

(別紙様式博 5)

## 学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 原田 賢

題目 : Studies on signaling pathways required for infection-related morphogenesis and pathogenesis of plant fungal pathogen *Colletotrichum orbiculare*

(植物病原菌ウリ類炭疽病菌の感染器官の形態形成と病原性に必要なシグナル経路に関する研究)

本研究は、植物病原糸状菌ウリ類炭疽病菌の感染過程に関わる因子を分子生物学的な手法により同定、機能解析し、準活物寄生菌の感染戦略に重要な役割を果たしている細胞内シグナルネットワークを明らかにしたものである。

### 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の防除機構開発に寄与し、食料保護を考える上で重要である。これまで、植物病原糸状菌の感染の成否に関わる感染器官の形態制御因子の解析に関して多くの知見が得られており、細胞内シグナル伝達系として cAMP-PKA 経路や MAPK 経路が中心的な役割を果たすことが解明されている。しかしながら、植物病原糸状菌においてこれらの経路を制御する上流因子に関する知見はほとんど得られていない。

また、農作物に大きな被害をもたらしているいもち病菌や炭疽病菌は準活物寄生と呼ばれる感染様式により、宿主植物への感染を成立させる。本様式は宿主細胞内で活物的な寄生をした後、死物的な寄生に切り替わるユニークな機構である。これまで、植物病原糸状菌において感染初期の活物寄生性の確立に対する細胞内シグナル伝達経路の関与については明らかにされていない。

本研究では、ウリ科植物に感染するウリ類炭疽病菌を準活物寄生性のモデル植物病原菌として扱い、cAMP-PKA 経路と MAPK 経路を制御する因子と活物寄生の確立に必要な因子を同定し、その機能解析を行った。

### Chapter 2: Ras GTPase activating protein CoRas1 is involved in infection-related morphogenesis by regulating cAMP and MAPK signaling pathways through CoRas2 in *Colletotrichum orbiculare*

(ウリ類炭疽病菌の Ras GTPase 活性化因子 CoRas1 は CoRas2 を介し cAMP, MAPK シグナル伝達経路を制御することで感染器官の形態形成に関与する)

本章は、感染器官の形態形成に重要な cAMP-PKA 経路や MAPK 経路を上流で制御する因子を明らかにすることを目的とした。

ウリ類炭疽病菌の T-DNA 挿入変異株系統で得られていた病原性欠損変異株 AA4510 株の変異遺伝子の同定と機能解析を行った。変異遺伝子は Ras GTPase activating protein

をコードし、出芽酵母の *Ira1* と高い相同性を示し、*CoIRA1* と命名した。出芽酵母において *Ira1* は細胞内 cAMP 合成に関わる上流因子 *Ras* の負の制御因子である。また、*Ras* は MAPK 経路の上流制御因子であり、ウリ類炭疽病菌の MAP キナーゼ *Cmk1* 経路上流の MEK キナーゼ *CoMEKK1* は *Ras* 結合ドメインをもつ。これらの知見から、ウリ類炭疽病菌の *CoIra1* は *Ras* を介し、病原性や感染器官の形態制御に重要な cAMP 経路や MAPK 経路を制御する上流因子であることが推定された。本章では、 $\Delta coira1$  株の細胞学的解析、恒常活性型、不活性型 *CoRAS1*、*CoRAS2*、*CoMEKK1* 導入変異株による遺伝学的解析、細胞内 cAMP 定量や MAPK *Cmk1* のリン酸化評価による生化学的な解析により、*CoIra1* および *CoRas2* が cAMP 経路と MAPK 経路を制御する因子であることを示した。

真核生物において *Ras* は活性化や不活化状態により局在部位が異なることが報告されている。本章では、菌糸における  $\Delta cowhi2$  株の *CoRas2* の局在解析と *CoIra1* と *CoRas2* 間の BiFC 解析により、*CoIra1* は *CoRas2* に対する負の制御因子である可能性を示した。

以上から、*CoIra1* は *CoRas2* を介し、cAMP 経路や MAPK 経路を制御することで感染器官の形態形成や病原性に関与することが示唆された。

### Chapter 3: *Colletotrichum orbiculare* *WHI2*, a yeast stress response regulator homolog, controls the biotrophic stage of hemibiotrophic infection through TOR signaling

(ウリ類炭疽病菌の出芽酵母ストレス応答制御因子ホモログ *WHI2* は TOR 経路を介し準活物感染の活物段階を制御する)

本章は、準活物寄生菌ウリ類炭疽病菌の活物寄生確立に関わる細胞内シグナル因子を明らかにすることを目的とした。

前章の結果より、適切な感染器官の形態形成には *CoRas2* の時空間的な制御が必要であることが推定された。そこで、*Ras* 局在制御因子である出芽酵母ストレス応答因子 *WHI2* のウリ類炭疽病菌におけるホモログ *CoWHI2* による *CoRas2* の局在制御を解析した。予想に反し、*CoWHI2* は *CoRas2* の細胞内局在に関与しないことが示された。一方、 $\Delta cowhi2$  株は病斑形成能の低下を示し、宿主のカロース蓄積の顕著な誘導とカロース合成酵素遺伝子の発現量の顕著な増加を示した。さらに、宿主の  $H_2O_2$  蓄積や抗菌性タンパク質遺伝子の発現が顕著に誘導されたことから、*CoWHI2* の変異は宿主免疫応答の誘導に関与することが示された。

一方、 $\Delta cowhi2$  株におけるリボゾームタンパク質遺伝子の発現が顕著な上方制御を示すことをマイクロアレイ解析により明らかにした。真核生物においてリボゾームタンパク質遺伝子の発現制御因子として TOR (Target of Rapamycin) シグナル伝達系が関与することから、本シグナル伝達系の関与が示唆された。そこで、TOR 活性抑制剤ラパマイシン処理時でのマイクロアレイ解析を行った結果、 $\Delta cowhi2$  株のリボゾーム関連遺伝子の発現は低下し、TOR シグナル伝達系の関与が支持された。さらに、ラパマイシン処理区での  $\Delta cowhi2$  株の宿主のカロース形成頻度は減少し、活物寄生は復帰した。

出芽酵母において *Whi2* はフォスホターゼ *Psr1* と複合体を形成し、転写因子 *Msn2* を脱リン酸化することで、ストレス応答遺伝子の発現を制御する。本章では、Y2H 法により *CoWhi2* が *CoPsr1* と相互作用することを示した。さらに、 $\Delta copsr1$  株は  $\Delta cowhi2$  株と同様に、宿主のカロース形成誘導と病斑形成能の低下を示したことから、*CoPsr1* と *CoWhi2* は複合体を形成することで、細胞内の機能に関与する可能性を示唆した。

以上から、ウリ類炭疽病菌 *CoWhi2* は TOR 経路を介し、準活物寄生の活物寄生段階

を制御することが示唆された。

#### Chapter 4: Search for downstream targets of CoWhi2 that associate with the maintenance of biotrophic stage in *C. orbiculare*

(ウリ類炭疽病菌での活物段階維持に関わる CoWhi2 の下流標的因子の探索)

本章では、ウリ類炭疽病菌での活物寄生段階確立に関わる CoWhi2 の下流標的因子の同定を行った。

本章では、マイクロアレイ解析、出芽酵母 Whi2 の研究知見および Y2H 実験により、CoWhi2 と TOR 経路の関係性に関与する新規因子の同定を試みた。マイクロアレイ解析より着目した UDP-glucose 6-glucose 6-dehydrogenase をコードする *CoUDPI* や NAD dependent epimerase dehydratase をコードする遺伝子 *CoNADI* と Y2H の結果から着目した glycogen phosphorylase をコードする *CoGPHI* の病原性への関与は認められなかった。一方、出芽酵母 Whi2 の研究知見より着目した出芽酵母ストレス応答転写因子 Msn2 のウリ類炭疽病菌におけるホモログ *CoMSN2* は病原性への関与を示した。出芽酵母において Whi2 と Psr1 は転写因子 Msn2 を介し、ストレス応答遺伝子の発現に関与する。本章の結果と出芽酵母の知見から、*CoMSN2* が準活物寄生の制御因子として機能する可能性が示唆された。

#### Chapter 5: General discussion (総括)

準活物寄生菌の感染過程は宿主細胞内に侵入するまでの宿主侵入前感染段階と宿主細胞から栄養を獲得するまでの宿主侵入後感染段階に分けられ、両段階の分子レベルの制御機構を理解することは同菌に対する有効な防除システムの開発に寄与すると考える。本研究の Chapter 2 では、CoIra1 や CoRas2 などの Ras シグナルネットワークが cAMP-PKA 経路や MAPK 経路を制御し、感染器官の形態形成や病原性に関わるシグナル伝達機構を明らかにし、宿主侵入前感染段階における制御機構を明らかにした。一方、宿主侵入後の感染段階に関わる主要シグナル伝達経路はこれまでに同定されていなかった。本研究の Chapter 3 では、CoWhi2 が TOR 経路を介し、活物寄生段階の確立に関与することを明らかにした。さらに、本研究の Chapter 4 では、転写因子 CoMsn2 が活物寄生段階確立に必要な CoWhi2 と TOR 経路に関与する可能性を示唆した。

以上、本研究では、活物寄生確立に関わるシグナル伝達経路に関して新知見を得た。今後、本知見が端緒となり、関連する様々な制御因子が同定されることで、本菌の感染制御機構解明の進展が期待される。