微鏡観察には MZFLIII (Leica Microsystems) またはオールインワン蛍光顕微鏡 BZ9000 (Keyence) を用いた。

3. イネいもち病菌のゲノム抽出

ゲノム抽出は Kamakura ら (2002) の方法にしたがい、一部を改変して行った。

PSA 培地上で培養したイネいもち病菌を YG 培地に植菌し、28°C, 130 rpm で 3 日間振盪培養した。吸引ろ過により集菌した菌体に液体窒素を加え、乳鉢と乳棒を用いて破碎後、2 mL の DNA Extraction buffer (0.1 mM EDTA, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) を加えて再度破碎した。融解後、2 mL マイクロチューブに移した後に 65°C で 10 分間インキュベートした。インキュベート後に等量のフェノール・クロロホルムを加えてよく混和した後に 15,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を新たな 2 mL チューブに移してフェノール・クロロホルム処理を計 2 回行った。回収した上清に対して 0.3 M の酢酸ナトリウムと等量のイソプロパノールを加えてよく混和した後に 15,000 rpm で 10 分間の遠心分離を行った。上清を捨て、70% エタノールにより洗浄して風乾後、50 µL の TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0) に溶解し、0.8% アガロースゲルにより電気泳動を行った。電気泳動によりゲノム DNA が確認されたサンプルには RNase A を加えて 37°C でインキュベート後、フェノール・クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿によりゲノム DNA を回収した。

4. イネいもち病菌のプロトプラスト作製

イネいもち病菌のプロトプラスト作製に用いた試薬は表 4 に示した。作製方法は Izawa ら (2009) の方法にしたがい、一部を改変して行った。

PSA 培地上で生育させた菌糸の先端部分を 3 号コルクボーラによって 2~3 個抜き取り、10 mL の YG 培地に植菌した。28°C, 130 rpm で 2 日間培養した培養液 1 mL を 100 mL の YG 培地に加え、28°C, 130 rpm で 24 時間培養を行った。培養液を 50 mL チューブに移し、6,000 rpm で 10 分間遠心分離して菌糸を沈殿させた。菌糸ペレットを 30 mL の滅菌蒸留水および 10 mL の OM バッファーで洗浄後、得られた約 1 g の菌糸に対して細胞壁分解酵素液 2 mL を加え、28°C, 70 rpm で 10 時間処理した。細胞壁分解酵素処理を行ったサンプルに、半分量の ST バッファーを境界面が崩れないように加え、swing rotor を用いて 4,000 rpm で 10 分間遠心し

た。境界面に生じたプロトプラスト層 1.5 mL を回収し、2 倍量の STC バッファーを加えた後に 6,000 rpm で 5 分間遠心分離した。沈殿したプロトプラストに STC バッファーを加えて懸濁し、血球計算盤 (Thoma hemocytometer) を用いて 5×10^7 個/mL に調整した。調整したプロトプラストは -80°C のディープフリーザーに保存した。

表 4 イネいもち病菌のプロトプラスト作製・形質転換試薬

・ OM バッファー (1L 組成)	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.2 M
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	10 mM
Concentrated HCl で pH 7.5 に調製	
別々にオートクレーブ後、蒸留水で 1 L にメスアップ	
・ 細胞壁分解酵素液	
Lysing enzyme (Sigma)	20 mg/mL
Yatalase (Takara)	3 mg/mL
OM buffer で溶解	
・ ST バッファー (1L 組成)	
Sorbitol	600 mM
Tris-HCl (pH 7.5)	10 mM
蒸留水で 1L にメスアップ	
・ STC バッファー (1L 組成)	
Sorbitol	1.2 M
Tris-HCl (pH 7.5)	10 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	20 mM
蒸留水で 1L にメスアップ	
・ 60% PEG	
Polyethylene glycol 4000	60%
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	20 mM

表 4 イネいもち病菌形質転換試薬 (つづき)

・ STC-50 バッファー (1L 組成)	
Sorbitol	1.2 M
Tris-HCl (pH 7.5)	10 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	50 mM
蒸留水で 1L にメスアップ	
・ YG1/2SC	
Yeast Extract	0.5%
Glucose	2%
Sorbitol	0.6 M
CaCl ₂ · 2H ₂ O	25 mM
蒸留水でメスアップ	
・ YG20S	
Yeast Extract	0.5%
Glucose	2%
Sucrose	20%
蒸留水でメスアップ	

5. PEG 法によるイネいもち病菌の形質転換

イネいもち病菌への遺伝子導入に用いた試薬は表 4 に示した。導入方法は Izawa ら (2009) の方法にしたがい、一部を改変して行った。

プロトプラスト懸濁液 100 μL に対して、65°C で 5 分間プレヒートした 5 μg の DNA を加え、25 μL の 60% PEG (polyethylene glycol) 溶液を 2 回に分けて重層した。室温で 20 分間静置後、1 mL の STC50 バッファーを加えて 6,000 rpm で 10 分間遠心分離した。沈殿したプロトプラストを 250 μL の YG1/2SC 培地に懸濁し、28°C で 24 時間静置した。その後、各種選抜培地上に塗布し、28°C で約 3 ~ 5 日間培養した。

6. 簡易ゲノム DNA 抽出と PCR

KOD-FX Neo polymerase (TOYOBO) を用いた PCR の鋳型 DNA の簡易抽出には溶解バッファー (20mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.3% SDS, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Protease K) を使用した。PSA 培地上で生育した菌糸の先端部分を 1 号コルクボーラにより打ち抜き、100 μL の溶解バッファーを添加した 1.5 mL マイクロチューブに加え、ボルテックスにて十分に攪拌した。その後、55°C のヒートブロックで 60 分間インキュベート後、95°C のヒートブロックに 5 分間静置して Protease K を失活させた。続いて、12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上清を PCR のテンプレートとして使用した。

PCR 反応液は 25 μL で行い、ゲノム DNA を 1 μL , forward/reverse プライマー (1 μM) を各 1.0 μL , 2 \times KOD FX Neo Buffer を 12.5 μL , 2 mM dNTPs を 2.5 μL , KOD FX Neo polymerase を 0.25 μL それぞれ PCR チューブに加えて調製した。反応条件は 94°C で 2 分間の熱処理後、PCR サイクルとして 98°C で 5 秒, 60°C で 30 秒, 68°C で所定時間 (1 kb あたり 30 秒) を 35 回行った。

7. 化学ストレス処理

分生子はオートミール培地上で 1 週間培養した気中菌糸をスパチュラで刈り取り、BLB ランプ下で 3 日間照射後、滅菌蒸留水に懸濁して回収した。血球計算盤 (Thoma hemocytometer) を用いて 1×10^3 個/mL に調整した分生子懸濁液 100 μL を所定の濃度の化学ストレス物質を含む PSA 培地に塗布し、28°C で 4 日間培養して蛍光観察に用いた。なお化学ストレス物質としてはブラストサイジン S, ビアラフォス, 名古屋大学の木村真准教授より分譲いただいた T-2 トキシン (赤かび病菌 *Fusarium graminearum* 由来), Methyl viologen, Methylmethane sulfonate,

ブレオシン，カルプロパミド，トリシクラゾールを用いた。(YFP 蛍光を有するコロニー数 / 全体のコロニー数) × 100 = 「相同組換え頻度」として算出した。また，(薬剤含有 PSA 培地上に生育したコロニー数 / 薬剤を含まない培地上に生育したコロニー数) × 100 = 「生存率」として算出した。

9. 接種試験

イネ種子は 28°C で 2 日間水道水に浸種して催芽させ，底面に穴をあけたプラスチックカップにクミアイ粒状培土 D (クレハ化学) を入れて播種し，2 ~ 3 週間温室で生育させたものを試験に用いた。血球計算盤を用いて 5×10^6 個/mL に調整した分生子懸濁液に Tween 20 を最終濃度 0.02% となるように加えて接種源とした。接種源をイネ幼苗にスプレーで噴霧接種し，高温・高湿度条件下で一晩静置した後に組換え温室に移した。接種してから 7 日後にいもち病菌の感染と形成された病斑より病原性を判定した。

10. 体細胞相同組換え検出マーカー遺伝子の構築

(1) pGEM-YFP::BSD の構築

YFP::BSD 融合遺伝子は GFBSD2 融合遺伝子 (Ochiai-Fukuda et al., 2005) の GFP 遺伝子領域を YFP 遺伝子領域と置換することにより作製した。構成的発現ベクターを構築するために，pMK-412 (Watanabe et al., 2007) を鋳型に translation elongation factor (TEF) プロモーターおよび glucoamylase (gla) ターミネーターを TEF-1 および TEF-2, GLA-1 および GLA-2 のプライマーセット (表 5) を用いてそれぞれ増幅し，Fusion PCR により連結した。得られた増幅産物は pGEM-T-Easy vector の ApaI および SacI サイトに挿入し，pGEM-PTEF-Tgla 発現ベクターバックボーンとした。

YFP::BSD 融合遺伝子を pGEM-PTEF-Tgla の AscI および PacI サイトに導入して pGEM-YFP::BSD とした。

(2) pTG-YFP::BSD および pRS-YFP::BSD の構築

体細胞相同組換え検出・選抜マーカー pTG-YFP::BSD を構築するために，pGEM-YFP::BSD を鋳型に EGFP-1 および TG-2 のプライマーセット，TG-1 および EGFP-4 のプライマーセット (表 5) を用いてそれぞれ増幅し，Fusion PCR により連結した。得られた増幅産物を pGEM-PTEF-Tgla の AscI および PacI サイトに導入して pTG-YFP::BSD とした。

体細胞相同組換え検出マーカー *pRS-YFP::BSD* のベクターバックボーンとして *pEU3-NII* (TOYOBO) の *SphI*-*NotI* サイトに合成リンカー (5'-CACTAGTGGCG CGCCGCCGGGCTTAATTAAGC-3'および 5'-GGCCGCTTAATTAAGCCCGGG CGGCGCGCCACTAGTGCATG-3') を挿入し、*pEULS5* とした。*pRS-YFP::BSD* は *pGEM-YFP::BSD* を鋳型に *RS-1* および *YFPBSD-2*, *YFPBSD-3* および *RS-2* のプライマーセット (表 5) を用いてそれぞれ増幅し、Fusion PCR により連結した。得られた増幅断片を *pEULS5* の *AscI* および *NheI* サイトに導入して *pRS-YFP::BSD* とした。

選抜マーカーとして *pMK-412* を *EcoRV* により処理し、*GFP* 遺伝子 cassette を除去したものを *pMK-dGFP* とした。本ベクターはハイグロマイシン B 耐性遺伝子 (*hygromycin B phosphotransferase: hph*) を有している。

11. 機能欠失型 *Avr-Pita* ホモログ (*RS-Avr-Pita*) の構築

Avr-Pita 遺伝子を取得するために、*AvrPita-11* および *Avr-Pita-10* のプライマーセット (表 5) により増幅し、TA クローニングにより *pGEM-T easy vector* に導入したものを *pGEM-Avr-Pita* とした。

機能欠失型 *Avr-Pita* ホモログ *RS-Avr-Pita* を構築するために、*pGEM-Avr-Pita* を鋳型として *AvrPita-9* および *AvrPita-4*, *AvrPita-3* および *AvrPita8* のプライマーセット (表 5) を用いてそれぞれ増幅し、Fusion PCR によって連結した。得られた増幅産物は *pMK-dGFP* の *SpeI* サイトに導入し、*pMK-RS-Avr-Pita* (*dysfunctional Avr-Pita*) とした。

12. PCR-RFLP

7.に示した簡易ゲノム DNA 抽出と PCR 方法により行った。プライマーは *AvrPita-22* および *AvrPita-23* (表 5) を用いた。PCR により得られた増幅産物はゲルから切り出して抽出し、*EcoRI* によって処理した。

表 5 使用したプライマーリスト

Primer name	Oligo sequence	Length (nt)
TEF-1	ATTGGGCCCAGCAAACGGTGGTCAAAGGATGGTT	34
TEF-2	GTTTAATTAACCTAGTGCGCGCCGACGGTTGTGTATGGAAGATTGAGT	49
GLA-1	TCGGCGCGCCACTAGTTTAATTAACAATCAATCCATTTTCGCTATAGTT	49
GLA-2	TGGGAGCTCCTGTCTGGTCTTCTACACGAAGGAA	34
EGFP-1	TCGGCGCGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT	35
TG-2	TGTCGCCCTCGAACTACACCTCGGCGCGGGT	31
TG-1	ACCCGCGCCGAGGTGTAGTTCGAGGGCGACA	31
EGFP-4	GTTTAATTAATTAGCCCTCCACACATAACCAGAG	35
RS-1	GAGGCGCGCCCTGGACGGCGACGTAAACGG	30
YFPBSD-2	GAATTCGGGCCACGTGGAGCCCTTGTAGAGCTCGTCCATGCCGAGAGT	49
YFPBSD-3	CTCCACGTGGCCGGAATTCCTTTGTCTCAAGAAGAATCCACCCTCATTG	49
RS-2	GCGCTAGCCTGTCTGGTCTTCTACACG	27
AvrPita-11	CACAATCAACATTATAATTACAATTAATAA	30
AvrPita-12	TTACAATATTTATAACGTGCACATTGTGC	30
AvrPita-9	TCCACTAGTTTTACACCGTTGCGAATTCGGCCTTCACCAACATTG	46
AvrPita-4	AAAATTATATGCACCCAATCATGTAATATAACT	33
AvrPita-3	AGTTATATTACATGATTGGGTGCATATAATTTT	33
AvrPita-8	CTGGAGCTCGTTATGTTAAAATCTCGCATGTTGCAGTTTTATTTTTGTA	44
AvrPita-22	TTTTTAATACTTTCTGTACTATCCA	24
AvrPita-23	TTTTTAATACTTTCTGTACTATCCA	25
M15	TTCCATACACAACCGTCGGCGC	22
M16	GCGAAATGGATTGATTGTTT	20
TG-4	GGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGC	31
EULS-25	GCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGG	30
EXFP-20	GAACTTGTGGCCGTTTACGTGCGCCGTCCAG	30

III. 結果

1. イネいもち病菌ゲノムにおける体細胞相同組換え

a. 体細胞相同組換え検出・選抜系の構築

従来のイネいもち病菌における体細胞相同組換えに関する知見は、分離株間の塩基配列の比較によって体細胞相同組換えが起きたことを推測しているにすぎない。したがって、体細胞相同組換えがゲノムで生じていることを実証可能なマーカー系を構築することは、イネいもち病菌の体細胞相同組換え研究において非常に重要であり、これまでにない新しい研究に繋がることが期待される。そこで、*YFP* 遺伝子とブラストサイジン S 耐性遺伝子 (*BSD: blasticiden S deaminase*) を融合した *YFP::BSD* 薬剤・蛍光選抜マーカー遺伝子を用いて、各細胞が糸状に連なる特性を持つ糸状菌に最適な体細胞相同組換え検出系の構築を試みた。まず、*YFP::BSD* 融合遺伝子発現ベクター *pGEM-YFP::BSD* を構築し、イネいもち病菌のプロトプラストに PEG 法により導入した。導入後のプロトプラストでは一過性の *YFP* 蛍光が観察され、プロトプラストをブラストサイジン S (200 µg/mL) を含む PSA 培地上に塗布すると菌糸の増殖と同時に *YFP* 蛍光が観察されたことから、本融合遺伝子が蛍光・薬剤選抜マーカーとして機能することが確認された (図 3)。

続いて、*pGEM-YFP::BSD* を鋳型として、2 種の非機能型マーカー遺伝子 *TG-YFP::BSD* および *RS-YFP::BSD* を構築した (図 4a)。*TG-YFP::BSD* (TG) は開始コドンから 340 bp の位置に終止コドン挿入することで、翻訳が *YFP* のコード領域の途中で終結するように設計し、*YFP* 遺伝子と *BSD* 遺伝子を連結するスペーサー領域には *SphI* 認識配列を挿入した (図 4a)。一方、*RS-YFP::BSD* (RS) は開始コドンを含む 54 bp とプロモーター領域を欠失させることで mRNA の転写や翻訳自体が起き得ないように設計し、スペーサー領域には *EcoRI* 認識配列を挿入した (図 4a)。上記 2 種のマーカー遺伝子を単独でイネいもち病菌ゲノムに導入した場合には、両マーカー遺伝子は *YFP* 蛍光およびブラストサイジン S への耐性を示さないことが確認された。

pTG-YFP::BSD, *pRS-YFP::BSD* およびハイグロマイシン B 耐性遺伝子 cassette を有する *pMK-412dGFP* の 3 種類のプラスミドを PEG 法によりイネいもち病菌プロトプラストに共導入し、ハイグロマイシン B (200 µg/mL) による薬剤選抜を行った。さらに、菌糸から抽出したゲノム DNA を鋳型として M15 および TG-4 プライマーセット (TG の確認用; 表 5), EULS-25 および EXFP-20 プライマーセット (RS の確認用; 表 5) を用いてそれぞれ PCR を行い、TG と RS の両者がゲノム内に挿入された株を選

抜して、TR (TG および RS 導入株) 系統とした。得られた TR9, 12, 13, 15, 18 および 22 の計 6 系統に対して TEF プローブおよび YFP::BSD プローブ (図 4a) を用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、TR15 系統においては TG および RS がそれぞれシングルコピーでゲノムに導入されていることが示唆され、その他の系統においてはマルチコピーとして様々な染色体座位に導入されていることが示された (図 4b)。

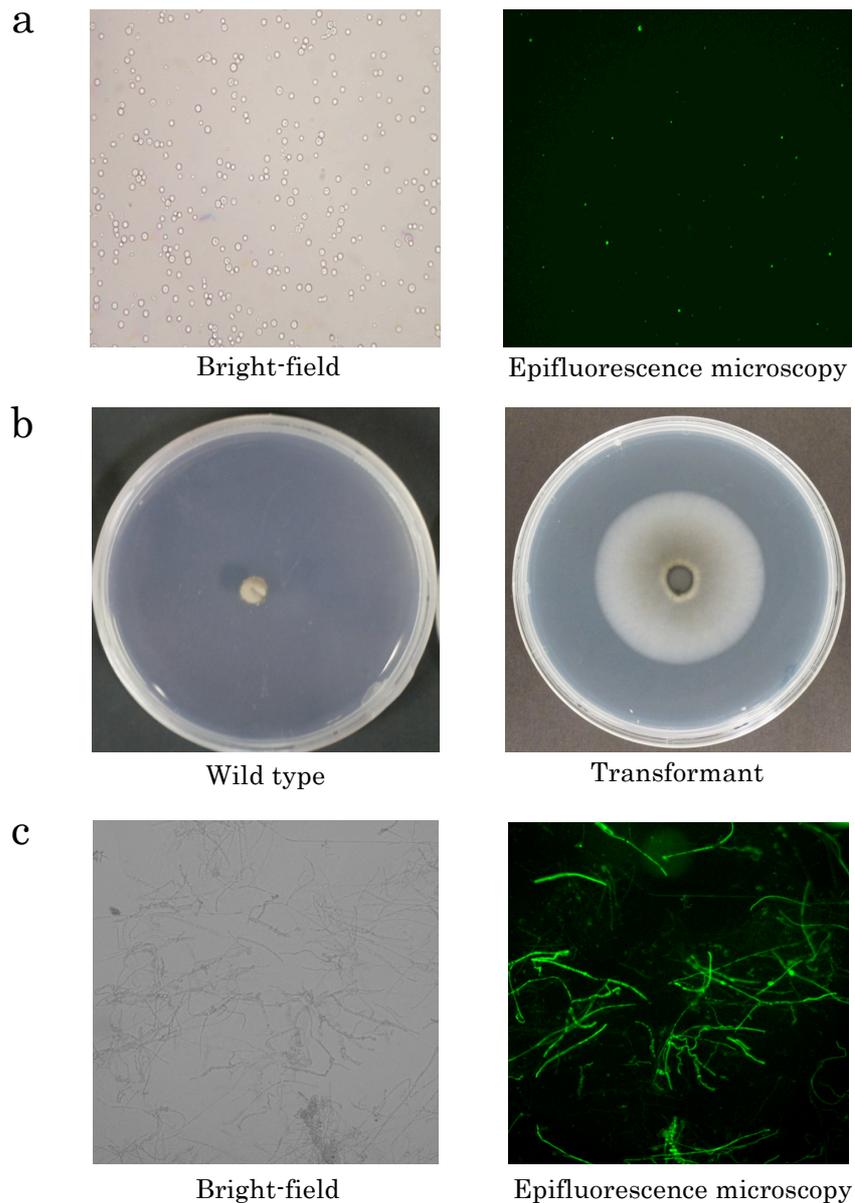


図 3 pGEM-YFP::BSD 導入株の表現型

- a プロトプラストにおける YFP の一過性発現
- b BS 含有プレート上での形質転換菌糸の生育
- c BS 含有プレート上で生育した形質転換菌糸の YFP 蛍光

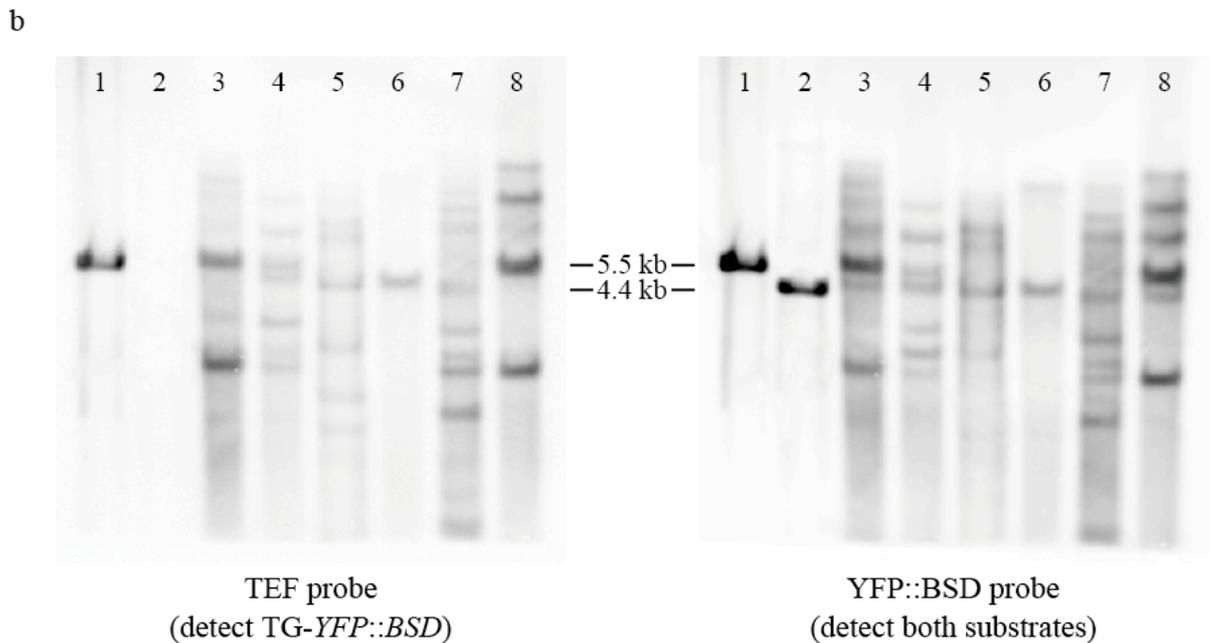
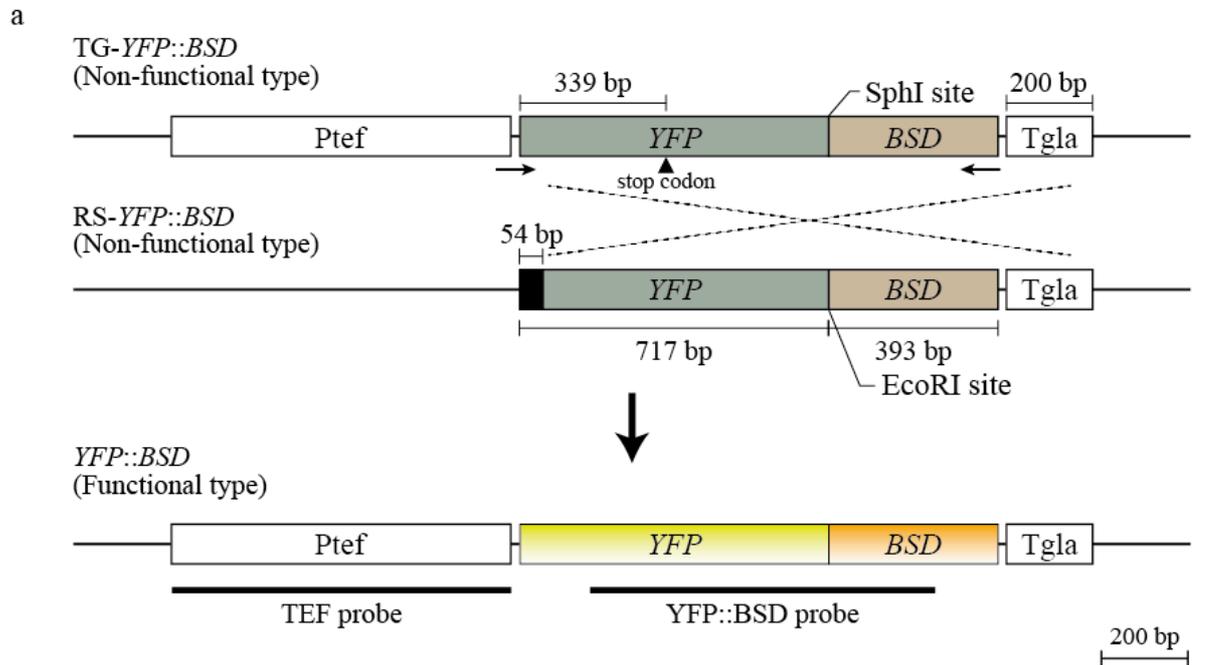


図4 体細胞相同組換え検出・選抜マーカーと両マーカー導入系統

- a 両マーカー遺伝子の模式図（配列確認用プライマーM15 および M16 は矢印で示す）
 b サザンハイブリダイゼーション結果
 ゲノムを *ApaI* および *BamHI* により消化後，TEF および YFP::BSD
 プローブで検出した。
 レーン 1: pTG, 2: pRS, 3-8: TR9, 12, 13, 15, 18, 22

TR 系統のゲノムにおいて非機能型マーカー間での相同組換えが生じた場合、TG 遺伝子内の終止コドンが当該 RS 配列によって修復され、発現型の *YFP::BSD* 配列に変換されることが考えられる (図 4a)。したがって、TG と RS 間で相同組換えが生じた細胞においては YFP 蛍光とブラストサイジン S への耐性が付与されることになる。そこで、PSA 培地上で 3 日間培養した各 TR 系統の菌叢を実体蛍光顕微鏡により観察し、YFP 蛍光を示す細胞の有無を調査したところ、菌叢の一部において扇状に生育した YFP 蛍光菌糸を確認することができた (図 5a)。このような YFP 蛍光は液体培養した TR 系統の菌糸や、そこから得たプロトプラストならびにオートミール培地上で生育させて得た分生子においても観察されたことから (図 5b-d)、イネいもち病菌ゲノムでは体細胞分裂過程において相同組換えが生じており、本マーカー系はその組換えを YFP 蛍光として検出可能であることが明らかとなった。次に、個々の細胞で生じたマーカー遺伝子間での相同組換えをブラストサイジン S により特異的に選抜できるかを検証した。PSA 培地上で 7 日間培養した菌糸片をブラストサイジン S (200 µg/mL) を含む PSA 培地上に植菌し、培養から 5 日後の菌糸生育を観察した。pGEM-*YFP::BSD* を導入した形質転換体と比較して各 TR 系統の生育速度には遅延がみられたものの、コントロールとして用いた非形質転換株と比較して明らかなブラストサイジン S 耐性を示し、菌糸生育と YFP 蛍光が観察された (図 5e, f)。また、選抜された菌糸から抽出したゲノム DNA を用いて *YFP::BSD* 配列を解析したところ、TG 配列が RS 配列に置き換わった発現型の *YFP::BSD* 配列が複数確認された (図 4a)。以上より、2 種の非機能型 *YFP::BSD* マーカー遺伝子を用いることで、イネいもち病菌ゲノムで生じる体細胞相同組換えを迅速にかつ非破壊的に検出して、効率的に選抜することに成功した。

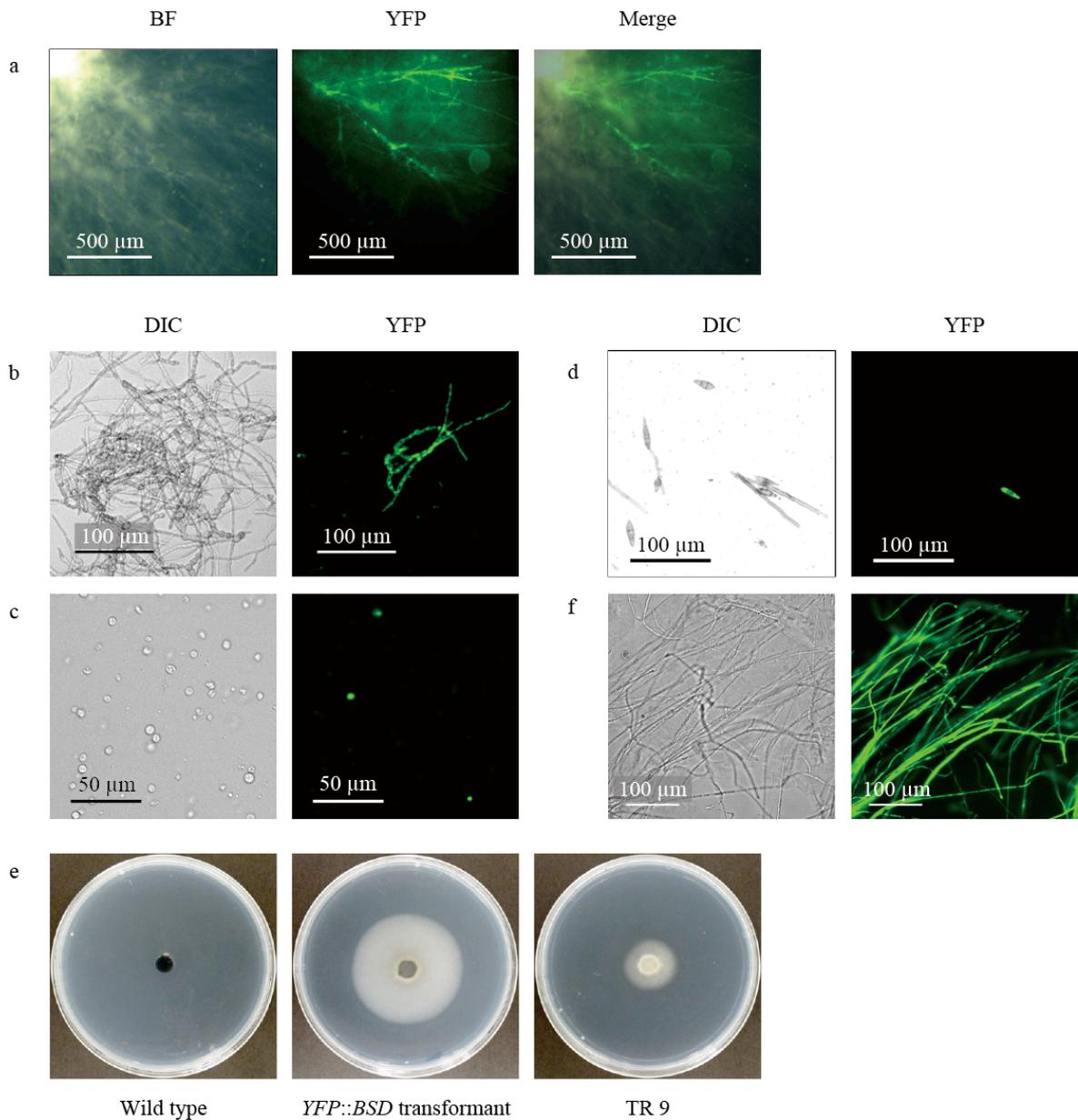


図 5 TR 系統において観察された表現型の変化

- a PSA 培地上で生育した菌糸
- b YG 培地中で生育した菌糸
- c プロトプラスト
- d 分生子
- e BS 含有プレート上での生育
- f BS 含有プレート上で生育した菌糸

BF: bright-field, DIC: differential interference contrast, YFP: epifluorescence microscopy

b. マーカー導入系統における体細胞相同組換え頻度と生育速度

姉妹染色分体上の同一の遺伝子を鋳型とした相同組換え修復とは異なり、ゲノム内の異なる配列を鋳型とした組換えは、遺伝子配列やゲノム構造を変化させる可能性を有している。本研究において構築した相同組換え検出系は TG と RS といった異なる遺伝子配列間で生じる相同組換えを簡易的に検出できることから、TR 系統を用いて体細胞相同組換え頻度の算出を試みた。YFP 蛍光を示さない菌糸プラグをオートミール培地で 7 日間培養して得た分生子懸濁液 (1×10^3 個/mL) 100 μ L を PSA 培地上に塗布し、形成されたコロニーの中で YFP 蛍光を有するものの割合を体細胞相同組換え頻度として算出した。全ての系統において YFP 蛍光を有するコロニーが数パーセント (約 5 ~ 8%) 検出されたことから、イネいもち病菌ゲノムでは無性的な繁殖過程においても一定の割合で相同組換えが生じており、その結果としてイネいもち病菌の遺伝的多様性が創出されることが考えられた (図 6)。各系統における相同組換え頻度はマーカー遺伝子のコピー数が少ない TR15 系統において低い傾向がみられたが、Student's *t* 検定においては統計的に有意な差異は認められなかった。

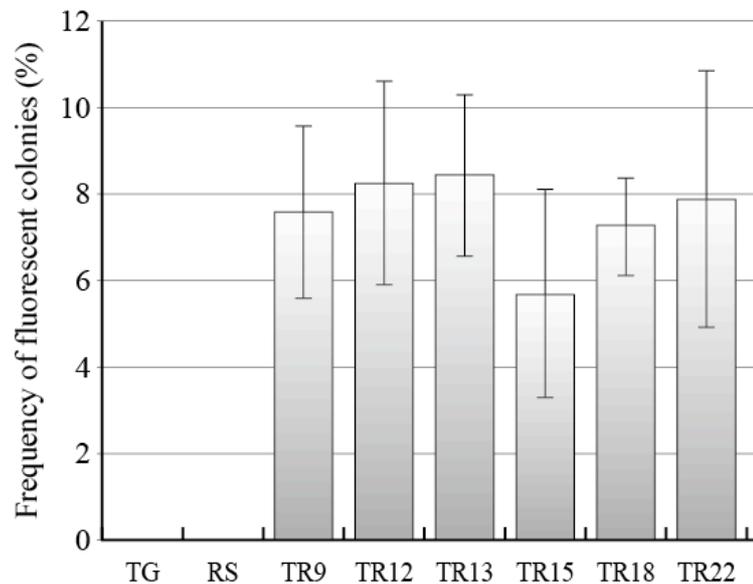


図 6 TR 系統の分生子において観察された YFP 蛍光出現頻度

上述したように、pGEM-YFP::BSD 形質転換体と TR 系統ではブラストサイジン S を含む PSA 培地上での生育速度に大きな差異があることから (図 5e), 組換えによってブラストサイジン S 耐性を獲得した細胞数とブラストサイジン S を含む培地上での生育速度には相関関係があるものと考えられた。そこで, TR 系統間における相同組換え頻度の差異を検証するために, PSA 培地上で 7 日間培養した菌糸片をブラストサイジン S (200 µg/mL) を含む PSA 培地上に植菌し, 3 日後および 5 日後のコロニーの直径を測定して比較した。3 日後のコロニーでは各系統間でその直径に大きな差異は認められなかったが, 5 日後においては TR15 系統のコロニー直径が他の系統と比較して有意に小さいことが示され, イネいもち病菌における体細胞相同組換えは相同遺伝子のコピー数に依存していることが示唆された (図 7)。

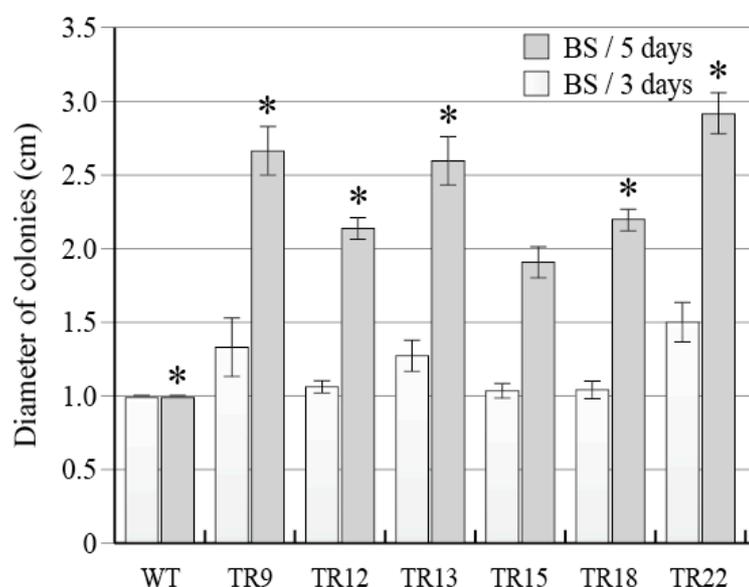


図 7 BS 含有培地上での生育速度の比較

アスタリクス (*) は TR15 と他の系統において有意差 ($P < 0.001$) があることを示す (Student's *t* 検定)。

c. 化学ストレス処理と体細胞相同組換え頻度

生物にかかる過度な選択圧は対抗適応を引き起こし, 種の分化や進化において重要な原動力となることが考えられている。近年では, 体細胞相同組換えが様々なストレスに対するゲノム応答反応として機能する事例も報告されていることから, TR9 系統を用いて化学ストレスが体細胞相同組換えに及ぼす影響について調査した。化学ストレス物質としてイネいもち病菌の一次代謝経路阻害剤であるブラストサイジン S, ビアラフォ

スおよびマイコトキシンである T-2 トキシンを用いた。ゲノムに直接損傷を与えるストレス薬剤としてはメチルメタンサルホン酸 (MMS) とブレオシンを用いた。酸化ストレス剤としては細胞質内で活性酸素を生成するメチルビオロゲン (MV) を用いた。上記の薬剤を処理するとイネいもち病菌の顕著な生育の遅延および生育阻害 (生存率の低下) が確認され、それらと同時に菌糸の一部に YFP 蛍光が観察された (図 8a-f)。マーカー系を導入した TR 系統の体細胞相同組換え頻度は、薬剤処理濃度の上昇とそれに伴う生存率の低下に依存して顕著な上昇が認められた (図 9-14)。特に、相同組換えが生じることによって処理薬剤に対する耐性形質を獲得することが可能なブラストサイジン S 処理においては、生存率の低下が認められない最小菌糸生育抑制濃度 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の薬剤処理においても体細胞相同組換え頻度の大幅な上昇が確認された (図 8)。一方、メラニンの生合成を阻害する二次代謝阻害剤トリシクラゾールおよびカルプロパミドを処理した際には、薬剤濃度に関係なく、生存率および相同組換え頻度に大きな差異は認められなかった (図 15, 16)。以上より、イネいもち病菌の体細胞相同組換えは DNA 二本鎖切断修復機構として機能するだけでなく、生育を阻害する化学ストレス環境に対するゲノム応答として誘導されることが考えられた。

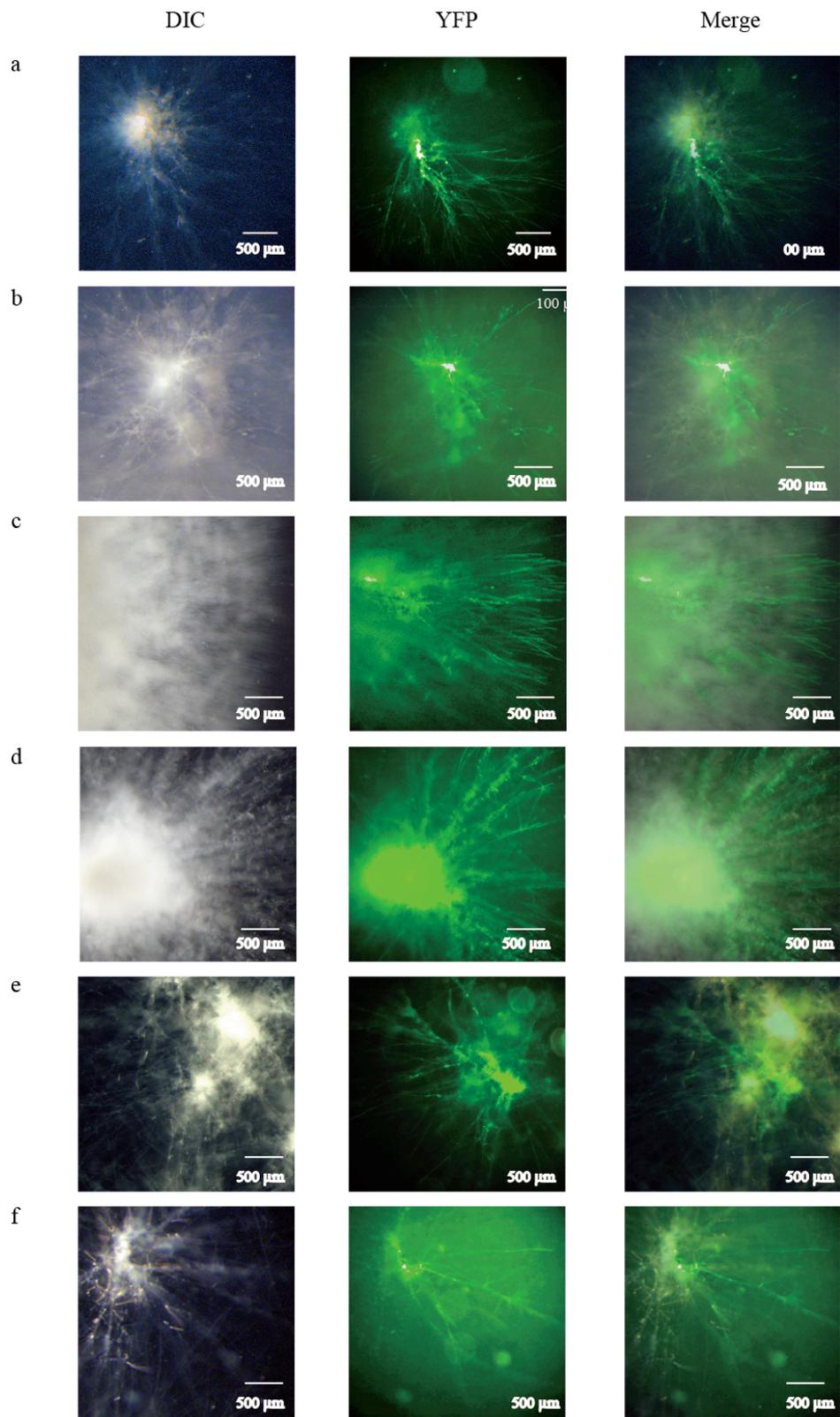


図 8 化学ストレス処理によって観察された TR 系統における YFP 蛍光
 a BS 処理, b ビアラフォス処理, c T-2 toxin 処理, d MMS 処理
 e ブレオマイシン処理, f MV 処理

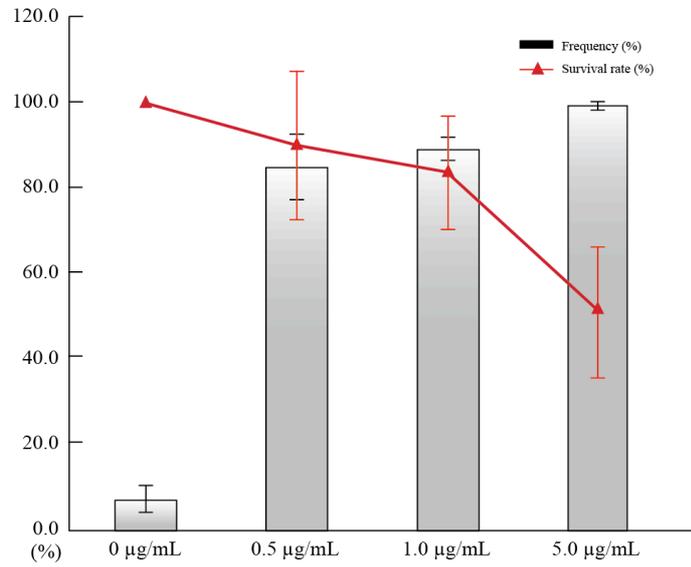


図 9 相同組換え頻度と生存率 (ブラストサイジン S)

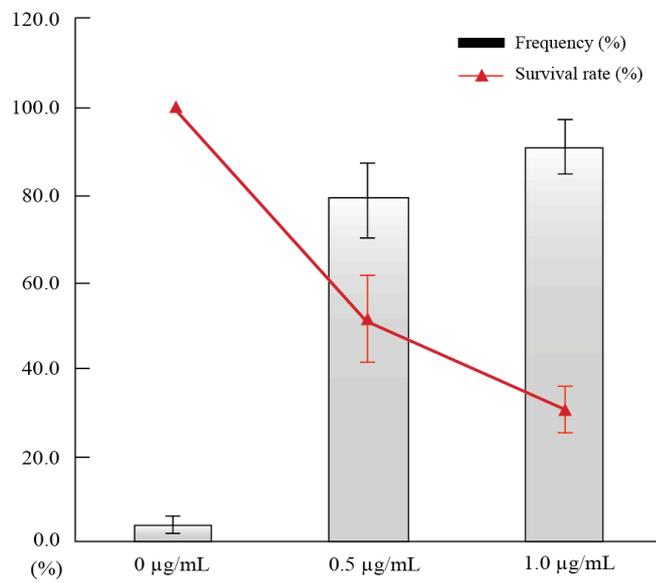


図 10 相同組換え頻度と生存率 (ビアラフォス)

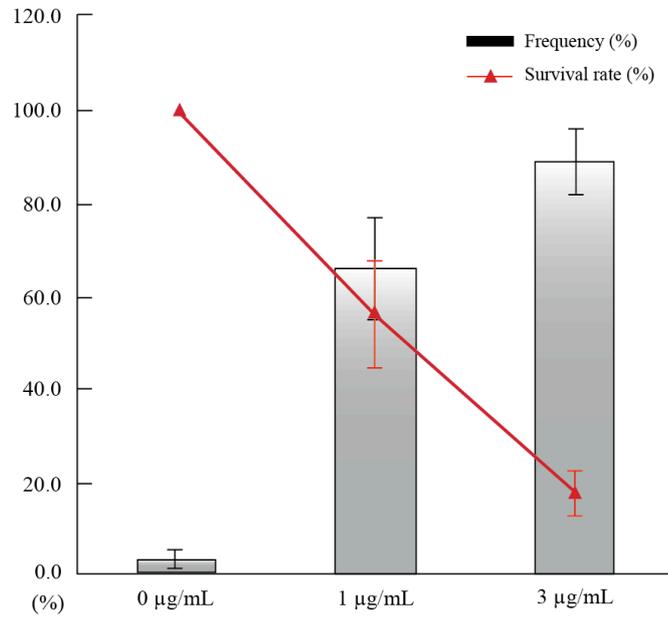


図 11 相同組換え頻度と生存率 (T-2 toxin)

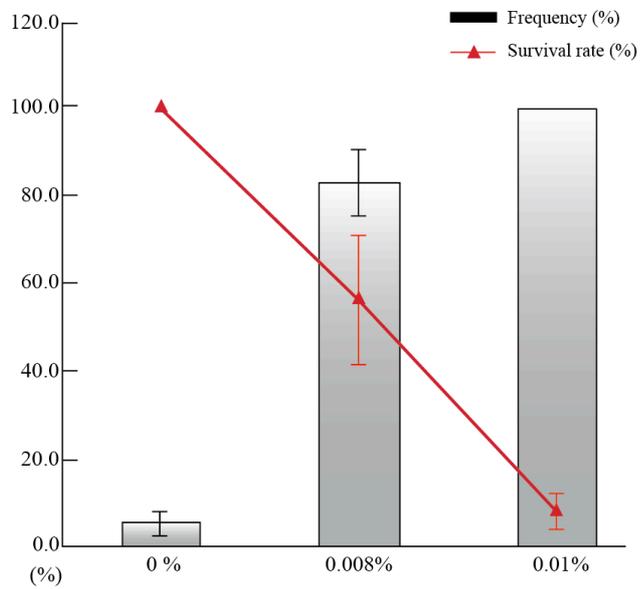


図 12 相同組換え頻度と生存率 (methyl methane sulfonate)

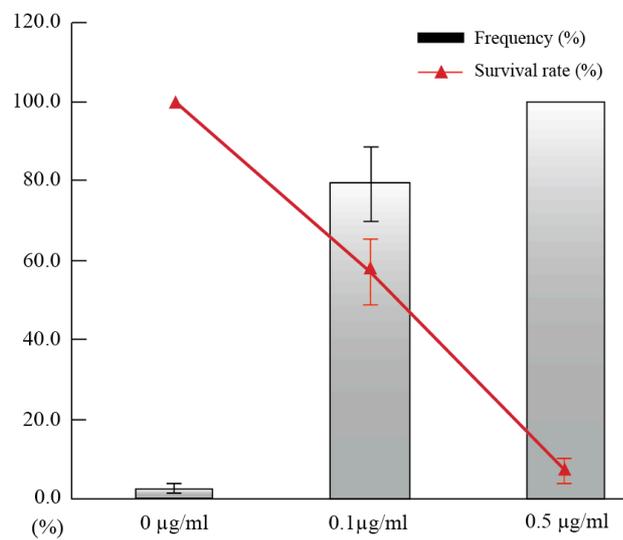


図 13 相同組換え頻度と生存率 (ブレオシン)

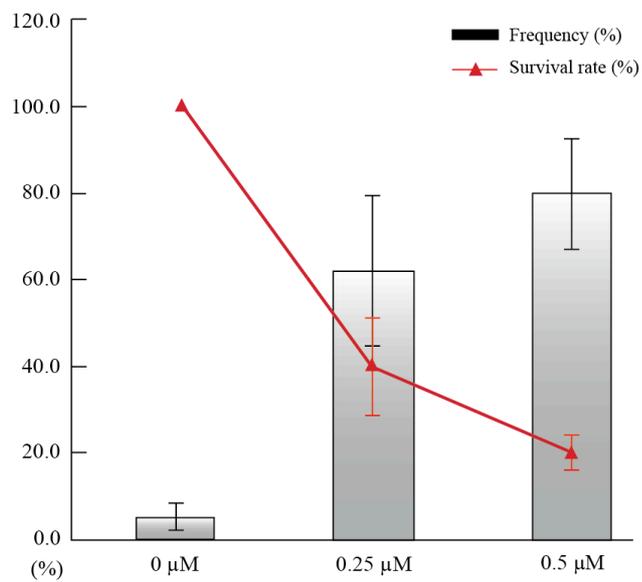


図 14 相同組換え頻度と生存率 (methyl viologen)

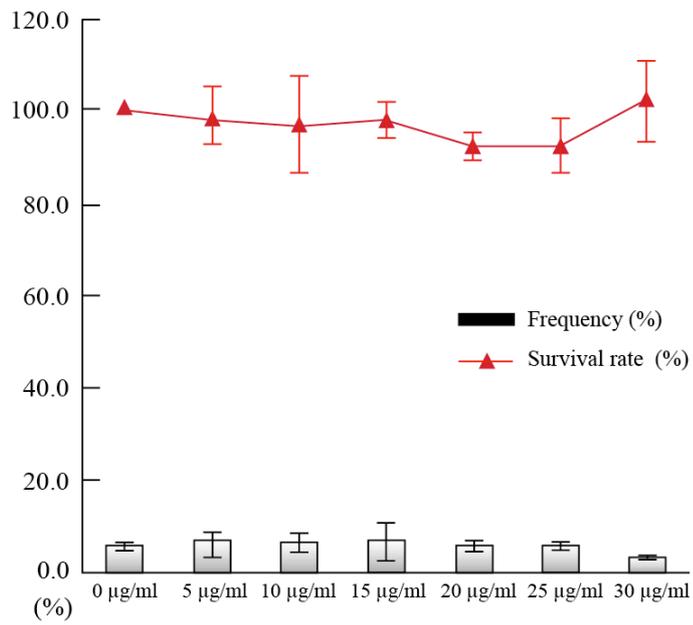


図 15 相同組換え頻度と生存率 (カルプロパミド)

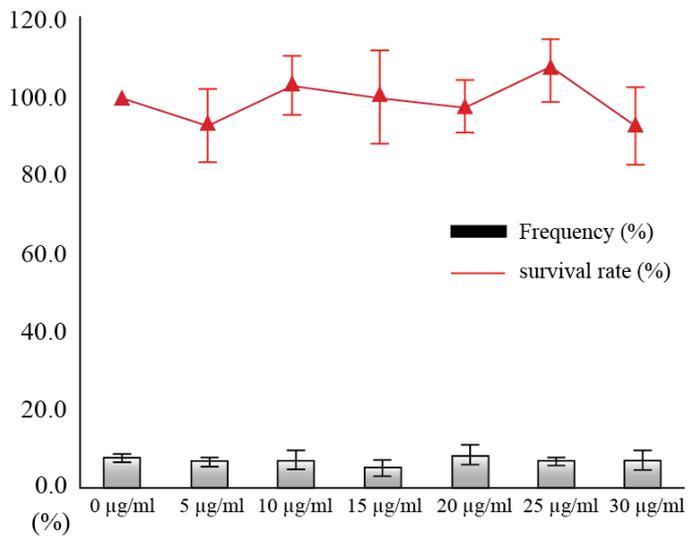


図 16 相同組換え頻度と生存率 (トリシクラゾール)

2. 体細胞相同組換えによる病原性変異

a. 非機能型 *Avr-Pita* ホモログの構築と非機能型ホモログ導入系統の作出

イネいもち病菌の抵抗性品種への新たな病原性の獲得は、非病原性遺伝子やその近傍において生じる遺伝的変異と、それに伴う非病原性遺伝子の機能消失により抵抗性遺伝子産物の認識を逃れることによって引き起こされる。これまでの結果から、イネいもち病菌ゲノムにおける体細胞相同組換えは無性的な繁殖過程においても生じており、ストレス環境下ではさらに強く誘導されることが示された。そこで、イネいもち病菌ゲノムで生じる相同組換えによって非病原性遺伝子の変異することを実験的に示す目的で、北-1株が保有する非病原性遺伝子 *Avr-Pita* をモデル系とした機能欠失型 *Avr-Pita* 遺伝子 (*RS-Avr-Pita*) の構築を行った。*RS-Avr-Pita* は北-1株が保有する *Avr-Pita* 遺伝子のプロモーター領域と開始コドンを含む 15 bp を欠失させることで非発現型とした。さらに、Jia ら (2000) の報告にしたがって *Avr-Pita* 遺伝子産物の N 末端から 177 番目のグルタミン酸をアスパラギン酸 (*E177D*) に、178 番目のメチオニンをトリプトファン (*M178W*) に置換してイネ抵抗性遺伝子 *Pita* 産物とのタンパク質間相互作用を消失させることで非機能型とした (図 17a)。また、コード領域の 44 番目のチミン残基をアデニン残基に置換することで、PCR-RFLP による相同組換え検出のための *EcoRI* 認識配列が生ずるように設計した (図 17a)。ハイグロマイシン B 耐性遺伝子 cassette (*hph*) を含む p*RS-Avr-Pita* を PEG 法により導入し、ハイグロマイシン B (200 µg/mL) 含有 PSA 培地上での生育が確認された菌株を AP (非機能型 *Avr-Pita* ホモログ導入株) 1, 2, 8 系統とした。AP 系統ゲノムにおいて内生の *Avr-Pita* とゲノムに挿入した *RS-Avr-Pita* との間で相同組換えが生じた場合、*Avr-Pita* に *EcoRI* 認識配列の挿入やメタロプロテアーゼ活性領域の不活性化 (*E177D*, *M178W*) が生じることになる (図 17a)。

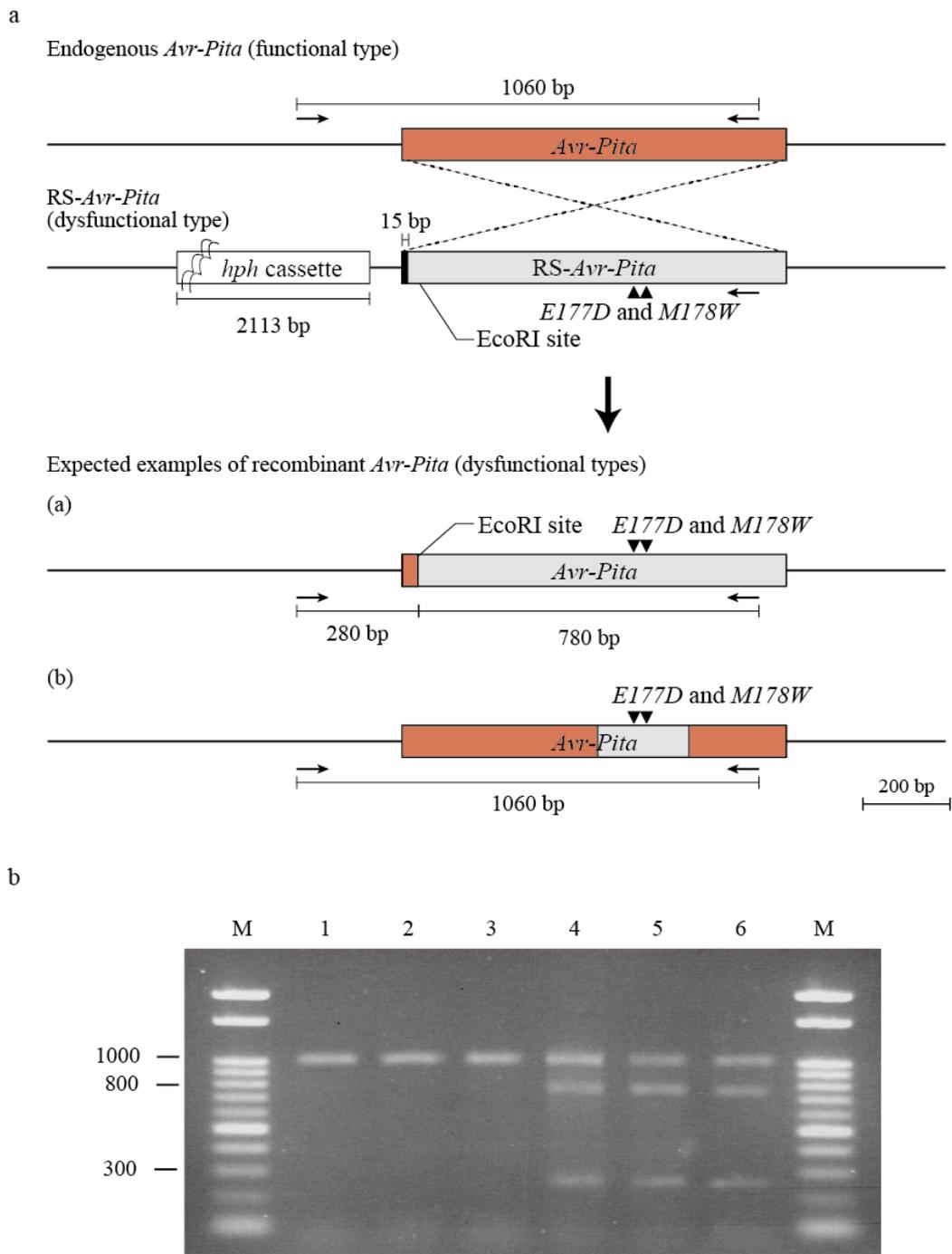


図 17 非機能型 *Avr-Pita* ホモログの模式図および PCR-RFLP による相同組換え配列の検出

a マーカー系の概略図

b PCR-RFLP (供試したプライマーは a に矢印で示した)

レーン 1: AP1, 2: AP2, 3: AP8, 4: AP1 (ブラストサイジン S 処理)

5: AP2 (ブラストサイジン S 処理), 6: AP8 (ブラストサイジン S 処理)

b. *Avr-Pita* 遺伝子領域において生じる体細胞相同組換えと病原性変異

北-1 株が保有する内生の *Avr-Pita* 遺伝子と導入された非機能型ホモログ *RS-Avr-Pita* 遺伝子との間で生じた相同組換えを検出するために、通常の PSA 培地または体細胞相同組換えを誘発することが考えられるブラストサイジン S (100 µg/mL) を加えた PSA 培地上でそれぞれ 7 日間培養した。培養後の各 AP 系統の菌糸片から簡易ゲノム抽出を行って PCR-RFLP により解析した。ブラストサイジン S を含まない PSA 培地上での培養では *EcoRI* による切断断片 (280 bp, 780 bp) はアガロースゲル電気泳動では確認できなかったが、ブラストサイジン S を加えた培養後の菌糸片では *EcoRI* による切断が確認された (図 17b)。PCR-RFLP 解析結果から、*Avr-Pita* と *RS-Avr-Pita* との間で相同組換えが生じたことが示唆され、その組換えはブラストサイジン S 処理によって促進されたと考えられた。

次に、*Avr-Pita* 遺伝子と *RS-Avr-Pita* 遺伝子との間で生じた相同組換えによってイネいもち病菌の病原性に変異することを実験的に証明するために、感受性品種である日本晴、*Pita* 遺伝子を保有する抵抗性品種ヤシロモチに対して接種試験を行った。接種試験により生じた病斑の分類は Valent ら (1991) および DeZwaan ら (1999) の評価方法に準じた。野生型の北-1 菌株を感受性品種である日本晴に接種したところ、タイプ 4・5 の典型的ないもち病の進展型病斑が観察されたのに対して (図 18a 左)、抵抗性品種であるヤシロモチへの接種試験においてはタイプ 1 に分類される褐変病斑が複数観察された (図 18a 右)。AP 系統の日本晴への接種試験においても北-1 菌株の接種試験結果と同様にタイプ 4・5 の病斑が観察された (図 18b, c 左)。一方で、ストレス処理を行っていない AP 系統を抵抗性品種ヤシロモチに接種したところ、ほとんどの病斑がタイプ 1 の褐変病斑を示したが、タイプ 2・4 の進展型病斑が少数ながら観察された (図 18b 右)。また、ブラストサイジン S による薬剤ストレスを加えた AP 系統においては、ストレス処理を行っていない AP 系統よりも多くのタイプ 2・4 の病斑を確認することができた (図 18c 右)。AP 系統を用いたヤシロモチへの接種試験によって得られた病斑から分生子を再分離して PCR により *Avr-Pita* 遺伝子領域の塩基配列を確認したところ、*RS-Avr-Pita* との間で組換えが生じたと認められる *EcoRI* 認識配列や活性部位への変異導入領域の塩基配列が得られた (図 18b)。以上の結果から、AP 系統では *Avr-Pita* 遺伝子と *RS-Avr-Pita* 遺伝子との間で相同組換えが生じ、相同組換えによって非病原性遺伝子 *Avr-Pita* が変異したことにより、*Pita* 遺伝子をもつ抵抗性品種に対する新たな病原性を獲得したと結論づけられた。

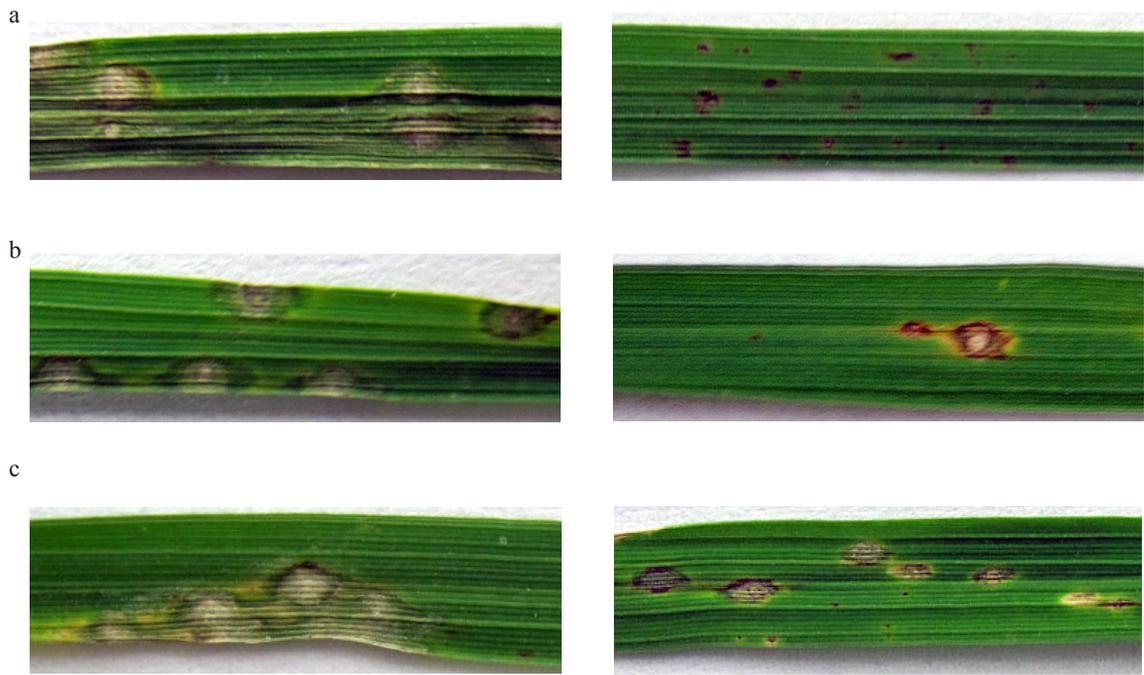


図 18 感受性品種および抵抗性品種への接種試験結果

a 北-1 株 (左: 日本晴, 右: ヤシロモチ)

b AP 系統 (左: 日本晴, 右: ヤシロモチ)

c ストレス処理を行った AP 系統 (左: 日本晴, 右: ヤシロモチ)

IV. 考察

本研究においてイネいもち病菌の体細胞相同組換えを非破壊的に検出・選抜可能なマーカー遺伝子系を確立することに成功した (図 4a)。体細胞相同組換えの検出系は動物や植物において少数の報告例はあるが、それらはすべて薬剤耐性や可視化による検出系であり、体細胞相同組換え細胞の検出と選抜の両者を同時に可能とする系ではない (Baker et al., 1996 ; Cooper et al., 1997; Kovalchuk et al., 2003; Lebel et al., 1993; Lucht et al., 2002; Puchta et al., 1995)。また、本検出・選抜系は菌類では初めての報告であるとともに、この系はイネいもち病菌だけでなく他の糸状菌においても応用可能であることから、菌類の遺伝的変異における体細胞相同組換えの重要性を実験的に検証可能になったといえる。マーカー系をゲノムに導入した TR 系統を用いることで検出された相同組換えは、細胞分裂による増殖中に体細胞の一部で相同組換えが生じたことを示す YFP 蛍光が現れて、体細胞相同組換えが生じた細胞からは同じ遺伝型を持つ細胞が連続して作り出される (図 5)。本系では相同組換えが起きた細胞をブラストサイジン S 耐性という表現型の変化によっても選抜可能であることから (図 5)、体細胞相同組換えが生じた細胞のみを得ることができ、遺伝子レベルでの解析が容易になるという利便性を有する。植物では GUS 遺伝子を利用して葉組織の一部の細胞に生じる体細胞相同組換えの検出に成功しているが (Lucht et al., 2002)、葉組織において生じた相同組換え細胞の分裂はやがて停止するため相同組換え細胞のみを収集することは困難である。

TR 系統を用いることで、イネいもち病菌の体細胞相同組換えによる表現型の変化は、分生子形成までの約 10 日間という短期間の内に全細胞の 5 ~ 8%にも達することが示された (図 6)。病害防除の観点から、無性的に繁殖するイネいもち病菌のポピュレーションの中で、常に数%の遺伝的多様性が創出されていることは脅威であり、イネいもち病菌は有性生殖を介さずとも個々の体細胞において高い変異特性を有していることを示している。イネいもち病菌の体細胞が 24 時間で 1 回分裂し、培養初期の細胞集団に組換え細胞が含まれていないと仮定すると、イネいもち病菌の細胞分裂 1 回あたりの相同組換え頻度は $5.12 \times 10^{-3} \sim 8.3 \times 10^{-3}$ 程度であると推測できる。一方、植物の体細胞相同組換え頻度は、SU 遺伝子座の crossing over により生じる葉色スポットの出現頻度から算出され、 $5.74 \times 10^{-5} \sim 7.70 \times 10^{-6}$ 程度であることが報告されており (Evans and Paddock, 1976)、ほ乳類のマーカー遺伝子系を用いた体細胞相同組換え頻度は $5.24 \times 10^{-7} \sim 6.31 \times 10^{-7}$ 程度であることが実験的に示されている (Smith et al., 2007)。したがって、体細胞相同組換えが遺伝子のコピー数や染色体座位に影響されることを考慮しても、イネいもち病菌の体細胞相同組換え頻度は高等動植物と比較して極めて高いことが

伺える。

イネいもち病菌の体細胞相同組換えは生育を阻害するような様々なストレス処理によって顕著に誘導された (図 9~16)。一次代謝阻害剤として用いたブラストサイジン S は 80S リボソームの 60S サブユニットに作用し、ペプチド転移反応を阻害することでタンパク質合成阻害を引き起こす抗生物質である (Huang et al., 1964)。また、赤カビ病菌 *Fusarium graminearum* が産生する T-2 トキシンもブラストサイジン S と同様に 60S サブユニットに作用し、タンパク質の合成阻害を引き起こすことが知られている (Cundliffe and Davies 1977)。ビアラフォスはグルタミン合成酵素の基質であるグルタミン酸塩の構造類似体であり、グルタミン合成酵素阻害による抗菌活性を有する (Tachibana et al., 1986)。このようなゲノムに直接損傷を与えないタンパク質合成阻害またはアミノ酸合成阻害によって、イネいもち病菌の体細胞相同組換えが強く誘導されたことは、体細胞相同組換えが DNA 二本鎖切断修復機構として働くだけでなく、細胞の生存が危機的状況下に置かれた際に自発的にゲノムを再編させるような一種のストレス応答機構として働くことを示唆している (図 9~11)。イネいもち病菌のゲノム応答の一例としては、熱ストレスや酸化ストレスに対するレトロトランスポゾンの活性化が知られている (Ikeda et al., 2001)。しかしながら、レトロトランスポゾンの活性化は抗菌性物質であるパラクマル酸やイソプロチオン処理においては認められていないことから (Ikeda et al., 2001)、ゲノム応答における体細胞相同組換えとトランスポゾン活性化のシグナル伝達経路は異なるものであると推測される。植物では、病原菌の感染やサリチル酸処理によって体細胞相同組換えが誘導されることが示されており、全身獲得抵抗性と相同組換えとを制御する同一の転写因子 SNI1 が同定されている (Lucht et al., 2002; Durrant et al., 2007)。ゲノムに損傷を与えない一次代謝阻害によって誘導されたイネいもち病菌のゲノム応答性は、植物が有する生物ストレスに対するゲノム応答と類似していることから、ストレス応答に関与するイネいもち病菌独自のシグナリング経路や制御因子が存在するのかもしれない。体細胞相同組換えを簡易的に検出することが可能な本系を用いることにより、相同組換えの制御やシグナリングに関連した遺伝子群を探索・解析することがより簡易になるだろう。また、動植物と比較して高い変異特性を有するイネいもち病菌の体細胞相同組換えを簡易的に検出することは、開発段階にある農薬の薬剤耐性菌出現予測試験や、マイコトキシン混入リスクの低減化に向けた毒素産生抑制剤の一次スクリーニングなどに用いるバイオアッセイ系として応用面での利用も期待できる。

一方で、ゲノムに直接損傷を与える MMS やブレオシン処理、細胞質内に活性酸素を蓄積させる MV 処理により体細胞相同組換えが高い頻度で観察されたことは、他の生

物と同様に DNA 二本鎖切断の修復機構として体細胞相同組換えが働くこと、その過程で異なる相同配列を鋳型としたエクトピックな相同組換えが生じる頻度が高まることを強く示唆している (図 12~14)。生体内において代謝の過程で副生され、DNA に損傷を与えることが広く知られている活性酸素種は (Boveris et al., 1972), 植物病理学分野でも病原菌の感染・侵入に対する植物の重要な初期抵抗性反応の一つである (Apostol et al., 1989)。一方、植物病原菌であるイネいもち病菌においても活性酸素種を産生することの重要性が示されており、NADPH オキシダーゼの産生に関わる Nox1 および Nox2 遺伝子を破壊すると、正常な付着期形成と植物細胞への侵入ができなくなり、イネへの感染能を失うことが報告されている (Egan et al., 2007)。Ndindeng ら (2010) は相同組換えに関与する Rad51 遺伝子と EGFP 遺伝子を連結させることで、イネいもち病菌ゲノムに生じる DNA 二本鎖切断の可視化に成功し、イネ上での生活環全てのステージにおいて DNA 二本鎖切断が生じていることを明らかにした。したがって、イネいもち病菌の体細胞相同組換えが DNA 二本鎖切断の修復機構として働くのであれば、イネいもち病菌ゲノムはイネへの感染過程において本質的に DNA 二本鎖切断に曝されていると考えられ、その修復過程におけるエクトピックな相同組換えがイネいもち病菌の持つゲノム多様性の要因であることが示唆される。

上記の知見を総合するとイネいもち病菌の相同組換えは体細胞増殖の全ての過程においてある頻度で生じており、感染過程やストレス環境によってその頻度が上昇することが推察される。稲作においてこれまで行われてきた農薬による防除や抵抗性品種の利用は、イネいもち病菌に過度の選択圧を与え、体細胞相同組換えを含むイネいもち病菌のゲノム応答を促進させてきたのかもしれない。本研究では、体細胞相同組換えがマーカー遺伝子だけでなく、内生の非病原性遺伝子近傍においても同様に生じていることを、非病原性遺伝子である *Avr-Pita* の機能欠失型ホモログ *RS-Avr-Pita* の導入により実証した (図 17, 18)。機能欠失型ホモログを導入した AP 系統においては、抵抗性品種であるヤシロモチに対して新たな病原性を示したが、その病斑のサイズは感受性品種と比較して小さく、病斑から分離された分生子には相同組換えが起こっていない分生子も含まれていた。このことから、非病原性遺伝子とホモログとの間で相同組換えが生じた分生子は接種源内では少数であり、非病原性遺伝子の機能欠失が起こっていないイネいもち病菌をイネが認識することで、病斑内で抵抗性反応が一部誘導されたことにより病斑の大きさに影響した可能性がある。しかしながら、相同組換えによって非病原性遺伝子に変異したイネいもち病菌は感染病斑内で増殖し、進展型病斑を形成したことになる。これまでの研究から、イネいもち病菌の多くの非病原性遺伝子には複数のホモログおよびパラログが存在することが報告されており (Chuma et al., 2011a; Khang et al.,

2008; Takahashi et al., 2010; Yoshida 2009), 自然界においても同様の現象が抵抗性崩壊の引き金と成り得ることを示唆している。本研究において、マーカー遺伝子がマルチコピーとして導入された系統では、シングルコピーとして導入された系統よりも高い相同組換え活性を示したことも (図 7) 本仮説を支持するものであり、複数のホモログの存在は遺伝的多様性に寄与しているであろう。しかしながら、非病原性遺伝子のホモログを全ての菌株が保有しているわけではなく、トリパノソーマのような変異機構の規則性はイネいもち病菌のゲノムからは見出されていないことから、非病原性遺伝子とそのホモログ間における相同組換えがイネいもち病菌のゲノム進化機構の全てであるとは断言できない。また、*Avr-Pita* 遺伝子の機能欠失が生じた組換え配列には、EcoRI 認識配列を含むものと含まないものの 2 種類が確認された (図 17)。同様の組換え配列の多様性は *YFP::BSD* マーカー遺伝子を用いた実験系においても確認されており (図 4)、これらの多様性は DNA 二本鎖切断が生じた位置や相同組換え修復様式 (ジーンコンバージョンや交叉) の違いによって創出されたことが考えられる。しかしながら、本マーカー系では DNA 二本鎖切断が生じた位置やその後の修復様式については明らかにはできないことから、イネいもち病菌ゲノムに生じる DNA 二本鎖切断部位やその修復様式をより詳細に解析する必要がある。

第二章 イネいもち病菌の DNA 二本鎖切断修復

I. 緒言

体細胞における DNA 二本鎖切断の修復機構には相同組換えと非相同末端結合 (non homologous end-joining: NHEJ) が存在し、これら 2 つの経路に大別される (Alylon et al., 2004)。相同組換えによる修復は以下のステップにより生じる (図 19)。①DNA 二本鎖切断末端がエキソヌクレアーゼ活性によって 5'から 3' 方向へ分解され、反応性に富む 3' ssDNA tail が形成される。②この tail が相同鎖を探索し、相同 DNA 二本鎖に侵入するとアニール反応が開始されて D-loop 構造が形成される。③損傷のない DNA 配列を鋳型とした DNA 合成反応が進み、片方の 3' ssDNA tail と相同な領域まで合成が進行すると、④拡大した D-loop 部分が片方の 3' ssDNA tail と結合し、今度は D-loop 領域を鋳型にして合成が進む。⑤合成が完了し、元の配列と結合すると 2 つの Holiday junction (HJ) をもった 4 量体 DNA の中間体が生じ、HJ が HJ resolvase によってランダムに切断・結合されることで非交叉型のジーンコンバージョンと交叉型のクロスオーバー産物が 1:1 の割合で生じることになる。しかしながら、実際には体細胞におけるクロスオーバーの割合が圧倒的に少ないことから、synthesis-dependent strand-annealing (SDSA) による修復経路が提唱されている (図 19)。SDSA では③の合成がある程度進行した後に 3' ssDNA tail が解離して⑥となり、切断を受けた DNA 鎖の 3' ssDNA tail とアニーリング、DNA 合成が行われた後に連結されて、非交叉型のジーンコンバージョン産物が生じる (Chen et al., 2009)。

相同組換え修復が 20 種類以上のタンパク質分子が関わる複雑な生化学反応であるのに対して、NHEJ 修復では空間的に最も近接する DNA 末端同士を Ku タンパク質などにより結合させることで修復する (図 20)。基本的には、①切断によって生じた DNA 末端の対合、②DNA 末端の処理、③末端結合によって修復され、DNA の損傷が生じた切断断片によっては欠失や挿入等の修復エラーが確認されることもある (Daley et al., 2005)。姉妹染色分体等の相同配列を必要とする相同組換え修復においては、DNA の複製中 (S 期) または複製終了後 (G2 期) に主に修復が行われるのに対して、NHEJ 修復では細胞周期の全ての段階で DNA 二本鎖切断を修復することが可能である (Takashima et al., 2009)。

DNA 二本鎖切断の修復経路はお互いに拮抗的に働いており、相同組換え修復を介した遺伝子ターゲティングや NHEJ 修復を介したランダムな遺伝子導入の効率から、酵母においては相同組換えが (Takita et al., 1997)、高等真核生物である動植物におい

ては NHEJ が優先して働くことが示唆されており (Tachibana, 2004), 生物種によってその主要な修復機構が異なることが考えられる。イネいもち病菌を含む糸状菌では相同組換え修復を利用した遺伝子ターゲティング効率が約 5%と低いことから, 動植物と同様に NHEJ が主要経路であることが推測されている。

Ninomiya らは 2 つの修復機構が互いに拮抗的に働くことに着目し, モデル糸状菌であるアカパンカビ (*Neurospora crassa*) の NHEJ 関連遺伝子 *Ku70* および *Ku80* 遺伝子を破壊することで, 相同組換えを介した遺伝子ターゲティング効率が約 70 - 100% までに上昇することを示した。同様の手法は複数の糸状菌において応用されており (Ferreira et al., 2006, Goins et al., 2006, Krappmann et al., 2006, Nayak et al., 2006, Poggeler and Kuck, 2006, Takahashi et al., 2006), イネいもち病菌においても NHEJ 関連遺伝子の破壊によって遺伝子ターゲティング効率を約 70 - 100% まで上昇させることに成功している (Kito et al., 2008; Villalba et al., 2008)。興味深いことに, NHEJ 関連遺伝子の破壊株においては菌糸の生育, 分生子の形成・発芽や病原性は野生株と比較して大きな差異は無いことが報告されている。一方, イネいもち病菌の相同組換え修復関連遺伝子 *Rhm51*, *Rhm54* (RAD homolog in *Mganaporthe*) を破壊した場合には, 菌糸の著しい生育遅延や病原性の低下が報告されていることから (Sone et al., 2009), イネいもち病菌を含む糸状菌では一概に NHEJ による DNA 二本鎖切断修復が主要経路であると断定できるものではなく, 相同組換え修復は生活環の中で重要な役割を担っていることが考えられる。

本章では上述した背景を鑑みて, 18 塩基認識の制限酵素 I-SceI (Colleaux et al., 1998) を用いた配列特異的な DNA 二本鎖切断の人為的導入法の確立とイネいもち病菌の DNA 二本鎖切断修復様式の解析を行った。

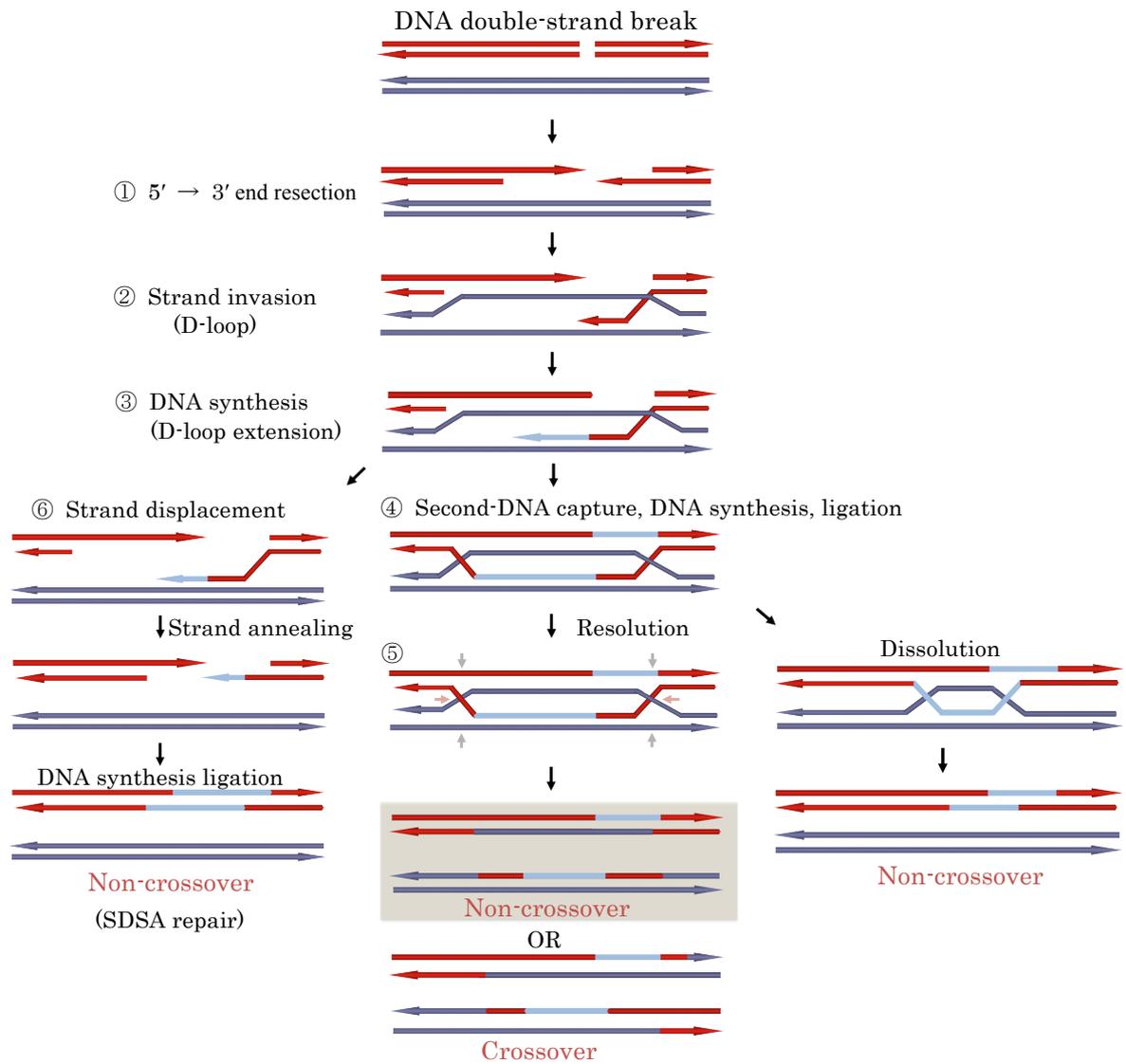


図 19 相同組換え修復様式

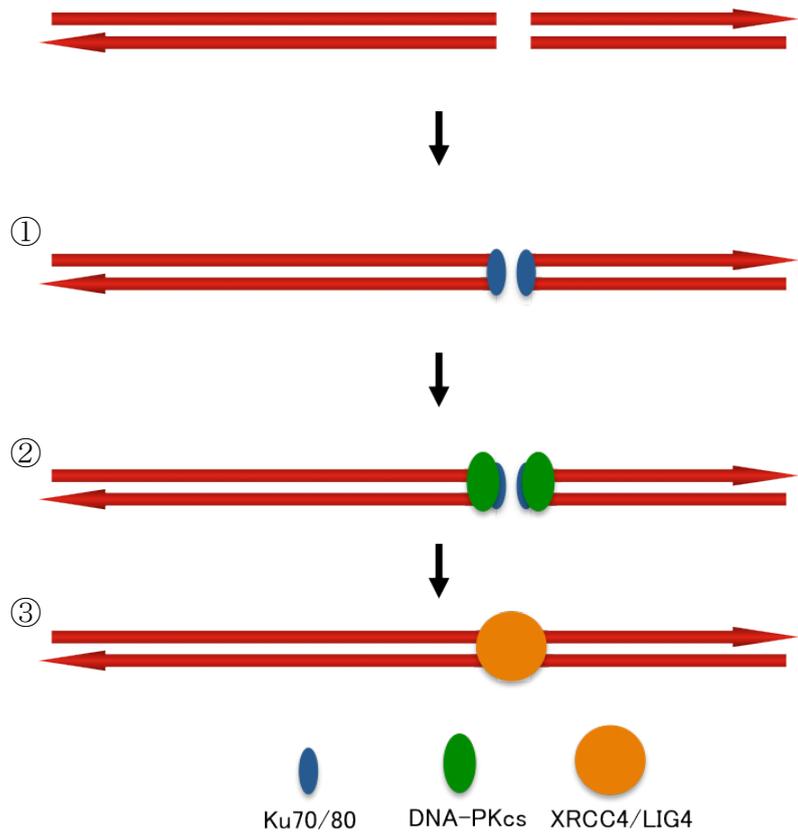


图 20 NHEJ 修復樣式

II. 実験材料および方法

1. 供試イネいもち病菌

イネいもち病菌は北-1 株を使用した。使用した培地，実験操作等は第一章と同様の方法で行った。

2. DNA 二本鎖切断検出・選抜マーカー遺伝子の構築

DNA 二本鎖切断の標的となる *ISTG-YFP::BSD* は第一章で構築した *pTG-YFP::BSD* および *pRS-YFP::BSD* をもとに構築した。*ISTG-YFP::BSD* のバックボーンベクターを構築するために，*pMK412-dGFP* を鋳型に *TTrpC-1* および *PTrpC-2* のプライマーセット（表 6）を用いてハイグロマイシン B 耐性遺伝子 cassette を増幅した。増幅産物を *pGEM-PTEF-Tgla* の *ApaI* サイトに挿入して *pGEM-hph* とした。DNA 二本鎖切断の標的配列を含む *ISTG-YFP::BSD* を構築するために，*I-SceI* の認識配列を *YFP::BSD* に挿入した。*pTG-YFP::BSD* を鋳型に *EGFP-1* および *YFISCE-4* のプライマーセット（表 6），*pRS-YFP::BSD* を鋳型に *YFISCE-3* および *EGFP-4* のプライマーセット（表 6）を用いてそれぞれ増幅し，Fusion PCR により連結した。得られた増幅産物を *pGEM-hph* の *AscI* および *PacI* サイトに挿入し，*pISTG-YFP::BSD* とした。

3. I-SceI 発現ベクターの構築

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のミトコンドリア DNA にコードされる *I-SceI* 遺伝子配列（GenBank Accession no. V00683.1）をもとに，イネいもち病菌での *I-SceI* 遺伝子の高発現を達成するためにコドン使用頻度を最適化した合成遺伝子を構築した（Operon Technologies に委託）。*I-SceI* 配列を構成的発現ベクターである *pGEM-PTEF-Tgla* の *AscI* および *PacI* サイトに挿入し，*pGEM-I-SceI* とした。さらに，Simian virus 40 large T antigen の核局在シグナル配列（Khang et al., 2010）を *I-SceI* の C 末端側に付加するために，*pGEM-I-SceI* の *PacI* サイトに合成リンカー（5'-TAAAGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAAAAAGAA GAGAAAGGTAGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTATAAGCTAGCTTAAT-3' および 5'-TAAGCTAGCTTATACCTTTCTCTTCTTTTTTGGATCTACCTTTCTCTTCTTTTTTGGATCTACCTTTCTCTTCTTTTTTGGATCTTTAAT-3'）を挿入し，*pGEM-I-SceI::SvNLS* とした。ビアラフォス耐性遺伝子 (*bar*) 発現ベクターバックボーンを構築するために，*pMK412-dGFP* を鋳型に *PTrpC-1* および *PTrpC-2* のプ

ライマーセット, TTrpC-1 および TTrpC-2 のプライマーセット (表 6) を用いてそれぞれ増幅し, Fusion PCR により連結した。増幅産物は pMK412-dGFP の ApaI サイトに挿入し, pMK412-PTrpC-TTrpC とした。*bar* cassette を構築するために, pDM302 (Ochiai-Fukuda et al., 2006) を鋳型に Bar-7 および Bar-8 プライマーセット (表 6) を用いて *bar* 遺伝子を増幅した。増幅産物を pMK412-PTrpC-TTrpC の AscI および PacI サイトに挿入して pMK-*bar* とした。pMK-*bar* から *bar* 遺伝子 cassette を切り出し, pGEM-I-SceI::SvNLS および pGEM-T-Easy vector の ApaI サイトにそれぞれ挿入し, pGEM-*bar*-I-SceI::SvNLS および pGEM-*bar* とした。

4. *Agrobacterium tumefaciens* mediated-transformation (ATMT) ベクターの構築

ATMT 用のバイナリーベクターバックボーンを構築するために, pCAMBIA1381 (CAMBIA) の XhoI-BsrGI サイトに合成リンカー (5'-TCGAGTCTAGAGAGCTCT-3'および 5'-GTACAGAGCTCTCTAGAC-3') を挿入し, XbaI および SacI サイトを付加して pCAMBIA-Lin とした。ATMT バイナリーベクターを構築するために, *hph* cassette を含む ISTG-*YFP::BSD* を pCAMBIA-Lin の XbaI および SacI サイトに挿入し, pFAG-ISTG-*YFP::BSD* とした。

5. RS-*YFP::BSD* への silent mutation の導入と相同領域の短縮化

(1) silent mutation の導入

RS-*YFP::BSD* の *YFP::BSD* 領域に約 15 bp 間隔で silent mutation を導入した *YFP::BSD* を合成し (Operon Technologies に委託), pRS-*YFP::BSD* の *YFP::BSD* 領域と置換して psRS-*YFP::BSD* とした。

(2) 相同領域の短縮化

ISTG-*YFP::BSD* と RS-*YFP::BSD* 間の相同領域を短縮するために, RS-*YFP::BSD* の *YFP::BSD* 領域 (1,074 bp) を 150, 600, 700, 800, 900 bp に短縮したベクターを構築した。pRS-*YFP::BSD* を鋳型として, RS75-1 および RS75-2 のプライマーセット, RS300-1 および RS300-2 のプライマーセット, RS-300-1 および Short RS-seq-4 のプライマーセット, RS-300-1 および Short RS-seq-6 のプライマーセット, RS-300-1 および Short RS-seq-8 のプライマーセット (表 6) を用いて PCR を行い *YFP::BSD* 領域をそれぞれ増幅した。得られた増幅産物を pRS-*YFP::BSD* の *YFP::BSD* 領域と置換して pRS-150, pRS-600, pRS-700,

pRS-800, pRS-900 とした。

6. マーカー遺伝子を用いた遺伝子ターゲティング評価系ベクターの構築

標的遺伝子への DNA 二本鎖切断導入による遺伝子ターゲティング効率を算出するために、pGEM-*YFP::BSD* を鋳型とした標的遺伝子 (*YFP::SCE::BSD*) と破壊ベクター (pRS-*YFP-bar-BSD*) を構築した。*YFP::SCE::BSD* のバックボーンベクターを構築するために、pGEM-*YFP::BSD* を鋳型として M-15 および 2A-2 のプライマーセット, M16 および 2A-3 のプライマーセット (表 6) を用いてそれぞれ増幅し、Fusion PCR により連結した。得られた増幅産物は pGEM-*YFP::BSD* の *YFP::BSD* 領域と置換し、pGEM-*YFP::DS::BSD* とした。続いて、pGEM-*YFP::DS::BSD* の SpeI-NheI サイトに合成リンカー (5'-CTAGCGGTAGG GATAACAGGGTAATGTTATTCACTGCGGCTTTAAAGCCGCAGTGCACCCGG A-3' および 5'-CTAGTCCGGGTGCACTGCGGCTTTAAAGCCGCAGTGAATAAC ATTACCCTGTTATCCCTACCG-3') を挿入し、pGEM-*YFP::SCE::BSD* とした。

pRS-*YFP-bar-BSD* のバックボーンベクターを構築するために、pGEM-*YFP::BSD* を鋳型として TV-1 および TV-2 のプライマーセット, TV-3 および TV-4 のプライマーセット (表 6) を用いてそれぞれ増幅し、Fusion PCR により連結した。得られた増幅産物は pUC19 (Takara) の BamHI および Hind III サイトに挿入し、pUC19-*YFP::BSD* とした。pUC19-*YFP::BSD* の ApaI サイトに pGEM-*bar* から切り出した *bar cassette* を挿入し、pRS-*YFP-bar-BSD* とした。

RS-*YFP-bar-BSD* の相同領域を短縮するために、pUC19-*YFP::BSD* を鋳型として YFP-targeting-1 および TV-2 のプライマーセット, TV-3 および YFP-targeting-2 のプライマーセット (表 6) を用いて増幅し、Fusion PCR によって連結した (pUC19-*YFP-BSD*-300 用)。同様に YFP-targeting-3 および TV-2 のプライマーセット, TV-3 および YFP-targeting-4 のプライマーセット (表 6) を用いて増幅し、Fusion PCR によって連結した (pUC19-*YFP-BSD*-100 用)。得られた増幅産物はそれぞれ pUC19-*YFP::BSD* の *YFP::BSD* 領域と置換し、pUC19-*YFP::BSD*-300 および pUC19-*YFP::BSD*-100 とした。pUC19-*YFP::BSD*-300 および pUC19-*YFP::BSD*-100 の ApaI サイトにそれぞれ *bar cassette* を挿入し、pRS-*YFP-bar-BSD*-300 および pRS-*YFP-bar-BSD*-100 とした。

表 6 使用したプライマーリスト

Primer name	Oligo sequence	Length (nt)
TTrpC-1	TTGGGCCCGATCCTCTAGAAAAGAAGGATTACCTCTAAA	38
PTrpC-2	GAGGGCCCTCGACAGAAGATGATATTGAAGGAGCATT	38
EGFP-1	TCGGCGCGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT	35
YFISCE-4	CGCGATTACCTGTTATCCCTAGGTCTTGTTAGTTGCCGTCGTCCTTGAA	49
YFISCE-3	GACCTAGGGATAACAGGGTAATCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGAC	49
EGFP-4	GTTTAATTAATTAGCCCTCCCACACATAACCAGAG	35
PTrpC-1	GGTTAATTAAGTAGTGGCGCGCCGCTTGGGTAGAATAGGTAAGTCAGA	49
TTrpC-2	GCGGCGCGCCACTAGTTTAATTAACCACTTAACGTTACTGAAATCATCA	49
Bar-7	TCGGCGCGCCATGAGCCCAGAACGACGCCCCGCGG	35
Bar-8	GTTTAATTAATCAGATTTTCGGTGACGGGCAGGACC	35
RS75-1	ATCTCTAGATTCAAGTCCGCCATGCCCGA	29
RS75-2	GGCGCTAGCGTCTCCTTGAAGTCGATGC	29
RS300-1	ATCTCTAGAGGCGCGCCCTG	20
RS300-2	CATGCTAGCGCTCAGGGCGGACTGGTAGC	29
Short RS-seq-4	CAAGCTAGCCGTGGAGCCCCCTTGTAGAGC	29
Short RS-seq-6	CAAGCTAGCCTGGCGACGCTGTAGTCTTC	29
Short RS-seq-8	CAAGCTAGCAGCAGCAGTCCCCAGCACCA	29
M15	TTCCATACACAACCGTCGGCGC	22
2A-2	AGGTCGAAGTTGAGGAGCTGGCTAGCCTTGTAGAGCTCGTCCATGCCGA	49
M16	GCGAAATGGATTGATTGTTT	20
2A-3	CAGCTCCTCAACTTCGACCTACTAGTATTCCCTTGTCTCAAGAAGAATC	49
TV-1	TTGGGATCCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCC	34
TV-2	TGAGACAAAGGAATGGGCCCCCTTGTAGAGCTCGTCCATGCCGAG	44
TV-3	ACGAGCTCTACAAGGGGCCCATTCCTTTGTCTCAAGAAGAATCC	44
TV-4	CTTAAGCTTCTGTCTGGTCTTCTACACGAAGGAA	34
YFP-targeting-1	CGGGGATCCGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAAC	34
YFP-targeting-2	CGGGGATCCGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAAC	34
YFP-targeting-3	GCCAAGCTTAGGATGCAGATCGAGAAGCACCTGT	34
YFP-targeting-4	AAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGAG	34
Hpt-5	TTCGGGGATTCCCAATACGAGGTGCGCCAAC	30
M22	ACCATGCCTTTCACGGTGTCTGTATTTC	28
YFP-seq-1	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT	25
YFP-seq-2	CTCCCACACATAACCAGAGGGCAGC	25
Is-1	ATGAAGAACATCAAGAAGAACCAGG	25
Is-4	CGAGTCGATGTAGATGATGGGCTTG	25

7. ATMT 法

ATMT 法に使用した培地は表 7 に示した。

(1) *A. tumefaciens* コンピテントセルの作製

A. tumefaciens AGL-1 菌株をカナマイシン (Km) 50 µg/mL を含む YEB 培地 10 mL にて 28°C, 120 rpm で 24 時間培養した。その後、培養液 1 mL を Km 50 µg/mL を含む YEB 培地 50 mL に加え、28°C, 120 rpm で O.D.₆₀₀ = 0.5 ~ 1.0 に達するまで培養した。培養後、4°C, 5,000 rpm で 5 分間遠心分離して集菌した。上清を除去した後に、氷冷した 1 mL の 20 mM CaCl₂ に懸濁した。懸濁液を 1.5 mL チューブに 100 µL ずつ分注して -80°C のディープフリーザーで保存した。

(2) 凍結融解法による *A. tumefaciens* への形質転換

プラスミド DNA 溶液 1 µg をコンピテントセルに加え、タッピングにより混和した後、液体窒素中に投入して急速凍結した。その後、37°C のヒートブロックに移して 5 分間インキュベートした。急速凍結と 37°C でのインキュベートを 3 回繰り返した。その後、YEB 培地 1 mL を加えた後に、28°C, 120 rpm で 2 ~ 4 時間培養した。培養液を 4°C, 5,000 rpm で 5 分間遠心分離して集菌し、Km 50 µg/mL およびアンピシリン (Amp) 100 µg/mL を含む YEB 培地上に塗布して選抜した。

(3) イネいもち病菌への形質転換

形質転換は Rho ら (2001) の方法にしたがい、一部を改変して行った。

凍結融解法によりプラスミド DNA を導入した *A. tumefaciens* の系統を Km 50 µg/mL および Amp 100 µg/mL を含む YEB 培地 10 mL に植菌し、28°C, 120 rpm で 24 時間振盪培養した。培養後、20°C, 6,000 rpm で 10 分間遠心分離して集菌した。アセトシリゴン 200 µM を含む IM 液体培地 5 mL に懸濁後、28°C, 180 rpm で 6 時間培養した。培養液 100 µL を 1 × 10⁶ 個/mL に調整したイネいもち病菌の分生子懸濁液 100 µL と混合し、200 µM のアセトシリゴンを含む IM 固形培地上に置いた滅菌済のニトロセルロースフィルター (0.45-µm-pore and 45-mm diameter, Whatman) に塗布した。28°C で 48 時間培養後、ニトロセルロースフィルターから菌糸片および *A. tumefaciens* を 2 mL の YG 培地に回収し、ハイグロマイシン B (200 µg/mL), セフトキシム (200 µg/mL) を含む PSA 培地上に塗布して選抜した。

表 7 ATMT に用いた試薬

・ YEB 培地 (1 L 組成)	
Bacto-beef extract	5 g
Bacto-yeast extract	1 g
Bacto-peptone	5 g
Sucrose	5 g
Agar	15 g
蒸留水で 1 L にメスアップ	
・ Induction medium (IM) (1 L 組成)	
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$	500 mg
K_2HPO_4	2.05 g
KH_2PO_4	1.45 g
NaCl	150 mg
MES	7.81 g
Glucose	1.8 g
Glycerol	5 mL
Acetosyringon	200 μM
(Agar)	(15 g)
蒸留水で 1 L にメスアップ	

III. 結果

1. DNA 二本鎖切断の人為的導入と相同組換え修復

a. I-SceI 認識配列を導入した体細胞相同組換え検出マーカー系の構築

DNA 二本鎖切断の修復経路やその機構は生物種によって異なることが推測されている。しかしながら、イネいもち病菌を含む糸状菌では、DNA 二本鎖切断の修復機構として相同組換えが直接的に関与するといった報告はこれまでにない。そこで、第一章で構築した体細胞相同組換え検出系を改良し、18 塩基認識の希少切断制限酵素遺伝子 I-SceI を用いて、マーカー遺伝子特異的な DNA 二本鎖切断の導入を試みた。まず、*YFP::BSD* 遺伝子の開始コドンから 328 bp の位置に I-SceI の認識配列を挿入し、I-SceI を用いた人為的な DNA 二本鎖切断導入の標的配列として *ISTG-YFP::BSD* を構築した (図 21)。I-SceI の認識配列内にはインフレームに 2 つの終止コドン挿入し、*TG-YFP::BSD* と同様に翻訳が途中で停止するように設計した (図 21)。*ISTG-YFP::BSD* の相同配列は第一章で構築した *RS-YFP::BSD* を用いた (図 21)。*ISTG-YFP::BSD* 遺伝子を単独でイネいもち病菌ゲノムに導入した際には YFP 蛍光およびブラストサイジン S への耐性は確認されなかった。

pISTG-YFP::BSD (ISTG) および *pRS-YFP::BSD* (RS) を PEG 法により共導入して、ハイグロマイシン B (200 µg/mL) によって選抜した。さらに RS 特異的増幅プライマーセット EULS-25 および EXFP-20 (表 6) を用いて PCR を行い、RS の増幅断片が確認された菌株を ISTR (ISTG および RS 導入株) 系統とした。第一章の結果から、イネいもち病菌の体細胞相同組換えは培養過程において生じることが確認されたことから、I-SceI による人為的な DNA 二本鎖切断導入の有無に関わらず、ISTG と RS との間で生じた体細胞相同組換えは YFP 蛍光およびブラストサイジン S 耐性能により検出・選抜が可能であることが推測される。そこで、得られた ISTR6, 11, 25, 30 の各系統の菌糸、プロトプラスト、分生子を蛍光顕微鏡により観察したところ、全ての系統で培養過程における YFP 蛍光の出現を確認することができた (図 22a-c)。次に、PSA 培地上で 7 日間培養した菌糸片をブラストサイジン S (200 µg/mL) を含む PSA 培地上に植菌し、組換えが生じた YFP 蛍光細胞が特異的に選抜可能かどうかを調査した。全ての系統において、ブラストサイジン S を含む培地上での生育と YFP 蛍光が確認されたことから (図 22d)、I-SceI 認識配列を挿入した ISTG と RS が体細胞相同組換え検出・選抜マーカー系として機能することが示された。

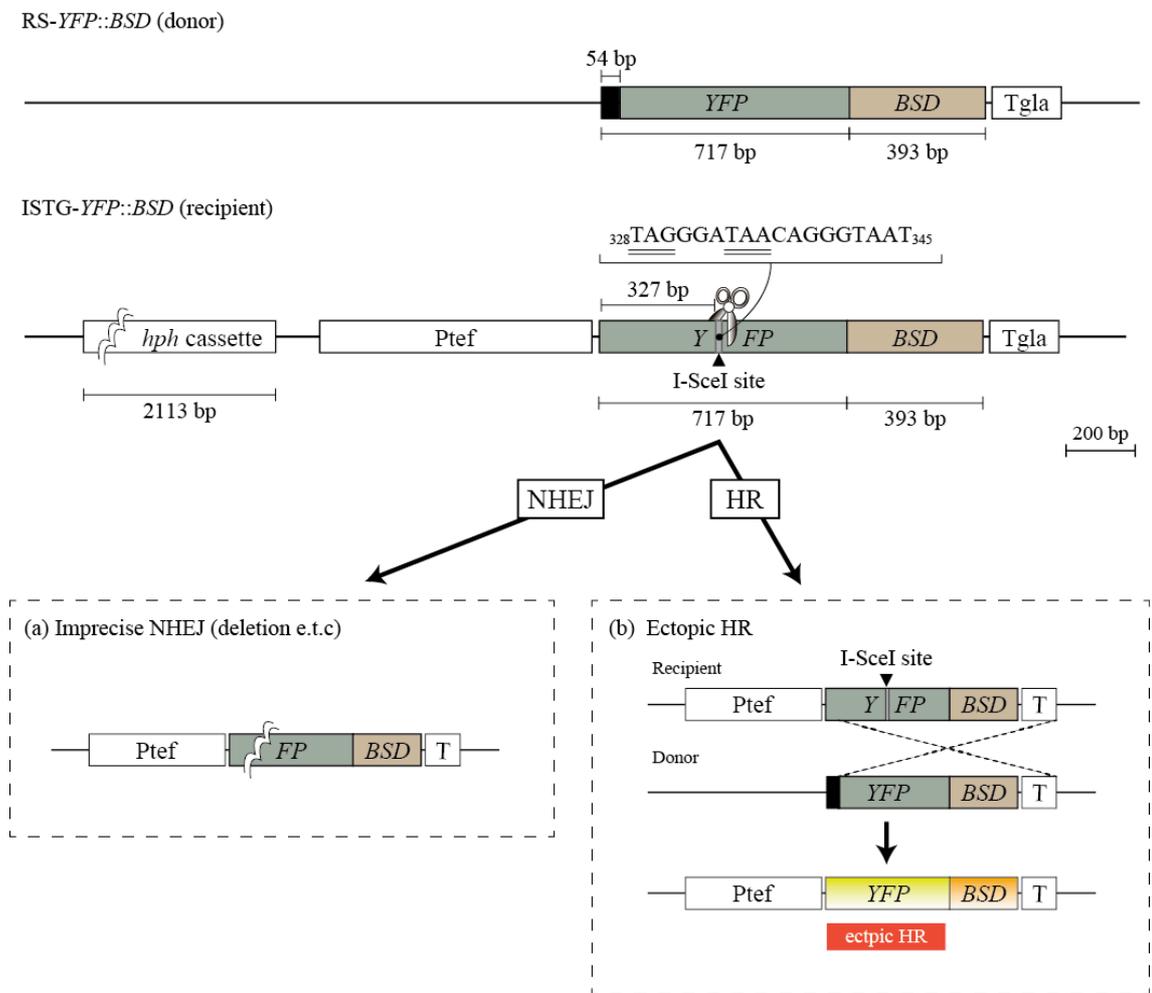


図 21 I-SceI による DNA 二本鎖切断導入マーカー系
= は終止コドンを示す

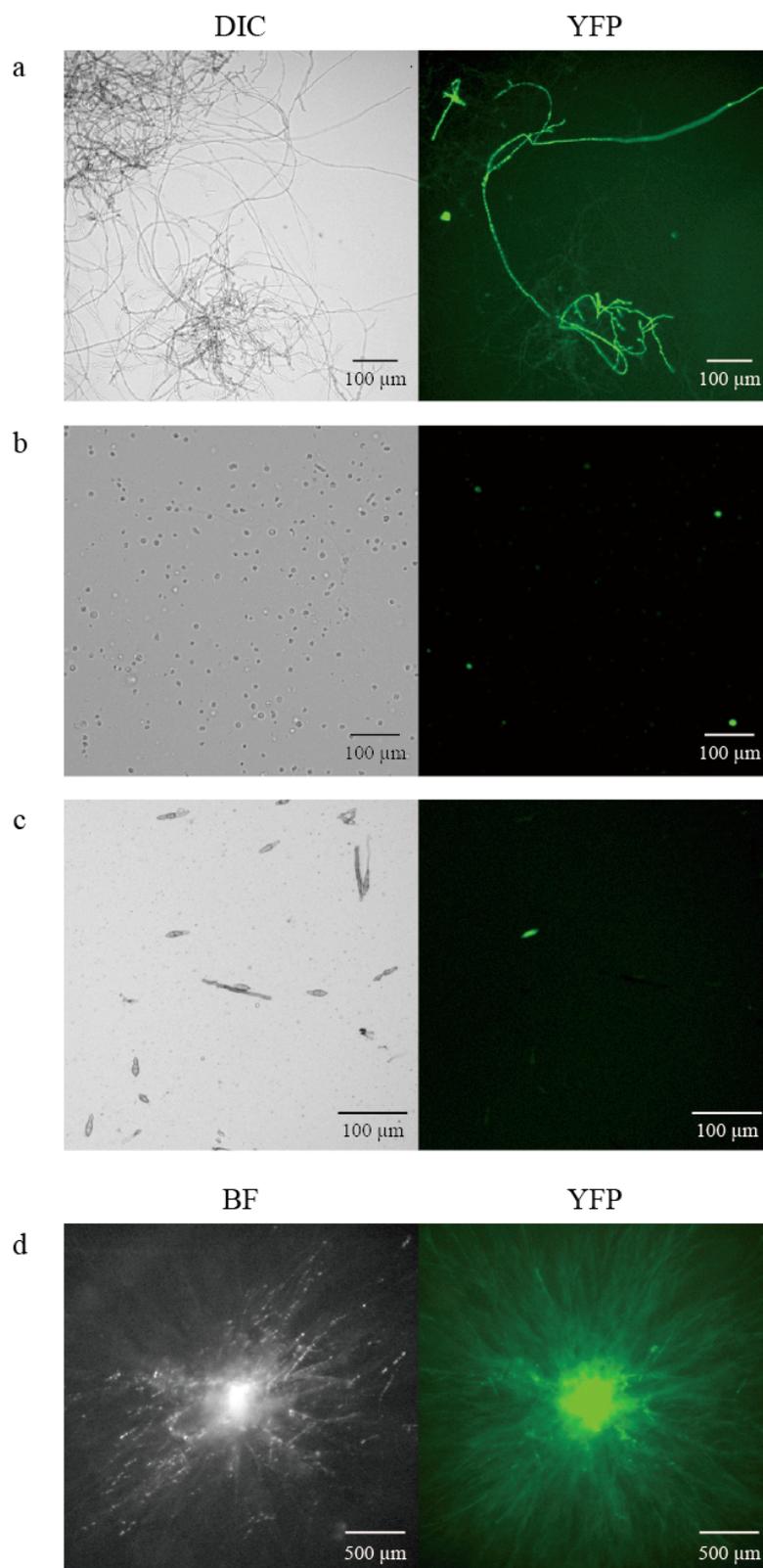


図 22 ISTR 系統において観察された表現型の変化

a 液体培養中の菌糸, b プロトプラスト, c 分生子, d BS 含有プレート上で生育した菌糸
 BF: bright-field, YFP: epifluorescence microscopy

b. I-SceI 発現によるイネいもち病菌の表現型への影響

ISTG-*YFP::BSD* 配列特異的に二本鎖切断を導入するために、I-SceI 遺伝子発現ベクター-pGEM-*bar*-I-SceI::SvNLS (I-SceI+*bar* cassette) を構築した (図 23a)。I-SceI による off target 活性を調査するために、I-SceI+*bar* cassette を野生株ゲノム (北-1 株) に導入し、形質転換体の表現型を調査した。得られた形質転換体は野生株と比較して菌糸生育、分生子形成、分生子発芽および病原性に差異は認められなかった。また、イネいもち病菌 (70-15 株) ゲノムデータベース (<http://www.broad.mit.edu>) を用いた BLAST 検索では I-SceI 認識配列 (5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3') に該当する配列は認められず、北-1 株ゲノム中にも I-SceI 認識配列が存在しないと考えられた。

c. DNA 二本鎖切断導入により誘導されるイネいもち病菌の体細胞相同組換え

ISTR 系統および I-SceI を用いて DNA 二本鎖切断活性と相同組換え修復頻度について調査した。I-SceI+*bar* cassette を PEG 法により各 ISTR 系統のプロトプラストに導入した。I-SceI がイネいもち病菌ゲノムに導入された場合にはビアラフォスへの耐性を示し、I-SceI の発現によって認識配列特異的な DNA 二本鎖切断の導入と、それに伴う RS を鋳型とした相同組換え修復が生じた場合には、ビアラフォス耐性に加えて YFP 蛍光とブラストサイジン S への耐性を示すことになる (図 21)。そこで、I-SceI+*bar* cassette を導入してから 24 時間後のプロトプラスト懸濁液をビアラフォス (20 µg/mL) を含む PSA 培地、ビアラフォスおよびブラストサイジン S (200 µg/mL) を含む PSA 培地上でそれぞれ選抜し、I-SceI+*bar* cassette がゲノムに導入された菌株数 (ビアラフォス耐性株) と I-SceI+*bar* cassette がゲノムに導入されて相同組換えが生じた菌株数 (ビアラフォスおよびブラストサイジン S 二重耐性株) とを比較した。I-SceI+*bar* cassette の導入により得られたビアラフォスおよびブラストサイジン S に対する二重耐性株数はビアラフォス耐性株数と比較して減少する傾向がみられたが (図 23b)、ブラストサイジン S 耐性を示した全ての菌株において YFP 蛍光が確認された (図 23c)。また、I-SceI+*bar* cassette の導入により出現した二重耐性株数はコントロールとして用いた *bar* cassette の導入と比較して有意に上昇し、各系統とも全体の約 40% を占める割合であった (表 8)。また、その倍率はコントロールの約 20 倍に相当する (表 8)。これは I-SceI の発現により *YFP::BSD* 配列内に DNA 二本鎖切断が導入されたこと、さらに切断が生じた *YFP::BSD* 配列が RS を鋳型としたエクトピックな相同組換えによって修復されたことを示している。一方で、コントロールとして用いた *bar* cassette 導入時においてもビアラフォスおよびブラストサイジン S に対する二重耐性株が確認されたが (表 8)、これらの二重耐性株は図 22b に示したようなプロトプラス

ト作製までの培養過程においてゲノム内にランダムに生じた DNA 二本鎖切断が *YFP::BSD* 配列内に偶発的に切断を導入し、RS を鋳型とした体細胞相同組換えにより修復された結果であると推察された。

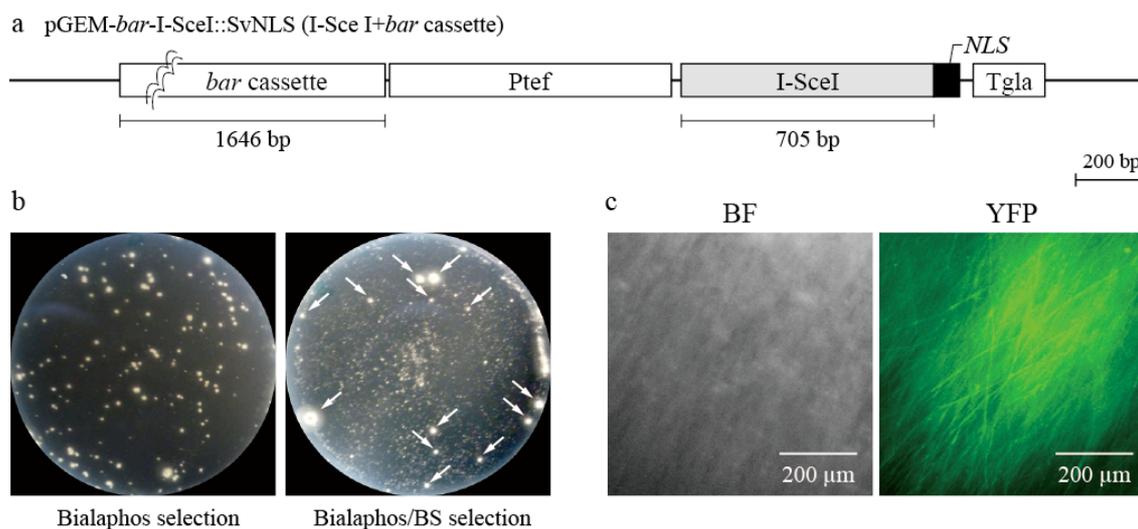


図 23 I-SceI の導入と相同組換えが生じた細胞の選抜および検出

- a I-SceI 発現ベクター, b ビアラフォスおよび BS による選抜結果
c ビアラフォスおよび BS 耐性株における YFP 蛍光
bar: ビアラフォス耐性遺伝子, *NLS*: 核局在シグナル (Sv40)

表 8 ISTR 系統への I-SceI 遺伝子導入と相同組換え修復頻度

Line	Gene	Total ^a	HR repair ^b	Frequency (%) ^c	Magnification ^d
ISTR6	I-SceI + <i>bar</i>	184	67	36.4	20.2
	<i>bar</i>	222	4	1.8	
ISTR11	I-SceI + <i>bar</i>	211	79	37.4	24.9
	<i>bar</i>	196	3	1.5	
ISTR25	I-SceI + <i>bar</i>	230	92	40.0	19.0
	<i>bar</i>	243	5	2.1	
ISTR30	I-SceI + <i>bar</i>	256	99	38.7	20.4
	<i>bar</i>	259	5	1.9	

- a ビアラフォス耐性コロニー数
b ビアラフォスおよび BS 耐性コロニー数
c $(b: \text{HR repair} / a: \text{Total}) \times 100 = \text{「Frequency」}$
d $\text{I-SceI+bar 導入 Frequency} / \text{bar 遺伝子導入 Frequency} = \text{「Magnification」}$

d. DNA 二本鎖切断によって誘導される外来相同 DNA を鋳型とした相同組換え修復
 標的遺伝子配列を破壊または変換することが可能な遺伝子ターゲティング法は生物が有する相同組換え修復機構を利用して外来 DNA を特定のゲノム領域に導入する技術である。人為的な DNA 二本鎖切断の導入により，異なる遺伝子配列間において生じるエクトピックな相同組換えが高頻度で検出されたことは，イネいもち病菌が高い変異特性を有することを示すと同時に，人為的な DNA 二本鎖切断導入が遺伝子ターゲティング法への応用に有用であることを示唆している。そこで，ISTG のみをイネいもち病菌ゲノムに導入した系統 (ISTG 系統) を用いて，外来相同 DNA と内生標的遺伝子との間で生じるエクトピックな相同組換え効率を簡易的に評価した。ATMT 法により ISTG 遺伝子を導入し，ハイグロマイシン B (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびサザンハイブリダイゼーションによって ISTG 配列がシングルコピーで導入されている菌株を選抜した (図 24)。得られた菌株を ISTG5, 11, 13, 19 系統とし，各系統のプロトプラストに対して (i) *bar* cassette (形質転換コントロール)，(ii) RS (相同配列)，(iii) I-SceI (DNA 二本鎖切断誘導)，(iv) I-SceI および RS (DNA 二本鎖切断誘導と相同配列) をそれぞれプラスミドの状態では PEG 法により導入または共導入を行った (図 25)。

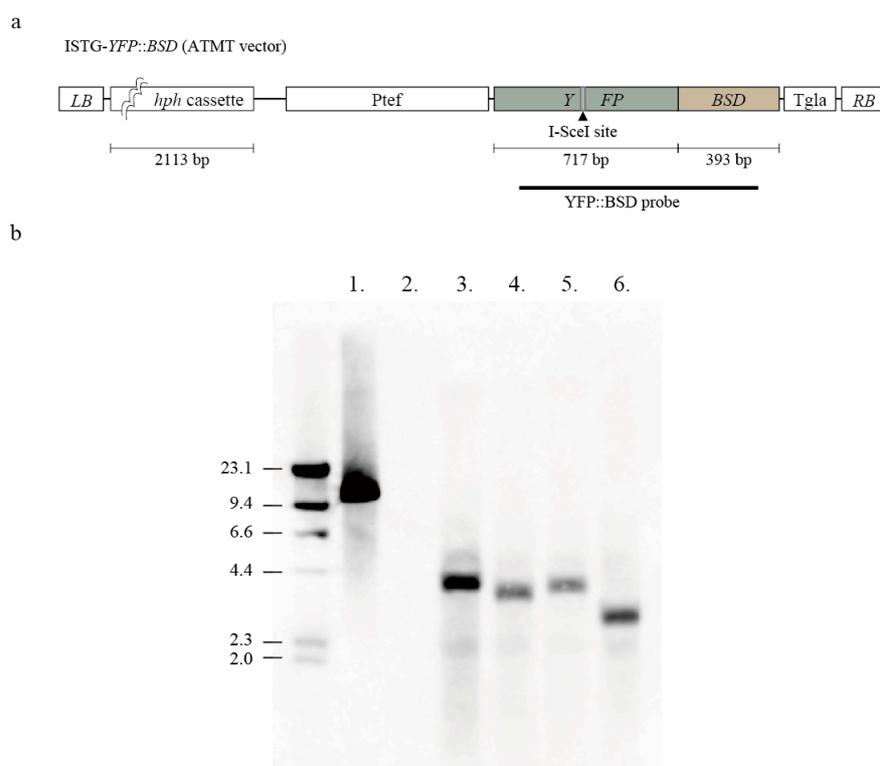
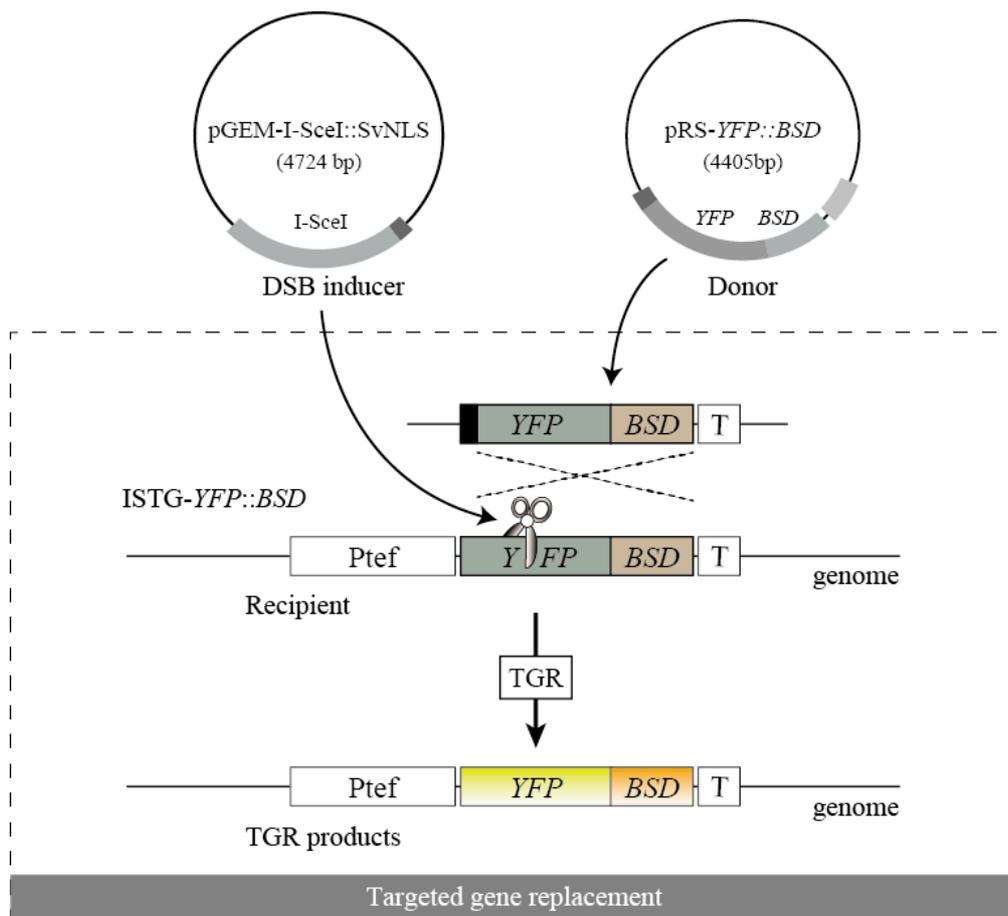
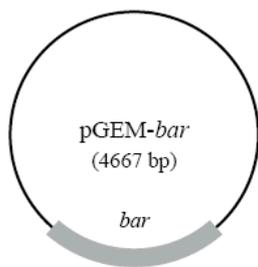


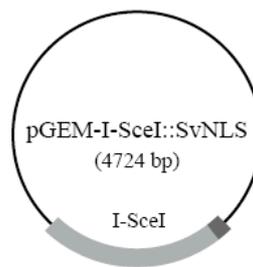
図 24 ISTG-*YFP::BSD* 遺伝子の導入とサザンハイブリダイゼーション
 a ISTG-*YFP::BSD* の模式図，b サザンハイブリダイゼーション結果
 ゲノムを *Sph*I および *Kpn*I で消化後，*YFP::BSD* プロブで検出した。
 レーン 1: pISTG, 2: 北-1 ゲノム, 3~6: ISTG5, 11, 13, 19



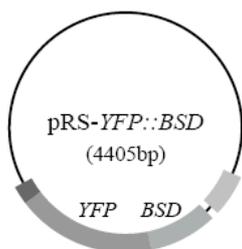
(i) *bar* cassette
(Control of transformation efficiency)



(iii) pGEM-I-SceI::SvNLS (DSB inducer)



(ii) pRS-YFP::BSD (Donor)



(iv) Donor + DSB inducer

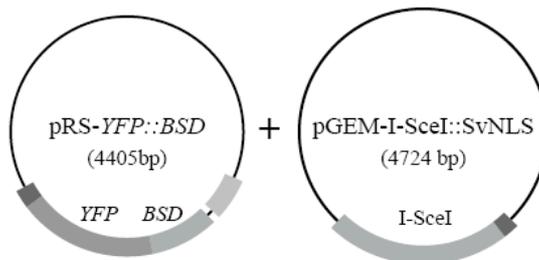


図 25 外来相同 DNA 導入による相同組換え効率の簡易評価法の概略図

外部から供給した RS とゲノムに挿入された ISTG との間で相同組換えが生じた場合、YFP 蛍光とブラストサイジン S への耐性を示すことから、各プラスミドを導入してから 24 時間後にブラストサイジン S (200 µg/mL) によって選抜し、YFP 蛍光が確認された菌株を組換え株数として算出した。なお、コントロールとして用いた *bar cassette* は導入後ビアラフォスによって選抜することで、ゲノムに内にランダムに挿入される形質転換効率として算出した。ISTG 系統への RS 単体での導入においては、全系統でブラストサイジン S への耐性を示す組換え菌株を確認することはできなかった (図 26)。一方で、I-SceI と RS の共導入では約 100 ~ 200 の組換え株を確認することができ、標的配列への特異的な DNA 二本鎖切断の誘導により相同性が高い外来 DNA 配列が、ターゲットとなるゲノム配列 (ISTG-YFP::BSD) に高効率で挿入されたことが示された (図 26)。また、得られた組換え株数は *bar cassette* がゲノムにランダム挿入されたビアラフォス耐性コロニー数と比較して有意に高い数値を示した。この結果から、組換え株の中で RS や I-SceI がゲノムにランダム挿入されたコロニー数が、形質転換効率として算出したビアラフォス耐性コロニー数と同程度とすると、ブラストサイジン S 耐性を示した組換え株数の約 70 ~ 80%程度はゲノムに導入されない一過的な I-SceI および RS の導入によって生じたことが推測された。一方で、I-SceI 単体で導入を行った場合においてもブラストサイジン S および YFP 蛍光を示す菌株が極めて少数出現した (図 26)。これらのコロニーは相同組換えと同様に DNA 二本鎖切断修復機構として働く NHEJ により修復され、その過程で生じた修復エラーによって I-SceI 認識配列の欠失が YFP コード領域内でインフレームに生じた結果であることが考えられた。

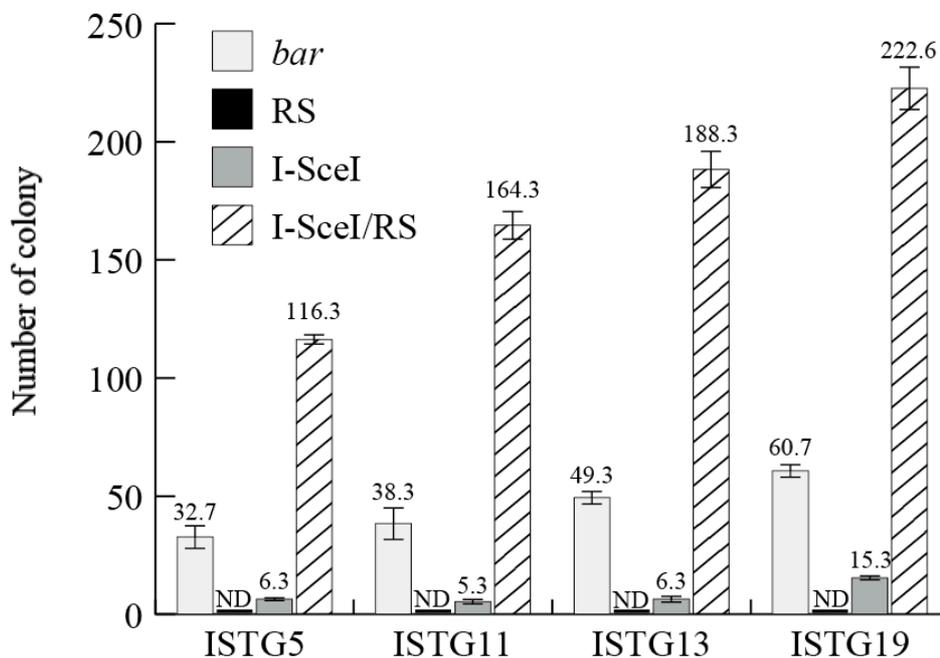


図 26 外来 DNA 導入による相同組換え効率

ND: not detected

2. イネいもち病菌における DNA 二本鎖切断修復様式の解析

a. 非相同末端結合 (NHEJ) による修復様式の解析

第二章の 1.より、希少切断制限酵素 I-SceI を用いたイネいもち病菌への人為的 DNA 二本鎖切断の導入に成功した。そこで、多くの真核生物において DNA 二本鎖切断修復機構の主要経路として働くことが考えられている NHEJ の修復様式を、ISTG 系統および I-SceI 遺伝子を用いて解析した (図 21)。ISTG 系統のプロトプラストに対して I-SceI+*bar* cassette を導入してから 24 時間後に、ビアラフォス (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む PSA 培地にプロトプラスト懸濁液を塗布し、I-SceI がゲノムに導入された形質転換体を得た。得られた形質転換体を用いて簡易ゲノム抽出と PCR によって *YFP::BSD* 領域を増幅し、I-SceI 導入前の配列との比較を試みた。しかしながら、ビアラフォス耐性株から目的の増幅断片および配列を得ることができなかった。その理由として、DNA 二本鎖切断による ISTG 配列の欠失や構造変化が考えられたため、I-SceI+*bar* cassette

導入後の選抜を (i) ビアラフォス, (ii) ビアラフォスおよびハイグロマイシン B (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (iii) ビアラフォスおよびブラストサイジン S (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の 3 種類で行った。ビアラフォスによる選抜では通常の形質転換効率と同等の耐性株が得られたのに対して, ビアラフォスおよびハイグロマイシン B による選抜においては耐性菌株数の大幅な減少が確認された (表 9)。

表 9 ISTG 系統への I-SceI 遺伝子導入による表現型の変化

Line	Cassette	Total ^a	Hyg+ ^b (percentage)	Hyg/bialaphos+ ^c (percentage)
ISTG5	I-SceI + <i>bar</i>	143	67 (46.9%)	1 (0.7%)
	<i>bar</i>	140	128 (91.4%)	0 (0.0%)
ISTG11	I-SceI + <i>bar</i>	77	36 (46.8%)	0 (0.0%)
	<i>bar</i>	70	84 (120.0%)	0 (0.0%)
ISTR13	I-SceI + <i>bar</i>	146	75 (51.4%)	0 (0.0%)
	<i>bar</i>	75	80 (106.7%)	0 (0.0%)
ISTR19	I-SceI + <i>bar</i>	257	158 (61.5%)	1 (0.4%)
	<i>bar</i>	232	208 (89.7%)	0 (0.0%)

a ビアラフォス耐性コロニー数

b ビアラフォスおよびハイグロマイシン B 耐性コロニー数

c ビアラフォスおよび BS 耐性コロニー数

Percentage: ビアラフォス耐性コロニー数 (Total) に占める二重耐性株数の割合

そこで, 得られたビアラフォス耐性株をハイグロマイシン B 含有 PSA 培地に植菌し, 菌糸伸張が認められなかった 16 菌株のゲノムを用いて, サザンハイブリダイゼーションによる ISTG 配列の有無を調査した。その結果, 全ての菌株において *hph* および *YFP::BSD* 遺伝子を検出することはできなかった。また, ハイグロマイシン B に感受性を示した 50 菌株のゲノムを鋳型として, Hpt-5 および M22 のプライマーセット (*hph* 遺伝子配列用; 表 6), M15 および M16 のプライマーセット (ISTG 配列用; 表 6) を用いて PCR によりそれぞれの ISTG 領域の増幅を行ったが, 全菌株において増幅は認められなかった。このことから, ゲノム内に挿入されていた ISTG 配列の全域が DNA 二本鎖切断の導入によって欠失していることが考えられ (図 27), その割合はおよそ 40~50%にも達した (表 9)。一方, ハイグロマイシン B に耐性を示した菌株においては M15 および M16 のプライマーセットを用いて PCR による *YFP::BSD* 遺伝子領域の増幅を

行い、その塩基配列を確認したところ、数十~数百 bp の欠失が確認された (図 27)。ピアラフォスおよびブラストサイジン S に耐性を示した菌株は極めて少数であったが (表 8), 耐性株は YFP 蛍光を有しており、I-SceI の認識配列の欠失が確認された (図 27)。

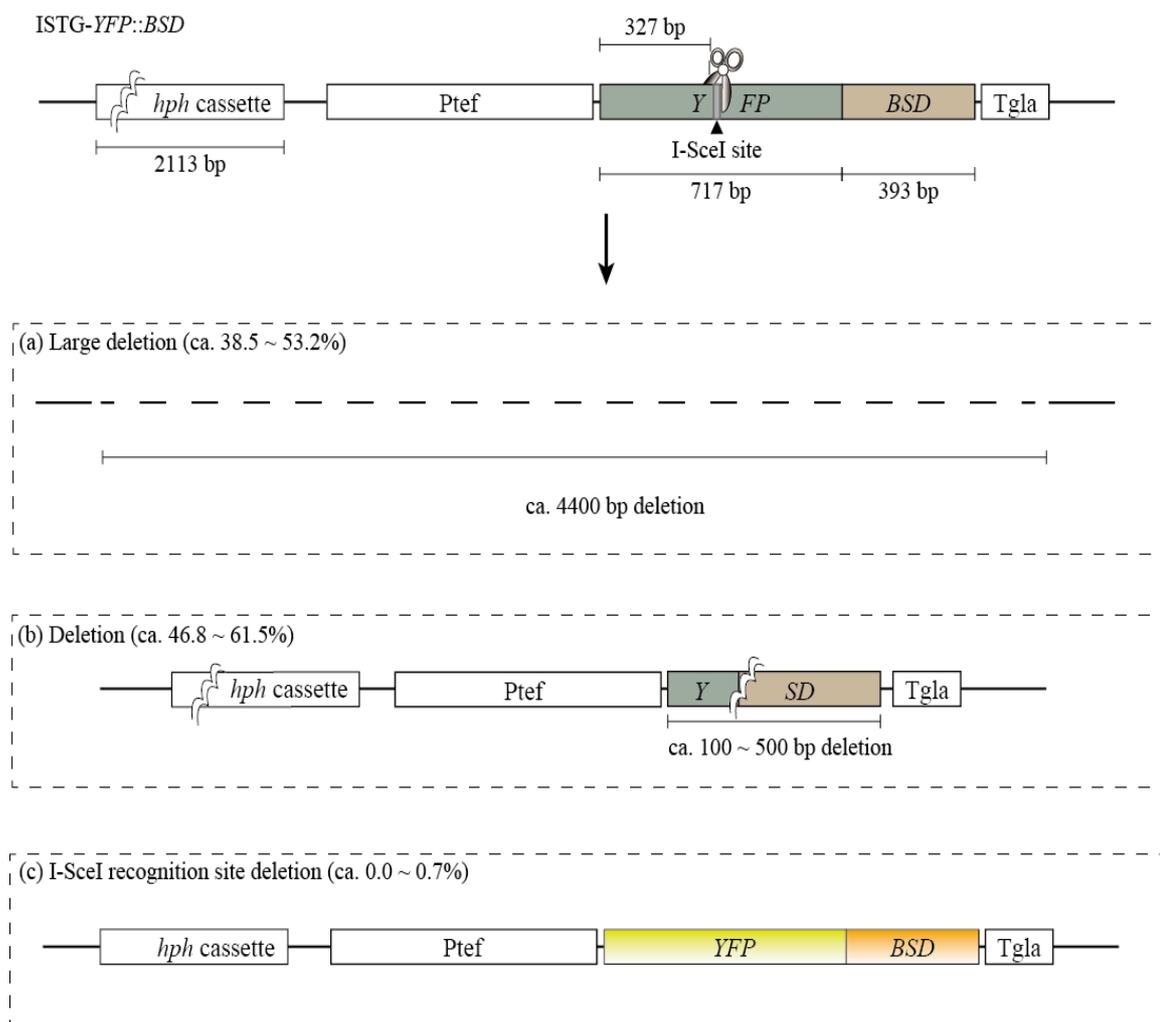


図 27 I-SceI 導入による ISTG-*YFP::BSD* の DNA 二本鎖切断修復パターン

b. 相同組換え修復様式の解析

人為的な DNA 二本鎖切断の導入により、イネいもち病菌ゲノムにおける相同組換え修復は非常に高い頻度で生じていることが考えられた。高等真核生物の知見から、相同組換え機構は交叉型と非交叉型（ジーンコンバージョン）の 2 種に大別される。そこで、I-SceI と ISTG 系統を用いてイネいもち病菌が有する相同組換え修復様式の解析を行った。まず、RS の *YFP::BSD* 遺伝子領域内に約 15 bp 間隔で silent mutation を導入した sRS-*YFP::BSD* (sRS) を構築した。切断が生じた ISTG 配列が sRS を鋳型とした相同組換えにより修復された場合、YFP 蛍光とブラストサイジン S 耐性を示すと同時に、修復された ISTG 配列には silent mutation の痕跡が残るように設計した。そこで、sRS および I-SceI を ISTG5 系統に対して共導入し、ブラストサイジン S (200 µg/mL) および YFP 蛍光によって選抜した。得られた耐性株よりゲノム DNA を抽出して、M15 および M16 プライマーセットを用いた PCR によって *YFP::BSD* 領域を増幅し、その塩基配列を確認した。その結果、切断部位から約 100 ~ 150 bp の領域において組換えが生じたことを示す silent mutation が確認された (図 28)。

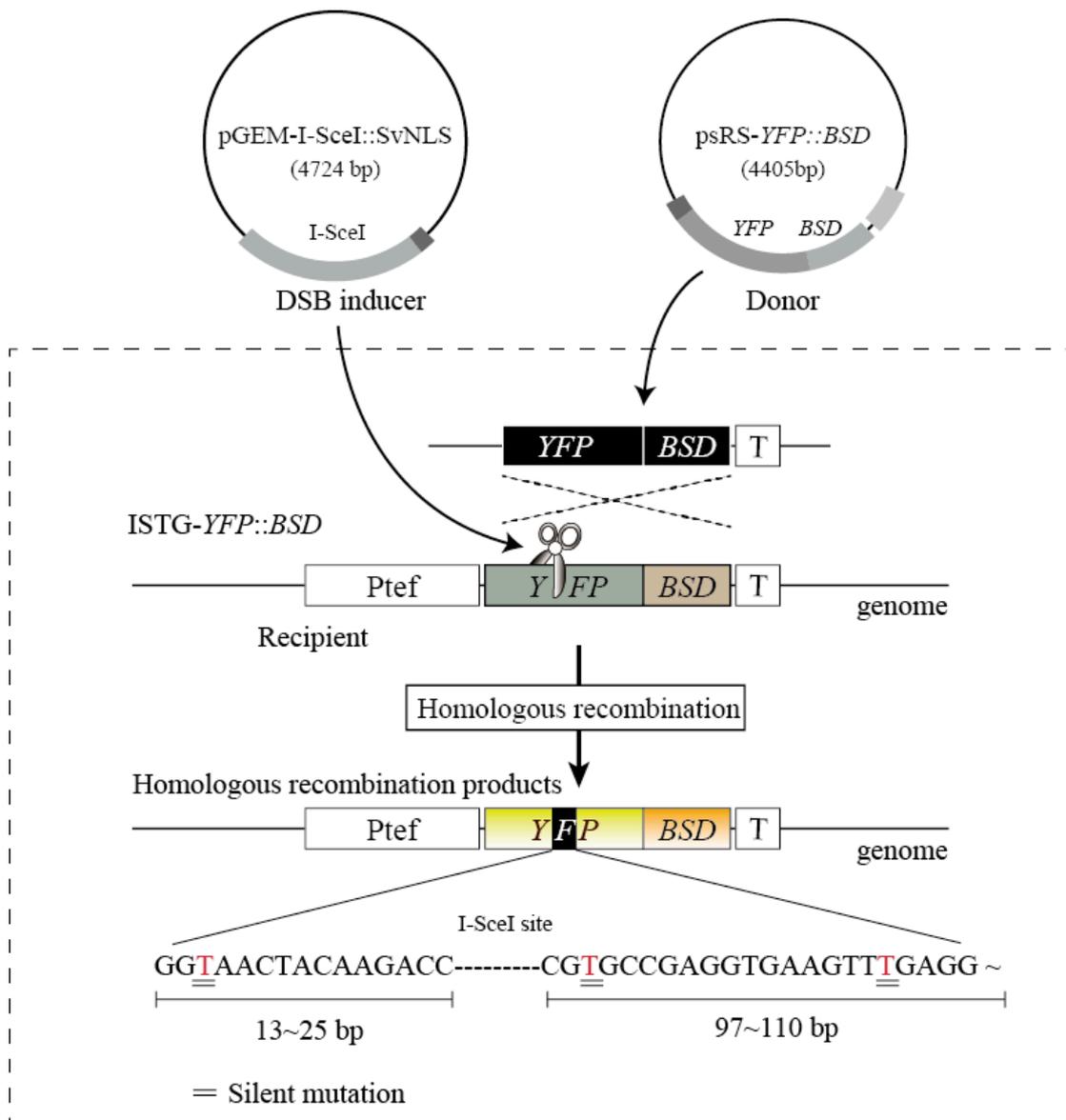


図 28 I-SceI 導入によって生じた相同組換え修復様式の模式図

続いて、このような組換えが交叉型なのか非交叉型なのかを調査するために、pRS-*YFP::BSD* に *bar* cassette を挿入した pRS-*bar-YFP::BSD* を構築した。本プラスミドの導入により、ISTG との間でシングルクロスオーバーによる組換えが生じた場合、切断部位の修復に伴い pRS-*bar-YFP::BSD* の全領域が導入されるため、ブラストサイジン S およびビアラフォスに対する二重耐性を示すことになる (図 29)。一方、非交叉型の組換えにより修復された場合、RS-*YFP::BSD* 遺伝子領域を鋳型とした切断部位の修復 (コピー) が行われるため、ブラストサイジン S への耐性のみを示すことになる (図 29)。

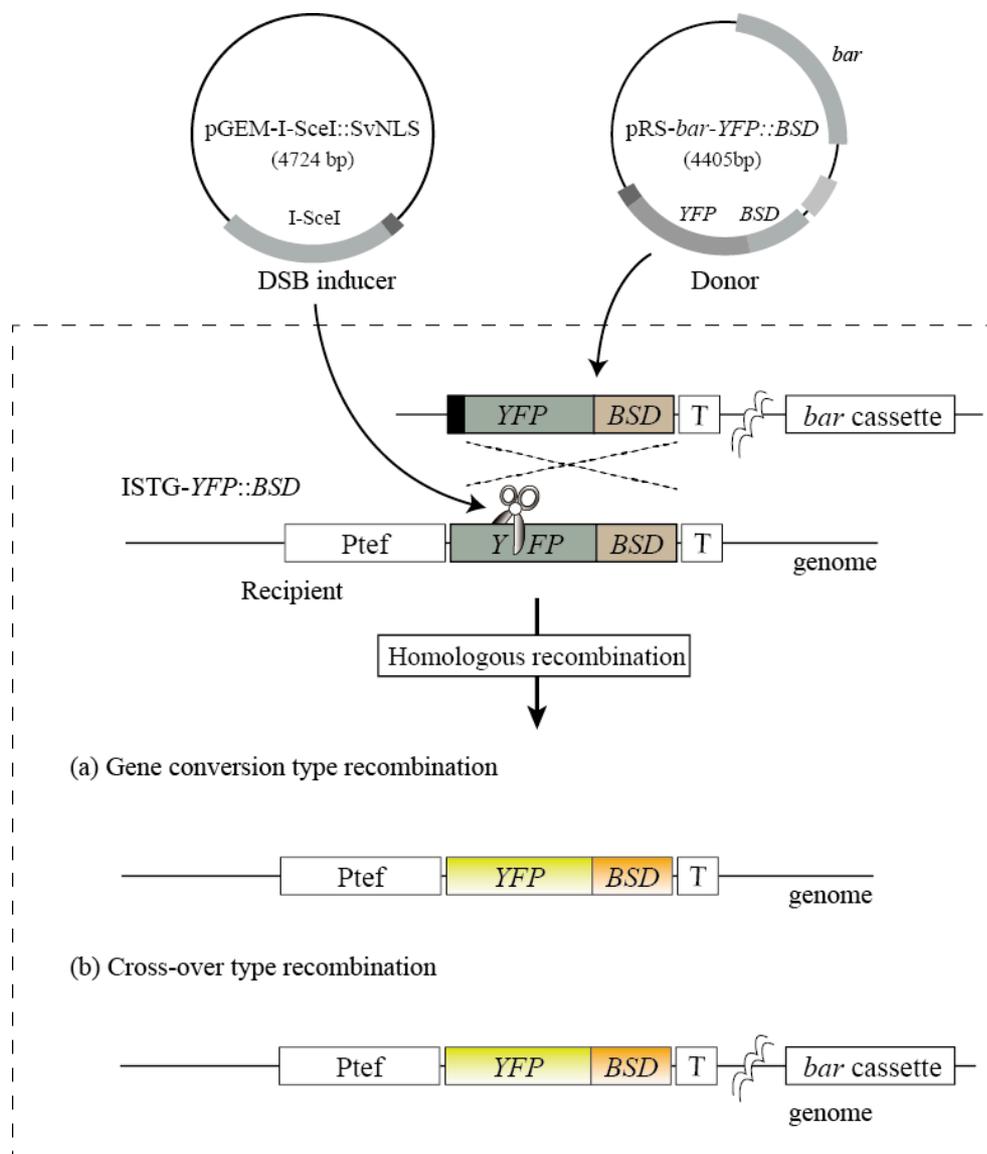


図 29 pRS-*bar-YFP::BSD* を用いた相同組換えタイプ検出系の概略図

ISTG5 系統に対して pRS-*bar-YFP::BSD* および I-SceI を共導入し、ブラストサイジン S (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) によって選抜した。ブラストサイジン S に耐性を示した菌株数は、第二章 2.d.の結果と同様に、コントロールとして用いた *bar cassette* の導入により得られた形質転換体数よりも顕著に高い数値を示した (図 30)。得られた 148 の耐性株をビアラフォス (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む PSA 培地に植菌し、菌糸の伸張が確認された二重耐性株数を算出した (図 30)。全ブラストサイジン S 耐性株 (148 株) のうち二重耐性を示した菌株は 71 株であり、*bar cassette* 形質転換体数 (107 株) や pRS-*bar-YFP::BSD* 形質転換体数 (65) と比較して耐性株数の上昇が認められないことから (図 30)、ゲノム内への *bar cassette* の導入はシングルクロスオーバーによるものではなく、ランダム導入により示された結果であることが推測された。したがって、イネいもち病菌の相同組換え修復は切断部位から 100 ~ 150 bp 程度の領域におけるジーンコンバージョンによって修復されると考えられた。

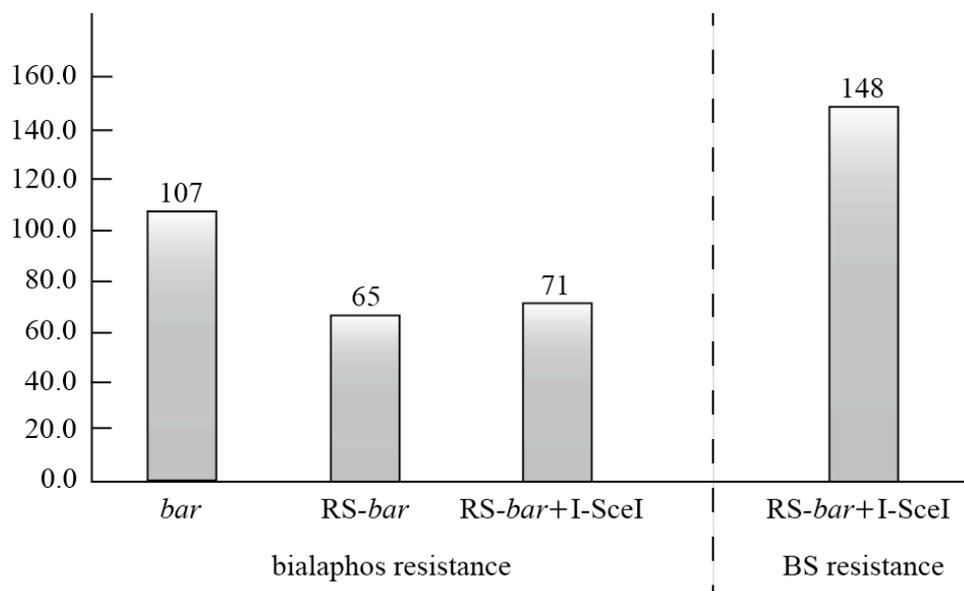


図 30 pRS-*bar-YFP::BSD* を用いた相同組換え株数

c. 相同組換えに必要な相同領域長の解析

上記よりイネいもち病菌の相同組換え修復は 100 ~ 150 bp 程度の相同領域を鋳型としたジーンコンバージョンによることが示されたことから、RS の相同領域を短縮することでイネいもち病菌の相同組換えに必要な相同領域長について検討した。RS-*YFP::BSD* 配列を鋳型として、PCR により相同領域長の短縮シリーズを作製した (相同領域: 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 150 bp; 図 31)。短縮シリーズをクローン化した各プラスミドと I-SceI cassette を ISTG5 系統に対して共導入し、ブラストサイジン S (200 µg/mL) と YFP 蛍光の有無により組換え株数を算出した。得られた耐性株数は相同組換え領域の短縮に伴い減少する傾向がみられたことから (図 32, 33), 実際に相同組換えが行われる DNA 領域よりも広い範囲で相同鎖の探索がなされていることが推測された。最終的には 150 bp まで相同領域を短縮した場合においても相同組換えが生じていることを示す YFP 蛍光およびブラストサイジン S 耐性を獲得した菌株数の上昇を確認した (図 32, 33)。

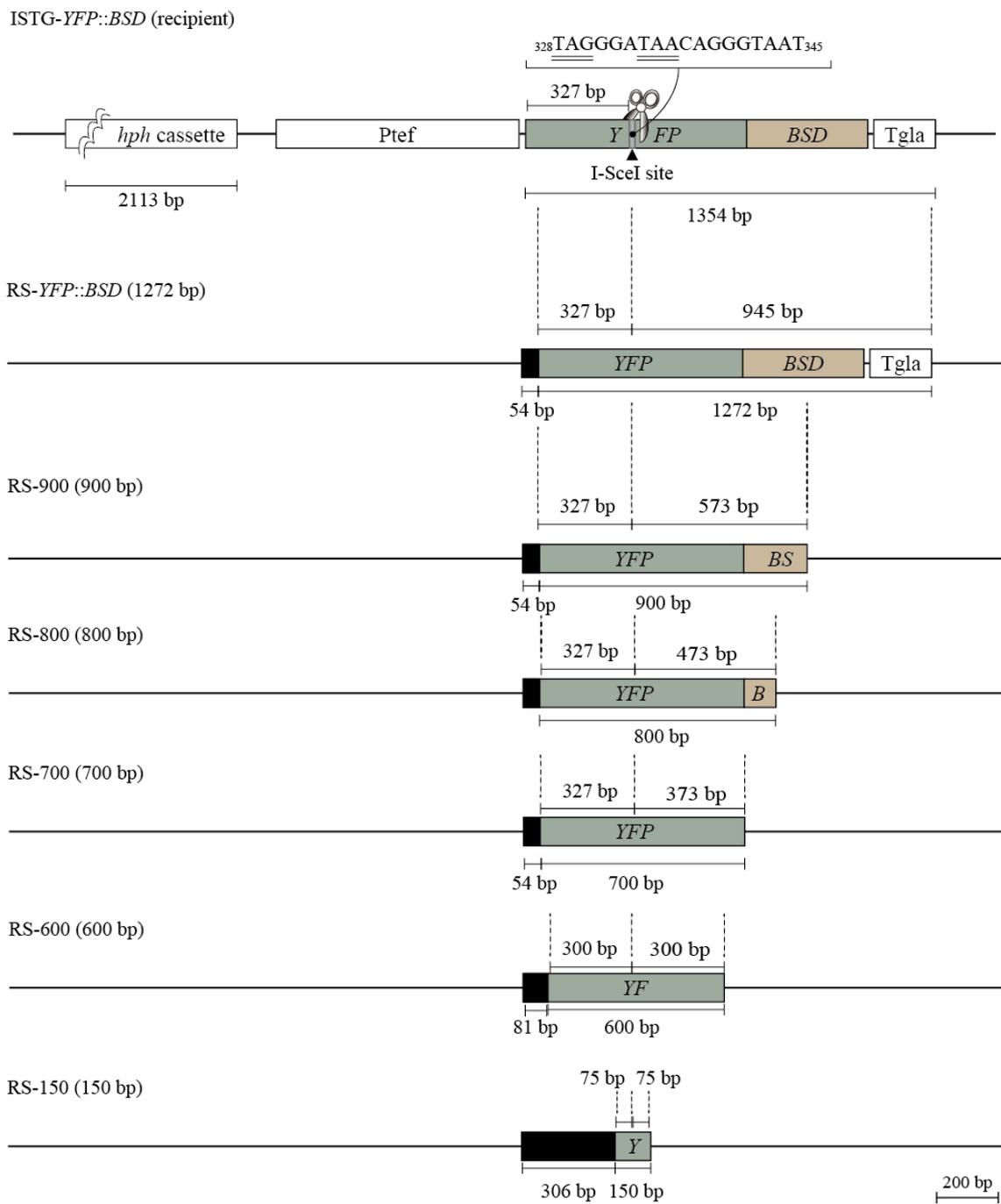


図 31 RS-*YFP::BSD* の相同領域短縮シリーズ

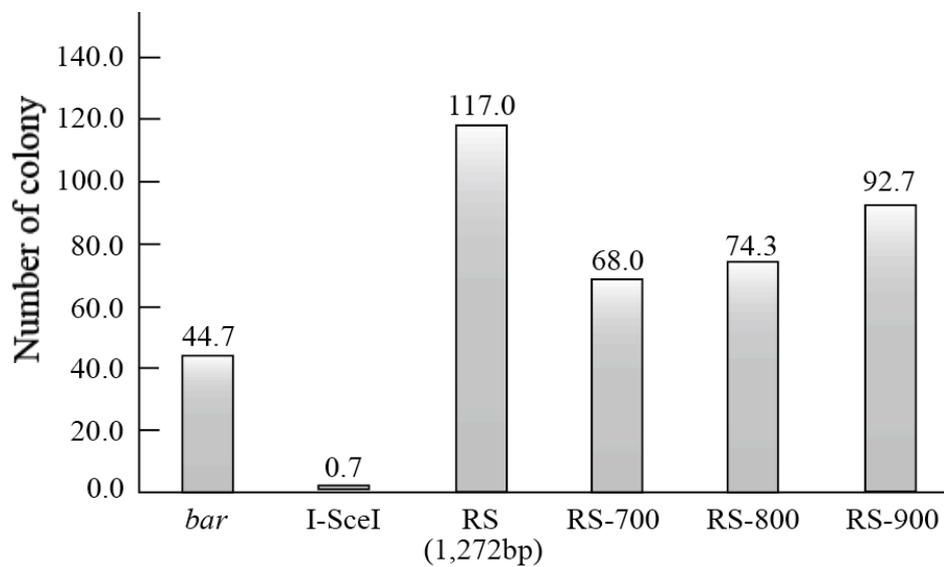


図 32 RS-*YFP::BSD* の相同領域短縮と組換え株数 (700~900 bp)

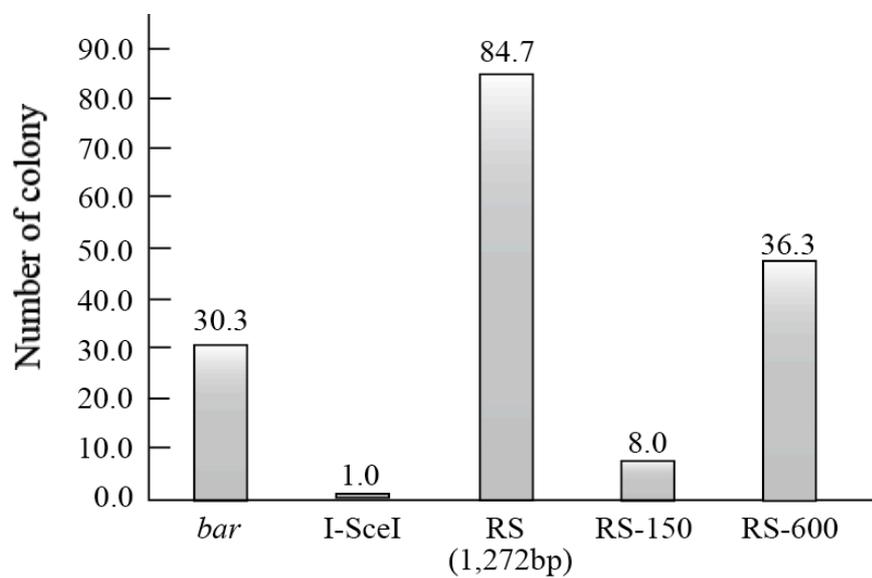


図 33 RS-*YFP::BSD* の相同領域短縮と相同組換え株数 (150~600 bp)

3. 遺伝子ターゲティング法への応用

第二章 2.の結果から、標的遺伝子への一過的な DNA 二本鎖切断の導入により遺伝子ターゲティング法の簡易化と高効率化が可能であることが示唆された。そこで、マーカー遺伝子および I-SceI を用いて、遺伝子ターゲティング効率の算出を行った。標的遺伝子として、*YFP::BSD* 遺伝子のスペーサー領域に I-SceI の認識配列を挿入した機能型 *YFP::SCE::BSD* を構築した (図 34a)。*YFP::SCE::BSD* を PEG 法によりイネもち病菌ゲノムに導入し、ブラストサイジン S およびサザンハイブリダイゼーションによりシングルコピーでゲノム導入された形質転換体を選抜し (図 34b), 形質転換体 no. 4 (TGY4 系統) を以後の実験に用いた。*YFP::SCE::BSD* を標的とした破壊ベクターとして、*RS-YFP::BSD* のスペーサー領域に *bar* cassette を挿入した *RS-YFP-bar-BSD* を構築した (図 35)。標的配列に破壊ベクターが導入された場合、*YFP* と *BSD* 遺伝子の間に *bar* cassette が導入されるため、ブラストサイジン S への耐性を失うことになる (図 35)。

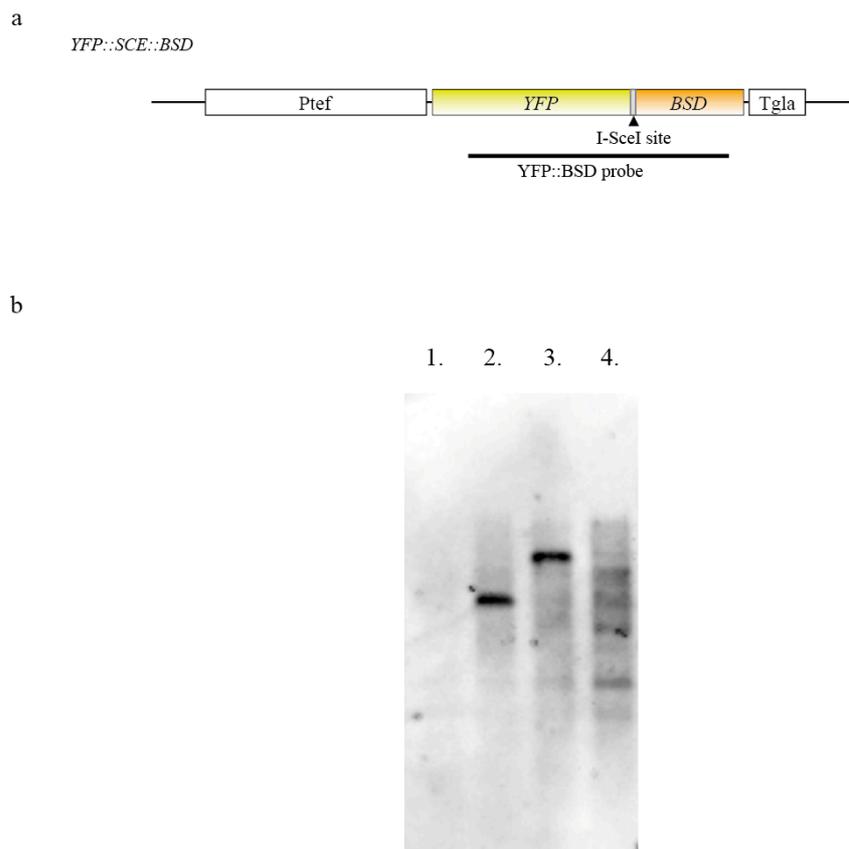


図 34 *YFP::SCE::BSD* の導入系統のサザンハイブリダイゼーション

a *YFP::SCE::BSD* の模式図

b サザンハイブリダイゼーション結果

ゲノムを *ApaI* で消化後、*YFP::BSD* プローブで検出した。

1: 野生株, 2: 形質転換体 no.4, 3: 形質転換体 no.13, 4:形質転換体 no.16

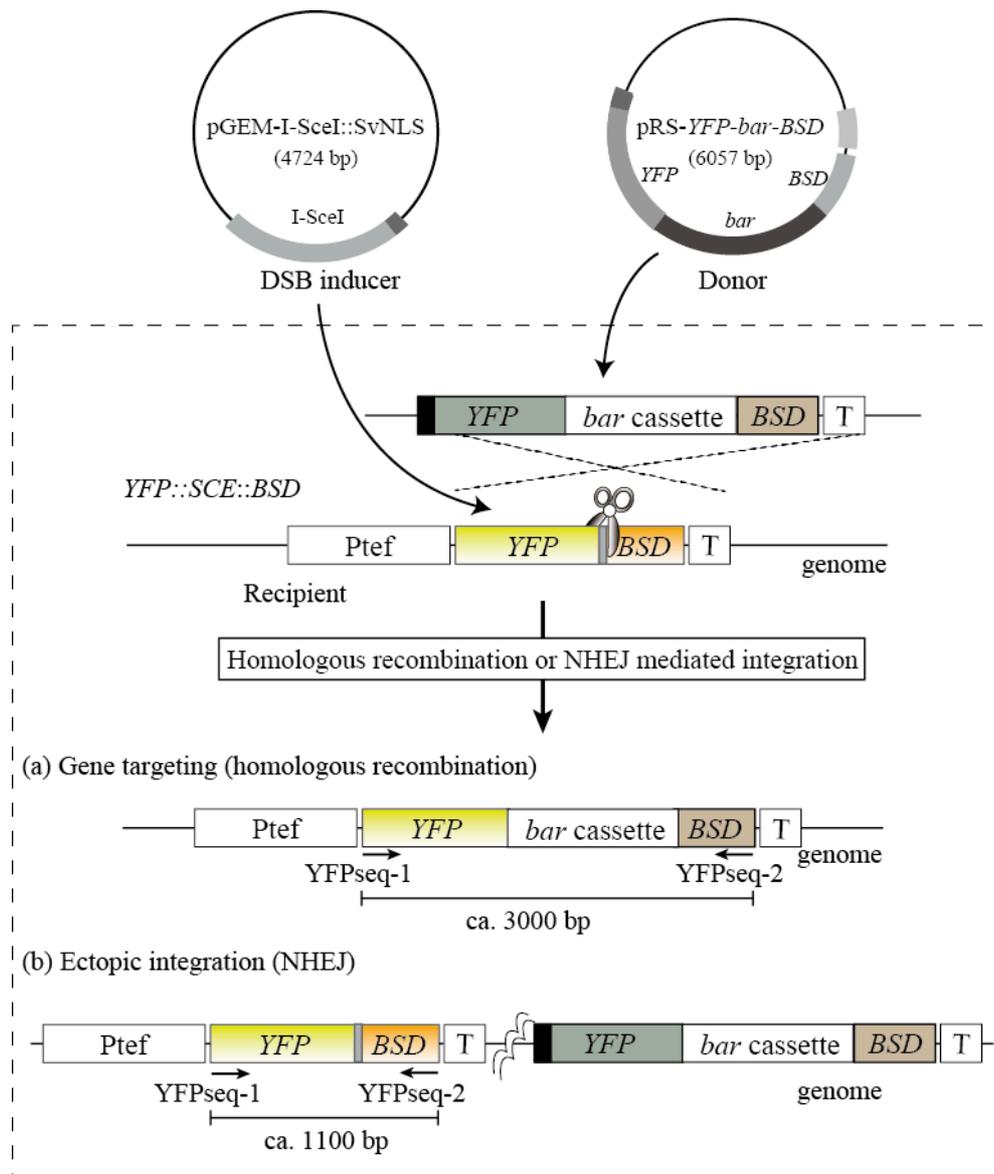


図 35 簡易遺伝子ターゲティング頻度算出系の概略図

TGY4 系統のプロトプラストに対して RS-*YFP-bar-BSD* および I-SceI を環状プラスミドの状態でも導入し、ビアラフォス (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および YFP 蛍光によって選抜した。得られたビアラフォス耐性株の中からランダムに選出した菌株をブラストサイジン S (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む PSA 培地上に植菌し、感受性を示した菌株数から遺伝子ターゲティング効率を算出した。ビアラフォス耐性を示す 156 菌株の中でブラストサイジン S に耐性を示した菌株はわずか 2 株であったことから、標的遺伝子に対してほぼ 100% の効率で破壊ベクターが挿入されたことが推測された (表 10)。一方、RS-*YFP-bar-BSD* のみを導入して得られた 114 のビアラフォス耐性株の中でブラストサイジン S に耐性

を示した菌株数は 112 であり，ブラストサイジン S に感受性を示した菌株はわずか 2 株であったことから，遺伝子ターゲッティング効率は 1.8%であった（表 10）。

表 10 マーカー遺伝子を用いたターゲッティング頻度の算出

Transgene	Total ^a	BS+ ^b	BS- ^c (percentage)	Frequency ^d
pRS- <i>YFP-bar-BSD</i>	114	112 (114)	2 (114)	1.8%
pRS- <i>YFP-bar-BSD</i> + I-SceI	632	2 (156)	154 (2)	98.7%

a ビアラフォース耐性コロニー数

b ビアラフォースおよびブラストサイジン S 耐性コロニー数: ランダム導入株数

c ビアラフォース耐性および BS 感受性コロニー数: 遺伝子ターゲッティング株数

d 遺伝子ターゲッティング頻度

供試した菌株数は括弧内に示した。

次に，ブラストサイジン S に対して感受性を示した菌株の中で，標的遺伝子配列特異的に破壊ベクターが挿入されているかを確認するために，YFPseq -1 および YFPseq-2 のプライマーセットを用いて PCR を行った。その結果，全ての菌株において目的の増幅断片（約 3,000 bp）を確認することができた（図 36）。

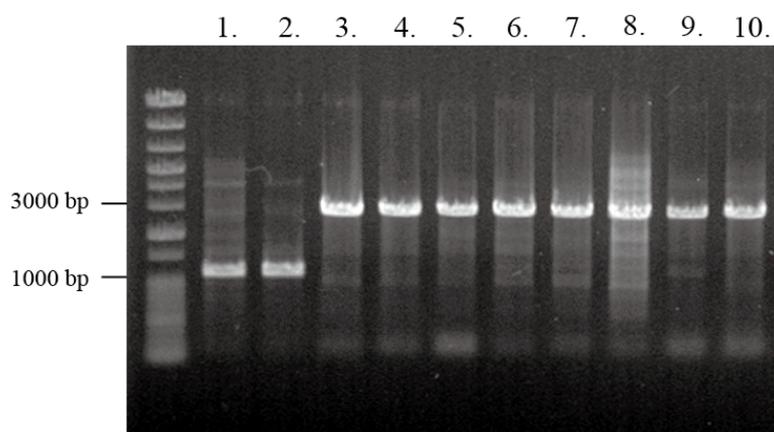


図 36 PCR による標的遺伝子領域の解析

1: TGY4 系統, 2: ブラストサイジン耐性株, 3~10: ブラストサイジン S 感受性株 no. 1~8

PCR により標的遺伝子への破壊ベクターの挿入が確認された菌株に対して，Is-1 および Is-4 プライマーセット（表 6）を用いて I-SceI 遺伝子がゲノムに導入されているか否かを確認した。供試した全ての菌株で I-SceI の増幅（約 580 bp）は認められなかったことから，得られた BS 感受性株は I-SceI 遺伝子および RS-*YFP-bar-BSD* の一過的

な導入によって作出されたことが示された (図 36)。

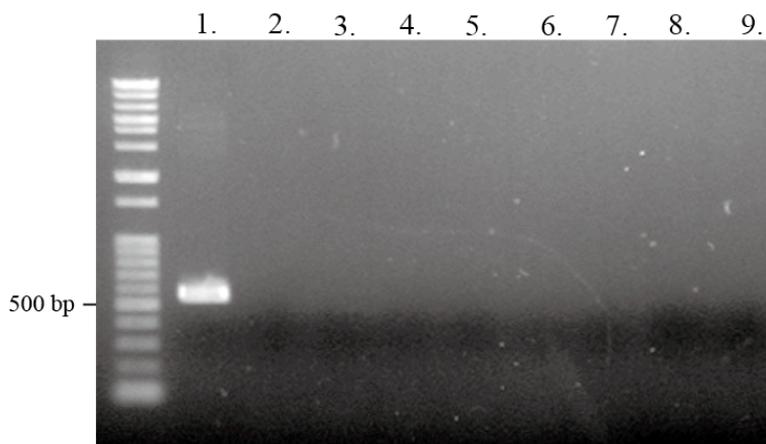


図 37 PCR による I-SceI 遺伝子導入の確認

1:pGEM-I-SceI, 2~9. ブラストサイジン S 感受性株 no. 1~8

相同組換えに必要な相同領域長の解析実験の結果より、イネいもち病菌の体細胞相同組換えは相同領域を短縮した場合においても高い組換え活性を示した。したがって、破壊ベクターに用いる相同領域においても同様に短縮可能であると考えた。そこで、破壊ベクターとして用いた *RS-YFP-bar-BSD* の *YFP* および *BSD* 遺伝子の各相同領域をそれぞれ 300 bp および 100 bp に短縮し、同様の実験手法により遺伝子ターゲッティング効率を算出した。その結果、破壊ベクターのみを導入した場合には、ブラストサイジン S 感受性株を得ることはできなかったが (表 11), I-SceI と相同領域を短縮した各破壊ベクターの共導入では、短縮前 (600 bp) の相同領域と同様に高い遺伝子ターゲッティング率を得ることができた (表 11)。

表 11 相同領域を短縮した破壊ベクターによるターゲッティング頻度

Transgene	Total ^a	BS+ ^b	BS- ^c	Frequency ^d
pRS- <i>YFP-bar-BSD</i> -300	113	30 (30)	0 (30)	0%
pRS- <i>YFP-bar-BSD</i> -300+ I-SceI	816	7 (50)	43 (50)	86%
pRS- <i>YFP-bar-BSD</i> -100	141	30 (30)	0 (30)	0%
pRS- <i>YFP-bar-BSD</i> -100+ I-SceI	996	0 (30)	30 (0)	100%

a ビアラフォス耐性コロニー数, b ビアラフォスおよびブラストサイジン S 耐性コロニー数: ランダム導入株数, c ビアラフォス耐性および BS 感受性コロニー数: 遺伝子ターゲッティング株数, d 遺伝子ターゲッティング頻度 供試した菌株数は括弧内に示した。

IV. 考察

本研究により I-SceI を用いた人為的な DNA 二本鎖切断の導入法およびその検出・選抜法が確立され、糸状菌において体細胞相同組換えが DNA 二本鎖切断の修復機構として働くことを初めて実証した。イネいもち病菌の体細胞相同組換え頻度は標的遺伝子への DNA 二本鎖切断導入により顕著な上昇を示し、その割合は得られた形質転換体の 40% 近くまで達した (表 8)。同様に、標的遺伝子への DNA 二本鎖切断の導入は、一過的に導入された外来相同配列とゲノム内に挿入した標的遺伝子との間で生じた相同組換えコロニーを多数出現させ、その頻度は形質転換コントロールとして用いた *bar* cassette がゲノム内にランダム挿入されたコロニー数よりも約 3 倍も高い値であった (図 26)。I-SceI を用いた DNA 二本鎖切断の導入と相同組換えの誘導は高等真核生物においても同様に試みられているが (Porteus and Baltimore, 2003; Pacht et al., 1999), 本研究において得られたような高い割合での相同組換え修復は示されていない。したがって、イネいもち病菌の体細胞相同組換え頻度は高等真核生物よりも高く、DNA 二本鎖切断の修復が相同組換え経路に依存している酵母と比較すると低いことになる (Takita et al., 1997)。ISTG および RS を用いた本実験系は、異なる相同配列を鋳型としたエクトピックな相同組換えを検出する手法であり、上述した外来 DNA の供給によって高い相同組換え活性が得られたことは、イネいもち病菌ゲノムが独自の変異特性を有することが窺える。本系ではゲノム内の同一遺伝子配列 (ISTG) を鋳型とした *error-free* な相同組換えを検出することはできない。即ち、相同組換えによって修復された DNA 配列は、本系において検出された 40% という割合よりも高いことが推測され、ゲノムに高い相同性を有する DNA 配列が存在する場合、イネいもち病菌は NHEJ よりも相同組換えによる修復を優先させているのかもしれない。

一方で、相同組換え修復と拮抗して働く NHEJ 修復様式の解析では、数百から数千塩基といった広範囲の欠失が高い割合で生じることが示された (図 27, 表 9)。高等真核生物の NHEJ 修復エラーにより生じる欠失は主として数塩基から数十塩基であることから (Bennardo et al., 2008; Bindra et al., 2013; Lloyd et al., 2012), イネいもち病菌の NHEJ 修復機構は高等真核生物と比較して正確性に欠け、NHEJ 修復経路に依存した DNA 二本鎖切断修復はゲノムに致命的な損傷を引き起こす可能性が考えられる。一方で、このような広域にわたる欠失の割合はゲノム内に相同配列が存在する ISTR 系統においては減少する傾向がみられたことから、相同組換え修復はゲノムに多様性をもたらすと同時に、ゲノムの安定性の維持においても重要な役割を担っていることが推察される。イネいもち病菌の付着器の形成は分生子内で有糸分裂した核が付着器へ移動し、

分生子内の核がオートファジー細胞死により消失することで、成熟した付着器が完成される (Veneault-Fourrey et al., 2006; Kershaw et al., 2009)。この付着器の形成過程と成熟は細胞周期の S 期によって厳密に制御されていることが示されており (Saundars et al., 2010)、相同組換え修復と細胞周期、相同組換え修復とオートファジー細胞死は密接に関連していることから (Shubassi et al., 2012; Heyer et al., 2010)、イネいもち病菌の相同組換え修復の重要性が示唆される。上記の知見から、イネいもち病菌の感染過程、とりわけ付着器の形成には相同組換え修復が重要であり、相同組換え関連遺伝子の破壊により観察されたイネいもち病菌の病原性の低下は (Sone et al., 2009)、修復されていない DNA 二本鎖切断の蓄積による細胞周期の遅延およびオートファジー細胞死が誘導されないことが原因であると考えられる。また、イネいもち病菌の NHEJ 関連遺伝子を破壊した菌株では表現型への影響が観察されないことから、イネいもち病菌の感染過程での相同組換え修復の関与が支持される。

相同組換え様式の解析から、イネいもち病菌の体細胞相同組換えは 150 bp という非常に短い相同領域が存在するだけでも生じており (図 33)、その組換え様式は非交叉型のジーンコンバージョンが主たるものであることが示された (図 28, 30)。相同組換え修復過程において Holiday junction を有する 4 量体 DNA が形成された場合、交叉型のクロスオーバーとジーンコンバージョンは同じ比率で生じることが考えられるため (図 22)、イネいもち病菌の体細胞相同組換えは他の生物と同様に synthesis-dependent strand-annealing (SDSA) 経路によって修復されていることが示唆される (図 22)。クロスオーバーを介さない SDSA によって DNA 二本鎖切断が修復される場合、交叉のような DNA 配列の交換ではなくコピーによる置換が生じることになる。片方の相同 DNA 配列を一方向的にコピーするジーンコンバージョンでは鋳型となる相同配列の選択によっては遺伝子の重複や欠失、転座を引き起こすことが考えられており、ヒトのゲノム進化や遺伝病の要因となることが明らかになりつつある (Chen et al., 2007)。

全ゲノム解析の結果から、38.8 Mbp のイネいもち病菌のゲノムに占める反復配列は 52%にも及ぶと報告されている (Raffaele and Kamoun, 2012)。また、その中で 200 bp 以上、65%以上の相同性を有するトランスポゾンや反復配列はゲノム全体の約 9.7%を占める (Dean et al., 2005)。仮にこれらの配列の長さが 200 bp と仮定した場合には約 2,062 bp あたりに 1 回、1000 bp と仮定した場合には約 10309 bp あたりに 1 回の頻度でトランスポゾン配列や反復配列が存在することになる。各トランスポゾン配列および反復配列間においては高い相同性を有する共通配列が複数存在しており、ゲノム内に散在したこれらの配列は DNA 二本鎖切断修復機構として働く相同組換えの鋳型となることで、ゲノムの再編を引き起こす要因となることが考えられる。興味深いことに、トラ

ンスポゾン配列やレトロトランスポゾン配列の solo-long terminal repeat (solo-LTR) は非病原性遺伝子近傍に複数存在する傾向が見出されており (Khang et al., 2008; Chuma et al., 2011a), その出現頻度は上記に示した頻度を大きく上回ることも考えられる。solo-LTR は種類によっても異なるが 150~200 bp 程度のものが多く, 本研究において得られた相同組換えに必要な相同領域長と合致している。以上の知見を総合すると, solo-LTR またはその近傍に生じた DNA 二本鎖切断は, 他の solo-LTR を鋳型としたジーンコンバージョンを誘発し, 非病原性遺伝子の欠失や転座, 重複を含むゲノム再編をもたらす可能性を強く示唆している。

上述したイネいもち病菌の変異特性を利用することで, 標的遺伝子特異的な DNA 二本鎖切断の導入により高効率遺伝子ターゲティング法が確立できると考えられる (表 10)。マーカー遺伝子を用いた遺伝子ターゲティング評価系においては, 上流および下流に約 600 bp の相同領域を設計した破壊ベクターと I-SceI 遺伝子の共導入によりほぼ 100% の効率で標的遺伝子を破壊することに成功した (表 10)。また, 破壊ベクターに組み込む相同領域を 300 bp または 100 bp まで短縮した場合でも, 600 bp の相同領域を利用した場合とほぼ同等の遺伝子ターゲティング効率を得ることができた (表 11)。糸状菌の遺伝子ターゲティングには, マーカー遺伝子の上流および下流にそれぞれ 1,000~1,500 bp 程度の相同領域を組み込むことが一般的であり, 導入の際にはそれらを線状化する必要がある。本系は標的遺伝子配列に特異的な DNA 二本鎖切断を導入することで, 体細胞では効率が低いとされている交叉型のダブルクロスオーバーではなく, ジーンコンバージョンによって標的遺伝子への特異的な外来 DNA の挿入が可能であることを示している (図 34)。したがって, 相同領域の短縮と環状プラスミドのままの遺伝子破壊が可能となり, DNA 二本鎖切断の標的遺伝子への導入は遺伝子ターゲティング法の簡易化に有用であることを示した。イネいもち病菌の平均遺伝子サイズは 1,683 bp であることから (Dean et al., 2005), 相同配列を短縮することで, 非病原性遺伝子などの染色体座位がデータベースの菌株と異なるような遺伝子配列を標的とした場合でも, 標的遺伝子のフランキング領域を必要としない遺伝子破壊や改変が可能となるだろう。

以上より, DNA 二本鎖切断はイネいもち病菌のゲノム進化の主要因であり, 糸状菌における新たな遺伝子工学技術の開発に有効な手法となり得ることが示された。しかしながら, I-SceI を用いた DNA 二本鎖切断の導入は 18 bp の認識配列によってその使用が制限されるために必ずしも実用的な手法とはいえない。最近, 進歩しつつある任意の遺伝子配列特異的に DNA 二本鎖切断を導入することが可能な人工ヌクレアーゼの使用により I-SceI のもつ欠点が解消されれば, さらなる研究の発展と利用が期待される。

第三章 イネいもち病菌ゲノムへの人工ヌクレアーゼによる DNA 二本鎖切断

I. 緒言

近年、様々な生物種において目的の遺伝子を自由に改変するゲノム編集技術が確立されつつある。ゲノム編集は、生物が有する DNA 二本鎖切断修復機構を利用することにより、標的遺伝子の破壊（ノックアウト）や外来遺伝子の付加（ノックイン）、遺伝子内への塩基置換、挿入や欠失の導入、染色体の転座や部分欠失等を人為的に誘導できる次世代の遺伝子改変技術として脚光をあびている（図 38, Johng and Sander 2013）。

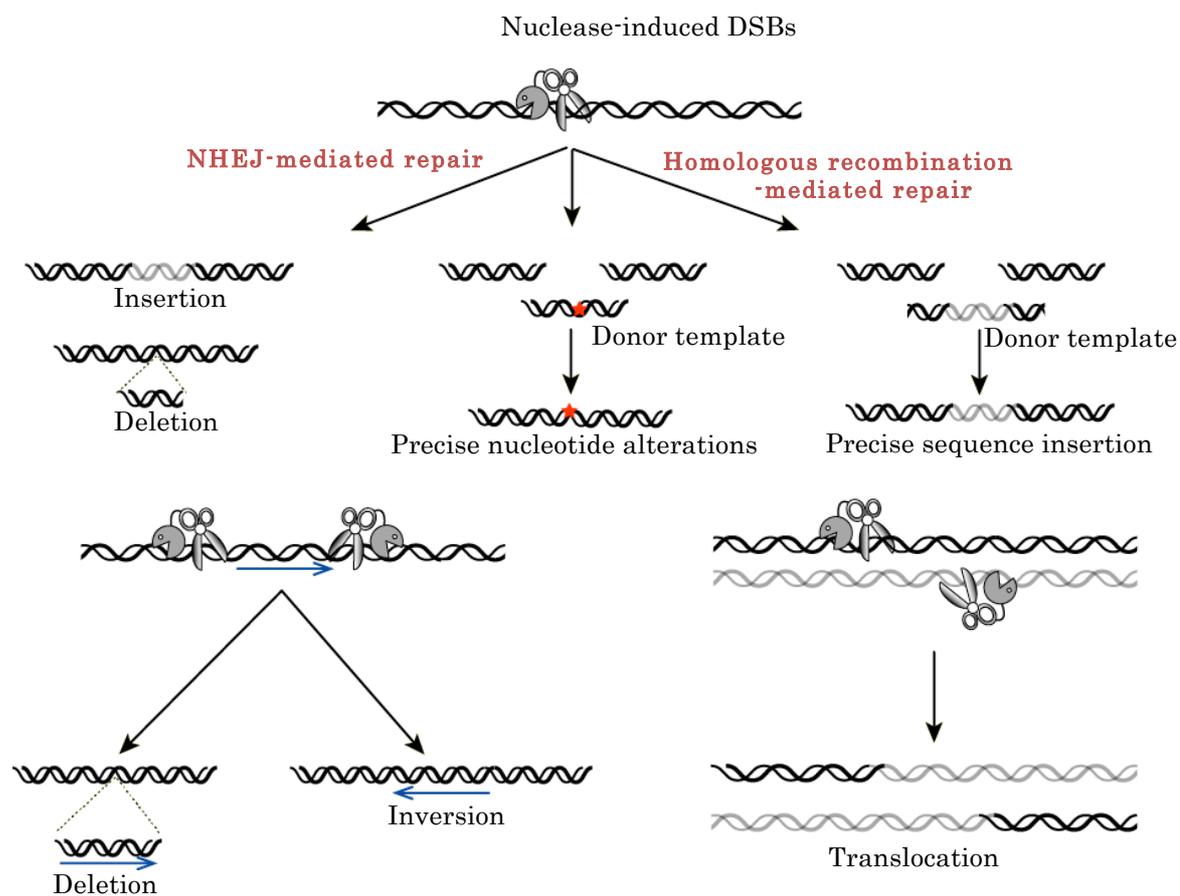


図 38 DNA 二本鎖切断修復機構を介したゲノム編集の模式図

ゲノム編集はこれまでにいくつかの高等真核生物において成功例が報告されており (Ansai et al., 2013; Hisano et al., 2013; Sakuma et al., 2013a; Suzuki et al., 2013; Mashimo et al., 2013), この技術革新の背景には任意の遺伝子配列特異的に DNA 二本鎖切断を導入することが可能な人工ヌクレアーゼ研究の飛躍的な発展がある。

Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) は植物病原細菌である *Xanthomonas spp.* から分離された transcription activator-like effectors (TALEs) を改変し, FokI ヌクレアーゼを融合させた人工ヌクレアーゼである (図 39)。TALEs は *Xanthomonas spp.* の感染と同時に分泌され, 宿主である植物ゲノムの転写領域に特異的に結合することで, 宿主ゲノムの転写を攪乱して自身の感染を助長する DNA 結合ドメイン型エフェクターとして発見された (Boch et al., 2009; Boch et al., 2010)。この DNA 結合ドメインは高度に保存された 34 アミノ酸残基からなる連続したモジュールによって構成されており, 各モジュールは Repeat-Variable-Diresidues (RVD) と呼ばれる可変領域 (2 アミノ酸残基) を有する (図 39)。

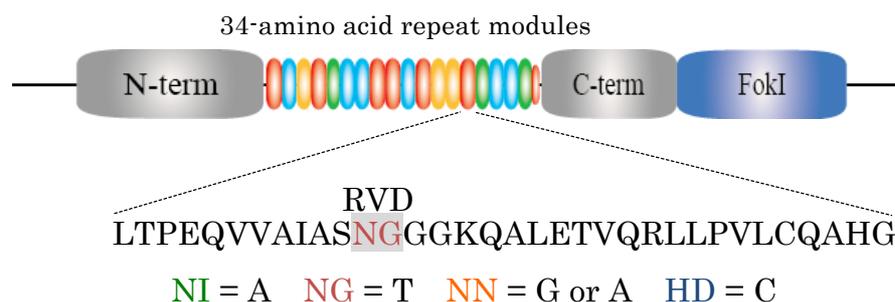


図 39 TALEN および DNA 結合ドメイン構造の模式図

モジュール内の RVD がアスパラギン・イソロイシン (NI) の並びであればアデニン残基, アスパラギン・グリシン (NG) であればチミン残基, アスパラギン・アスパラギン (NN) であればグアニンまたはアデニン残基, ヒスチジン・アスパラギン酸 (HD) であればシトシン残基と特異的に結合する (図 39)。即ち, 標的となる DNA 配列に対応したモジュールを連結して構築した TALEs が特定の配列に結合し, TALEs に連結した FokI ヌクレアーゼ活性ドメインが二量体となることで DNA を切断する。これまでに, RVD 以外の配列がほぼ同一な複数のモジュールを効率的に連結・配置するためのプラットフォームとして Type IIs 制限酵素を用いた Golden Gate digestion and ligation 法 (Engler et al., 2008, Engler et al., 2009) が開発され, 様々な研究グループが TALEN 作製キットとして公開している (Cermak et al., 2011; Sakuma et al., 2013b; Sanjana et al., 2012; Miller et al., 2011)。Golden Gate digestion-ligation 法は

BsaI や BsmBI といった認識部位の外側で切断が生じる制限酵素を用いることにより、単一の制限酵素処理によって複数のオーバーハングをもった断片の作成、ライゲーションを同時に行う方法である (図 40)。

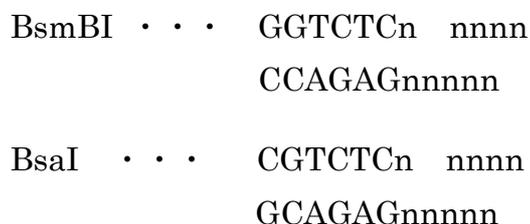


図 40 Type IIs 制限酵素認識配列と切断部位の一例

このような TALEN 作製キットの整備に伴い、様々な高等真核生物で TALEN によるゲノム DNA 切断の成功事例が報告されているが、糸状菌や細菌といった微生物における TALEN の使用例は皆無である。その原因の一つとして、現在公開されている TALEN 作製キットのコドン使用頻度は高等真核生物に対応したものであり、微生物細胞内での翻訳効率が低いことや菌類の DNA 二本鎖切断修復機構の理解が制限されていることが大きな障壁となっていると考えられる。

第二章において、イネいもち病菌の相同組換え修復頻度は高等真核生物と比較して明らかに高く、その特性はフィールド分離株にみられるゲノム進化の原動力となっていること、遺伝子ターゲティングなどの遺伝子工学的手法の開発に有用であることが示唆された。したがって、任意のゲノム配列に DNA 二本鎖切断を導入することができれば、順遺伝学的解析による本菌のゲノム進化機構の解明と自由度の高い逆遺伝学的解析手法となるゲノム編集技術のデザインが可能であると考えた。そこで本研究においては糸状菌用にコドン使用頻度を改変した TALEN 作製キットの開発と TALEN を用いたゲノム切断活性の検証を行った。

II. 実験材料および方法

1. 供試イネいもち病菌およびプライマー

イネいもち病菌は北-1 株を使用した。使用したプライマーは表 12 に示した。培地ならびに実験操作方法は第一章および第二章と同様に行った。

2. DNA 二本鎖切断検出・選抜マーカー遺伝子の構築

TALEN を用いた DNA 二本鎖切断の標的配列 TG-*YFSCEEET::BSD* は第二章で構築した pISTG-*YFP::BSD* を改変して作製した。pISTG-*YFP::BSD* を鋳型として、M15 および ZFEBT-4 のプライマーセット、ZFEBT-1 および M16 のプライマーセット (表 12) を用いてそれぞれ増幅し、Fusion PCR により連結した。得られた増幅産物を pISTG-*YFP::BSD* の *YFP::BSD* 領域と置換して pTG-*YFSCEEET::BSD* とした。

3. 2A ペプチド連結バイシストロン性ベクターの構築

第二章で構築した pGEM-*YFP::DS::BSD* をもとに作製した。2A ペプチド連結バイシストロン性ベクターを構築するために、pGEM-*YFP::DS::BSD* の SpeI/NheI サイトに合成リンカー (5'-CTAGCCAGCTCCTCAACTTCGACCTCCTCAAGCTCGCCGGTGACGTCGAGTCGAACCCCGGTCCTCA-3' および 5'-CTAGTGGGACCGGGTTTCGACTCGACGTCACCGGCGAGCTTGAGGAGGTCGAAGTTGAGGAGCTGG-3') を挿入し、pGEM-*YFP::2A::BSD* とした。

4. コロニーPCR

PCR 反応は 15 μ L で行い、10 \times Paq buffer を 1.5 μ L, dNTP を 1.5 μ L, 各種 10 μ M のプライマーをそれぞれ 1.5 μ L, Paq ポリメラーゼ 0.5 μ L を PCR チューブにそれぞれ調製した。反応条件は 94 $^{\circ}$ C で 2 分間熱処理後、サイクル内を 94 $^{\circ}$ C で 30 秒, 60 $^{\circ}$ C で 30 秒, 72 $^{\circ}$ C で所定時間 (1 kb あたり 30 秒), 25 サイクルで行った。

5. イネいもち病菌用 TALEN tool box kit の構築

(1) 各種ベクターの構築

Sanjana ら (2012) の tool box を参考に全ての CDS 領域をイネいもち病菌コドン使用頻度に基づき書き換えた。イネいもち病菌コドン使用頻度に基づき最適化した各モジュールを構築するために、アデニン結合型モジュールとして RVD が NI の並びである合

成遺伝子 (Operon Technologies に委託) を鋳型として, RVD-1 および RVD-2 のプライマーセット (表 12) により増幅後, TA クローニングによって pGEM-T easy vector に導入したものを pGEM-MoTALE NI とした。pGEM-MoTALE NI を鋳型として, RVD-1 および RVDC-2 のプライマーセット, RVDC-2 および RVD-2 のプライマーセット (表 12) によりそれぞれ増幅し, Fusion PCR によって連結した。増幅産物を TA クローニングによって pGEM-T easy vector に導入し, RVD が HD のアミノ酸配列に置換された pGEM-MoTALE HD を作製した。同様に, pGEM-MoTALE NI を鋳型として, RVD-1 および RVDG-2 のプライマーセット, RVDG-1 および RVD-2 のプライマーセット (表 12) を用いて pGEM-MoTALE NN を, RVDT-1 および RVD-2 のプライマーセット (表 12), RVDT-1 および RVD-2 を用いて pGEM-MoTALE NG を構築した。TALEN の発現ベクターバックボーンを構築するために, pK18 mob (国立遺伝学研究所より分譲) を HincII および SmaI によって処理し, セルフライゲーションすることでマルチクローニングサイトの一部を除去して pK18v2 とした。TALEN の N 末端側および C 末端側 (RVD 0.5 repeat NI) の CDS 領域をイネいもち病菌コドン使用頻度に最適化した合成遺伝子を鋳型として, TALEN-1 および ccdB-2 のプライマーセット, ccdB-3 および TALEN-2 のプライマーセット (表 12) によってそれぞれ増幅した。同時に pENTR 3C Dual selection (Invitrogen) を鋳型として ccdB-3 および ccdB-4 のプライマーセットを用いてクロラムフェニコール耐性遺伝子および ccdB 遺伝子 cassette を増幅し, Fusion PCR により TALEN の N 末端側および C 末端側の CDS 領域の間に連結した。得られた増幅産物は TA クローニングにより, pGEM-T easy vector に導入し, pGEM-backbone NI とした。pGEM-backbone NI を鋳型として TALEN-1 および TALENC-2 のプライマーセット, TALENC-1 および TALEN-2 のプライマーセット (表 12) を用いてそれぞれ増幅し, Fusion PCR によって連結した。得られた増幅産物は AscI および PacI によって処理し, pGEM-backbone NI の CDS 領域と置き換えて pGEM-backbone HD とした。同様に, pGEM-backbone NI を鋳型として, TALEN-1 および TALENG-2 のプライマーセット, TALENG-1 および TALEN-2 のプライマーセット (表 12) を用いて pGEM-backbone NN を, TALEN-1 および TALENT-2 のプライマーセット, TALENT-1 および TALEN-2 のプライマーセット (表 12) を用いて pGEM-backbone NG を構築した。pGEM-backbone NI, HD, NN, NG の CDS 領域はそれぞれ pK18 v2 の EcoRI サイトに挿入し, pK18-backbone NI, HD, NN, NG とした。イネいもち病菌コドン使用頻度に最適化した FokI ヌクレアーゼを構築するために, Mo Fok I 1, Mo Fok I 2, Mo Fok I 3, Mo Fok I 4,

Mo Fok I 5, Mo Fok I 6, Mo Fok I 7, Mo Fok I 8, Mo Fok I 9, Mo Fok I 10, Mo Fok I 11, Mo Fok I 12, Mo Fok I 13, Mo Fok I 14, Mo Fok I 15 (表 12) のオリゴ DNA (10 μ M) をチューブに調製し, 80°Cで 8 分間, 57°Cで 8 分間処理した後に, KOD Plus Neo ポリメラーゼを加えて 30 サイクル PCR 増幅を行った。得られた増幅産物をテンプレートとして, MoFok-1 および PTALEN-14 のプライマーセット (表 12) を用いて増幅し, pK18-backbone NI, HD, NN, NG の BamHI および PacI サイトにそれぞれ導入したものを pK18-TALEN backbone NI, HD, NN, NG とした。pK18-TALEN backbone NI, HD, NN, NG はネガティブセレクションマーカーである *ccdB* cassette を保有しているため, *ccdB* 耐性大腸菌 One shot *ccdB* survival 2T1R competent cell (Invitrogen) に形質転換してプラスミド DNA を得た。pK18-TALEN backbone NI, HD に目的のモジュール配列が挿入されたベクターを Left TALEN および Right TALEN とした。Left TALEN は AscI および SpeI で処理し, pGEM-YFP-2A-BSD の AscI および NheI サイトに挿入して YFP 遺伝子領域と置換した。Right TALEN は NheI および PacI により処理し, pGEM-YFP-2A-BSD の SpeI および PacI サイトに挿入して BSD 遺伝子領域と置換することで 2A 配列を挟んで Left および Right TALEN を保有するベクターを pTALEN-L/R とした。

(2) Golden Gate digestion-ligation によるヘキサマーの構築

対応する 6 つのモジュール (図 45 の 1, 6, 7, 12, 13, 18 のモジュールは 18 ng/ μ L, それ以外のモジュールは 15 ng/ μ L に調整) をそれぞれ 1 μ L, 10 \times Tango buffer (Thermo Scientific) を 1 μ L, 10 mM DTT を 1 μ L, T7 ligase (Enzymatics) を 0.25 μ L, ATP (10 mM) を 1 μ L, Esp3I (Thermo Scientific) を 0.75 μ L それぞれ PCR チューブ加えて切断・連結反応を行った。反応条件は 37°Cで 5 分, 25°Cで 5 分を 15 サイクル行った。

(3) Plasmid-Safe DNase 処理

上記 (2) の digestion-ligation 反応液 4 μ L に 10 \times Plasmid-Safe reaction buffer を 1 μ L, ATP (10mM) を 1 μ L, Plasmid-Safe ATP-dependent DNase (AR Brown) を 1 μ L 加えて DNase 処理を行った。反応条件は 37°Cで 30 分処理後, 70°Cで 30 分処理した。

(4) Golden Gate digestion-ligation によるバックボーンベクターへの導入

切断・連結反応は10 μ Lで行った。対応した pK18-TALEN backbone (100 ng/ μ L) を1 μ L, 10 \times NEB buffer 3 を1 μ L, BSA (1 mg/mL) を1 μ L, ATP (10 mM) を1 μ L, BsaI-HF (NEB) を0.75 μ L, T7 ligase を1 μ L, 3つのヘキサマー (20 ng/ μ L) をそれぞれ1 μ L PCR チューブに加えて反応液を作製した。反応条件は37°Cで5分, 25°Cで5分を15サイクル行った。

6. イネいもち病菌用 Platinum Gate TALEN kit の構築

(1) 各種ベクターの構築

Platinum TALEN の各モジュールを構築するために pGEM-MoTALE NI, HD, NN, NG を鋳型として, PRVD-1 および PRVD-2 のプライマーセット (表 12) によりそれぞれ増幅した。得られた増幅産物は TA クローニングによってそれぞれ pGEM-T easy vector に導入し, pGEM-Mo1NI, 1HD, 1NN, 1NG とした。同様に pGEM-MoTALE NI, HD, NN, NG を鋳型として, PRVD-3 および PRVD-4 のプライマーセット (表 12) を用いて pGEM-Mo2NI, 2HD, 2NN, 2NG を, PRVD-5 および PRVD-6 を用いて pGEM-Mo3NI, 3HD, 3NN, 3NG を, PRVD-7 および PRVD-8 を用いて pGEM-Mo4NI, 4HD, 4NN, 4NG を構築した。発現ベクターバックボーンを構築するために, pK18-TALEN backbone NI を鋳型として, TALEN-1 および PTALEN-2 のプライマーセット, PTALEN-3 および PTALEN-12 のプライマーセット, PTALEN-9 および PTALEN-14 のプライマーセット (表 12) を用いてそれぞれ増幅した。同時に pFUS2_a1a (広島大学 山本卓教授より分譲) を鋳型として, PTALEN-1 および PTALEN-2 のプライマーセット (表 12) により lacZ 遺伝子 cassette を増幅した。得られた4つの増幅産物を Fusion PCR により連結し, pGEM-PTEF-Tgla の AscI および PacI サイトに導入したものを pGEM-MoPTALEN backbone NI とした。pGEM-MoPTALEN backbone NI を鋳型として, TALEN-1 および TALENC-2 のプライマーセット, TALENC-1 および PTALEN-14 のプライマーセット (表 12) を用いてそれぞれ増幅し, Fusion PCR により連結した。得られた増幅産物を pGEM-PTEF-Tgla の AscI および PacI サイトに導入したものを pGEM-MoPTALEN backbone HD とした。同様に, pGEM-MoPTALEN backbone NI を鋳型として, TALEN-1 および TALENC-2 のプライマーセット, TALENC-1 および PTALEN-14 のプライマーセット (表 12) を用いて pGEM-MoPTALEN backbone NN を, TALEN-1 および TALENT-2 のプライマーセット, TALENT-1 および PTALEN-14 のプライマーセット (表 12) を用

いて pGEM-MoPTALEN backbone NG を構築した。pGEM-YFP-2A-BSD へのクローニングは 5. (1) と同様に行った。

(2) Golden Gate digestion-ligation による中間ベクターへのモジュールの導入

反応液は 2 μ L で行った。中間ベクター (25 ng/ μ L) を 0.3 μ L, 4 つのモジュール (50 ng/ μ L) をそれぞれ 0.3 μ L, 10 \times T4 DNA ligase buffer を 0.2 μ L, BsaI-HF を 0.1 μ L, T7 ligase を 0.1 μ L それぞれ PCR チューブに調製し, 超純水により 2 μ L にメスアップして切断・連結反応液とした。反応条件は 37 $^{\circ}$ C で 5 分, 16 $^{\circ}$ C で 10 分を 3 サイクル行った。反応後, 10 \times NEB buffer 4 を 0.25 μ L, BSA (1 mg/mL) を 0.25 μ L, BsaI-HF を 0.1 μ L 加えて, 50 $^{\circ}$ C で 30 分間, 80 $^{\circ}$ C で 5 分間処理した。

(3) Golden Gate digestion-ligation による backbone ベクターへの導入

反応液は 4 μ L で行った。各種中間ベクターにモジュールを導入した 4 つのプラスミド (50 ng/ μ L) をそれぞれ 0.6 μ L, 対応した pGEM-MoPTALEN backbone (50 ng/ μ L) を 0.3 μ L, 10 \times T4DNA ligase buffer を 0.4 μ L, Quick ligase (NEB) を 0.2 μ L, Esp3I を 0.2 μ L それぞれ PCR チューブに加えて切断・連結反応を行った。反応条件は 37 $^{\circ}$ C で 5 分, 16 $^{\circ}$ C で 10 分を 6 サイクル行った。反応後, 10 \times Tango buffer を 0.5 μ L, DTT (10 mM) を 0.5 μ L, Esp3I を 0.2 μ L を加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間, 80 $^{\circ}$ C で 5 分間処理した。

7. *Scytalone dehydratase (SDH)* 破壊ベクターの構築

SDH 遺伝子を標的とした破壊ベクターを構築するために, *SDH* 遺伝子上流 (1169 bp) および下流 (1242 bp) の配列を Scytalone-17 および Scytalone-18 のプライマーセット, Scytalone-19 および Scytalone-20 のプライマーセット (表 12) によってそれぞれ増幅し, Fusion PCR によって連結した。得られた増幅産物は pUC19 ベクターの BamHI および HindIII サイトに挿入し, pUC-*SDH* とした。pUC-*SDH* の ApaI サイトに *bar* cassette を挿入し, pTV-*SDH* とした。

表 12 実験に供試したプライマーリスト

Primer name	Oligo sequence	Length (nt)
M15	TTCATACACAACCGTCGGCGC	22
ZFEBT-4	ATTACCCTGTTATCCCTAGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGA	44
ZFEBT-1	CCTAGGGATAACAGGGTAATTTATTACTGCGGCTTTAAAGCCG	44
M16	GCGAAATGGATTGATTGTTT	20
RVD-1	CTCACCCCGAGCAGGTCGTCGCCA	25
RVD-2	ACCGTGGGCCTGACAGAGGACGGGG	25
RVDC-1	GTCGCCATCGCCTCGCACGACGGTGGTAAGCAGGCC	36
RVDC-2	GGCCTGCTTACCACCGTCGTGCGAGGCGATGGCGAC	36
RVDG-1	GTCGCCATCGCCTCGAACAGGGTGGTAAGCAGGCC	36
RVDG-2	GGCCTGCTTACCACCGTTCGAGGCGATGGCGAC	36
RVDT-1	GTCGCCATCGCCTCGAACGGTGGTGGTAAGCAGGCC	36
RVDT-2	GGCCTGCTTACCACCGTTCGAGGCGATGGCGAC	36
TALEN-1	GGCGCGCCGCTAGCATGGAACAAGGACC	30
ccdB-2	TGGGGTGCCTAATGCGGCCGCGGTCTCTGTGAGGTTGAGGGGG	44
ccdB-3	ACAGCCAGTCTGCAGGTCGACGGTCTCGACTCACCCCGAGCAG	44
TALEN-2	TTAATTAAGGATCCGGCGACACGGTGGCAG	30
ccdB-4	TGCTCGGGGGTGAGTCGAGACCGTCGACCTGCAGACTGGCTGTG	44
TALENC-1	GTCGCCATCGCCTCGCACGACGGTGGTTCGTCGCCGCC	36
TALENC-2	GGCGGGACGACCACCGTCGTGCGAGGCGATGGCGAC	36
TALEN-2	TTAATTAAGGATCCGGCGACACGGTGGCAG	30
TALENG-1	GTCGCCATCGCCTCGAACAGGGTGGTTCGTCGCCGCC	36
TALENG-2	GGCGGGACGACCACCGTTCGAGGCGATGGCGAC	36
TALENT-1	GTCGCCATCGCCTCGAACGGTGGTTCGTCGCCGCC	32
TALENT-2	GGCGGGACGACCACCGTTCGAGGCGATGGCGAC	32
Mo Fok I 1	AGGGGATCCCAGCTCGTCAAGTCGGAGCTCGAGGAGAAGAAGTCGGAGCTCCGTCACAAGCTCAAGTACG	70
Mo Fok I 2	TCGAGTTACGGGCGATCTCGATGAGCTCGATGTAAGTTCGTTGGGGACGTAAGTTCGTTGAGCTTGAGCGGAGCTC	70
Mo Fok I 3	CTCATCGAGATCGCCCGTAACTCGACCCAGGACCGTATCCTCGAGATGAAGGTCATGGAGTTCTTCATGA	70
Mo Fok I 4	GCTTACGCGAACCACCGAGGTGCTTACCACGGTAACCGTAGACCTTCATGAAGAAGTCCATGACCTTCAT	70
Mo Fok I 5	AAGCACCTCGGTGGTTTCGCGTAAGCCCGACGGTGCCATCTACACCGTTCGCGCCATCGACTACGGTG	70
Mo Fok I 6	TGGGGAGGTTGTAACACCCGAGTAGGCCTGGTGTGCGACGATGACACCGTAGTCGATGGGCGAACCGAC	70
Mo Fok I 7	TACTCGGGTGGTTACAACCTCCCATCGGTCAGGCCGACGAGATGCAGCGTTACGTCGAGGAGAACCAGA	70
Mo Fok I 8	GGTAGACCTTCCACCACCTCGTTGGGGTTGATGTGCTTGTACGGGCTGGTTCTCCTCGACGTAACGCTG	70
Mo Fok I 9	CCCAACGAGTGGTGAAGGTCTACCCCTCGTCCGTCACCGAGTTCAAGTTCCTTCTCGTTCGGGTCAC	70
Mo Fok I 10	TGATGTGGTTGAGACGGGTGAGCTGGGCCTTGTAGTTACCCTTGAAGTGACCCGAGACGAAGAGGAAGT	70
Mo Fok I 11	CAGCTCACCCGTCTCAACCACATCACCACCTGTAACGGTGCCTCCTCCTCGGTCGAGGAGCTCCTCATCG	70
Mo Fok I 12	GGACCTCCTCAAGGGTGAGGGTACCGGCTTGTATCATCTCACCACCGATGAGGAGCTCCTCGACCGAGAG	70
Mo Fok I 13	GGTACCCTCACCTTGGAGGAGTCCGTCGTAAGTTCAACAACGGTGAAGTCAACTTCGATCCAAAAAAGA	70
Mo Fok I 14	TTTTTGGATCTACCTTTCTTTCTTTTTTGGATCTACCTTTCTTTCTTTTTTGGATCGAAGTTGATCTC	70
Mo Fok I 15	AAGAAGAGAAAGGTAGATCAAAAAAGAAAGAAAGTATAATTAATAAACA	53
Mo Fok-1	GCCGGATCCCAGCTCGTCAAGTCGGAGCTCGAGG	34
PTALEN-14	GCCGGATCCCAGCTCGTCAAGTCGGAGCTCGAGG	38
PRVD-1	GGTCTCGACCCCGACCGTTCGTCGCCAT	30
PRVD-2	GGTCTCCGTCAGACCGTGGTCTGACAGAGGACGGGGAG	40
PRVD-3	GGTCTCGACCCCGAGCAGGTCGTCGCCA	30
PRVD-4	GGTCTCCGTCAGACCGTGGGCCTGACAGAGGACGGGGAGG	40

表 12 実験に供試したプライマーリスト (つづき)

Primer name	Oligo sequence	Length (nt)
PRVD-5	GGTCTCGTGACCCCGACCAGGTCGTGCGCC	30
PRVD-6	GGTCTCCTCAGACCGTGGGCCTGACAGAGGACGGGGAGGA	40
PRVD-7	GGTCTCGCTGACCCCGCCAGGTCGTGCGC	30
PRVD-8	GGTCTCCAGGCCGTGGTCCTGACAGAGGACGGGGAGGAG	40
PTALEN-2	GTAGCGGCGCCCGTCTCCTTGAGGGGGCACCCGGTGAGGGCG	42
PTALEN-3	CCACCGGTCGTCTCACCCCGGAGCAGGTCGTGCGCATCGCCTC	44
PTALEN-12	GCGGGTGAGCTGGGCCTTGTAGTTACCCTGAAGTGACCCGAAA	44
PTALEN-9	TTCGGGTCACTTCAAGGGTAACTACAAGGCCAGCTCACCCGC	44
PTALEN-1	CCTCACCGGTGCCCCCTCAAGGAGACGGGCGCCGCTACAGG	42
Scytalone-17	CGGGGATCCGTAGAGACAAGCAAGCAGTCCGA	34
Scytalone-18	GGACACCTTCTCCGGGCCGGGGTCGCCACACCTGCTTGCTC	44
Scytalone-19	GCTGGGCGACCCCGGGCCGGAGAAGGTGTCCGAGGACGAGGTC	44
Scytalone-20	GCCAAGCTTCTCGATTGCCCGTTGGCAAATGCG	34
ExF-1	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTCTCTCACCCCGAGCAGGTCGTC	64
In-R1	TCTTATCGGTGCTTCGTTCTCGTCTCCGGTGAGGCCGTGGGCCTGACAGAGGA	53
In-F2	CTGTATTAGGACGAGTTGCCCGTCTCGCACCCCGAGCAGGTCGTGCGC	48
In-R2	CGTTTCTTCCGGTCGTTAGCGTCTCTAGTCAGACCGTGGGCCTGACAG	49
In-F3	CCAAAGATTCAACCGTCTCGTCTCGGACTCCCGAGCAGGTCGTC	46
In-R3	TGAGCCTATGATTCCCGTCTCTGAGGCCGTGGGCCTGACAGAG	48
In-F4	TATTCATGCTTGGACGACTCGTCTCGCCTCACCCCGAGCAGGTCGTC	49
In-R4	AGTCTGTCTTCCCTTTCCCGTCTCTCAGACCGTGGGCCTGACAGAG	48
In-F5	GTCCTAGTGAGGAATACCGCGTCTCGTCTGACCCCGAGCAGGTCGTC	49
In-R5	CCGAAGAATCGCAGATCTACGTCTCTCGTAAGACCGTGGGCCTGACAG	49
In-F6	TTCTTGATACCGTAGCTCGCGTCTCGTACGCCCGAGCAGGTCGTCGC	48
Ex-R1	GCTGACCGTCTCCGTTCACTGTCTTTCCCTTTCCGGTCTCTCAATCCGTGGGCCTGACAG	63
Ex-F2	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTCTCGATTGACACCGGAACAAGTTGTGCGCCATCGCCTCG	78
Ex-R2	GCTGACCGTCTCCGTTCACTGTCTTTCCCTTTCCGGTCTCAGCCGTGGGCCTGACAGAG	62
Ex-F3	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTCTCGCGGCCTCACCCCGAGCAGGTCG	67
Ex-R4	GCTGACCGTCTCCGTTCACTGTCTTTCCCTTTCCGGTCTCTGAGTCCGTGGGCCTGACAG	64
Hex-F	CTTAAACCGGCCAACATACC	20
Hex-R	AGTCTGTCTTTCCCTTTCC	20
TALE-SeqF1	CCTCCTCACCGTCGCCGGTG	20
TALE-SeqR1	GCGAGAGCTGGGCGACGATC	20
TALE-F	GTGCCCCCTCAACCTGACCCAG	24
TALEN-R1	GGCGACCGGTGCGAGGTACGCTC	24
Scytalone-2	TCTATGAGCGTGTGCCAATGTCCA	25
Scytalone-3	ATGGGTTCGCAAGTCAAAAGAGCG	25
Scytalone-7	CAAAACAAGCAAAACAATGGCGTTTT	25
Scytalone-4	AAAGATCCTGTCAAAGTCGAACTCG	25
FokI-1	TCGTCAAAGTCGGAGCTCGAGGAGAA	25
FokI-2	GGGTGAGCTGGGCCTTGTAGTTACC	25

III. 結果

1. イネいもち病菌用 TALEN tool box を用いた DNA 二本鎖切断導入

a. *TG-YFSCEEET::BSD* 導入システムの作出

Sanjana ら (2012) が構築した TALENs tool box kit は基本的に FokI タンパク質の左右に存在する Left target および Right target の認識配列が 19 bp ずつの計 36 bp となるよう設計されている。また, Left TALEN および Right TALEN 間のスペーサー領域は 14~20 bp 程度必要であり (図 41), これまで用いてきた *YFP::BSD* 簡易相同組換え検出系により活性を評価する場合, TALEN 認識配列と切断領域が合計で 50~70 bp 程度必要となる。そこで, TALEN の DNA 二本鎖切断活性を簡易的に評価するために, ターゲットとなる *TG-YFSCEEET::BSD* を構築した。*TG-YFSCEEET::BSD* は *YFP::BSD* 遺伝子の開始コドンから 327 bp の位置に I-SceI の認識配列および Zinc finger nuclease の評価系に用いられている EB 配列 (Cornu and Cathomen, 2007) を挿入し, 計 52 bp の TALENs ターゲット配列およびスペーサー配列とした。

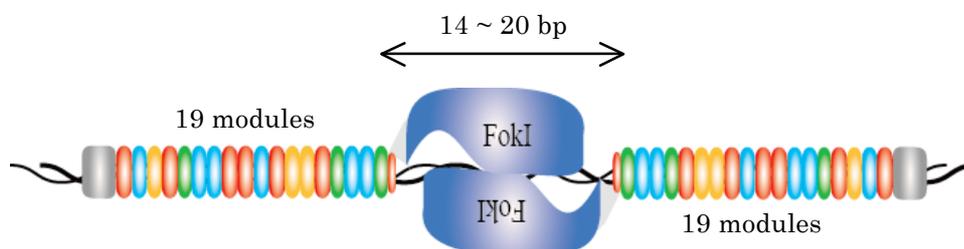
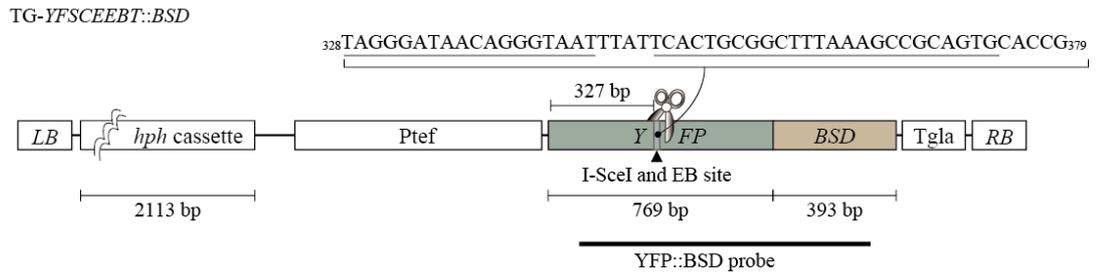


図 41 モジュール数とスペーサー領域の模式図

ATMT 法により *TG-YFSCEEET::BSD* 遺伝子を導入し, ハイグロマイシン B (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) による選抜とサザンハイブリダイゼーションによって *TG-YFSCEEET::BSD* 配列がシングルコピーで導入されている菌株を取得した (図 42)。得られた EBTG2 系統を以下の実験に用いた。EBTG2 系統では YFP 蛍光およびブラストサイジン S への耐性は確認されなかった。一方で, I-SceI 遺伝子と共に *RS-YFP::BSD* を相同配列として EBTG2 系統に共導入した際にはこれまでと同様に, 複数のブラストサイジン S 耐性株および YFP 蛍光を有する組換え株が出現した。

a



b

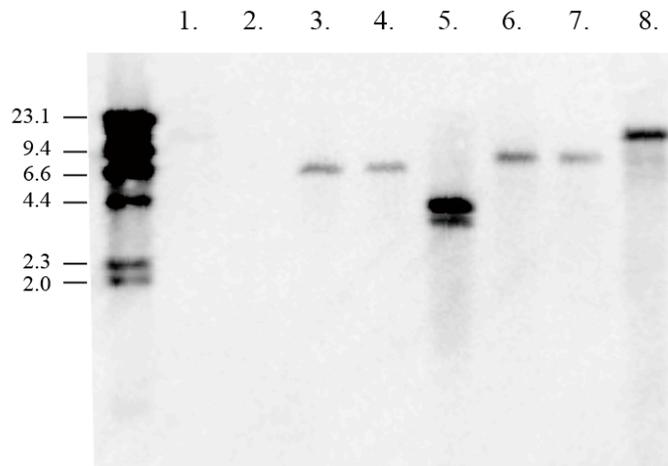


図 42 TG-*YFSCEEBT::BSD* の模式図と導入系統のサザンブロット

a TG-*YFSCEEBT::BSD* 模式図

b 導入系統のサザンブロット結果

各系統のゲノム DNA を *ApaI* (A) および *NheI* (N), *XbaI* (X) および *NheI* (N) によりそれぞれ消化して YFP::BSD プローブで検出した。

1: wild-type (A/N), 2: wild-type (X/N), 3~5: EBTG2, 6, 10 (A/N)

6~8: EBTG2, 6, 10 (X/N)

b. TALEN の構築

TALEN Targeter (<https://boglab.plp.iastate.edu/>) により TG-*YFSCEEBT::BSD* 配列の I-SceI および EB 認識配列をターゲットとした TALEN モジュール配列を選定した。I-SceI 認識配列から EB 配列にかけて (19 bp: 5'-AACAGGGTAATTTATTTCAC-3') Left TALEN が, EB 配列から YFP 配列にかけて (19 bp: 5'-TGCACCGCGCGCCGAGGTG-3') Right TALEN が認識するように設計し, スペース領域は 19 bp とした (図 43)。

t AACAGGGTAATTTATTTCAC

t AACAGGGTAATTTATTTCACtgcggetttaaagccgcagTGCACCGCGCGCCGAGGTG a
ACGTGGCGCGCGGCAGGTC t

-  : Start thymine of TALEN target site
-  : Left TALEN recognition sequence
-  : 0.5 repeat at the site of TALEN
-  : Spacer and DSB site
-  : Right TALEN recognition sequence

図 43 TG-*YFSCEEBT::BSD* を標的とした TALEN の設計

続いて, pGEM-MoTALE NI, HD, NN, NG を鋳型として, Ex-F1 および In-R1, In-F2 および In-R2, In-F3 および In-R3, In-F4 および In-R4, In-F5 および In-R5, In-F6 および Ex-R1, Ex-F2 および In-R1, In-F6 および Ex-R2, Ex-F3 および In-R1, In-F6 および Ex-R4 のプライマーセット (表 12) によりそれぞれモジュールを増幅し, タイプ IIs 制限酵素とその付着末端を付加した (図 44)。増幅産物をゲルから切り出して精製した後に, 図 45 に示したように 96 穴プレートに各モジュールをプールした。

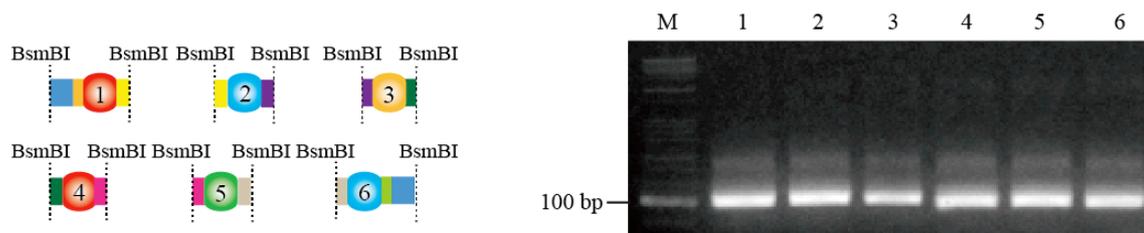


図 44 各モジュールの増幅と制限酵素サイトの付加

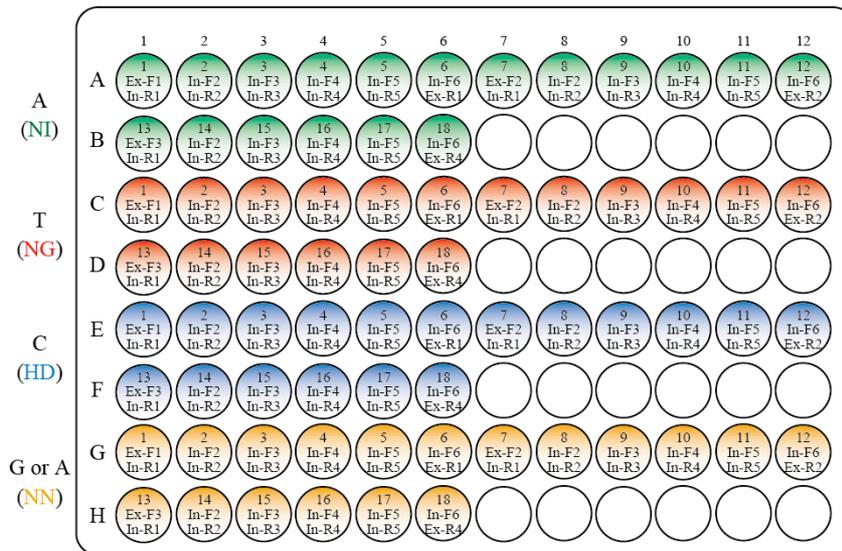


図 45 各モジュールの増幅産物と 96 穴プレートへのプール

TG-YFSCEEET::BSD のターゲット配列の並びにしたがって、Left TALEN 構築用のそれぞれ 6 つのモジュール 3 種 (A1-A2-G3-A4-E5-E6 / E7-C8-A9-A10-C11-C12 / D1-B2-D3-D4-H5-B6) および Right TLANE 構築用のそれぞれ 6 つのモジュール 3 種 (G1-A2-G3-G4-C5-G6 / E7-E8-G9-E10-G11-E12 / H1-F2-F3-D4-F5-H6) を 96 穴プレートから選択し (図 45), Golden Gate digestion-ligation 反応後, Plasmid-Safe DNase 処理によって不適切な ligation 反応により生じた DNA 断片を除去した (図 46a)。続いて, Plasmid-Safe DNase 処理後の反応液を鋳型として, Hex-F および Hex-R のプライマーセット (表 12) により, 6 つのモジュールが連結したヘキサマーの増幅を行った (図 46)。

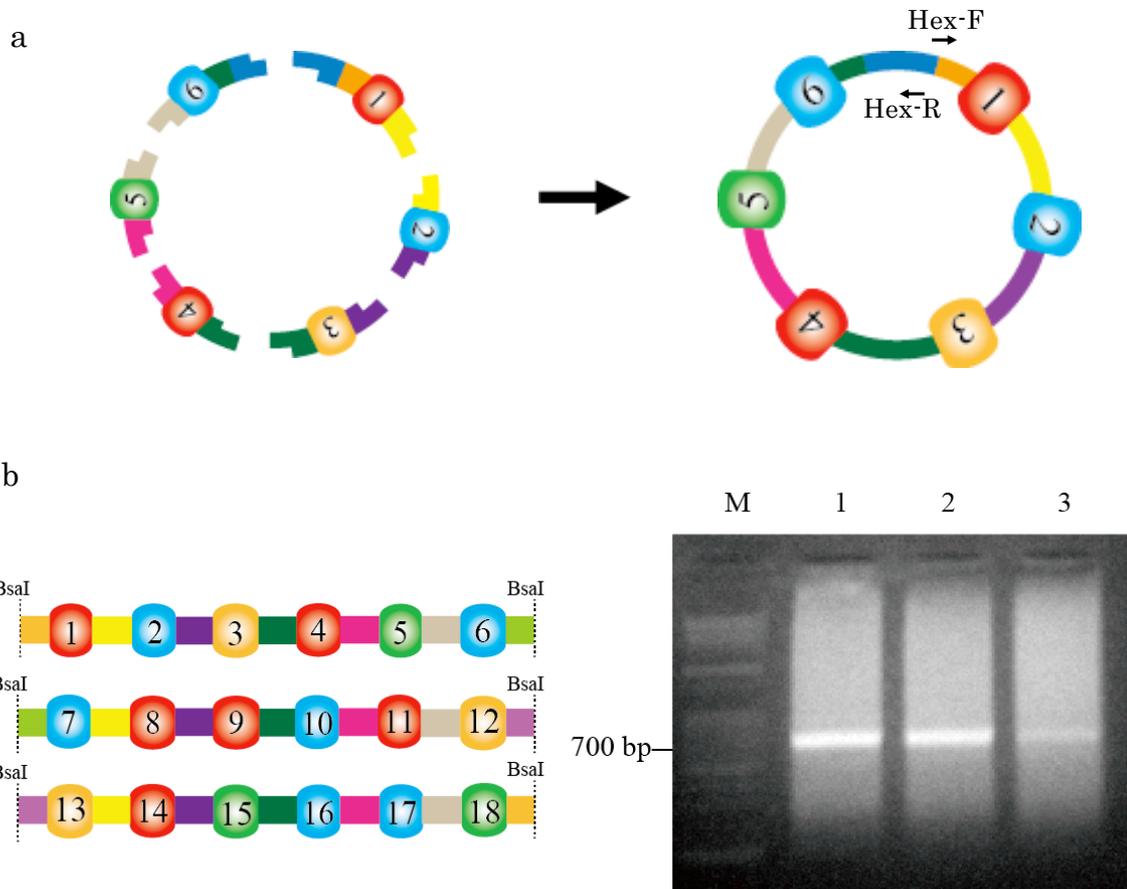


図 46 Golden Gate digestion-ligation 反応とヘキサマーの増幅

a Golden Gate digestion-ligation 反応の模式図

b Hex-F, R プライマーを用いたヘキサマーの増幅

得られた各 3 つのヘキサマーを用いて pK18-TALEN backbone HD (Left TALEN) および pK18-TALEN backbone NI (Right TALEN) に Golden Gate digestion-ligation により挿入した。得られた反応液を用いて Plasmid-Safe DNase 処理を行い、反応液全量を形質転換に使用した (図 47)。得られた形質転換コロニーを鋳型として TALE-Seq-F1 および TALE-Seq-R1 のプライマーセットにより PCR を行い、目的の増幅断片が得られたコロニーをそれぞれ Left TALEN および Right TALEN とした (図 47)。

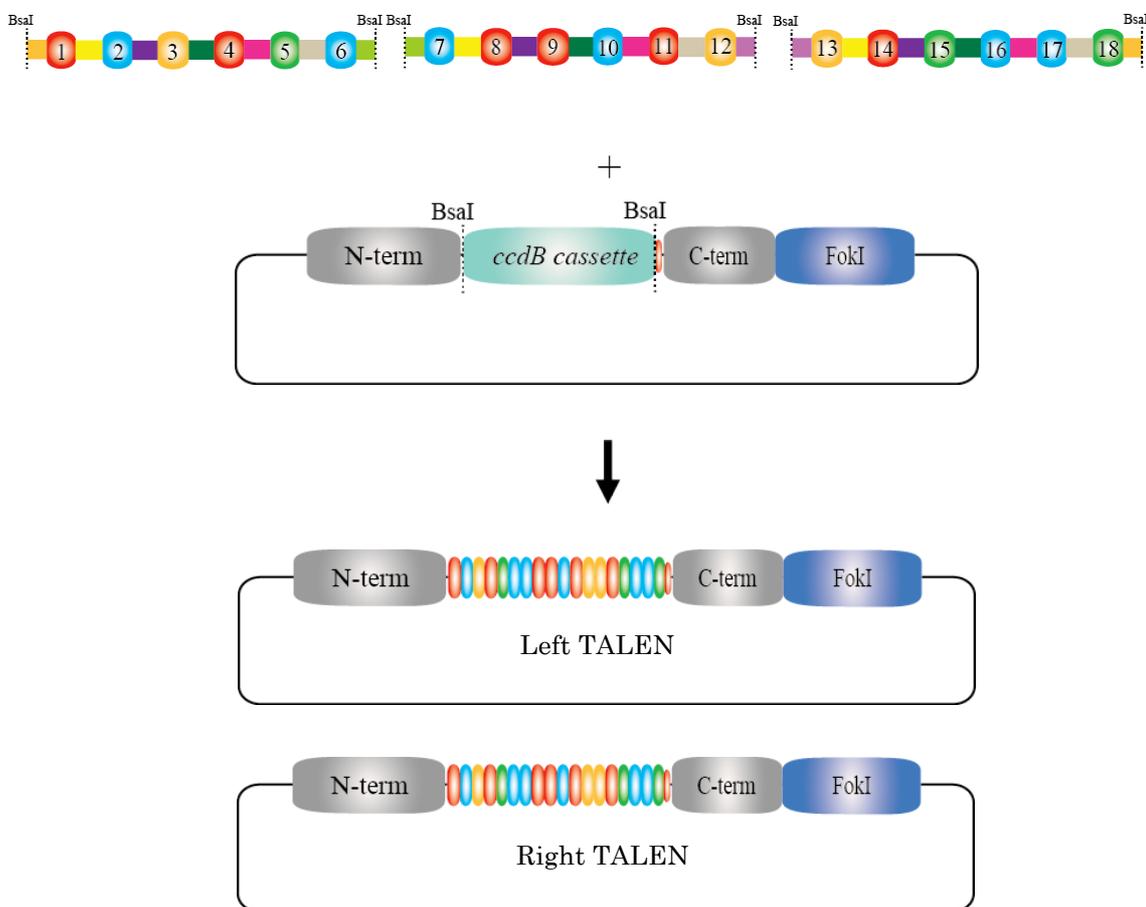


図 47 Golden Gate digestion-ligation によるバックボーンベクターへのヘキサマー導入

それぞれ 3 つの Left TALEN (no. 1, 2, 3) および Right TALEN (no. 1, 2, 3) を単一のプロモーターから 2 種のタンパク質を同時に発現することが可能な 2A ペプチド連結バイシストロン性ベクター pGEM-YFP-2A-BSD に計 9 つの組み合わせで乗せ換えた pTALEN-L-2A-R no. 1~9 を構築した (図 48a)。

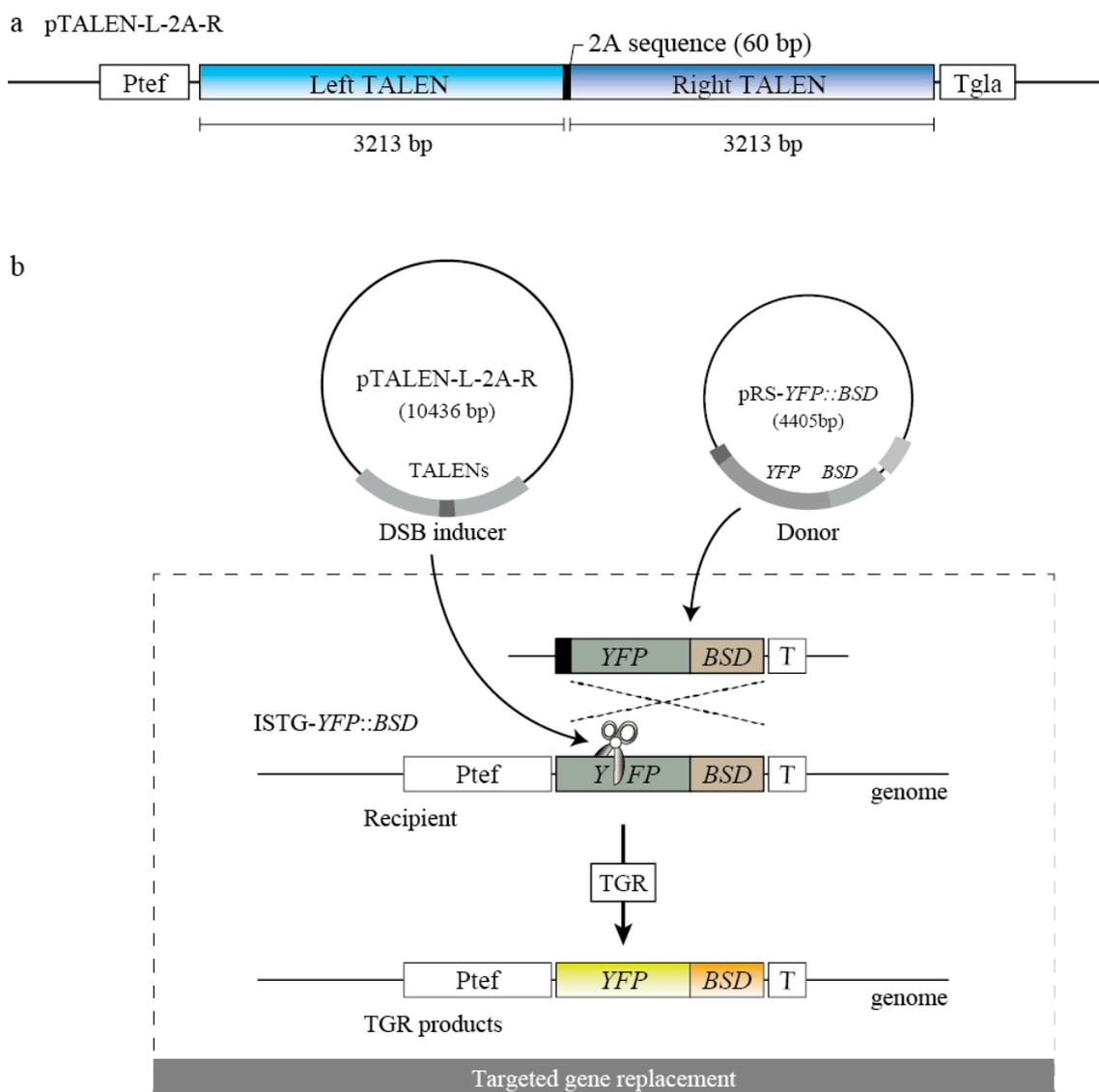


図 48 pTALEN-L-2A-R の模式図 (a) および切断活性評価系の概略図 (b)

c. TALEN の活性調査

構築した pTALEN-L-2A-R no.1~no.9 を pRS-YFP::BSD と共に, EBTG2 系統に PEG 法により導入した (図 48)。導入してから 24 時間後に, ブラストサイジン S (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む PSA 培地上に塗布し, 菌糸の生育および YFP 蛍光が確認できた株を組換え株として算出した。導入した 9 つの pTALEN-L-2A-R の中で no. 5 のみ 49 の組換え株が確認され, その活性は I-SceI の約 30% 程度であった (図 49)。以上より, イネいもち病菌ゲノムにおいても TALEN を用いた DNA 二本鎖切断の導入が可能であることが示された。しかしながら, no. 5 以外の pTALEN-L/R の導入により組換え株を得ることができず, 本手法では活性型 TALEN の作製効率が低いことが考えられた。

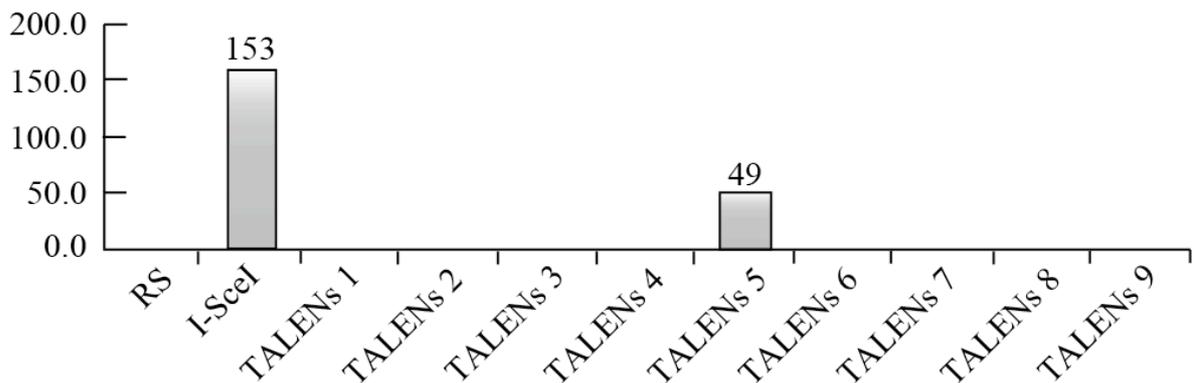


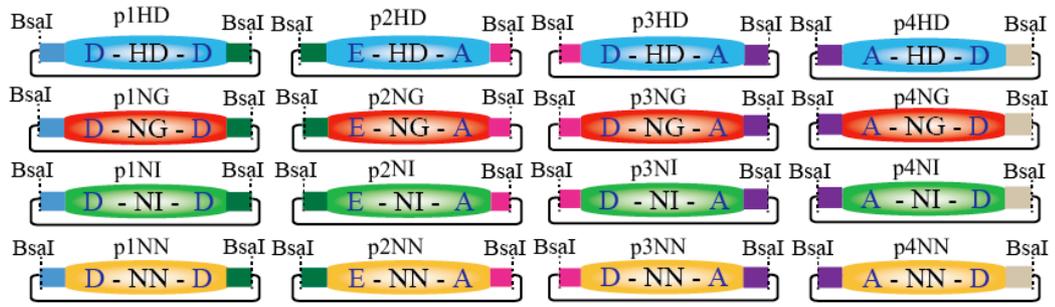
図 49 TALEN 導入によるヌクレアーゼ活性

2. イネいもち病菌用 Platinum TALEN kit の構築と DNA 二本鎖切断導入

a. Platinum TALEN の構築

Sanjana ら (2012) の tool box kit をイネいもち病菌用のコドン使用頻度に最適化した TALEN の構築および DNA 二本鎖切断の導入では、一部のベクターにおいてヌクレアーゼ活性がみられたものの、その作製効率は低く、複数の遺伝子をターゲットとした解析および遺伝子ターゲッティング法として利用するには有用であるとは言い難い。Sanjanara ら (2012) や Cermak ら (2011) は DNA 結合モジュールのアミノ酸配列を RVD 以外固定している。一方で、Miller ら (2011) は RVD 以外のアミノ酸配列にもバリエーションを持たせており、Sander ら (2011) は 4 種類のリピートを周期的に配置することで (I→II→III→IV→I→II→…), その複雑性を再現した。Sakuma ら (2013) はこれら 4 種類のリピート配列を取り入れた PCR を介さないアセンブリー方法 Platinum Golden Gate TALEN kit (Platinum TALEN) の作製に成功している (図 50)。そこで、広島大学との共同研究により、より簡易的かつ高活性型のイネいもち病菌用 Platinum TALEN の構築を行った。上述したイネいもち病菌用 TALEN tool box kit の各遺伝子配列をベースとして Platinum TALEN に最適化した各種 DNA 結合モジュールを有するベクター (pGEM-Mo1NI, 1HD, 1NN, 1NG ~ Mo4NI, 4HD, 4NN, 4NG) および backbone ベクター (pGEM-MoPTALEN backbone NI, HD, NN, NG) を構築した (図 50)。

STEP 1



STEP 2

Number of modules

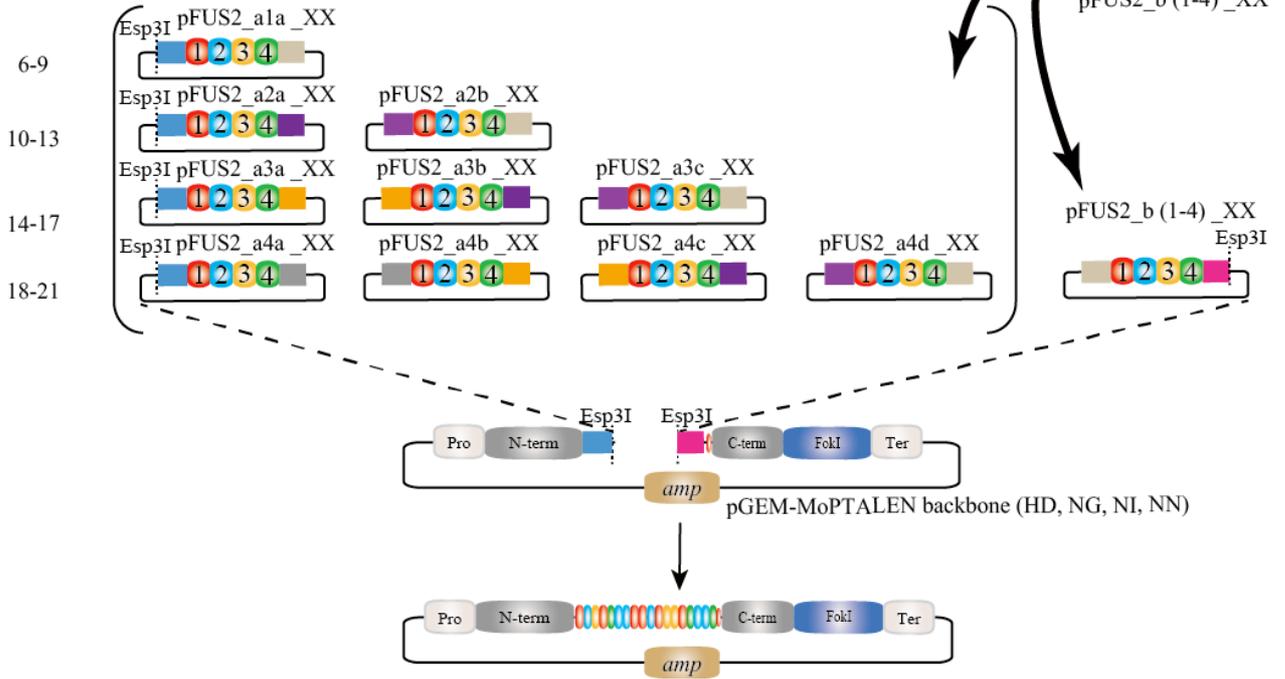


図 50 Platinum TALEN 作製手順の概略図

TALEN Targeter により TG-*YFSCEEBT::BSD* 配列の I-SceI および EB 認識配列をターゲットとした TALEN のモジュール配列を選定した。I-SceI 認識配列から EB 配列 (17 bp: 5'-AACAGGGTAATTTATTC-3') にかけて Left TALEN が, EB 配列から YFP 配列 (17 bp: 5'- CAGTGCACCGCGCGCCG-3') にかけて Right TALEN が認識するように設計し, スペーサー領域は 18 bp とした (図 51)。

t AACAGGGTAATTTATTC

t AACAGGGTAATTTATTC actgcggtttaaagcgg CAGTGCACCGCGCGCCG a
GTCACGTGGCGCGCGGC t

 : Strat tyminine of TALEN target site

 : Left TALEN recognition sequence

 : 0.5 repeat at the site of TALEN

 : Spacer and DSB site

 : Right TALEN recognition sequence

図 51 TG-*YFSCEEBT::BSD* をターゲットとした Platinum TALEN の設計

TG-*YFSCEEBT::BSD* のターゲット配列の並びにしたがって, Left TALEN 構築用のモジュールを有するプラスミド 4 種・4 組 (pGEM-Mo1NI, 2NI, 3HD, 4NI / pGEM-Mo1NN, 2NN, 3NN, 4NG / pGEM-Mo1NI, 2NI, 3NG, 4NG / pGEM-Mo1NG, 2NI, 3NG, 4NG) および Right TLANE 構築用のモジュールを有するプラスミド 4 種・4 組 (pGEM-Mo1HD, 2NN, 3NN, 4HD / pGEM-Mo1NN, 2HD, 3NN, 4HD / pGEM-Mo1NN, 2NN, 3NG, 4NN / pGEM-Mo1HD, 2NI, 3HD, 4NG) を Golden Gate digestion-ligation 反応によりそれぞれの中間ベクター (pFUS2_a3a, a3b, a3c, b4) に導入した (図 50)。青白選抜によって得られた白コロニーを鋳型として pCR_8F1 および pCR_8R1 のプライマーセット (表 12) によりコロニーPCR を行い, 目的の増幅産物 (約 700 bp) が得られたコロニーを後の実験に用いた (図 52)。

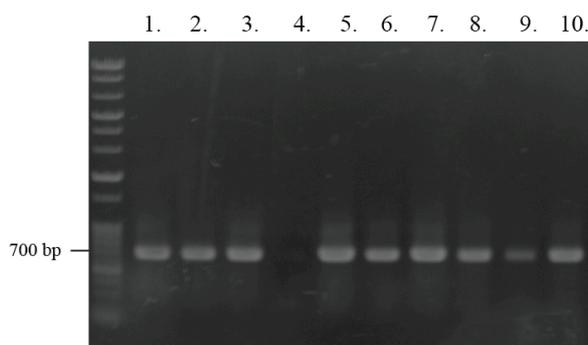


図 52 コロニーPCR による中間ベクターへのモジュール挿入確認

中間ベクターに目的のモジュールが導入された Left TALEN 用ベクター (pFUS2_a3a *YFSCEEEDD::BSD* F1 , _a3b *YFSCEEEDD::BSD* F2 , _a3c *YFSCEEEDD::BSD* F3, _b4 *YFSCEEEDD::BSD* F4) および Right TALEN 用ベクター (pFUS2_a3a *YFSCEEEDD::BSD* R1 , _a3b *YFSCEEEDD::BSD* R2 , _a3c *YFSCEEEDD::BSD* R3, _b4 *YFSCEEEDD::BSD* R4) を Golden Gate digestion-ligation 反応により , pGEM-MoPTALEN backbone HD (Left TALEN) および pGEM-MoPTALEN backbone NN (Right TALEN) への導入を行った (図 50)。青白選抜によって得られた白コロニーを鋳型として TALE-F および TALEN-R1 のプライマーセット (表 12) により PCR を行い , 目的の増幅産物 (約 1,800 bp) が得られたコロニーをそれぞれ pPTALEN-*YFSCEEEDD::BSD* L (Left TALEN) および pPTALEN-*YFSCEEEDD::BSD* R (Right TALEN) とした (図 53)。2つの Left TALEN (no. 1, 2) および Right TALEN (no. 1, 2) を pGEM-*YFP-2A-BSD* に計 4つの組み合わせで乗せ換えた pPTALEN-L-2A-R *YFSCEEEDD::BSD* no.1~no.4 を構築した (図 54)。

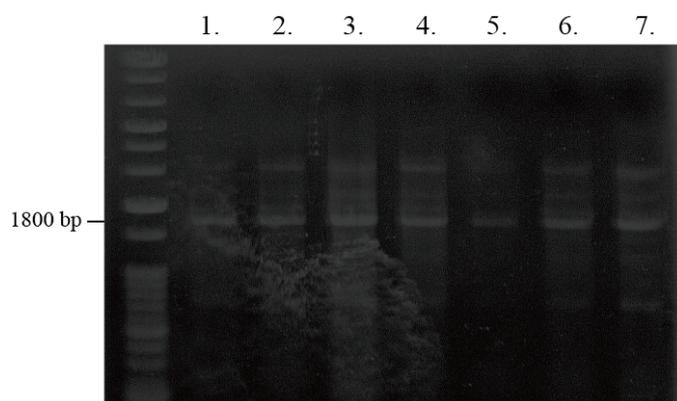


図 53 コロニーPCRによる発現ベクターへのモジュール挿入確認

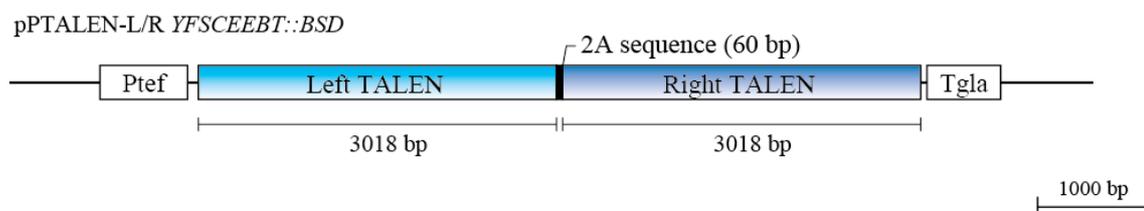


図 54 pPTALEN-L-2A-R *YFSCEEEDD::BSD* の模式図

b. Platinum TALEN の活性調査

構築した pPTALEN-L-2A-R *YFSCEEET::BSD* no.1~no.4 を pRS-*YFP::BSD* と共に、EBTG2 系統に対して PEG 法により導入した。導入してから 24 時間後に、ブラストサイジン S (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む PSA 培地上に塗布し、菌糸の生育および YFP 蛍光が確認できた株を組換え株として算出した。導入した全ての pPTALEN-L-2A-R *YFSCEEET::BSD* no.1~no.4 において複数のコロニーの出現を確認した (図 55)。各 pPTALEN-L-2A-R *YFSCEEET::BSD* no.1~no.4 間におけるコロニー数に大きな差異はなく、TALEN 発現ベクターの作製効率の向上に成功した (図 55)。

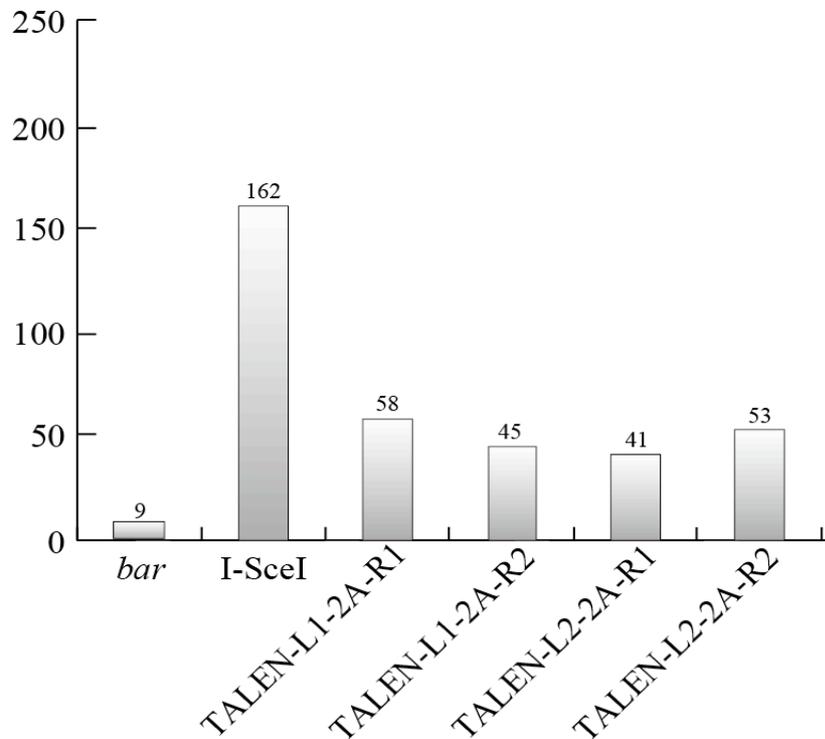


図 55 pPTALEN-L-2A-R 導入によるヌクレアーゼ活性

c. Platinum TALEN の導入方法の検討

標的遺伝子配列への効果的な DNA 二本鎖切断の導入には、ヌクレアーゼベクターの細胞導入効率とヌクレアーゼの強発現化が重要である。そこで、第三章 2. b. に示した 2A ペプチド連結バイシストロン性ベクターを用いた TALEN 導入方法とは別に **Left TALEN** と **Right TALEN** の各ベクターを **pRS-YFP::BSD** と共に **EBTG2** 系統に対して導入する方法により、DNA 二本鎖切断活性を相同組換え株数により評価した (図 56)。共導入の結果、相同組換えが生じたことを示す、ブラストサイジン S への耐性と YFP 蛍光を有する複数のコロニーを確認した (図 57)。得られたコロニー数は、2A ペプチド連結バイシストロン性ベクターを用いた際のコロニー数と比較して明らかに上昇したことから、TALEN の導入には個々のベクターを共導入することで、より高い細胞導入効率とヌクレアーゼ活性を示すことが明らかになった。

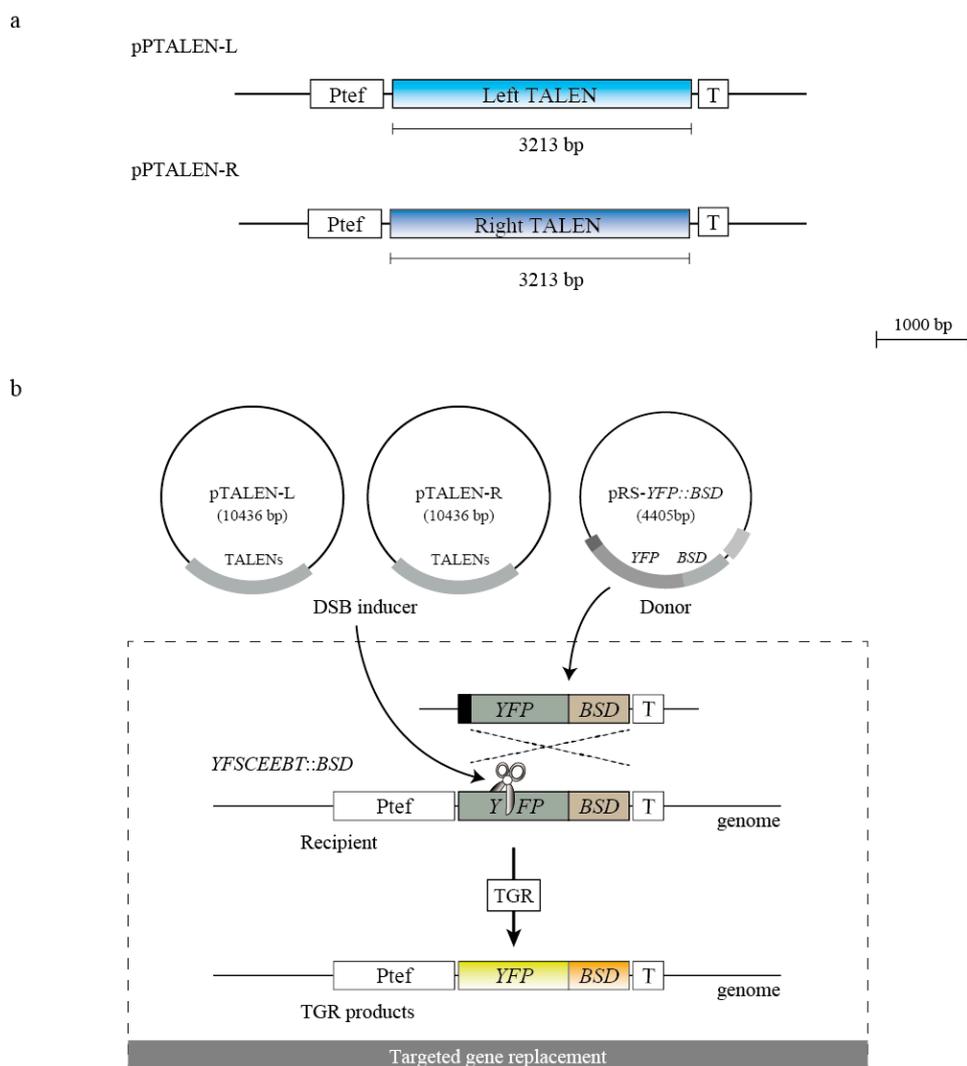


図 56 pPTALEN-L および R の模式図と切断活性評価系の概略図

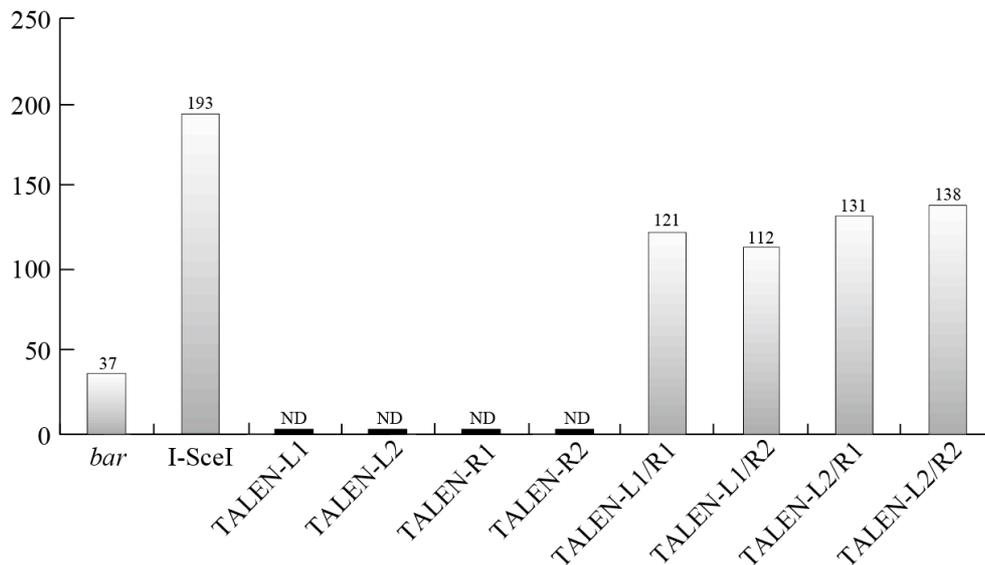


図 57 pTALEN L および R の共導入によるヌクレアーゼ活性

3. 内生遺伝子 *SDH* をターゲットとした DNA 二本鎖切断の導入

a. Platinum TALEN の構築

イネいもち病菌 70-15 株ゲノムデータベース (<http://www.broad.mit.edu>) をもとに設計した Scytalone-2 および Scytalone-3 のプライマーセット (表 12) を用いて北-1 株が保有する *SDH* 遺伝子の配列を決定した。得られた配列をもとに TALEN Targeter により *SDH* 配列を標的とした TALEN モジュール配列を選定した。Left TALEN および Right TALEN とも *SDH* 配列の 17 bp を認識するように設計し、スペーサー領域は 16 bp とした (図 58)。

t GGGCGACCCACCTCC
t GGGCGACCCACCTCC gcacgcagcaattcat CGGCGGCACGCGCTGGG a
GCCGCCGTGCGCGACCC t

- : Strat tyamine of TALEN target site
- : Left TALEN recognition sequence
- : 0.5 repeat at the site of TALEN
- : Spacer and DSB site
- : Right TALEN recognition sequence

図 58 *SDH* 遺伝子をターゲットとした Platinum TALEN の設計

SDH 遺伝子のターゲット配列の並びにしたがって、Left TALEN 構築用のそれぞれのモジュールを有するプラスミド 4 種・4 組 (pGEM-Mo1NN, 2NN, 3NN, 4HD / pGEM-Mo1NI, 2NI, 3HD, 4HD / pGEM-Mo1HD, 2HD, 3NI, 4HD / pGEM-Mo1HD, 2HD, 3NG, 4HD) および Right TALEN 構築用のそれぞれのモジュールを有するプラスミド 4 種・3 組 (pGEM-Mo1HD, 2HD, 3HD, 4NI / pGEM-Mo1NN, 2NG, 3NN, 4HD / pGEM-Mo1HD, 2NN, 3HD, 4HD) を Golden Gate digestion-ligation 反応により中間ベクターに導入した (図 50)。なお、Left TALEN 作製に用いる中間ベクターの一つは第三章 2.a.により構築した pFUS2_a3b *YFSCEEED::BSD* R2 と同じターゲット配列であったため本実験系においてもそのまま使用した。以下、第三章 2.a.と同様の手法により中間ベクターに目的のモジュールが導入された Left TALEN 用ベクター (pFUS2_a3a *SDH* F1, _a3b *SDH* F2, _a3c *SDH* F3, _b4 *SDH* F4) および Right TALEN 用ベクター (pFUS2_a3a *SDH* R1, _a3b *YFSCEEED::BSD* R2, _a3c *SDH* R3, _b4 *SDH* R4) を構築し、バックボーンベクター pGEM-MoPTALEN backbone HD backbone (Left TALEN 用) および pGEM-MoPTALEN backbone NN (Right TALEN 用) に各モジュールを導入した。得られたプラスミドを pPTALEN-*SDH* L no.1, 2 (Left TALEN) および pPTALEN-*SDH* R no.1, 2 (Right TALEN) とした (図 50)。

b. Platinum TALEN を用いた *SDH* 遺伝子のターゲッティング

イネいもち病菌が保有する *SDH* 遺伝子はメラニン合成系のシタロン脱水過程を担う遺伝子である。したがって、遺伝子ターゲッティング法によって *SDH* 遺伝子が破壊された場合、メラニンの消失による菌糸の白色化によって簡易的に遺伝子ターゲッティング頻度を算出することが可能である。そこで、*bar* cassette の上流および下流に *SDH* 遺伝子を含む約 1,200 bp の相同領域を挿入した破壊ベクター pTV-*SDH* と Left TALEN no.1 / Right TALEN no.1, pTV-*SDH* と Left TALEN no.2 / Right TALEN no.1, pTV-*SDH* と Left TALEN no.1 / Right TALEN no.2, pTV-*SDH* と Left TALEN no.2 / Right TALEN no.2 の 4 種の組み合わせでイネいもち病菌北-1 株のプロトプラストに共導入した (図 59)。

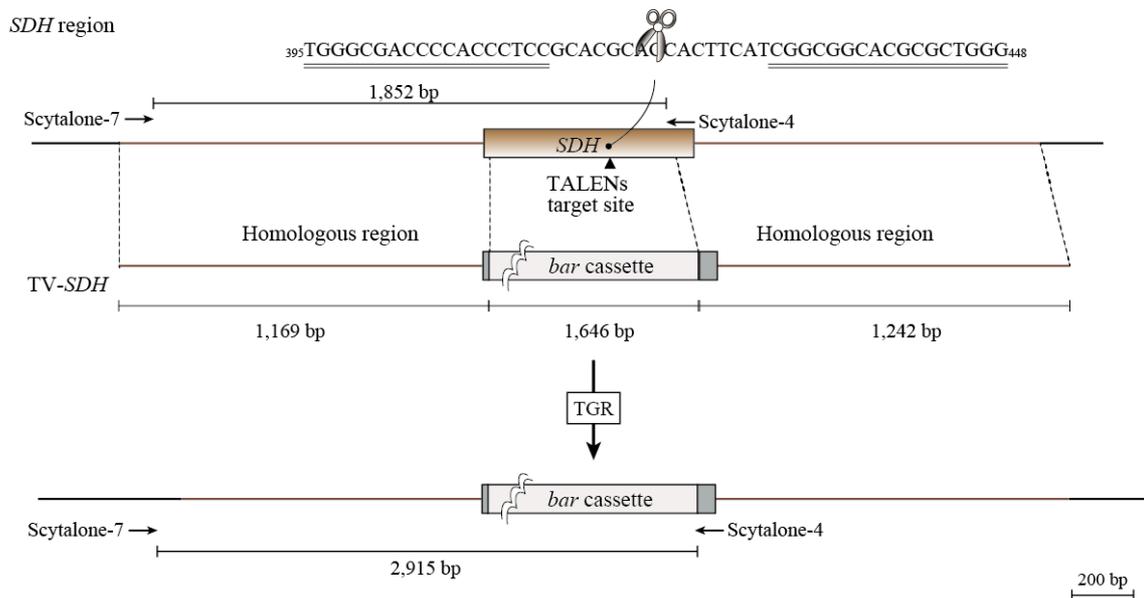


図 59 *SDH* 遺伝子を標的としたターゲッティング系の概略図

導入してから 24 時間後のプロトプラストをビアラフォス (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む PSA 培地上に塗布し、生育が確認されたコロニーを再びビアラフォス (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む PSA 培地に植菌してメラニン合成の有無を確認した。TALEN の導入により得られたビアラフォス耐性株数は 180 ~ 233 株であり、pTV-*SDH* のみを導入した際に得られたビアラフォス耐性株数 (16 株) を大幅に上回った (表 13)。

また、TALEN の導入により得られたビアラフォス耐性株では、全ての菌株でメラニン合成が阻害されたことを示す菌糸の白色化が確認され、100%の効率で *SDH* 遺伝子が破壊されていることが推測された (表 13, 図 60)。

表 13 PTALEN 導入による *SDH* 遺伝子ターゲティング効率

Transgene	Total ^a	White colony ^b	Frequency ^d
TV only	16	0	0%
TV+Left TALEN1+Right TALEN1	225	225	100%
TV+Left TALEN2+Right TALEN1	189	189	100%
TV+Left TALEN1+Right TALEN2	233	233	100%
TV+Left TALEN2+Right TALEN2	180	180	100%

a ビアラフオス耐性コロニー数

b ビアラフオス耐性を示したコロニーの中で白色化が確認された株数

c 遺伝子ターゲティング効率

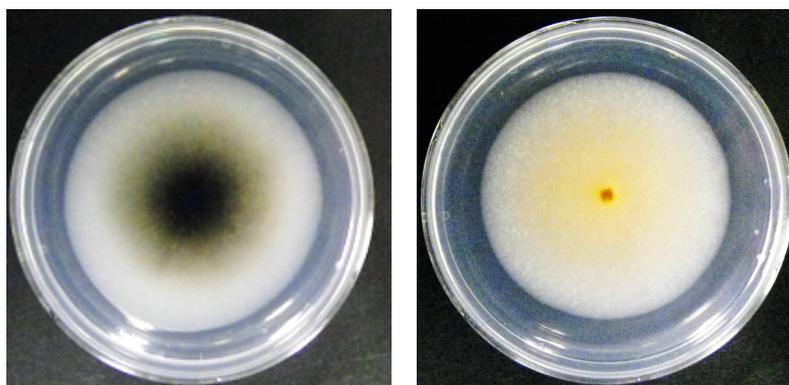


図 60 観察された菌糸の白色化

左：野生株（北-1）

右：TALEN および破壊ベクターの導入によって得られたビアラフオス耐性株

次に、 Left TALEN no.2 / Right TALEN no.2 の導入により得られた 8 菌株から、簡易ゲノム抽出を行い、 Scytalone-7 および Scytalone-4 プライマーセット (表 12) を用いた PCR により *SDH* 遺伝子の破壊を確認した。PCR により、全ての菌株で *SDH* 遺伝子特異的に *bar* cassette が挿入されたことを示す PCR の増幅断片を確認することができた (図 61)。

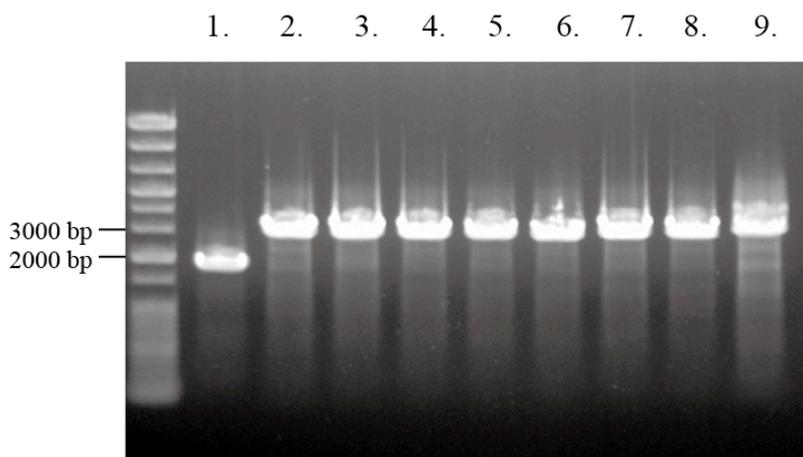


図 61 PCR による *SDH* 遺伝子への破壊ベクター導入確認
1. wild-type, 2~9. 白色化した菌株 no. 1~8

SDH 遺伝子の破壊が確認された 8 菌株に対して、TALEN の FokI 領域を標的とした FokI-1 および FokI-2 プライマーセット (表 12) を用いて PCR を行ったが、PCR による FokI 領域の増幅 (460 bp) は確認されなかった (図 62)。このことから、標的遺伝子である *SDH* 配列以外のゲノム領域にヌクレアーゼ遺伝子が挿入されていないことが示された。したがって、TALEN の一過的な発現によって内生の遺伝子を標的とした DNA 二本鎖切断の導入に成功し、イネいもち病菌における高効率遺伝子ターゲティング法が確立された。

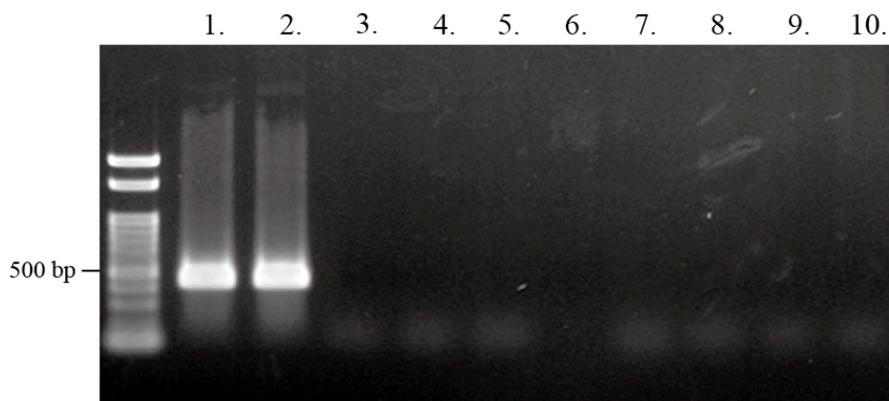


図 63 PCR による FokI 遺伝子の導入確認
1: pPTALEN-scytalone F, 2: pPTALEN-scytalone R
3~9: 白色化した菌株 no. 1~8

IV. 考察

本研究において、TALEN の全ての CDS 領域をイネいもち病菌のコドン使用頻度に最適化することで、TALEN を用いたイネいもち病菌ゲノムへの標的配列特異的な DNA 二本鎖切断の導入に成功した。糸状菌を含む菌類への人工ヌクレアーゼの適応は本研究が初めての例である。Sanjana ら (2012) が発表した TALEN tool box kit は最初のステップであるモジュールの増幅から、発現ベクターを得るに至るまで最短で 2~3 日の短期間で構築することが可能である。しかしながら、本研究において活性を有する TALEN が得られた効率は 1/9 と低い値であった (図 49)。第一章より用いてきたマーカース系を利用した切断活性の簡易評価法であれば各 TALEN クローンの活性を即座に判定することができるが、内生の遺伝子を標的とした順遺伝学的解析や逆遺伝学的解析を目的とする研究に用いるためには作製効率が低すぎるということが問題である。作製効率が低い原因として、作製過程に含まれる PCR による連結されたモジュールヘキサマーの増幅過程が考えられた (図 46)。ヘキサマーは RVD 領域を除いて同一かほぼ同一な配列を有するモジュールが 6 個連続した構造を取るため (図 41)、PCR により TALE リピートを増幅する際に DNA 合成酵素の塩基取り込みエラーやリピートに部分的欠失が生じる可能性が高まる。しかしながら、増幅された TALE リピートは、構造上の特性により通常のシーケンサーを用いて塩基配列を決定することがほぼ不可能であり、TALE リピートが設計通りか否かを判定できない。実際に得られた 9 つの TALEN 発現ベクター間における TALE リピートの遺伝子サイズは同一であったものの、その活性は異なるものであった。一方で、Platinum Gate TALEN kit では発現ベクターの作製まで少なくとも 4~5 日間要するが、基本的な作製手法は Type IIs 制限酵素と T7 ligase (Quick ligase) を用いたモジュール切断と連結によるため、PCR による増幅過程は含まれない。そのため、簡便かつ再現性良く TALE リピートのアセンブリーが可能である (図 50)。作製における最初の 4 モジュールのアセンブリーに必要となる中間ベクタープラスミドの総数は $4^4 + 4^4 + 4^4 + 4 + 4^2 + 4^3 + 4^4 = 1108$ となるため、ある程度のライブラリー化が進めば、最初の Golden Gate digestion-ligation ステップを省略することが可能であり、最終的に 3 日間で発現ベクターを構築できるようになる。

Platinum TALEN と相同配列を共導入することで、TG-YFSCEE $BT::$ BSD を標的とした DNA 二本鎖切断の導入に成功し、複数の組換えコロニーを取得することができた (図 55)。TALEN の導入方法の検討では 2A ペプチド連結バイシストロン性ベクターを用いた導入方法よりも、Left TALEN および Right TALEN を共導入する方法により標的 DNA 配列に高頻度で DNA 二本鎖切断を導入できることを示した (図 55, 56)。2A

ペプチド切断によるバイシストロン性翻訳効率を確認する予備実験として、*YFP::BSD* 遺伝子のスペーサー領域に *2A* 配列を挿入した *pGEM-YFP::2A::BSD* をイネいもち病菌ゲノムに導入した際には、*YFP* 蛍光およびブラストサイジン *S* への耐性を示す形質転換体を取得することができた。また、その表現型は *pGEM-YFP::BSD* を導入した形質転換体との差異はなく、ウエスタンブロット解析により *YFP::2A::BSD* 融合タンパク質が高効率で翻訳され、*YFP* および *BSD* の切断が行われていることが示された。したがって、細胞への *TALEN* の導入をより高効率に行うために、*2A* ペプチド連結バイシストロン性ベクター *pPTALEN-L-2A-R YFSCEEET::BSD* を用いたが、それぞれの *TALEN* ベクターを共導入した場合と比較すると、その *TALEN* ヌクレアーゼ活性は低いものであった。その理由として、*TALEN* のような連続したリピートを有することや *YFP::BSD* 遺伝子 (約 1,200 bp) よりも CDS 領域長が増加 (約 6,000 bp) することによって単一のプロモーター下での mRNA 転写量が低下してしまうことが考えられた。一方、各 *TALEN* ヌクレアーゼと相同配列の 3 種類のプラスミドを同時に導入する方法では全てのプラスミドが細胞内に導入された場合のみ、その *TALEN* ヌクレアーゼ活性と相同組換えが誘導されるため、細胞導入効率の低下が懸念されたが、イネいもち病菌プロトプラストへのプラスミドの一過的な導入は、想定していた以上に高効率に導入されていることが分かり、より簡易的な *TALEN* の導入方法と作製方法の短縮が可能となった。正確な細胞導入効率については今後検討すべきではあるが、複数の *TALEN* と破壊ベクターを高効率に細胞に導入する技術が確立できれば、一度の遺伝子導入により複数の遺伝子破壊を行う多重遺伝子破壊法やマーカーフリーな遺伝子改変法の確立が可能となるかもしれない。

本研究においては、内生遺伝子を標的とした *TALEN* の活性検定として *SDH* 遺伝子を標的とした遺伝子ターゲティング効率により *TALEN* 活性を評価した。Platinum *TALEN* を用いることにより、100%の効率で遺伝子を破壊することが可能となり、本系が遺伝子ターゲティング法への応用に非常に有用であることが示された (表 13, 図 60)。このような飛躍的な遺伝子ターゲティング効率の向上は *TALEN* と破壊ベクターの一過的な導入によってもたらされたと考えられるため、ゲノムに余計な配列が残存する可能性は低い (図 63)。また、通常のイネいもち病菌プロトプラストへの遺伝子導入では、選抜培地上に塗布してから 3 ~ 5 日後にコロニーの形成が確認されるが、*TALEN* を共導入した菌株においては選抜培地上に塗布してから 2 日でコロニーの形成が確認され、3 日後には形質転換体として分析することが可能な菌糸量のコロニーが形成された。このようなコロニー形成期間の短縮は DNA 二本鎖切断が導入されてから、相同組換えによって修復されるまでが非常に迅速に行われていることを示唆している。

標的遺伝子の破壊を目的としない通常の形質転換では、プラスミド DNA が細胞内または核内で分解されて線状化された後に、ゲノム内にランダムに生じた DNA 二本鎖切断部位との対合と、NHEJ 修復による連結によって線状化されたプラスミドがゲノム内に挿入される (図 20)。一方、ヌクレアーゼと標的遺伝子の相同配列を導入した場合には、一過的な DNA 二本鎖切断の導入とその相同組換え修復によってプラスミドの状態でもゲノムに取り込まれることになる (図 56)。したがって、自然発生的に生じる DNA 二本鎖切断と NHEJ 修復によるランダムな遺伝子導入よりも、人工ヌクレアーゼを用いた特異的な DNA 二本鎖切断と相同組換え修復による遺伝子ターゲティングの方が、選抜に用いられるマーカー遺伝子のゲノムへの挿入が迅速に行われることになる。しかしながら、上記の仮説は細胞周期のどの段階においても相同組換えによる修復が行われることを前提としており、通常の相同組換え修復は S 期から G2 期に行われることが考えられている。即ち、ヌクレアーゼと破壊ベクターの共導入によって観察されたコロニー形成期間の短縮は、イネいもち病菌の相同組換え修復が細胞周期に関係なく行われている可能性を示唆する。本研究に用いたプロトプラストが細胞周期のどの段階で採集されているのかは不明であるが、細胞周期と相同組換え修復の関連性を調べることでイネいもち病菌が有する独自の変異特性に関する新しい知見が得られるかもしれない。

また、*SDH* 配列用 TALEN もしくは *TG-YFSCEEBT::BSD* 配列用 TALEN を共導入することによる、組換え株数の減少は観察されなかったことから、TALEN 導入による標的遺伝子配列以外の切断 (off target 活性) や細胞毒性は極めて低いことが考えられる。糸状菌研究では NHEJ 関連遺伝子を破壊した株を用いることで遺伝子ターゲティング効率の大幅な上昇が示されているが、NHEJ 修復能の低下による相同組換え修復への負荷上昇がゲノムの不安定化や表現型に影響を及ぼすと指摘する報告もある (Fattah et al., 2008; Lopez et al., 2011)。また、白色腐朽菌やクモノスカビのように産業上重要な糸状菌であっても遺伝子導入手法が確立されていない糸状菌が存在し、これらの糸状菌においては NHEJ 関連遺伝子の破壊自体が困難である。Platinum TALEN を用いた標的遺伝子への DNA 二本鎖切断の導入と遺伝子改変はプラスミドの一過的導入・発現のみで遺伝子改変を達成できることから、通常では遺伝子がゲノムに挿入されない糸状菌でも標的遺伝子配列の破壊や導入を強制的に誘導することが可能であると予想される。したがって、人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子導入手法は様々な糸状菌や広範囲の微生物に適応できることが期待される。

これまでの研究結果から、イネいもち病菌のゲノム進化の原動力は DNA 二本鎖切断と相同組換えが起り易いイネいもち病菌のゲノム環境によってもたらされていると推察される。Platinum TALEN を用いた任意のゲノム配列を標的とした DNA 二本鎖

切断導入技術の確立は、イネいもち病菌が有する相同組換え修復と特殊なゲノム環境との関連性を解析することを可能とする。非病原性遺伝子の近傍やトランスポゾン配列、LTR 配列を標的とした DNA 二本鎖切断の導入とその修復過程においてイネいもち病菌のゲノム進化や病原性の変異が引き起こされる可能性は高い。今後、TALEN を用いることでイネいもち病菌のゲノム進化機構の解明が進展し、糸状菌における新たなゲノム編集技術が確立されることを期待する。

総合考察

人類は様々な技術を駆使して高度に農業技術を発展させてきた。しかしながら、イネいもち病菌は驚異的なスピードで対抗適応し、短期間で新規農薬に対する薬剤耐性や真性抵抗性品種、圃場抵抗性品種に対する新たな病原性を獲得してきた歴史がある。現在でもイネいもち病菌を完全に制御する持続的な防除技術を得るには至っておらず、稲作はイネいもち病大発生のおそれにさらされている。本研究では、これまでの植物病理学や比較ゲノム解析から得られているイネいもち病菌の遺伝的多様性に関する知見から、体細胞相同組換えに着目し、無性的な生活環を有するイネいもち病菌のゲノム進化の一端を解明することに成功した。

第一章では姉妹染色分体とは異なる相同配列を鋳型としたエクトピックな体細胞相同組換えを検出・選抜することが可能なマーカー系を構築し、マーカー系を導入したイネいもち病菌の生育過程において一定の割合で相同組換えが生じていることを明らかにした。また、その相同組換え頻度は様々な薬剤ストレスによって上昇することを明らかにし、非病原性遺伝子である *Avr-Pita* においても体細胞相同組換えが生じること、体細胞相同組換えにより病原性が変化することを示した。

第二章ではイネいもち病菌の体細胞相同組換えが DNA 二本鎖切断の修復機構として働くことを実証し、イネいもち病菌の相同組換え修復頻度が動植物と比較して高いことを示した。イネいもち病菌の相同組換えは数百塩基という短い相同配列の存在においても生じており、その組換え様式は遺伝子置換（ジーンコンバージョン）が主たる様式であると考えられた。さらに、イネいもち病菌のゲノム変異特性から標的遺伝子への DNA 二本鎖切断の導入は遺伝子ターゲティング法への応用に利用可能であること示した。

第三章では任意の配列特異的な DNA 二本鎖切断を導入することが可能なイネいもち病菌用 TALEN の構築を行い、ゲノムに簡易的かつ効果的に DNA 二本鎖切断を導入できること、さらには TALEN により高効率で遺伝子ターゲティングが可能となることを示した。

上記の知見を総合すると、イネいもち病菌ゲノムは非常に不安定であり、植物への感染過程において生じる活性酸素種などによって誘導される DNA 二本鎖切断と、エクトピックな相同配列を鋳型とした相同組換え修復によってゲノム多様性を獲得してきたことが推察された。さらに、その相同組換え様式からイネいもち病菌ゲノムに散在する反復配列やトランスポゾン近傍で生じる DNA 二本鎖切断が、ゲノムの再編と病原性の変異の起点となることが考えられた。

本仮説が成り立つとすると、イネいもち病菌はどのようにしてこのような変異機構を

獲得したのだろうか。腐生的な生活環を有するアカパンカビ (*Neurospora crassa*) や産業的に広く用いられている麹菌 (*Aspergillus oryzae*) など、通常の遺伝子ターゲティング効率や NHEJ 関連遺伝子破壊株の表現型はイネいもち病菌と比較して大きな差異はない (Ninomiya et al, 2004; Takahashi et al., 2006)。したがって、イネいもち病菌の相同組換え頻度は他の糸状菌と比較して突出して高いわけではなく、相同組換え修復の役割やその機構は他の糸状菌と比べて大きな差異はないと考えられる。このような観点から、イネいもち病菌はゲノム内に複数の相同配列 (トランスポゾン等) を保有することで、ゲノムにおいて生じる相同組換え頻度を高めて、様々な環境に対して迅速に適応することが可能なゲノム環境を獲得してきたことが考えられる。

遺伝的に近縁なアカパンカビでは、生育環境の悪化に伴い有性生殖のサイクルに入る。有性生殖の過程では Repeat induced point mutation (RIP) が作用することで 80% 以上の相同性を持つ重複遺伝子内に塩基置換が導入される (Cambareri et al., 1991; Davis and Perkins 2002)。そのため、アカパンカビのゲノムには活性型のトランスポゾン配列は皆無であり、相同性の高い遺伝子ファミリーもほとんど存在しない (Galagan et al., 2003)。RIP 機構は有性生殖時に作用する糸状菌独自の機構である。なぜ RIP 機構が菌類には必要だったのだろうか。動植物のゲノム内にはイネいもち病菌と同様に複数の反復配列やトランスポゾン配列が存在している。しかしながら、動植物ゲノムにおける体細胞相同組換え頻度は極めて低く、NHEJ 修復が主要経路であると考えられており、トランスポゾンの発現を制御する複雑な機構が明らかになりつつある。動植物のように、複数の細胞群が組み合わせられて形成される個体において体細胞時におけるゲノムの変異は致命的、もしくは疾患の原因となる。したがって、動植物は体細胞での変異を極力少なくするために、トランスポゾンの発現制御や NHEJ 修復機構等を発達させ、有性生殖時においてのみゲノムの多様性を創出するように進化してきたのではないだろうか。本研究において得られた知見から、RIP は動植物と比較して体細胞相同組換え頻度が高い糸状菌ゲノムの安定性を保持するために菌類が独自に獲得した機構であると考えられる。即ち、無性的繁殖時には同一の遺伝情報を迅速に子孫に伝え、自身が危機的な環境下に曝された場合には有性生殖によって多様性を獲得するという動植物に近い理にかなった生活環であると思われる。しかしながら、このような有性生殖を介したストレス応答や多様性の創出は、植物への寄生を生活環とするイネいもち病菌とは対照的なものである。実際に、イネいもち病菌は無性的な繁殖過程の中で、様々な環境に適応してきている。これらを総合すると、イネいもち菌は進化の過程で、有性生殖と RIP 機構を敢えて放棄することにより相同配列やトランスポゾン配列などをゲノムに蓄積させ、高い相同組換え活性を有するゲノム環境を保つことで有性生殖を介し

たゲノムの多様性創出よりも迅速に様々な環境の変化や宿主であるイネの進化に対抗適応する能力を獲得してきたと考えることもできる。

興味深いことに、植物病原菌や産業に利用される糸状菌は有性生殖を介さない不完全菌類に属する場合が多い。不完全菌類に属する糸状菌では、ゲノム内に複数の相同配列が確認されていることから (Galagan et al., 2005; Nierman et al., 2005), 有性生殖の欠如は不完全菌類に属する糸状菌において共通の進化だったことが示唆される。無性的な繁殖過程における遺伝子の重複, 欠失, 転座等のゲノム進化は, 特殊な酵素の分泌, 毒素生産や植物に寄生するためのエフェクターの獲得・欠失など糸状菌の急速な特性変化をもたらすことになる。近年では, イネいもち病菌のトランスポゾン配列間での相同組換えによって非病原性遺伝子が欠失した例が報告されており (Sone et al., 2013), 酒造産業で重要な麹菌の α アミラーゼ遺伝子はトランスポゾン様配列を介した重複によって 3 コピーに増加したことが示唆されている (Hunter et al., 2011)。人工ヌクレアーゼを用いて, ゲノムに散在する相同配列特異的に DNA 二本鎖切断を導入することができれば, 無性的な生活環を有するゲノム進化機構を実験的に検証することが可能であり, 筆者が今後最も明らかにしたい事象でもある。

以上より, イネいもち病菌を含む不完全菌類に属する糸状菌は, 有性生殖を主とする他の糸状菌とは異なるゲノム進化機構を持ち, 不完全菌類は体細胞相同組換えによる変異性が高いというゲノム特性を持つといえるであろう。本研究によって得られた知見が, イネいもち病菌ゲノムの進化や病原性の理解の一助となり, さらには産業上広く利用されている糸状菌の人為的ゲノム進化による新たな分子育種法やゲノム編集技術の確立に資することを期待する。

摘要

生物界では宿主と寄生者という相互関係が形成される場合があり、両者間において競うように遺伝的変異が引き起こされる宿主・寄生者の共進化プロセスは、双方のゲノムに劇的な変化がもたらされると考えられている。このような共進化は栽培植物とその病原体との関係においても例外ではない。

イネ (*Oryza sativa*) とイネに重要病害を引き起こすイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) の関係は植物病理学の分野においてその一例として知られている。イネ品種によって病原性が異なるレースが他の植物病原菌と比較して数多く存在することは、これまでにイネいもち病菌の遺伝的変異が繰り返されてきたことを示している。これは稲作の安定化のために、いもち病抵抗性品種の作出と導入が盛んに行われてきたのに呼応して、イネいもち病菌が急速に対抗適応し、自らのゲノムを変化させることで、抵抗性の打破 (抵抗性の崩壊) を引き起こしてきたことを物語っている。また、防除手段として広く用いられてきた化学農薬に対する耐性菌の出現も同様であり、イネいもち病菌は病害防除の観点からみても極めて制御が難しい病原菌である。自然界で繰り返されてきた宿主と植物病原菌の共進化の観点から、本病原菌の変異特性は、まさに多様性の原動力である。その類希なる変異特性により、人類が新しい農業技術を開発して高度に駆使する歴史の中で、それらの選択圧を乗り越えるために驚異的なスピードで独自の進化を遂げてきたといえる。

イネいもち病菌のイネへの感染の可否は非病原性遺伝子産物をイネが保有する抵抗性遺伝子産物によって認識されるか否かによって決定される (遺伝子対遺伝子説)。したがって、イネいもち病菌が保有する非病原性遺伝子に変異が生じれば、宿主は病原菌を認識できなくなり、抵抗性品種に対して新たな病原性を獲得することになる。これまでの研究から、イネいもち病菌の病原性変異機構として、非病原性遺伝子へのトランスポゾンの挿入や欠失、点変異等による機能消失が報告されている。しかしながら、野外圃場から分離されたイネいもち病菌においては非病原性遺伝子の欠失や転座、重複に加えて、染色体多型や過剰染色体の形成等の他の生物では例が少ないゲノム多様性が確認されており、イネいもち病菌のゲノム多様性は単に非病原性遺伝子に変異が生じるという単純な機構に留まらず、染色体レベルでの多様性を誘発する特性を生物的に保持していることが推測される。このようなゲノム多様性の一要因として、無性的な繁殖過程において生じる相同組換え (体細胞相同組換え) の関与が示唆されているが、イネいもち病菌を含む糸状菌において体細胞相同組換えに関する知見は乏しく、未だ明確な結論を得るには至っていない。本研究ではイネいもち病菌においてマーカー遺伝子を用いた体

細胞相同組換え検出・選抜系の構築を行うと共に、DNA二本鎖切断による体細胞相同組換え修復について解析した。

第一章では、イネいもち病菌の体細胞相同組換えを簡易かつ非破壊的に検出および選抜するためのマーカー遺伝子系の構築と、それらを用いたイネいもち病菌の体細胞相同組換え特性について明らかにした。まず、*EYFP*遺伝子と抗生物質であるブラストサイジンS耐性遺伝子 (*BSD*) を融合した *YFP::BSD* 遺伝子を作製し、それをもとに2種の非機能型遺伝子からなるマーカー系 (*TG-YFP::BSD* および *RS-YFP::BSD*) の構築を行った。これら2種の非機能型マーカー遺伝子間において相同組換えが生じた場合、機能型 *YFP::BSD* 遺伝子が形成されてYFP蛍光とブラストサイジンS耐性を示すように設計した。各マーカー遺伝子をイネいもち病菌ゲノムに共導入した系統を培養し、YFP蛍光による相同組換え細胞の検出およびブラストサイジンSによる相同組換え細胞の特異的な選抜に成功した。イネいもち病菌の体細胞相同組換えは無性的な繁殖過程においてもある一定の頻度で生じており、その頻度は一次代謝阻害薬剤やゲノム損傷薬剤、活性酸素産生薬剤の処理によって有意に上昇することが示された。この実験から、イネいもち病菌の体細胞相同組換えはストレス環境下におけるゲノム応答機構として機能していること、DNA二本鎖切断の修復機構として機能していること、感染過程において必然的に生じていることが明らかとなった。

続いて、体細胞相同組換えが非病原性遺伝子やその近傍においても同様に生じていることを検証するために、非病原性遺伝子の一つである *Avr-Pita* をイネいもち病菌ゲノムからクローニングし、活性部位に変異を導入することで非機能型ホモログを構築した。内生の *Avr-Pita* と非機能型ホモログとの間で相同組換えが生じた場合、PCR-RFLPによる組換え配列の検出と抵抗性品種 (ヤシロモチ) に対する新たな病原性が獲得される。実際に非機能型ホモログを導入したイネいもち病菌系統においては、*Avr-Pita* とホモログとの間で相同組換えが生じたことを示すPCR-RFLP断片とヤシロモチへの病原性獲得が確認された。また、その頻度はストレス薬剤処理によって向上したことから、イネいもち病菌の体細胞相同組換えは非病原性遺伝子近傍においても同様に生じることが明らかとなり、病原性変異に関与することが考えられた。

第二章では、マーカー遺伝子への人為的なDNA二本鎖切断を18塩基認識の制限酵素遺伝子 *I-SceI* によって導入し、その修復機構について解析を試みた。配列特異的なDNA二本鎖切断を導入するための標的遺伝子として、*YFP::BSD* 遺伝子内に *I-SceI* の認識配列を挿入した *ISTG-YFP::BSD* を構築し、*RS-YFP::BSD* と共にイネいもち病菌ゲノムに導入した系統を作出した。DNA二本鎖切断の導入にはイネいもち病菌のコドン使用頻度に最適化した *I-SceI* 遺伝子を用いた。 *I-SceI* の発現によりマーカー遺伝子特異的に導

入されたDNA二本鎖切断が、RS-YFP::BSD遺伝子を鋳型とした相同組換えによって修復された場合、各系統の細胞はYFP蛍光とブラストサイジンSへの耐性を示すことが期待される。マーカー遺伝子を有する各系統ゲノムへのI-SceI遺伝子の導入により、全体の約40%を占める細胞においてYFP蛍光およびブラストサイジンSへの耐性が確認された。また、ISTG-YFP::BSDのみを導入した系統に対して、RS-YFP::BSDおよびI-SceI遺伝子を外来DNAとして供給した際にも高い相同組換え活性を得ることができた。これらの結果は他の生物と同様に体細胞相同組換えがDNA二本鎖切断の修復機構として働くことを示しているのと同時に、類似配列DNAを鋳型としたエクトピックな相同組換えが他の高等動植物よりも高い頻度で生じることを意味している。また、本マーカー系を用いることによりイネいもち病菌の体細胞相同組換えは数百bp程度の短い相同配列の存在によっても生じることが明らかとなり、その様式は非交叉型のジーンコンバージョンに依存していることが示された。このことから、イネいもち病菌は非常に高い変異特性を有しており、ゲノムに散在する反復配列やトランスポゾン因子が相同組換え修復の鋳型となることで広く染色体レベルでの多様性が生じていることが示唆された。一方、このような可逆的なゲノム特性から、標的遺伝子への人為的なDNA二本鎖切断の導入が新たなゲノム編集技術として応用可能であることを見出した。

第三章では、第一章および第二章の結果を鑑みて、任意の遺伝子配列特異的にDNA二本鎖切断を導入することが可能な人工ヌクレアーゼの構築を行い、配列特異的DNA切断が体細胞相同組換え頻度に与える影響を明らかにした。近年、多くの生物において成功例が報告されているtranscription activator-like effector nuclease (TALEN) の全DNA結合ユニットとFokI DNA切断活性領域をイネいもち病菌のコドン使用頻度に最適化し、糸状菌用TALEN作製キットとして構築した。作製したTALENの標的遺伝子特異的なDNA二本鎖切断活性を確認するために、YFP::BSD遺伝子内にヌクレアーゼの認識配列を挿入したTG-YFSCEEET::BSDを構築した。TG-YFSCEEET::BSDをゲノムに導入した系統に対して、認識配列特異的に結合・切断するように設計したTALENと相同配列であるRS-YFP::BSDを共導入した。TALENとの共導入により非常に高い相同組換え活性が得られたことから、構築したTALENが十分なDNA結合能とヌクレアーゼ活性を有していることを示した。続いて、内生の遺伝子配列を標的としたTALENのヌクレアーゼ活性を調査するために、イネいもち病菌のメラニン生合成過程を担うScytalone dehydratase (SDH) 遺伝子を標的としたTALENの構築を行った。加えて、SDH配列を含むそれぞれ約1200 bpの相同配列を組み込んだ破壊ベクターを構築し、TALENと共に導入することで、遺伝子破壊効率による活性を評価した。得られた複数のSDH破壊株においてはメラニン合成の阻害を示す菌糸の白色化が認められ、破壊株

の作出効率はほぼ100%にまで上昇した。また、標的遺伝子以外の領域にベクター配列が挿入された痕跡はなく、通常の遺伝子ターゲティング効率が3-7%であることを加味すると、標的遺伝子配列への特異的なDNA二本鎖切断の導入は新たな遺伝子ターゲティング技術として非常に有用であることが示された。今回構築した糸状菌用TALENでは、他の人工ヌクレアーゼにおいて問題となっている細胞毒性や作製効率の低下がみられなかったことから、標的遺伝子への効率的なDNA二本鎖切断導入ツールとして有用であることを示した。

以上より、イネいもち病菌の体細胞相同組換えに関する基礎的知見を得て、遺伝的多様性を担うゲノム再編機構への関与を見出だした。また、イネいもち病菌が有する変異特性は次世代のゲノム編集技術開発に有用であることを示した。本研究によって得られた知見および技術が、イネいもち病菌の新たな防除技術および遺伝子工学技術の発展に資することを期待する。

謝辞

本研究を遂行し、論文を完成させるにあたって多くの方にご指導、ご協力いただきました。ここに皆様に感謝を申し上げます。

博士後期課程への進学を快諾していただき、技術面から論文作製に至るまで終始熱心にご教授いただき、さらに研究面のみならずその姿勢や生活全般に渡って、多大なるご指導いただきました明治大学 桑田茂 教授に深く感謝申し上げます。

本論文を審査していただき、研究遂行過程で多くのご助言、ご指導、さらにはどんな些細なことも親身になりお話しいただきました明治大学 大里修一 講師に感謝申し上げます。同じく本論文の審査をしていただき、多くのご指導をいただきました明治大学 賀来華江 教授に感謝申し上げます。

さらに、学部・修士時代の御指導に留まらず、御退官後も温かい御心遣いを賜りました、前明治大学農学部植物病理学研究室の 米山勝美 教授に心より深謝申し上げます。

また、上に挙げた先生方以外にも、明治大学農学部生命科学科および農学科の先生方には入学以来多くのご指導、激励をいただきました。ここに感謝致します。

本研究で使用した形質転換ベクターおよびイネ品種の提供と様々なご指導・ご指摘をいただきました共同研究先である東京農工大学 有江力 教授、ならびに 寺岡徹 教授に感謝申し上げます。

同じく、T-2 トキシンを提供していただきました共同研究先である名古屋大学 木村真 准教授に感謝申し上げます。

同じく、Platinum TALEN kit を提供していただきました共同研究先である広島大学 山本卓 教授、ならびに 佐久間哲史 助教に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり多くのご助言をいただきました北海道大学 曾根輝雄 准教授に感謝申し上げます。

研究を進めるにあたり、同じグループで私と一緒に研究を行ってくれた植物細胞工学研究室の 用之丸哲也 氏に感謝いたします。上に挙げただけでなく植物細胞工学研究室および植物病理学研究室の皆様には沢山の協力をいただきました。ここに感謝申し上げます。

最後に私が9年間も大学に通い、研究を続けられたのは両親の理解なくしてなし得なかったものだと思います。この場を借りて感謝いたします。

引用文献

- Allen RL, Bittner-Eddy PD, Grenville-Briggs LJ, Meitz JC, Rehmany AP, et al. 2004. Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science* 306:1957-1960
- Ansai S, Sakuma T, Yamamoto T, Ariga H, Uemura N, et al. 2013. Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases. *Genetics* 193:739-749
- Apostol I, Heinsteinst PF, Low PS. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant-cells-role in defence and signal transduction. *Plant Physiology* 90:109-116
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, et al. 1996. Involvement of mouse *Mlh1* in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature Genetics* 13:336-342
- Bennardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM. 2008. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genetics* 4: e1000110 [doi:10.1371/journal.pgen.1000110]
- Bindra RS, Goglia AG, Jasin M, Powell SN. 2013. Development of an assay to measure mutagenic non-homologous end-joining repair activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 41: e115 [doi:10.1093/nar/gkt255]
- Boch J, Bonas U. 2010. *Xanthomonas AvrBs3* family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology* 48:419-436
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, et al. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326:1509-1512
- Boothroyd CE, Dreesen O, Leonova T, Ly KI, Figueiredo LM, et al. 2009. A yeast-endonuclease-generated DNA break induces antigenic switching in *Trypanosoma brucei*. *Nature* 459:278-281
- Boveris A, Oshino N, Chance B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128:617-630
- Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia YL, Hershey HP, et al. 2000. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12:2033-2045
- Bush AO, Fernandez JC, Esch GW, Seed JR. 2001. Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites. Cambridge, UK: Cambridge University Press
- Cambareri EB, Singer MJ, Selker EU. 1991. Recurrence of repeat-induced point mutation (RIP) in *Neurospora crassa*. *Genetics* 127:699-710

- Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, et al. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research* 39: e82. [doi: 10.1093/nar/gkr218]
- Chen JM, Cooper DN, Chuzhanova N, Ferec C, Patrinos GP. 2007. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. *Nature Reviews Genetics* 8:762-775
- Chuma I, Isobe C, Hotta Y, Ibaragi K, Futamata N, et al. 2011a. Multiple translocation of the *AVR-Pita* effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. *PloS Pathogens* 7: e1002147 [doi:10.1371/journal.ppat.1002147]
- Chuma I, Hotta Y, Tosa Y. 2011b. Instability of subtelomeric regions during meiosis in *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General Plant Pathology* 77:317-325
- Colleaux L, Dauriol L, Galibert F, Dujon B. 1988. Recognition and cleavage site of the intron-enclosed omega transposase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:6022-6026
- Cooper PK, Nospikel T, Clarkson SG, Leadon SA. 1997. Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science* 275:990-993
- Cornu TI, Cathomen T. 2007. Targeted genome modifications using integrase-deficient lentiviral vectors. *Molecular Therapy* 15:2107-2113
- Cundliffe E, Davies JE. 1977. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein-synthesis by trichothecene fungal toxin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11:491-499
- Dai YT, Jia YL, Correll J, Wang XY, Wang YL. 2010. Diversification and evolution of the avirulence gene *AVR-Pital* in field isolates of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 47:973-980
- Daley JM, Palmboos PL, Wu DL, Wilson TE. 2005. Nonhomologous end joining in yeast. *Annual Review of Genetics* 39:431-451
- de Wit P, Mehrabi R, van den Burg HA, Stergiopoulos I. 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology* 10:735-747
- Davis RH, Perkins DD. 2002. *Neurospora*: a model of model microbes. *Nature Reviews Genetics* 3:397-403
- de Wit P, Mehrabi R, van den Burg HA, Stergiopoulos I. 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology* 10:735-747
- Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, et al. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434:980-986
- DeZwaan TM, Carroll AM, Valent B, Sweigard JA. 1999. *Magnaporthe grisea*

- Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* 11:2013-2030
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Teh T, Wang CIA, et al. 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:8888-8893
- Durrant WE, Wang S, Dong XN. 2007. *Arabidopsis* SNI1 and RAD51D regulate both gene transcription and DNA recombination during the defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:4223-4227
- Egan MJ, Wang ZY, Jones MA, Smirnov N, Talbot NJ. 2007. Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11772-11777
- Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. 2009. Golden Gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS ONE* 4: e5553 [doi:10.1371/journal.pone.0005553]
- Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS One* 3: e3647 [doi:10.1371/journal.pone.0003647]
- Fattah FJ, Lichter NF, Fattah KR, Oh S, Hendrickson EA. 2008. *Ku70*, an essential gene, modulates the frequency of rAAV-mediated gene targeting in human somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:8703-8708
- Ferreira MED, Kress M, Savoldi M, Goldman MHS, Hartl A, et al. 2006. The *akuB* (*KU80*) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 5:207-211
- Flor HH. 1956. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine* 8:29-54
- Fudal I, Ross S, Brun H, Besnard AL, Ermel M, et al. 2009. Repeat-induced point mutation (RIP) as an alternative mechanism of evolution toward virulence in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:932-941
- Fung H, Weinstock DM. 2011. Repair at single targeted DNA double-strand breaks in pluripotent and differentiated human cells. *PLoS One* 6: e20514 [doi:10.1371/journal.pone.0020514]
- Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, et al. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422:859-868
- Goins CL, Gerik KJ, Lodge JK. 2006. Improvements to gene deletion in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: absence of *Ku* proteins increases homologous recombination, and co-transformation of independent DNA molecules allows rapid complementation of deletion phenotypes. *Fungal*

- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics* 44:113-39
- Hisano Y, Ota S, Arakawa S, Muraki M, Kono N et al. 2013. Quantitative assay for TALEN activity at endogenous genomic loci. *Biology Open* 2:363-367
- Huang KT, Asuyama H, Misato T. 1964. Selective toxicity of blasticidine S to *Pyricularia oryzae* + *Pellicularia sasakii*. *Journal of Antibiotics* 17:71-74
- Hunter AJ, Jin B, Kelly JM. 2011. Independent duplications of alpha-amylase in different strains of *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 48:438-444
- Ikeda K, Nakayashiki H, Takagi M, Tosa Y, Mayama S. 2001. Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Genetics and Genomics* 266:318-325
- Izawa M, Takekawa O, Arie T, Teraoka T, Yoshida M, et al. 2009. Inhibition of histone deacetylase causes reduction of appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General and Applied Microbiology* 55:489-498
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal* 19:4004-4014
- Joung JK, Sander JD. 2013. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14:49-55
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, et al. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:11086-11091
- Kamakura T, Yamaguchi S, Saitoh K, Teraoka T, Yamaguchi I. 2002. A novel gene, *CBP1*, encoding a putative extracellular chitin-binding protein, may play an important role in the hydrophobic surface sensing of *Magnaporthe grisea* during appressorium differentiation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:437-444
- Kang S, Lebrun MH, Farrall L, Valent B. 2001. Gain of virulence caused by insertion of a *Pot3* transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:671-674
- Kanzaki H, Yoshida K, Saitoh H, Fujisaki K, Hirabuchi A, et al. 2012. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae AVR-Pik* and rice *Pik* genes driven by their physical interactions. *Plant Journal* 72:894-907
- Khang CH, Berruyer R, Giraldo MC, Kankanala P, Park SY, et al. 2010. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *Plant Cell* 22:1388-1403

- Khang CH, Park SY, Lee YH, Valent B, Kang S. 2008. Genome organization and evolution of the *AVR-Pita* avirulence gene family in the *Magnaporthe grisea* species complex. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:658-670
- Kishimoto K, Kouzai Y, Kaku H, Shibuya N, Minami E, Nishizawa Y. 2010. Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice. *Plant Journal* 64:343-354
- Kito H, Fujikawa T, Moriwaki A, Tomono A, Izawa M, et al. 2008. MgLig4, a homolog of *Neurospora crassa* Mus-53 (DNA ligase IV), is involved in, but not essential for, non-homologous end-joining events in *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology* 45:1543-1551
- Kiyosawa S. 1982. Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant-disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 20:93-117
- Kovalchuk I, Kovalchuk O, Kalck V, Boyko V, Filkowski J, et al. 2003. Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. *Nature* 423:760-762
- Krangel MS. 2003. Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nature Immunology* 4:624-630
- Krappmann S, Sasse C, Braus GH. 2006. Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryotic Cell* 5:212-215
- Leach JE, Cruz CMV, Bai JF, Leung H. 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* 39:187-224
- Lebel EG, Masson J, Bogucki A, Paszkowski J. 1993. Stress-induced intrachromosomal recombination in olant somatic-cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:422-426
- Lloyd AH, Wang D, Timmis JN. 2012. Single Molecule PCR reveals similar patterns of Non-homologous DSB repair in *Tobacco* and *Arabidopsis*. *PLoS One* 7: e32255 [doi:10.1371/journal.pone.0032255]
- Lopez CR, Ribes-Zamora A, Indiviglio SM, Williams CL, Haricharan S, Bertuch AA. 2011. *Ku* must load directly onto the chromosome end in order to mediate its telomeric functions. *PLoS Genetics* 7: e1002233 [doi:10.1371/journal.pgen.1002233]
- Lucht JM, Mauch-Mani B, Steiner HY, Metraux JP, Ryals J, Hohn B. 2002. Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. *Nature Genetics* 30:311-314
- Mashimo T, Kaneko T, Sakuma T, Kobayashi J, Kunihiro Y, et al. 2013. Efficient gene targeting by TAL effector nucleases coinjected with exonucleases in zygotes. *Scientific Reports* 3: 1253 [doi:10.1038/srep01253]

- Miki S, Matsui K, Kito H, Otsuka K, Ashizawa T, et al. 2009. Molecular cloning and characterization of the *AVR-Pia* locus from a papuan field isolate of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant Pathology* 10:361-374
- Miller JC, Tan SY, Qiao GJ, Barlow KA, Wang JB, et al. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* 29:143-148
- Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, et al. 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172:1557-1566
- Nierman WC, May G, Kim HS, Anderson MJ, Chen D, Denning DW. 2005. What the *Aspergillus* genomes have told us. *Medical Mycology* 43:3-5
- Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H. 2004. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:12248-12253
- Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198:249-266
- Ochiai-Fukuda T, Takahashi-Ando N, Ohsato S, Igawa T, Kadokura K, et al. 2006. A fluorescent antibiotic resistance marker for rapid production of transgenic rice plants. *Journal of Biotechnology* 122:521-527
- Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B. 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12:2019-2032
- Poggeler S, Kuck U. 2006. Highly efficient generation of signal transduction knockout mutants using a fungal strain deficient in the mammalian *ku70* ortholog. *Gene* 378:1-10
- Porteus MH, Baltimore D. 2003. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* 300:763
- Puchta H, Dujon B, Hohn B. 1996. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5055-5060
- Rho HS, Kang S, Lee YH. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules and Cells* 12:407-411
- Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki K, Kashiwagi K, et al. 2013a. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes to Cells* 18:315-3
- Sakuma T., Ochiai H, Kaneko T, Mshimo T, Tokumatsu D, Sakane Y, et al. 2013b, Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Scientific Reports* 3:1253[doi:10.1038/srep03379]

- Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, et al. 2011. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nature Biotechnology* 29:697-698
- Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng GP, Zhang F. 2012. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature Protocols* 7:171-192
- Saunders DGO, Aves SJ, Talbot NJ. 2010. Cell cycle-mediated regulation of plant infection by the rice blast fungus. *Plant Cell* 22:497-507
- Shibuya N, Minami E. 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:223-233
- Shinohara M, Sakai K, Shinohara A, Bishop DY. 2003. Crossover interference in *Saccharomyces cerevisiae* requires a *TID1/RDH54* and *DMC1*-dependent pathway. *Genetics* 163:1273-1286
- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research* 18:134-147
- Silue D, Nottoghem JL, Tharreau D. 1992. Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza-sativa-Maganporthe-grisea* pathosystem. *Phytopathology* 82:577-580
- Smith JA, Bannister LA, Bhattacharjee V, Wang YB, Waldman BC, Waldman AS. 2007. Accurate homologous recombination is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian chromosomes and is modulated by mismatch repair protein Msh2. *Molecular and Cellular Biology* 27:7816-7827
- Sone T, Takeuchi S, Miki S, Satoh Y, Ohtsuka K, et al. 2013. Homologous recombination causes the spontaneous deletion of *AVR-Pia* in *Magnaporthe oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* 339:102-109
- Sone T, Ndindeng SA, Kudou R, Abe A. 2010. The role of DNA recombinational repair in the life cycle of the rice blast fungus. The 10th Conference on Fungal Genetics and Molecular biology, Hiroshima, Japan. Abstract O-13.
- Suzuki KI, Isoyama Y, Kashiwagi K, Sakuma T, Ochiai Het al. 2013. High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis* embryos. *Biology Open* 2:448-452
- Swoboda P, Gal S, Hohn B, Puchta H. 1994. Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *EMBO Journal* 13:484-489
- Tachibana A. 2004. Genetic and physiological regulation of non-homologous end-joining in mammalian cells. *Advances in Biophysics* 38:21-44
- Tachibana K, Watanabe T, Sekizawa Y, Takematsu T. 1986. Action mechanism of bialaphos .2. accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *Journal of Pesticide Science* 11:33-37

- Takahashi M, Ashizawa T, Hirayae K, Moriwaki J, Sone T, et al. 2010. One of two major paralogs of *AVR-Pita1* is functional in Japanese rice blast isolates. *Phytopathology* 100:612-618
- Takahashi T, Masuda T, Koyama Y. 2006. Enhanced gene targeting frequency in *ku70* and *ku80* disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. *Molecular genetics and genomics* 275:460-70
- Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto H, Hayashi M, Honma M. 2009. Dependence of DNA double strand break repair pathways on cell cycle phase in human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50:815-22
- Takita Y, Takahara M, Nogami S, Anraku Y, Ohya Y. 1997. Applications of the long and accurate polymerase chain reaction method in yeast molecular biology: Direct sequencing of the amplified DNA and its introduction into yeast. *Yeast* 13:763-768
- Tokai T, Koshino H, Kawasaki T, Igawa T, Suzuki Y, et al. 2005. Screening of putative oxygenase genes in the *Fusarium graminearum* genome sequence database for their role in trichothecene biosynthesis. *Fems Microbiology Letters* 251:193-201
- Valent B, Farrall L, Chumley FG. 1991. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. *Genetics* 127:87-101
- Villalba F, Collemare J, Landraud P, Lambou K, Brozek V, et al. 2008. Improved gene targeting in *Magnaporthe grisea* by inactivation of *MgKU80* required for non-homologous end joining. *Fungal Genetics and Biology* 45:68-75
- Watanabe S, Kunakura K, Izawa N, Nagayama K, Mitachi T, et al. 2007. Mode of action of *Trichoderma asperellum SKT-1*, a biocontrol agent against *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Pesticide Science* 32:222-228
- Wilson RA, Talbot NJ. 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews Microbiology* 7:185-195
- Yoshida K, Saitoh H, Fujisawa S, Kanzaki H, Matsumura H, et al. 2009. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 21:1573-1591
- Zhou EX, Jia YL, Singh P, Correll JC, Lee FN. 2007. Instability of the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AVR-Pita* alters virulence. *Fungal Genetics and Biology* 44:1024-1034