

(別紙様式博5)

## 学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 深田史美

題目 : Significance of cell cycle regulation during appressorium development for the establishment of successful infection in *Colletotrichum orbiculare*.

(ウリ類炭疽病菌の感染成立における付着器分化過程の細胞周期制御の意義)

本研究では、植物病原糸状菌の感染器官分化において Rab GAP 複合体が G1/S 期の移行抑制、核分裂に伴う隔壁形成を制御し、感染器官形成や病原性に関わる遺伝子の発現変動を伴って植物感染を成立させることを見出した。さらに、本制御機構は酵母や非病原糸状菌とは異なる特徴を有することを示し、植物病原糸状菌が植物感染成立のために独自の細胞周期制御メカニズムを獲得してきたことを提唱した。

### Chapter 1: General introduction (序論)

植物病原糸状菌は植物疾病のうち約 80% を占め、その感染制御機構を理解することは新規防除法の開発に寄与し、安定した食料生産を確保する上で重要である。炭疽病菌は 3200 種以上の単子葉、双子葉植物に感染し、世界中で深刻な被害をもたらす植物病原糸状菌である。本菌は感染過程において核分裂と同調化した劇的な形態分化を行い、付着器と呼ばれる感染器官を介して感染する。一般に、糸状菌の形態形成は適切な細胞周期進行に基づいて行われるが、植物病原糸状菌において細胞周期制御と感染過程における形態分化の関連性に関する研究事例は極めて限られている。本研究では、ウリ科植物を宿主とするウリ類炭疽病菌の付着器分化には、Rab GAP 複合体を構成する Bub2/Bfa1 による G1/S 期の移行抑制が必要であることを明らかにし、さらに本制御機構が植物病原糸状菌に共通して存在し、機能することを示すことにより、植物病原糸状菌の感染成立における細胞周期制御機構の意義を考察した。

**Chapter 2: *Colletotrichum orbiculare* regulates cell cycle G1/S progression via a two-component GAP and a GTPase to establish plant infection.** (ウリ類炭疽病菌は GAP 複合体および GTPase を介して細胞周期 G1/S 期進行を制御して植物感染を確立する)

本章では、ウリ類炭疽病菌における植物感染成立に重要な新規の細胞周期制御因子を発見した。

ウリ類炭疽病菌の病原性欠損変異株 PDM-1 株の変異遺伝子を同定したところ、出芽酵母において Rab GAP をコードし、M 期終了機構を抑制する *BUB2* 遺伝子の相同遺伝子であったことから、本遺伝子を *CoBUB2* と命名した。ウリ類炭疽病菌の野生株と *cobub2* 破壊株の細胞周期を評価したところ、*cobub2* 破壊株は野生株よりも M 期が早期化していた。S 期の開始時期を評価するために、LacO/LacI-GFP システムを糸状菌で初めて導入することに成功し、染色体蛍光タギング法を確立した。本法を用いた解析の結果、M 期の早期化はそれに先立つ G1/S 期移行の早期化によることを見出した。酵母ツーハイブリッド法により *CoBub2* は *CoBfa1* と GAP 複合体を形成することを明らかにし、GTPase *CoTem1* をコードする遺伝子の恒常不活化型の導入解析により、本遺伝子が *CoBub2/CoBfa1* の下流因子として G1/S 期進行制御を担うことを明らかにした。*CoBUB2*、*CoBFA1* および *CoTEMI* の遺伝子破壊株は侵入菌糸形成に必要な細胞骨格因子であるアクチンおよびセプチン集合体の動態異常を示すとともに、感染部位における植物の防御応答を誘導し、植物感染能が顕著に低下した。以上より、ウリ類炭疽病菌において *CoBub2/CoBfa1* 複合体は GTPase *CoTem1* を介して G1/S 期の進行を抑制し、感染器官の形態形成および植物への感染確立に必須であることを明らかにした。

**Chapter 3: Bub2 is a master regulator of cell cycle progression and septum formation during appressorium development and involved in pathogenesis of *Colletotrichum* and *Magnaporthe*.** (炭疽病菌およびいもち病菌の付着器分化過程において Bub2 は細胞周期と隔壁形成の主要制御因子であり、病原性に関与する)

本章では、トランスクリプトーム解析を基にウリ類炭疽病菌における *CoBUB2* の細胞周期制御と病原性への関与を検討するとともに、アブラナ科炭疽病菌およびイネいもち病菌における *BUB2* の細胞周期、隔壁形成に関する機能の保存性を評価した。ウリ類炭疽病菌の野生株と *cobub2* 破壊株の感染過程におけるマイクロアレイ解析を行った結果、G1/S、G2/M 期進行を司る SCF (Skp/Cullin/F-box) 複合体を含むユビキチン-プロテアソーム系や、DNA 複製、DNA 修復といった S 期関連遺伝子群に大幅な発現変動が認められた。加えて転写因子、小型分泌タンパク質、糖質関連酵素、膜輸送体に関連する遺伝子についても発現変動が認められ、これらの遺伝子発現の変動が病原性低下の要因となる可能性が示唆された。さらに、ウリ類炭疽病菌とは異なり、発芽胞子の内部に隔壁を形成するアブラナ科炭疽病菌およびイネいもち病菌における *bub2* 破壊株は、ウリ類炭疽病菌と同様に G1/S 期の早期化が確認された一方で、核分裂に伴う隔壁形成の頻度が低下した。隔壁形成には隔壁形成開始機構 (SIN) およびアクチンリング収縮 (CAR) が必要である。SIN の構成要素の一つである *Dbf2* およびアクチンマーカである *Lifeact* の細胞内局在解析を行った結果、*Dbf2* および *Lifeact* シグナルは M

期後期に発芽胞子内の隔壁形成予定部位に観察されたが、*bub2* 破壊株ではこれらの局在頻度が低下した。さらに、アブラナ科炭疽病菌およびイネいもち病菌の *bub2* 破壊株は共に宿主植物への侵入能力が顕著に低下した。以上より、付着器を介した植物侵入を行う炭疽病菌といもち病菌に共通して、*BUB2* は G1/S 期進行を抑制し、核分裂に伴って隔壁形成を開始させることを見出し、これらの細胞周期および隔壁形成制御が植物病原菌の感染確立に重要な役割を果たすことを明らかにした。

#### Chapter 4: General discussion (総括)

本研究では、植物病原菌において Rab GAP 複合体が GTPase を介して G1/S 期進行を抑制し、核分裂に伴って隔壁形成を開始させることにより、病原性に関与する遺伝子の発現変動を伴って、植物感染を成立させるという新知見を見出した。本研究の Chapter 2 ではウリ類炭疽病菌において Rab GAP 複合体 CoBub2/CoBfa1 が GTPase CoTem1 を介して G1/S 期の進行を抑制するという、これまで他の生物で報告されていた機能とは異なるユニークな現象を見出し、その細胞周期制御が感染器官の形態形成および感染確立に必須であることを明らかにした。本研究の Chapter 3 では、*BUB2* の下流では S 期関連遺伝子群および転写因子や小型分泌タンパク質を含む病原性関連遺伝子群の遺伝子発現が大きく影響を受けることを明らかにし、*BUB2* による細胞周期制御と病原性に関する情報ネットワークの基礎的知見を得ることができた。さらに、付着器を介した植物感染戦略をとるアブラナ科炭疽病菌、イネいもち病菌においても *BUB2* の G1/S 期の進行制御機能が共通していることを明らかにし、胞子発芽時の細胞周期と隔壁形成が関連して、植物感染確立に重要な役割を果たすことを見出した。*Bub2* が制御する下流のカスケードは酵母、非病原糸状菌、ショウジョウバエ、ヒトにおいても広くホモログが存在するが、本研究で明らかにした細胞周期、隔壁形成制御はそれらの生物種における機能とは異なっており、特に G1/S 期に関与することを報告した研究事例は皆無であった。以上より、植物病原菌は植物感染を成立させるにあたり、特徴的な細胞周期、隔壁形成機構を獲得してきたことを提唱した。