

氏 名(本籍)	陳 <sup>チン</sup> 隆 <sup>リュウ</sup> 鐘 <sup>ショウ</sup>
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 4 1 6 号
学位授与年月日	平 成 3 年 3 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農 学 専 攻
学位論文題目	植物病原糸状菌 <u>Rhizoctonia solani</u> (AG-4) のプラスミド様DNAの性状解析
論文審査委員(主 査)	教 授 江 原 淑 夫 教 授 日 向 康 吉 助教授 羽 柴 輝 良 助教授 菊 本 敏 雄

# 論文内容要旨

## 1. 緒言

植物病原菌では、プラスミドに病原性遺伝子の一部をコードしているものがある。例えば、Agrobacterium tumefaciens菌、Pseudomonas syringae pv. savastanoi菌、Pseudomonas pv. atropurpurea菌のプラスミドは病原性の発現に重要な役割を果たしている。植物病原糸状菌では、1980以降になって、2～10Kbの線状プラスミドが発見され、これらのプラスミドはミトコンドリアに内在しているものが多い。

線状プラスミドの機能に関する情報は極めて少く、わずかに、Kluyveromyces lactisのキラー蛋白質の生産と耐性の形質がプラスミド、pGKL1に指令されているとの報告、トウモロコシの細胞質雄性不稔の発現と2種のプラスミドDNA、S1、S2との関連についての報告のみである。また、植物病原糸状菌では、Fusarium oxysporumの分化型やRhizoctonia solaniの菌糸融合群とプラスミドとの間に関係が認められており、プラスミドの存在と病原性との関係に興味が注がれている。

本研究では、R. solani菌の菌糸融合第4群（AG-4）に属するプラスミド様DNAの抽出条件と細胞内所在、並びにプラスミド様DNAの性状について検討するとともに、病原菌の進化について論議した。

## 2. 全DNA、核DNAおよびミトコンドリアDNAの抽出法

本研究では、野外より分離したR. solani菌のAG-4群に属する菌株、計15菌株を供試した。供試菌株はPS培地（ジャガイモ200gの煎汁1lにショ糖20g添加）で前培養後、更にPPS培地（PS培地にポリペプトン10g添加）に移し、2週間培養した。培養菌体は集菌後、凍結乾燥させ保存し、実験に供試した。Fig. 1に示した種々の方法によって、DNAの抽出方法を検討した。

CsCl-エチジウムブロマイド密度勾配遠心による全DNA (Total DNA)の抽出方法ではミトコンドリアDNAと核DNAを分離することは出来ない。そこで、全DNA抽出後、更に、CsCl-ビスベンズイミドによる密度勾配遠心

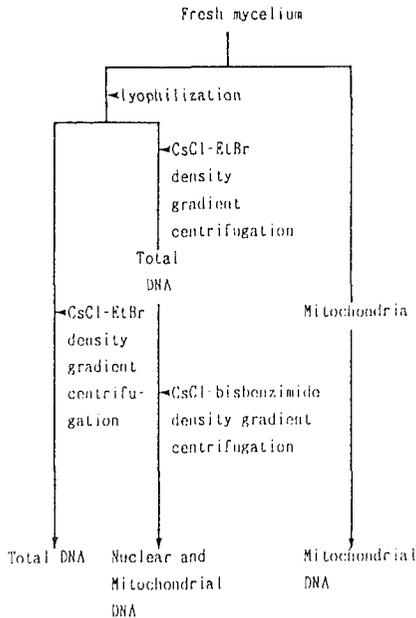


Fig. 1. Isolation methods for nuclear and mitochondrial DNA from *Rhizoctonia solani*.

を行うことによって2本の明瞭なバンド、ミトコンドリアDNAと核DNAを得ることが出来た(Fig. 2)。本方法をエチジウムブロマイド-ビスベンズイミド密度勾配遠心法と呼ぶことにした。

本方法では、10gの乾燥菌体からミトコンドリアDNA約105 $\mu$ g、核DNAは約350 $\mu$ gを得ることが出来た(Fig. 3)。生菌体からショ糖密度勾配遠心法によって、ミトコンドリア分画を得、更に、ミトコンドリアからミトコンドリアDNAを分離する方法を検討した。本方法では、10g

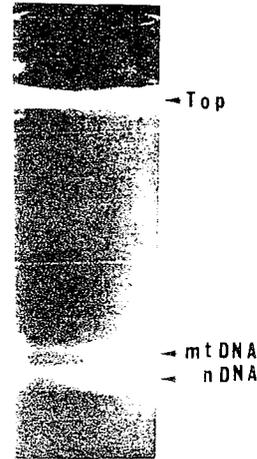


Fig. 2. Mitochondrial and nuclear DNA prepared using ethidium bromide-bisbenzimidazole density gradient centrifugation.

mtDNA:mitochondrial DNA, nDNA:nuclear DNA.

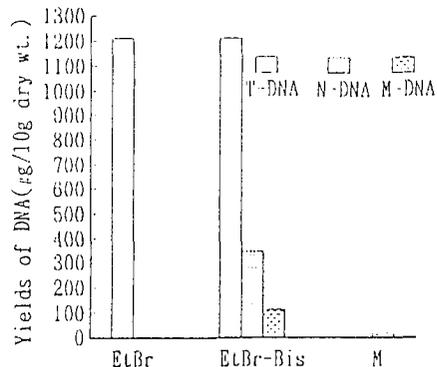


Fig. 3. Comparison of isolation methods and yields of DNA from lyophilized mycelia of isolate RI-64 of *Rhizoctonia solani*. EtBr:CsCl-ethidium bromide density gradient centrifugation; EtBr-Bis:CsCl-ethidium bromide density gradient centrifugation followed by CsCl-bisbenzimidazole density gradient centrifugation; M:Mitochondrial DNA from cell fraction.

の生菌体からミトコンドリアDNA約25 $\mu$ gを得ることが出来た(Fig.3)。以上の結果から高純度のDNAを抽出するには、エチジウムブロマイド-ビスベンズイミド密度勾配遠心法が最適であった。

### 3. 培養条件と全DNAおよびプラスミド様DNAの収量

培養期間と全DNAの収量との関係を検討した。全DNAは前培養(P S培地)2週間目の菌体から最も多く得られ、乾燥菌体10gから980 $\mu$ g回収された。プラスミド様DNAの収量も2週間、前培養した菌体から最も多く得られた(Fig.4)。

後培養(P P S培地)における培養期間と全DNAの収量との関係では、2週間目の乾燥菌体10gから全DNA1200 $\mu$ g、核DNA460 $\mu$ g、ミトコンドリアDNA110 $\mu$ gを得ることができた。プラスミド様DNAの収量は、2,1,3,4週間の順に減少した(Fig.5)。

以上の結果から全DNAの収量を上げるにはP S培地で2週間、更に、P P S培地で2週間の培養が最適であった。

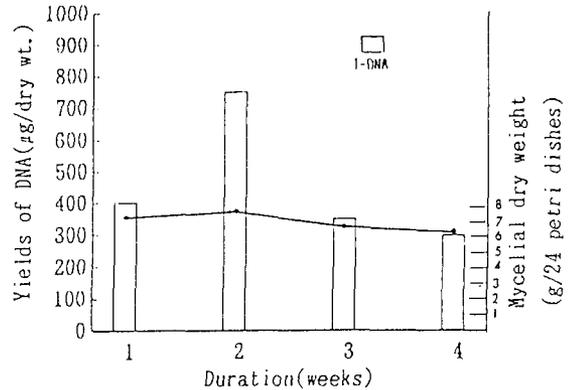


Fig.4.Yields of DNA from lyophilized mycelia of isolate RI-64 at different pre-cultured stages of growth in potato sucrose medium.The DNA purified by CsCl-ethidium bromide density gradient centrifugation.

—:mycelial dry weight.

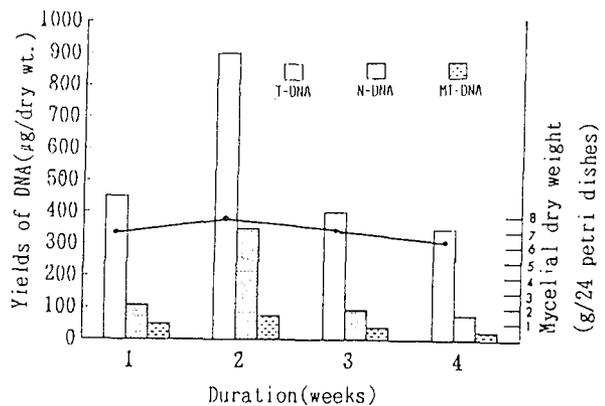


Fig.5.Yields of DNA from lyophilized mycelia of isolate RI-64 at different post-cultured stages of growth in polypeptone sucrose medium.The DNA purified by CsCl-ethidium bromide density gradient centrifugation followed by CsCl-bisbenzimidazole density gradient centrifugation.

—:mycelial dry weight.

#### 4. 凍結乾燥菌体の保存期間と全DNAおよびプラスミド様DNAの収量

4週間凍結保存期間の内、常温にもどす回数が多いほど、全DNAの収量は減少した。また、プラスミド様DNAの収量も同様に保存期間が長くなるにつれて減少した(Fig.6)。

#### 5. プラスミド様DNAの細胞内所在 本菌におけるプラスミド様DNA

の細胞内所在について検討した。R. solaniに属する菌株15菌株を用いて、全DNAを抽出し、0.7%アガロース・ゲル電気泳動によって12菌株からプラスミド様DNAを検出した。この方法ではプラスミド様DNAの検出頻度は4/5であった。細胞分画法で得た

ミトコンドリアDNAからもプラスミド様DNAが検出された。そこで、エチジウムブロマイド-ビスベンズイミド密度勾配遠心法によって得た上部のバンドがミトコンドリアDNAであることを実証するために、細胞分画法で得たミトコンドリアDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行った結果、エチジウムブロマイド-ビスベンズイミド密度勾配遠心法によって得たミトコンドリアDNA分画とハイブリダイズした。しかも、エチジウムブロマイド-ビスベンズイミド法によって分画したAG-4群に属するすべての菌株のミトコンドリアDNA分画からプラスミド様DNAが検出された。これらの結果は、プラスミド様DNAがミトコンドリアに内在していることを示唆している。

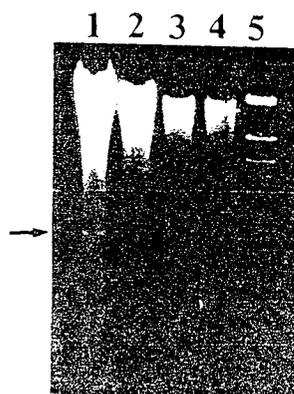


Fig.6. Electrophoretic analysis of total DNA extracted from freeze-preservation mycelia at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 4 weeks. Lane 1: One time taking-out; lane 2: Two times taking-out; lane 3: Three times taking-out; lane 4: Four times taking-out; lane 5: Size marker,  $\lambda$ DNA digested with HindIII. Arrow indicates plasmid-like DNAs.

6. 第4群菌株から検出したミトコンドリア分画中のプラスミド様DNAの相同性

*R. solani* AG-4 群菌株の15菌株すべてから検出されたプラスミド様DNAの相同性を知るために、すでにRI-64菌から検出しているプラスミド、pRS64-1とpRS64-2のクローンpUC19X-8とpUC19X-11をプローブとして相同性の検討を行った。供試した*R. solani* AG-4 群菌株のプラスミド様DNAはすべて本プローブとハイブリダイズした(Fig. 7)。また、本プローブは2量体、3量体あるいは4量体と思われるバンドとも反応した。

以上の結果から、RI-64菌株のプラスミドはAG-4群の菌株から検出したプラスミド様DNAと高い相同性を示した。

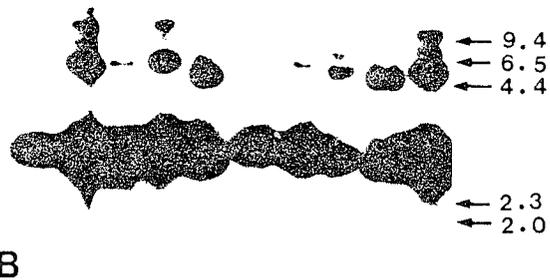
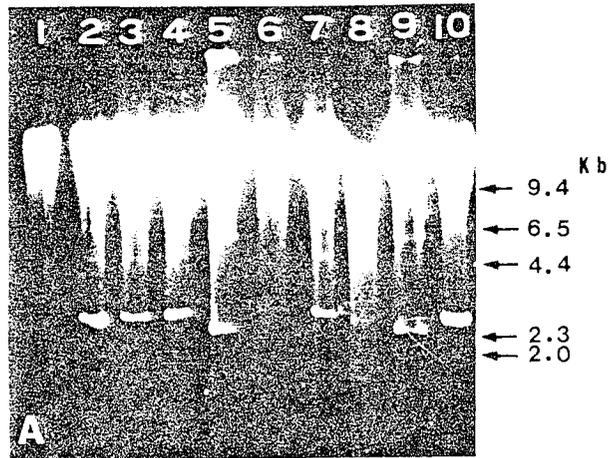


Fig. 7. Gel electrophoretic analysis and Southern hybridization of mtDNA of different isolates of *Rhizoctonia solani* (AG-4). A. Gel electrophoretic analysis of mtDNA. B. Southern hybridization analysis of mitochondrial fractions probed with labeled pRS64 DNAs (mixture of pRS64-1 and pRS64-2). Lane 1: RI-64; Lane 2: Chr3; Lane 3: GM-7; Lane 4: RI01; Lane 5: RR5-2; Lane 6: C-656; Lane 7: GM-11; Lane 8: SH-34; Lane 9: AH-1; Lane 10: AH-3.

7. 第4群菌株から検出したプラスミド様DNAの制限酵素地図の作成と  
pRS64-1, 2, 3の制限酵素地図との比較

*R. solani* AG-4群菌株に属する菌株からプラスミド様DNAを抽出、精製し、7種類の制限酵素、BamHI、EcoRI、HindIII、MluI、KpnI、PvuII、DraIを供試して、制限酵素地図を作成した。プラスミド様DNAは塩基数から2つのグループ、2.4Kbと2.7Kbに分けられた。更に、AG-4群の菌株には5つのタイプのプラスミド様DNAが存在した。2.4Kbのプラスミド様DNAを持つ菌株はタイプA, Bに分けられた。2.7Kbのプラスミド様DNAを持つ菌株はタイプC, D, Eに分けられた(Fig.8)。

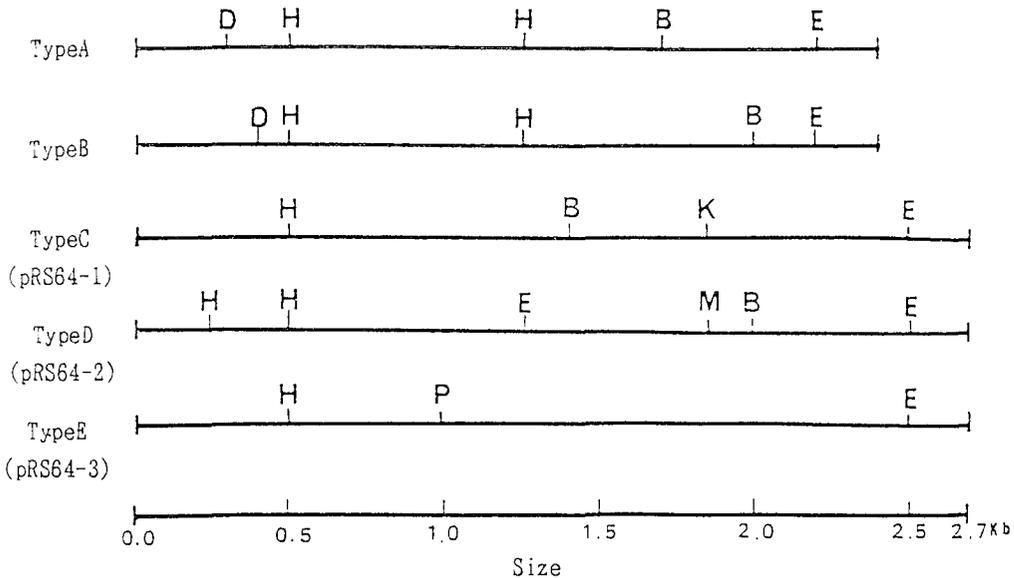


Fig.8. Restriction maps of detected plasmid-like DNAs from different isolates of *Rhizoctonia solani*(AG-4).

2.4Kbのプラスミド様DNAを持つグループの中に2種類（タイプAとタイプB）のプラスミド様DNAを持つ菌株と1種類（タイプB）のプラスミド様DNAを持つ菌株が認められた。一方、2.7Kbのプラスミド様DNAを持つグループの中にはタイプC（pRS64-1）のプラスミド様DNAを持つ菌株、タイプD（pRS64-2）のプラスミド様DNAを持つ菌株、2種類、タイプDとタイプE（pRS64-3）のプラスミド様DNAを持つ菌株と、タイプC、D、Eを同時に持つ菌株が存在した。しかしながら、2.7Kbのプラスミド様DNAを保持している供試9菌株の内6菌株がタイプD（pRS64-2）のプラスミド様DNAを持つことが判明した(Fig.9)。

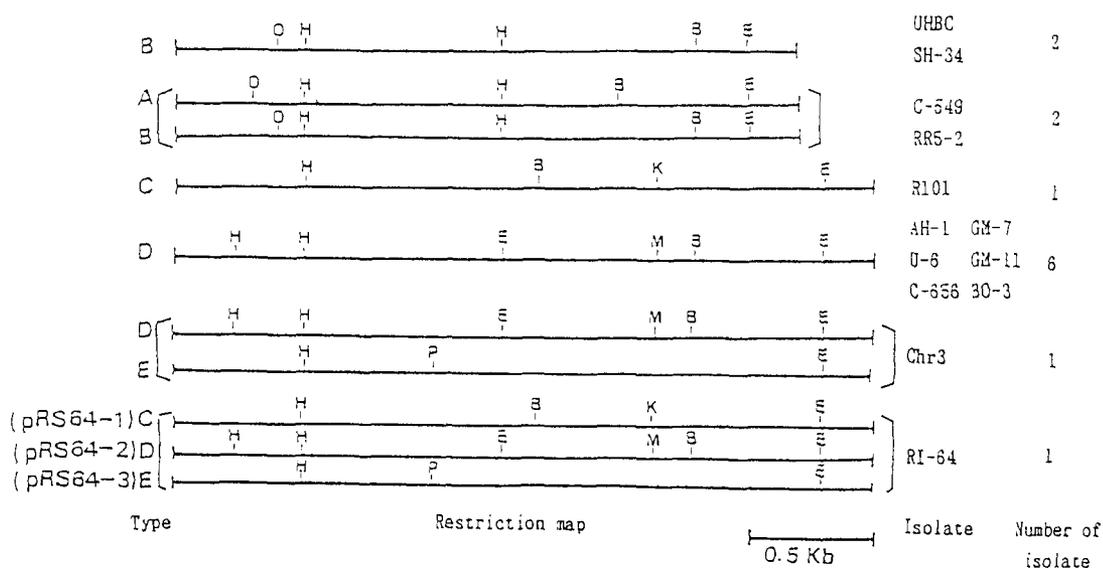


Fig.9. Types of plasmid-like DNA of *Rhizoctonia solani*(AG-4).  
 S: ScoRI, B: BamHI, H: HindIII, M: MluI, X: XonI, D: DraI, P: PvuII.

制限酵素地図の解析の結果から5つのタイプのプラスミド様DNAの中央部分は異なっていた。しかしながら、末端部近傍では同一の制限酵素地図を示した。このことからAG-4群菌株から検出したプラスミド様DNAは両末端部近傍に共通配列を有しているものと思われた。

更に、両末端部位の相同性を検討するために、pRS64-3のEcoRIから末端ヘアピン・ループまでの領域をクローン化

したDNA断片(TFA-8E)をプローブにサザン・ハイブリダイゼーションを行った。供試した末端部プローブは0.85Kbの断片、1.3Kbの断片、1.85Kbの断片および無切断断片とハイブリダイズした。すなわち、右側の各制限酵素切断断片とのみハイブリダイズし、左側の各断片とはハイブリダイズしなかった(Fig10)。以上の結果から、本プラスミドの両末端の配列は異なっていると思われた。

### 考察

*R. solani* AG-4群の菌株からエチジウムブロマイド-ビスベンズイミド密度勾配遠心法によってミトコンドリア分画から検出したプラスミド様DNA

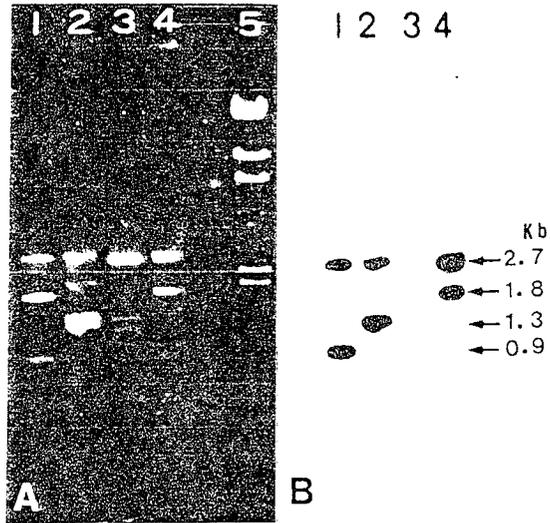


Fig.10. Electrophoretic analysis and Southern hybridization analysis of pRS64 probed with labeled TFA-8E.

A. Electrophoretic analysis of pRS64.

B. Southern hybridization analysis of pRS64 probed with labeled TFA-8E. This probe is cloned fragment the right termini to *EcoRI* of pRS64-3.

Lane 1: *KpnI* restriction patterns; Lane 2: *BamHI* restriction patterns; Lane 3: *EcoRI* restriction patterns; Lane 4: *PvuII* restriction patterns; Lane 5: Size marker, 10 DNA digested with *HindIII*.

は塩基数から2つのグループ、すなわち、2.7Kbと2.4Kbに分けられた。この結果は、DNA-DNA再会合反応速度解析によって類別した国永らのAG-4-IとAG-4-IIと一致した。

更に、AG-4群に属するプラスミド様DNAは5つのタイプに分けられた。それぞれ、5つのタイプの内、2.4Kbに属するタイプAとタイプBのプラスミド様DNAは今回新しく発見したものである。しかも、タイプD (pRS64-2) のプラスミドはAG-4群菌株に普遍的に存在しており、2種類、3種類のプラスミドを保持する菌株はタイプDから派生したものと考えられ、進化の面からも興味を持たれる。

R. solani AG-4群から検出した複数のプラスミドの複製には末端部共通配列構造の存在、並びにヘアピン・ループ構造が重要であると考えられる。また、R. solani菌から検出したプラスミド様DNAは各菌糸融合群が固有に保持している因子であると考えられた。

本菌から検出したプラスミド様DNAについて、更に、病原性との関係、病原菌の進化に関して検討を行っている。

## 審査結果の要旨

本研究では、R. solani 菌の菌糸融合第 4 群 (AG-4) に属するプラスミド様 DNA の抽出条件と細胞内所在、並びにプラスミド様 DNA の性状について検討するとともに、病原菌の進化について論議した。

1. R. solani 菌から全 DNA、核 DNA およびミトコンドリア DNA の抽出法を検討した結果、高純度の DNA を抽出するには CsCl-エチジウムブロマイド密度勾配遠心後、CsCl-ビスベンズイミド密度勾配遠心法が最適であった。培養条件と全 DNA およびプラスミド様 DNA の収量との関係では、PS 培地で 2 週間前培養し、更に、PPS 培地で 2 週間の後培養が最適であった。凍結乾燥菌体の保存期間と DNA の収量との関係では、保存期間が長くなるにつれて減少した。

2. プラスミド様 DNA の細胞内所在について検討した結果、プラスミド様 DNA はミトコンドリアに内在していることを認めた。

3. 第 4 群菌株から検出したプラスミド様 DNA の性状について検討した。その結果、RI-64 菌株のプラスミドは AG-4 群の菌株から検出したプラスミド様 DNA と高い相同性を示した。更に、プラスミド様 DNA は塩基数から 2 つのグループ、2.4 Kb と 2.7 Kb に分けられ、AG-4 群の菌株には 5 つのタイプのプラスミド様 DNA が存在した。2.4 Kb のプラスミド様 DNA を持つ菌株は、タイプ A、B に分けられた。2.7 Kb のプラスミド様 DNA を持つ菌株はタイプ C、D、E に分けられた。

2.4 Kb のプラスミド様 DNA を持つグループの中に 2 種類 (タイプ A とタイプ B) のプラスミド様 DNA を持つ菌株と 1 種類 (タイプ B) のプラスミド様 DNA を持つ菌株が認められた。一方、2.7 Kb のプラスミド様 DNA を持つグループの中にはタイプ C (pRS64-1) のプラスミド様 DNA を持つ菌株、タイプ D (pRS64-2) を持つ菌株、タイプ D とタイプ E (pRS64-3) を持つ菌株、タイプ C、D、E を同時に持つ菌株が存在した。しかも、タイプ D (pRS64-2) のプラスミドは AG-4 群菌株に普遍的に存在しており、2 種類、3 種類のプラスミドを保持する菌株タイプ D から派生したものと考えられる。AG-4 群から検出したプラスミドの複製には末端部共通配列構造の存在、並びにヘアピン・ループ構造が重要であると考えられた。

以上のように、本研究により R. solani (AG-4) 菌保有のプラスミド様 DNA の性状が明らかとなり、本菌の進化的知見が得られた。よって審査員一同は本論文提出者は農学博士の学位を受けるに値すると判定した。