

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	吉 田 裕 史
論文題目	Fungal response to plant sugars: nutrition, metabolic state changes, and differentiation switching (糸状菌の植物糖応答： 栄養利用，代謝状態変化，ならびに形態分化スイッチング)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文で主に取り上げたトウモロコシごま葉枯病菌 (<i>Bipolaris maydis</i>) は、伝播・感染源として分生子を形成し、分散、伝播した分生子が宿主トウモロコシ葉上で発芽、侵入、さらには菌糸体を発達させ、72時間後には新たな分生子を用いて次の分散を行うことが知られている。また、本菌はイネいもち病菌などとは異なり、宿主感染時に宿主細胞壁ないし細胞間層に侵入菌糸を局在させることも知られている。これらの知見は、本菌が植物体侵入以降、宿主細胞壁成分を主な栄養源として利用している可能性を示すものであり、かつ、宿主体内で侵入菌糸が短時間の間に栄養生長から生殖生長への切り替えを行っていることも示唆するものであるが、その詳細ならびに分子生物学的な解析は行われてはいない。本論文は、宿主感染時の宿主細胞壁分解酵素遺伝子ならびに宿主細胞壁を構成する植物糖の代謝に関わる遺伝子発現パターンの解析、植物糖の菌細胞生理に及ぼす影響、ならびに栄養条件依存的な分生子分化誘導の存在とそのスイッチング機構を明らかにしたものであり、以下の5章から構成されている。</p> <p>第1章は、上述の知見を示すとともに、序論として、本研究の背景ならびに本論文で取り扱う課題について解説した。</p> <p>第2章では、トウモロコシの主要な細胞壁構成多糖の一つであるキシランに着目し、宿主感染時におけるキシラン利用行動を調査した。キシラン分解酵素遺伝子プロモーター制御下で緑色蛍光蛋白質を発現する遺伝子組換え株を作出し、宿主感染行動における遺伝子発現パターンを調べた。その結果、本菌は宿主侵入後すみやかにキシラン分解酵素の産生を開始することが見出された。さらに、定量PCRによる遺伝子発現解析からも、宿主感染初期の活発なキシラン分解酵素産生が裏付けられ、同時にキシラン分解物であるキシロースやアラビノースの代謝に関連した酵素群の発現も活性化していることが示された。また、遺伝子破壊によりキシロース・アラビノース代謝能欠損株を作出し、野生型株との間で病原力を比較した。その結果、代謝欠損株では病斑形成能が部分的に低下することが示された。以上の調査から、本菌は宿主感染時に宿主細胞壁のキシランを積極的に分解すること、その構成単糖類キシロースならびにアラビノースを炭素源として利用するものの、生長に必要な炭素源として全依存していないことが明らかになった。</p> <p>第3章では、本菌が宿主内で容易に調達可能と考えられる単糖類について、本菌の菌糸体生長ならびに分生子形成に及ぼす影響をまず調べた。その結果、アラビノースによって、菌糸体生長が抑制されるとともに速やかな分生子形成が顕著に促進される現象を見出した。さらに、アラビノース存在下では、グリオキシル酸回路の亢進による糖新生経路の賦活が認められ、炭素飢餓応答が引き起こっていることが示唆された。そこで、アラビノースによる分生子形成促進のメカニズムを探究するため、各種糖存在条件における炭素源利用様式について、炭水化物代謝フラックスに焦点を当てて調査を行なった。遺伝子発現解析に基づいた炭水化物代謝フラックス推定の結果、</p>			

アラビノース存在下では、他の条件で観察されないようなヘキソースリン酸(HMP)側路の亢進が生じていることが示された。さらに、HMP側路に関与する遺伝子の破壊株を作出し、アラビノース存在下における表現型を調べた。その結果、破壊株は野生型株と比較して分生子形成が顕著に抑制されるとともに菌糸体生長率が増加した。以上のことより、アラビノースはHMP側路の亢進を誘導することで、本菌の分生子形成行動に影響を及ぼしていると考えられた。

第4章では、アラビノース存在下で認められるHMP側路の亢進と分生子形成促進の関連について、さらに解明を進めた。一般的にHMP側路はNADPHの産生に寄与することから、HMP側路の亢進はNADPH供給量の増加を引き起こし、NADPH依存的な化学反応の促進に繋がるものと予想される。そこで、アラビノース存在下でのNADPH消費経路の動態を調べたところ、NADPH依存的な反応系に関わる酵素の一つであるNADPHオキシダーゼの関連遺伝子群が、アラビノース存在下で発現増加傾向にあることを見出した。NADPHオキシダーゼはNADPH依存的に活性酸素種(ROS)を生成する酵素である。従って、NADPH依存的なROS生成の活発化がアラビノース存在下での分生子形成促進に関連していることが考えられた。そこで、メナジオンを用いて細胞内ROS生成誘導を行ったところ、顕著な分生子形成促進ならびに菌糸体生長抑制が観察され、上記仮説と矛盾しなかった。さらに、HMP側路恒常的活性化株を作出したところ、分生子形成が顕著に促進され、菌糸体生長は抑制された。また、この組換え株では、HMP側路恒常的活性化に伴いNADPHオキシダーゼ関連遺伝子群の発現増加が再現された。以上の結果より、アラビノースによるHMP側路亢進はROS生成を引き起こし、ROSが分生子分化誘導のスイッチングを担っていることが明らかとなった。

第5章では、以上明らかとなったアラビノースによる分生子形成促進ならびにその機構について、本菌ならびに他の糸状菌の生活史ならびに生態学的特性と併せて議論を行なった。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

糸状菌の分生子形成誘導は、概日リズム、光刺激等などのキューによって誘導され、その分子生物学的誘導メカニズムも解明されているが、最も古くから認識されているキューの一つである栄養条件の変化に起因する分生子分化誘導については、ほとんど解明されていない。また、本論文で主として取り上げられている *B. maydis* は、宿主植物体上で極めて短い感染サイクルを持つことから、感染菌糸は宿主組織侵入後、速やかにモードを栄養生長から生殖生長に切り替えていると考えられるが、そのキューについても不明である。本論文では、本菌の宿主感染時における、宿主細胞壁分解酵素遺伝子ならびに宿主細胞壁を構成する植物糖の代謝に関わる遺伝子の発現パターンを解析し、さらに、植物糖の本菌細胞生理に及ぼす影響を調べた。その結果、細胞壁構成要素の植物糖がキューとなり、栄養条件依存的な分生子分化誘導を引き起こすことを見出すとともに、その ROS を介したスイッチング機構を明らかにした。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. レポーターアッセイ法ならびに感染植物由来試料に基づく qRTPCR 法を用い、宿主トウモロコシ感染初期葉内での *B. maydis* の細胞壁分解酵素の発現動態を明らかにした。
2. アラビノースによって *B. maydis* の菌糸体生長が抑制され、且つ分生子形成を顕著に促進する現象を見出した。菌細胞における糖代謝フラックスを調べた結果、アラビノース存在下では、他の条件で観察されないような HMP 側路の亢進が生じていることを解明した。
3. アラビノース存在下で認められる HMP 側路の亢進は NADPH オキシダーゼ関連遺伝子群の発現量増加を引き起こし、その結果、生じる ROS が分生子分化誘導のスイッチングを担っていることを示した。

以上のように、本論文は、感染侵入によって宿主細胞壁から遊離するアラビノースがキューとなり本菌の栄養生長から生殖生長への切り替えが宿主細胞内で進行している可能性を示し、その過程には HMP 側路亢進とその結果生じる ROS が関わることを明らかにしたものであり、微生物環境制御学、真菌学ならびに植物保護学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 31 年 2 月 15 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）