

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	辻 健也
論文題目	Studies on the formation and elongation of the delimiting membrane in <i>Bipolaris maydis</i> (トウモロコシごま葉枯病菌における前孢子膜の形成および伸長に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>有性生殖は真核生物の遺伝的多様性をもたらす重要な機構の一つであり、分散あるいは耐久器官として孢子を形成する真菌類にとって、有性孢子はそれらの機能だけでなく種集団の維持の上でも極めて重要な役割を担っている。真菌類の有性孢子形成メカニズムの研究はモデル生物である出芽酵母ならびに分裂酵母を用いて極めて詳しく行われている。しかし、多くの植物病原菌および産業利用菌はこれら酵母と同じく子嚢菌類に属しているが、様々な理由からその有性孢子である子嚢孢子形成の分子生物学的な解析はあまり進んでいない。その理由の一つとして、子嚢孢子形成過程の複雑さと可視化の問題が挙げられる。先の酵母類では体細胞自身が配偶子として接合した後、全実性的に子嚢孢子を生ずる。一方、糸状子嚢菌では子嚢果と呼ばれる器官内で様々な分化を伴いながら、子嚢孢子形成を行うだけではなく、出芽酵母等で解析に用いられた蛍光タンパク質マーカーが糸状子嚢菌の子嚢孢子形成時には検出できないことが具体的理由として指摘されている。</p> <p>本論文では、糸状子嚢菌の子嚢孢子形成メカニズムの一端を明らかにするために、植物病原菌トウモロコシごま葉枯病菌 (<i>Bipolaris maydis</i>) を実験材料として、子嚢孢子的形成研究における遺伝子破壊と外来蛍光タンパク質遺伝子導入がもたらす影響を見出し、その影響を低減する手段を用いて、子嚢孢子膜の前駆体である前孢子膜の形成および伸長に関与する因子の解析を試みた。論文の内容は以下の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、子嚢孢子的形態形成に関与すると考えられるセプチン遺伝子の一つ <i>Cdc10</i> の遺伝子破壊株を作出し、本破壊株と野生型株との交配により生じる子嚢孢子的形態異常について調査した。この形態異常は子孫子嚢孢子的における <i>Cdc10</i> の遺伝子型に関わらず、同一子嚢内の8個すべての子嚢孢子里に生じ、<i>Neurospora crassa</i> の <i>Asm-1</i> 突然変異株で認められた現象に類似することを見出した。さらに、この現象が同菌で報告されているRNAサイレンシングの一種、meiotic silencing by unpaired DNA (MSUD) に該当するか否かを調査した。MSUDは減数分裂時に非対合となる遺伝子が、相同染色体対合以降から子嚢孢子的完成の間サイレンシングされる現象である。<i>Cdc10</i> 遺伝子破壊株では <i>Cdc10</i> 座の野生型アリルが薬剤耐性マーカー遺伝子に置換されており、野生型株との有性生殖過程において、野生型株由来の野生型アリルが非対合となってサイレンシングを受けた可能性がある。そこで、非対合を回避するために <i>Cdc10</i> 座の野生型アリルにフレームシフトを生じさせた菌株を作出し、野生型株との交配に供した。その結果、子嚢孢子的形態は全て正常であった。また、<i>Cdc10</i> 遺伝子を <i>Cdc10</i> 座以外に異所的に導入した菌株を作出し、有性生殖過程において <i>Cdc10</i> 遺伝子が非対合となるような交配実験から得られた子嚢孢子的形態は全て異常であった。さらに、MSUDへの関与が予想される遺伝子 <i>Rdr1</i> の破壊株を作出し、<i>Cdc10</i> 遺伝子破壊株との交配を</p>			

行った。その結果、正常な子嚢胞子が形成されることを確認した。以上の実験結果から、野生型株と*Cdc10*遺伝子破壊株の交配で認められた子嚢胞子異常はMSUDによるものと結論づけた。また、*Rdr1*等MSUD関連遺伝子の系統解析の結果、これら遺伝子は真正子嚢菌綱に広く分布していることが明らかとなった。MSUDはSordariomycetesの一部の菌でのみ確認されている現象であるが、分類学的に遠縁のDothideomycetes所属菌である本菌で発見ならびにこの系統解析結果は、MSUDが糸状子嚢菌で進化系統的に保存された機構である可能性を示すものである。

第3章では、無性および有性生殖生活環におけるCDC10を構成要素とするセプチンの局在解析を行った。従来、本菌の子嚢胞子形成過程では緑色蛍光タンパク質遺伝子(*eGFP*)の発現は確認できていなかったが、その原因がMSUDによるものであることを見出し、*Rdr1*遺伝子破壊株を交配に供試することで問題の解決を行った。*eGFP*融合*Cdc10*遺伝子(*CDC10-eGFP*)が野生型*Cdc10*遺伝子(*CDC10*)と同等の機能を持つことを確認後、同遺伝子発現株の菌糸、分生子および子嚢胞子におけるCDC10-eGFPの局在ならびに高次構造形態を調査した。その結果、セプチンは器官ごとに特異的な高次構造を形成し、器官の形態によって局在パターンが変化することを見出した。また分生子および子嚢胞子内の3D像解析から、それらの高次構造体は発芽と共に分解され、構成要素が発芽時の菌糸形態形成のために、再利用されている可能性を見出した。さらに子嚢胞子形成過程の3D像解析の結果、CDC10-eGFPは胞子形成中の前胞子膜表面近傍に局在し、無性生殖生活環の器官形成では観察されなかったネット様構造を構築していることが明らかになった。また、同一子嚢内のすべての前胞子膜が蛍光を示したことから、子嚢母細胞で発現したCDC10-eGFPは娘細胞(子嚢胞子)が成熟するまで共有利用されていることも示唆された。

第4章ではexocyst複合体の構成因子の一つであり、細胞内の小胞輸送に関与していると予想される*Sec5*遺伝子の子嚢胞子形成に関わる機能について主に調査した。*Sec5*遺伝子破壊株は菌糸生育および病原性の低下を示し、また、野生型株との交配において子嚢胞子は形成されなかったことから、子嚢胞子形成に必須であることが示唆された。*Rdr1*遺伝子破壊株を用いMSUDの影響を抑制した場合でも子嚢胞子形成は著しく阻害されることを明らかにした。*Sec5*遺伝子破壊株の有性生殖過程を解析した結果、本遺伝子の破壊は減数分裂とその後の有糸分裂による娘核の8核化までの過程にはなんら影響を及ぼさず、その後の前胞子膜の形成不全あるいは、前胞子膜の伸長不全を引き起こし、子嚢胞子形成不全となることを明らかにした。

第5章では、以上明らかとなったMSUDおよび有性生殖時におけるCDC10およびSEC5の機能について、本菌を含む糸状子嚢菌と子嚢菌酵母の前胞子膜の形成および伸長メカニズムについて議論を行った。

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)

本論文はトウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) におけるセプチン遺伝子 *Cdc10* の破壊株と野生型株の交配で全子嚢胞子が形態異常を示すことの発見を端緒に、その現象が本菌の減数分裂から子嚢胞子形成時に特異的に生じるRNAサイレンシング (MSUD) によって引き起こされていることを明らかにするとともに、MSUD の回避により有性生殖過程解析へ蛍光タンパク質マーカー遺伝子の利用が可能となることを示し、この技術を用いて、セプチンならびに小胞輸送関連因子SEC5が子嚢胞子膜の前駆体である前胞子膜の形成および伸長に関与することを明らかにした。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. *Cdc10* 遺伝子破壊株と野生型株の交配により生じる全子嚢胞子の形態異常にMSUDが関与していること、*Rdr1* 遺伝子破壊株を交配に用いることでMSUDを抑制することが可能であることを見出した。また、*Dothideomycetes* 所属菌においてMSUDが機能していることを初めて示し、同機構が糸状子嚢菌において広く保存されている可能性を示した。
2. MSUDを抑制することで、従来困難であった蛍光タンパク質の子嚢胞子形成過程における局在解析への利用が可能になることを示した。
3. CDC10-eGFP融合タンパク質発現株を用いた解析により、CDC10は子嚢胞子の形態形成過程において、菌糸、分生子および子嚢胞子内部では観察されなかったネット様構造を前胞子膜表面近傍に形成しながら局在することを明らかにし、糸状子嚢菌と出芽酵母の子嚢胞子形成過程におけるセプチンの局在や高次構造体の形態が異なることを初めて示した。
4. SEC5が本菌の子嚢胞子形成過程の前胞子膜の形成に必須であることを明らかにするとともに、菌糸生育および病原性にも関与していることを示した。

以上のように、本論文は、MSUDが糸状子嚢菌の有性胞子形成に関する分子生物学的解析の阻害要因の一つとなっている可能性を示し、その回避が子嚢胞子形成機構の解明に貢献できることを*Cdc10*ならびに*Sec5*遺伝子の研究を通して実証したものである。さらに、これら遺伝子産物の子嚢胞子形成過程に果たす役割を糸状子嚢菌ではじめて明らかにしたのもでもあり、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、令和4年2月16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)