

### 【審査結果の要旨】

本研究は、ウリ類炭疽病菌の感染器官分化を環境シグナルの受容と細胞応答という視点から捉え、植物表層シグナル分子の受容に関わる細胞内シグナル伝達経路として MOR [morphogenesis-related NDR (nuclear Dbf2-related) kinase network] 経路を見出し、感染器官分化と病原性への関与を明らかにしている。その成果は植物病原糸状菌の感染機構の分子生物学的研究に関して、新規の知見を提示するものである。

Chapter 1 では、序論として、本研究の背景となる植物病害防除における植物病原糸状菌の感染機構研究の重要性を示し、植物表層シグナルの受容と感染器官の形態分化に関する研究について、現在までの知見と未解明な点について述べ、本論文の意義と目的を明らかにした。

Chapter 2 では、ウリ類炭疽病菌における植物表層由来のクチンモノマー認識を介した付着器形成を介在する新規のシグナル伝達経路を見出している。植物上で付着器形成異常と病原性欠損を示す変異株 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、細胞分離に関与する 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。次に、出芽酵母 *pag1* 破壊株の *CoPAG1* 相補実験により、*CoPAG1* が *PAG1* の機能的オルソログであることを示した。ウリ類炭疽病菌の物理的シグナルの受容を介した付着器形成には *CoKEL2* 遺伝子が関与する。二重遺伝子変異株 *copag1Δcokel2Δ* は宿主葉上および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、異常形態付着器の形成と病原性欠損を示し、*CoPAG1* が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* の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* の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、膜輸送体などの病原性関連因子の発現を下方制御することを見出した。以上より、NDR キナーゼ *CoCbk1* と足場タンパク質 *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 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ている。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い、*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を示唆した。さらに、これらの MOR 経路下流遺伝子群から転写因子遺伝子 *MTF1~10* (MOR-related transcription factor) を選抜し、遺伝子破壊実験により、Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型転写因子遺伝子 *CoMTF4* の破壊株が *copag1Δ* と類似した表現型を示すことを見出した。また、恒常活性型 CoCbk1 導入株および過剰発現型 *CoMTF4* 導入株の解析により *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。細胞内局在解析では、宿主葉上での付着器形成における CoMtf4 の胞子核への局在から、CoMtf4 の植物シグナル応答性を確認した。さらに、*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。また、*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を示唆した。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 では、Chapter 2 と Chapter 3 の結果をまとめて、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総括し、考察が加えられている。具体的内容は以下の通りである。Chapter 2 では NDR キナーゼ CoCbk1 と足場タンパク質 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、植物病原糸状菌において報告事例のない、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。Chapter 3 では、MOR 経路制御下にある転写因子遺伝子 *CoMTF4* 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、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病原糸状菌に保存されて

いることから、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の開発や、病原菌の認識を回避する表層構造をもつ作物の作出といった新規防除技術開発の可能性を提示している。

以上、本論文は、植物病原糸状菌の感染戦略における植物表層シグナルの認識と細胞内シグナルネットワークに関して新知見を得ており、博士学位論文として価値があるものと判断した。

## 6 最終試験の結果の要旨

平成30年2月8日 午前10時30分より稲盛記念会館会議室において博士学位論文発表会を公開で行った。口頭発表後、質疑応答が行われた。質問は植物病原糸状菌の感染機構研究における研究成果の意義、結果の解釈、今後の課題など多岐にわたってなされたが、申請者は全ての質問に対し、適切に回答を行った。以上より、最終試験の結果については、審査員全員一致で合格とした。