

氏名	こ じま かい へい 小 島 海 平
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1378 号
学位授与の日付	平 成 15 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 学 専 攻
学位論文題目	Studies on the mitogen-activated protein kinase cascades in the phytopathogenic fungus <i>Colletotrichum lagenarium</i> (植物病原糸状菌であるウリ類炭そ病菌におけるマップキナーゼシグナル伝達 経路に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 奥 野 哲 郎 教 授 遠 藤 隆 教 授 植 田 和 光

### 論 文 内 容 の 要 旨

植物病原糸状菌は孢子を形成し飛散させることにより、その感染を成立させ、そして拡大していく。病原菌の孢子の多くは、宿主植物上において発芽し、発芽管の先端に付着器と呼ばれるドーム状の侵入器官を形成する。これらの形態分化は、植物体表面などの外的環境から刺激の受容、そしてその情報の細胞内伝達、伝達後の適切な反応を経て進行していくと考えられるが、その詳細は明らかにされていない。Mitogen-Activated Protein (MAP) キナーゼが関与する細胞内シグナル伝達経路は、真核生物の細胞応答、細胞分化、細胞周期制御を司る最も重要な経路の一つであるが、植物病原菌においてMAPキナーゼ経路の感染機構での役割についてはほとんど知見は得られていなかった。本研究においては、ウリ科植物の病原糸状菌であるウリ類炭そ病菌 (*Colletotrichum lagenarium*) を対象として、2種類のMAPキナーゼ経路の役割を主に分子遺伝学的手法を用いて解析した。その結果、これらの細胞内シグナル伝達経路が、本菌の環境応答、殺菌剤感受性、そして植物感染過程において重要な役割を果たしていることを明らかにしている。

第一章では、出芽酵母のHog1ファミリーに属するMAPキナーゼをコードする遺伝子を分離し、その機能解析を行った。Hog1型MAPキナーゼ間の保存アミノ酸配列を元にデザインした縮合プライマーを用いたPCR法により、ウリ類炭そ病菌からMAPキナーゼ遺伝子 *OSCI* を分離した。相同性組換えを介した遺伝子破壊法により *OSCI* 遺伝子破壊株を作出した結果、*OSCI* 破壊株は栄養培地上で野生株と同等に生育した。また、破壊株は宿主植物に対し野生株と同等の病原性を有していた。これらの結果より、*OSCI* は、本菌の栄養生育および病原性発現に必須でないことを示した。一方、*OSCI* 破壊株の生育は、高浸透圧環境下で顕著に低下したことから、*Osc1*MAPキナーゼ経路は糸状菌の外界環境への適応に関与していることが明らかとなった。さらに *OSCI* 破壊株は、Phenylpyrrole系殺菌剤であるFludioxonilに対し、顕著な耐性を示し、*Osc1*MAPキナーゼ経路が殺菌剤感受性に関与することを明らかにした。

第二章では、出芽酵母のMpk1ファミリーに属するMAPキナーゼをコードする遺伝子 *MAF1* を分離し、その機能解析を行った。*MAF1* 遺伝子破壊株は、培地上では野生株同様に生育するが、宿主植物にほとんど感染できない。このことから *Maf1*MAPキナーゼ経路が、本菌の病原性に必須であることを示した。*MAF1* 破壊株は、本菌の植物感染に必須な細胞器官である付着器を形成できなかった。この結果より、*Maf1*MAPキナーゼ経路は、ウリ類炭そ病菌の感染過程において付着器形成を制御していることを示した。本菌においては、出芽酵母のFus3型MAPキナーゼをコードする遺伝子 *CMK1* が、付着器形成に関与していることが示されている。*MAF1* 破壊株と *CMK1* 破壊株の比較より、*Maf1*MAPキナーゼが付着器の初期分化段階を制御しているのに対し、*Cmk1*MAPキナーゼが付着器分化後の成熟化に関与していることを示唆した。

第三章では、*Maf1*MAPキナーゼによる付着器の形成制御についてさらに検討した。*MAF1* 破壊株は、病原性および付着器形成の欠損に加えて、細胞壁強度の低下を示した。*MAF1* 破壊株における付着器形成の欠損と細胞壁強度の低下との関係を調べるため、多種の生物で細胞壁合成への関与が報告されている Rho GTPase をコードする遺伝子 *CRH1* を本菌より分離し、その機能解析を行った。*Crh1* の機能は本菌の生存に必須であると考えられたため、*Crh1* の機能を阻害する変異

型Crh1を発現する遺伝子CRHI<sup>T19N</sup>を作出し、本菌の野生株に導入した。CRHI<sup>T19N</sup>導入株は、MAFI破壊株と同様に細胞壁強度の低下を示し、CMK1が本菌の細胞壁維持に関与していることを示した。しかし、CRHI<sup>T19N</sup>導入株は、MAFI破壊株とは異なり付着器分化能を保持していた。このことから、細胞壁強度の低下がMAFI破壊株における付着器形成の欠損の直接の原因でないことが示唆された。一方、CRHI<sup>T19N</sup>導入株は病原性の低下を示したことから、Rho GTPase 経路は本菌の病原性発現において重要であることを示唆した。

### 論文審査の結果の要旨

植物病原糸状菌は宿主植物表面などの外的環境を認識し、感染行動を進行させていくが、この過程にどのような細胞シグナル伝達経路が関与しているのかについてはほとんど明らかにされていなかった。本論文はウリ類炭そ病菌をモデル植物病原糸状菌として用いて、2種のMAPキナーゼ伝達経路の本菌における役割を研究し、これらの細胞内シグナル伝達経路が、本菌の浸透圧応答、殺菌剤感受性機構、および植物感染過程において重要な役割を果たしていることを明らかにしている。本論文においてその評価すべき点は以下の通りである。

1. 出芽酵母のHog1ファミリーに属するMAPキナーゼ遺伝子OSC1がウリ類炭そ病菌の生育および病原性発現には必須でないが、本菌の浸透圧応答および殺菌剤Fludioxonilに対する感受性機構に関与することを明らかにした。
2. Mpk1ファミリーに属するMAPキナーゼをコードする遺伝子MAFIの機能解析を行い、Maf1MAPキナーゼ経路が、ウリ類炭そ病菌の病原性に必須であることを示した。
3. Maf1MAPキナーゼが、ウリ類炭そ病菌の付着器の初期分化段階を制御しているのに対し、Fus3型MAPキナーゼCmk1が、付着器分化後の成熟化に関与していることを示唆した。
4. MAFI破壊株は、病原性および付着器形成の欠損に加えて、細胞壁強度の低下を示したが、細胞壁維持に関与するRho GTPase Crh1の機能を阻害した変異株の表現型解析より、細胞壁強度の低下がMAFI破壊株における付着器形成の欠損の直接の原因ではないことを示唆した。
5. Rho GTPase 経路のウリ類炭そ病菌の病原性発現への関与を示唆した。

以上のように本論文は、植物病原糸状菌であるウリ類炭そ病菌においてはじめてMAPキナーゼの役割を明らかにした。その研究結果は、MAPキナーゼ経路が本菌の環境適応、農薬感受性と耐性、および病原性発現において極めて重要な役割を果たしていることを示しており、植物病理学、植物保護学、微生物学、細胞生物学の分野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15年10月23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。