

【論文目録】

別紙に記載

【審査結果の要旨】

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、準活物寄生性の植物病原糸状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 では、序論として、本研究の背景として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、植物病原糸状菌の感染過程における環境受容と細胞内シグナル伝達機構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、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検討した。

ウリ類炭疽病菌の病原性欠損変異株 AA4510 株の変異遺伝子の同定を行った。その結果、変異遺伝子が Ras GTPase activating protein をコードし、出芽酵母の *Ira1* と高い相同性を示すことを示し、*CoIRA1* と命名した。申請者は出芽酵母における知見から、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を推定した。そこで、 $\Delta coiral$ 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を行い、*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。さらに、*CoRas2* の局在が付着器分化過程でダイナミックな局在変化を伴うこと、さらに *CoIra1* と *CoRas2* 間の BiFC 解析により、*CoIra1* が *CoRas2* に対する負の制御因子であることを示唆した。

以上の結果から、*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を結論づけている。

Chapter 3 では、準活物寄生菌であるウリ類炭疽病菌の感染初期における活物寄生性確立に関わる細胞内シグナル因子を検討した。

前章で適切な感染器官の形態形成には *CoIra1* による *CoRas2* の時空間的な制御が必要であることが推定されたことから、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ている。その結果、 $\Delta cowhi2$ 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、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し、活物寄生性の喪失をもたらすことが示唆された。

さらに、マイクロアレイ解析により $\Delta cowhi2$ 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明らかにした。一方、TOR(Target of Rapamycin)活性抑制剤処理時にはリボゾームタンパク質遺伝子の上方制御が抑制されたことから *CoWhi2* 下流における TOR シグナル伝達系の関与を明らかにした。さらに、ラパマイシン処理区では $\Delta cowhi2$ 株の宿主のカロース形成頻度は減少し、活物寄生が復帰することを示した。

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。申請者は、Yeast Two-Hybrid (Y2H)法により *CoWhi2* が *CoPsr1* と相互作用することを示し、さらに $\Delta copsisr1$ 株が $\Delta cowhi2$ 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ことを提示した。

以上の結果から、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と結論づけている。

Chapter 4 では、ウリ類炭疽病菌での活物寄生段階確立に関わる *CoWhi2* の下流標的因子を検討した。

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により着目した 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* が病原性に関与することを示した。

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を提示した。

Chapter 5 では、総括として、Chapter 2 から Chapter 4 の結果をまとめて、準活物寄生菌の感染過程における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の両段階における分子レベルの制御機構を総括し、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、*CoIra1* や *CoRas2* などの Ras シグナルネットワーク 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。

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、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提示し、以上により、準活物寄生菌の植物感染におけるシグナル伝達機構について総括している。

以上、本論文は、準活物寄生性の植物病原糸状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28年8月3日 午前10時30分より図書館視聴覚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。質問は植物病害防除における研究の意義、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。