

氏 名 ^{たか}高 ^の野 ^{よし}義 ^{たか}孝
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学位記番号 論 農 博 第 2207 号
 学位授与の日付 平成 10 年 11 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
 学位論文題目 Molecular Genetic Studies on Appressorial Melanization of *Colletotrichum lagenarium*

(ウリ類炭そ病菌の付着器のメラニン化に関する分子遺伝学的研究)

(主査)

論文調査委員 教授 古澤 巖 教授 泉井 桂 教授 津田盛也

論 文 内 容 の 要 旨

多くの植物病原糸状菌は、その宿主植物への侵入に際して、分生胞子の発芽、付着器分化、侵入菌糸の形成という過程を経て感染を成立させる。ウリ科植物を侵すウリ類炭そ病菌 (*Colletotrichum lagenarium*) では、宿主植物への侵入成立にメラニン色素による付着器の着色が必須であることが明らかにされている。本論文はウリ類炭そ病菌における付着器のメラニン化機構を分子遺伝学的に解析した研究をとりまとめたものである。

まず、本菌のメラニン合成欠損アルビノ株を相補する遺伝子 *PKS 1* の全塩基配列決定を行った。その結果、*PKS 1* 遺伝子は 2 ケ所のイントロンによって分断される 3 つのエキソンからなり、2187 アミノ酸をコードしていることが判明した。*PKS 1* 遺伝子の欠損変異株の表現型およびその推定アミノ酸配列から *PKS 1* 遺伝子は、メラニン合成の初期過程であるペンタケタイド合成に関与するポリケタイド合成酵素をコードしていることが明らかとなった。

次に、この *PKS 1* 遺伝子とナン黒斑病菌のポリケタイド合成酵素遺伝子 *ALM* との機能の比較を行った。ナン黒斑病菌では付着器のメラニン化が認められず、また、メラニン合成欠損株でも病原性を有しており、メラニンの器官局在性や、その役割がウリ類炭そ病菌とは異なっている。そこで、このポリケタイド合成酵素をコードしている *ALM* 遺伝子を用いて *PKS 1* 欠損アルビノ株の相補性の検討を行った。その結果、*ALM* 遺伝子導入により *PKS 1* 欠損アルビノ株のメラニン合成能が回復した。したがって、ナン黒斑病菌のポリケタイド合成酵素 *ALM* はウリ類炭そ病菌のポリケタイド合成酵素 *PKS 1* と相同の機能を有していると推定された。しかし、その侵入力は完全には回復しなかった。また、*ALM* 遺伝子導入株と野生株における付着器のメラニン化を比較したところ、*ALM* 遺伝子導入株では野生株において認められるメラニン沈着層のうち内層および中間層が認められなかった。したがって、*PKS 1* 遺伝子によって相補されるが *ALM* 遺伝子によっては相補されないメラニン沈着層の内層および中間層の形成がウリ類炭そ病菌の宿主侵入過程において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

次に、メラニン合成酵素遺伝子の発現・調節機構を明らかにするため、分生胞子の発芽から付着器分化までの過程における *PKS 1*、*SCD 1*、*THR 1* 各遺伝子の経時的な転写パターンを調べた。この結果、3 遺伝子は付着器分化過程の初期段階、つまり発芽開始と同時に *de novo* に転写されることが明らかとなった。また、分生胞子が発芽しても付着器分化を行わない付着器非分化過程における転写パターンとの比較から、付着器分化過程においては、形態分化と連携したメラニン合成酵素遺伝子の転写レベルおよび転写後のレベルでの制御が関与していることを示した。

次に、メラニン合成酵素 *SCD 1* の付着器分化過程における蓄積および局在性について解析するため緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合タンパク質レポーター系を確立した。ウリ類炭そ病菌の *SCD 1* 遺伝子の下流に改変型 GFP である *EGFP* 遺伝子を連結させ、*SCD 1*-EGFP 融合遺伝子を構築し野生株に導入した。そして *SCD 1* 遺伝子と相同性組換えを起こすことにより、融合遺伝子が *SCD 1* 遺伝子とほぼ同様の転写パターンを示す EGSD53 株を得た。この EGSD53 株においては、*SCD 1*-

EGFPタンパク質による蛍光は付着器のメラニン化が観察され始める培養開始5時間後においてはじめて観察された。また、その蛍光は付着器に限定されていた。

したがって、*SCD 1* 遺伝子の転写は分生胞子の発芽開始と同時に進行するが、その翻訳は付着器形成後のメラニン化へと移行する時期に起き、さらにその翻訳産物は付着器に局在することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

多くの植物病原菌は、その宿主植物へ付着器を形成して侵入する。ウリ類炭そ病菌ではこの付着器のメラニン化が病原性発現に必須の因子である。しかし、付着器のメラニン化過程に関与する遺伝子の構造、機能、発現制御機構に関しては詳細な研究は行われていなかった。本論文では、この付着器のメラニン化機構を、分子遺伝学的手法を用いて詳細に解析しており、メラニン合成酵素遺伝子の構造決定および機能解析を行い、また、メラニン合成酵素遺伝子の発現制御について検討したものである。評価すべき点は以下のとおりである。

1. ウリ類炭そ病菌のメラニン合成欠損株であるアルビノ株を相補する遺伝子 *PKS 1* の全塩基配列を決定した。*PKS 1* 遺伝子は2ヶ所のイントロンによって分断される3つのエキソンからなり、2187アミノ酸をコードしていた。また、その推定アミノ酸配列からメラニン合成経路のうちペンタケタイド合成に関与するポリケタイド合成酵素をコードしていることが明らかとなった。

2. *PKS 1* 遺伝子とナシ黒斑病菌のポリケタイド合成酵素遺伝子 *ALM* との機能の比較を行った。*ALM* 遺伝子をウリ類炭そ病菌の *PKS 1* 欠損アルビノ株に導入し、*ALM* 遺伝子によって *PKS 1* 欠損株のメラニン合成能が回復することを明らかにした。導入株についての詳細な解析の結果、導入株の付着器におけるメラニン沈着層およびその侵入能は野生株と同一ではないことを明らかにした。*ALM* 遺伝子によっては付着器におけるメラニン沈着層の内層、中間層の形成は相補されず、この内層、中間層がウリ類炭そ病菌の侵入能に重要であることを示した。

3. メラニン合成酵素遺伝子 *PKS 1*、*SCD 1*、*THR 1* の付着器分化過程における経時的転写パターンを調べ、3遺伝子が付着器分化過程の初期段階において *de novo* に転写されることを明らかにした。さらに、付着器非分化過程における転写パターンとの比較から、付着器分化過程には形態分化と連携したメラニン合成酵素遺伝子の転写制御および転写後の制御が関与していることを示した。

4. メラニン合成酵素 *SCD 1* の付着器分化過程での蓄積および局在性の検討のため、EGFPを用いる融合タンパク質レポーター系を確立した。導入した *SCD 1*-EGFP融合遺伝子が本来の *SCD 1* 遺伝子と同様の転写パターンを示す形質転換株を分離し、この株における *SCD 1*-EGFPタンパク質による蛍光を経時的に観察することにより、*SCD 1* 転写産物が付着器のメラニン化が始まる直前に翻訳されることを明らかにした。また、付着器分化胞子において、*SCD 1* タンパク質が付着器に局在していることを示した。

以上のように本研究は、植物病原菌ウリ類炭そ病菌における付着器のメラニン化に関する分子遺伝学的研究を行い、メラニン合成酵素遺伝子の構造決定とその機能解析、さらにメラニン合成酵素遺伝子の転写、翻訳について明らかにしたものであり、植物病原菌の病原性機構について多くの新知見をもたらした。分子生物学、病原微生物学並びに植物病理学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10年10月22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。