

(別紙様式博 5)

学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 小玉紗代



題目: Studies on plant surface signal perception and infection-related morphogenesis of plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*.

(植物病原糸状菌ウリ類炭疽病菌の植物表層シグナル受容と侵入器官の形態形成に関する研究)

本研究は、植物病原糸状菌ウリ類炭疽病菌が植物表層のクチンモノマーを認識し、MOR [morphogenesis-related NDR (nuclear Dbf2-related) kinase network]シグナル伝達経路およびその下流標的転写因子の制御を介して感染器官の形態分化および病原性に関わる遺伝子の発現を制御することにより、植物感染を成立させることを明らかにしたものである。

Chapter 1: General introduction (序論)

植物病原糸状菌が原因となる植物病害は病原全体の約 80%を占める。その感染制御機構を解明することは新規防除技術の開発に寄与し、安定した食料生産を確保する上で重要である。植物病原糸状菌の中でも炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) によって引き起こされる炭疽病は多種の植物に感染し、深刻な被害をもたらすことが知られている。植物上に付着した分生胞子は、植物表面のワックスやクチンモノマーなどの化学的物質や、硬さや疎水性といった物理的形状のシグナルを感知して付着器と呼ばれる感染器官を形成し、宿主植物への侵入を開始する。炭疽病菌を含む多くの植物病原糸状菌において付着器形成は病原性発現に必須であるが、植物表層から受容したシグナルを集約し、付着器形態分化へと変換する細胞内シグナル伝達ネットワークは不明である。これまでにウリ科植物を宿主とするウリ類炭疽病菌において、分裂酵母極性成長部位マーカー *tea1* のホモログ *CoKEL2* 遺伝子が植物表面の硬さや疎水性などの物理的シグナル受容を介した付着器形成に関与することが明らかになっている (Sakaguchi *et al.*, 2008)。一方、ワックスやクチンモノマーなどの化学的シグナル受容経路が、*CoKEL2* 依存的な物理的シグナル受容経路とは独立して存在する可能性が示唆されてきた。本研究では、ウリ類炭疽病菌がクチンモノマーを感知して NDR キナーゼ *CoCbk1* と足場タンパク質 *CoPag1* を構成因子とする MOR シグナル伝達経路を活性化することによって付着器分化を誘導していることを明らかにした。さらに、植物シグナル認識を介した付着器形成には MOR 経路制御下にある

転写因子が必要であることを示し、ウリ類炭疽病菌の植物表層シグナル受容と侵入器官の形態形成メカニズムの全体像について考察した。

Chapter 2: The morphogenesis-related NDR kinase pathway of *Colletotrichum orbiculare* is required for translating plant surface signals into infection-related morphogenesis and pathogenesis. (ウリ類炭疽病菌の形態形成関連 NDR キナーゼ経路は植物表層シグナルの侵入器官分化への変換および病原性に必要である)

本章では、ウリ類炭疽病菌におけるクチンモノマー認識を介した付着器形成に重要な新規のシグナル伝達経路因子を発見した。ウリ類炭疽病菌の付着器形成・病原性欠損 *cokel2* 二重変異株 PDM-4 株の変異遺伝子を同定したところ、出芽酵母の細胞極性成長、分離などに関与する MOR 経路の構成因子 *PAG1* の相同遺伝子であったことから、本遺伝子を *CoPAG1* と命名した。まず、出芽酵母 *pag1* 破壊株の *CoPAG1* 相補株を作成し、*CoPAG1* が *PAG1* の機能的オルソログであることを示した。宿主葉上で *copag1Δ* および *cokel2Δ* は正常付着器を形成し、病原性を保持していたのに対し、*copag1Δcokel2Δ* は異常形態付着器を形成し、病原性欠損であった。さらに、宿主葉由来のクチンモノマー存在下の人工基質上においても各単独破壊株と比較して、*copag1Δcokel2Δ* は異常形態付着器を形成した。このことより、*CoPAG1* はクチンモノマー認識を介した付着器分化に関与することが示され、ウリ類炭疽病菌の付着器形成において *CoKEL2* 依存的な物理的シグナル受容経路と *CoPAG1* 依存的な化学的シグナル受容経路が重複して機能することを明らかにした。次に、酵母ツーハイブリッド法により、*CoPag1* は MOR 構成因子である NDR キナーゼ *CoCbk1* と複合体を形成することを明らかにし、*CoCbk1* 恒常活性型の導入解析およびリン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロットにより、*CoPag1* が *CoCbk1* 活性化を介して付着器形成を制御することを示した。さらに、トランスクリプトーム解析により、*copag1* 破壊および条件的 *CoCbk1* 不活化は付着器形成の異常を引き起こすだけでなく、転写因子、小型分泌タンパク質、植物細胞壁分解酵素、膜輸送体などといった病原性関連因子の発現を抑制することを見出した。以上より、NDR キナーゼ *CoCbk1* と足場タンパク *CoPag1* を構成因子とする MOR 経路は植物シグナルに応答して活性化し、ウリ類炭疽病菌の侵入器官の形態形成および植物への感染確立を制御するコーディネーターとなっていることを明らかにした。

Chapter 3: The *Colletotrichum orbiculare* *MTF4* is a key transcription factor downstream of MOR essential for plant-derived signal dependent appressorium development. (ウリ類炭疽病菌 *MTF4* は植物シグナル認識を介した付着器形成に必要な MOR 下流の転写因子である)

本章では、トランスクリプトーム解析を基に同定した MOR 経路制御下にある新規の転写因子が植物

表層シグナル認識を介した付着器形成に必要であることを見出した。MOR 経路下流転写因子を同定するために、野生株、*copag1Δ*、CoCbk1-AS (analog-sensitive) 株を用いて付着器形成時におけるマイクロアレイ解析を行った。その結果、野生株と比較して *copag1Δ*、CoCbk1-AS 株で下方制御される MOR 経路下流遺伝子の 95%が植物上特異的に上方制御された植物シグナル応答遺伝子であり、これらの遺伝子発現の変動が異常付着器形成の要因となる可能性が示唆された。そこで、これらの MOR 経路下流遺伝子群から転写因子をコードすると推定される遺伝子 *MTF1~10* (MOR-related transcription factor)を同定し、遺伝子破壊株を作出した。その結果、菌類特異的なタンパク質ドメイン構造を持つ Zn(II)₂Cys₆型転写因子遺伝子 *CoMTF4* の破壊株が *copag1* 破壊株と類似した表現型を示すことを見出した。さらに、恒常活性型 CoCbk1 導入解析および過剰発現型 *CoMTF4* 導入解析により *CoMTF4* が MOR 経路下流因子として植物シグナル認識を介した付着器形成および病原性に寄与することを示した。CoMtf4 の細胞内局在解析を行った結果、宿主葉上で付着器形成時の胞子核へ局在したが、スライドガラス上では局在が見られなかったことから、CoMtf4 の植物シグナル応答性が示された。*CoMTF4* の遺伝子発現、核局在性への CoPag1 および CoCbk1 の関与を評価することにより、*CoMTF4* は MOR 経路因子による発現制御および翻訳後制御を受ける可能性を示した。さらに、*CoMTF4* の破壊株と過剰発現株のマイクロアレイ解析を行った結果、*CoMTF4* により発現制御される遺伝子には細胞壁合成や細胞壁成分代謝に関連する遺伝子が含まれており、これらの遺伝子が *CoMTF4* 下流で付着器の形態形成に寄与する可能性が示唆された。以上より、*CoMTF4* は MOR 経路下流で植物シグナル認識を介した付着器形成を制御する転写因子であることを明らかにした。

Chapter 4: General discussion (総括)

本研究では、植物病原糸状菌の植物表層シグナル応答と感染器官の形態形成に関して新知見を見出した。本研究の Chapter 2 では NDR キナーゼ CoCbk1 と足場タンパク CoPag1 からなる MOR シグナル伝達経路がクチンモノマーにより活性化されることによって付着器を誘導していることを示し、これまで他の植物病原糸状菌においても報告されていない植物シグナルを付着器誘導へと変換する制御機構を明らかにした。また、MOR シグナル伝達経路は付着器形成だけでなく、植物細胞壁分解酵素を含む病原性関連遺伝子群の発現を制御し、炭疽病菌の感染成立に寄与することを明らかにした。本研究の Chapter 3 では、MOR 経路制御下にある植物シグナル応答遺伝子群の中から新規の転写因子を同定し、MOR 経路下流の標的因子として植物シグナル認識を介した付着器形成および病原性に寄与することを示した。MOR 経路因子は酵母から哺乳類まで広く真核生物に保存されており、細胞の形態形成への関与が報告されているが、本研究で明らかにした病原菌と宿主植物との相互作用における機能を報告した研究事例は皆無であった。以上より、ウリ類炭疽病菌は植物表層シグナルを

感染器官の形態形成および病原性発現へと変換する機構として MOR 経路を活用していることが示された。MOR 経路はウリ類炭疽病菌に限らず多数の病原菌がもつ機構であることから、本研究を基盤とし、病原菌の植物認識機構をターゲットとした新規農薬や、病原菌に認識されない表層構造をもつ作物といった新規防除技術開発への貢献が期待される。