

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	Nur Sabrina Ahmad Azmi
論文題目	Studies on an effector NLP1 expressed during the late phase of plant infection by <i>Colletotrichum orbiculare</i> (ウリ類炭疽病菌の植物感染後期において発現するエフェクターNLP1の研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>作物生産における糸状菌病の防除は、安定した食糧確保のための重要な課題の1つである。より効果的な糸状菌防除を実現するためには、植物病原糸状菌の感染戦略、および作物側の防御戦略を詳細に理解することが重要である。植物病原糸状菌は感染を成立させるためには、宿主植物の防御応答を抑制する必要がある、この抑制には一般には「エフェクター」と呼ばれる一群の分泌タンパク質が重要な役割を担っていると推定されている。しかし、エフェクターによってどのように宿主植物の抵抗性が抑制されるのか、その詳細は不明である。エフェクターの中には、その発現時期が厳密に制御されているものが多い。例えば、細胞死を誘導するエフェクターであるNLP (Necrosis- and ethylene-inducing-like proteins) は、その発現時期は殺傷フェーズと呼ばれる感染後期に限定されている。NLPの厳密な発現制御は植物病原糸状菌のみならず、植物病原性の卵菌においても見出される。では、この制御は感染戦略上、重要なのであろうか？もしこの制御が乱れたらどうなるのであろうか？</p> <p>本研究では、この問題に取り組むために、エフェクターNLPを恒常的に発現する植物病原糸状菌を人為的に作出し、この病原菌に対する詳細な解析を実施することを計画した。研究には、ウリ類炭疽病菌 <i>Colletotrichum orbiculare</i> を用いた。本菌はウリ科作物に炭疽病と呼ばれる病害を引き起こす。解析の結果、ウリ類炭疽病菌において恒常的に発現させた当該エフェクターのカルボキシル側の領域が、ウリ科作物によって病原体関連分子パターン (Pathogen-Associated Molecular Pattern: PAMP) として認識され、その抵抗反応が活性化されることを発見した。主な内容は以下の通りである。</p> <ol style="list-style-type: none">1. 感染後期において高発現している細胞死誘導型のNLP (NLP1と命名) を恒常的に発現するウリ類炭疽病菌の形質転換株を作出した。本形質転換株をキュウリに接種した結果、この株は野生型株とは異なりキュウリに感染することが全くできなかった。この現象はメロン、トウガンなどの他のウリ科作物においても観察された。NLP1を恒常的に発現するウリ類炭疽病菌は、野生型株と同等にキュウリ子葉上でメラニン化した付着器を形成していた。しかし、形質転換株の付着器は野生株のそれとは対照的にキュウリへの侵入菌糸形成が効率的に行われず、また、その相互作用部位ではキュウリ細胞による活性酸素の生成およびカロースの蓄積が検出された。これらの結果より、感染後期に発現するエフェクターNLP1を恒常的にウリ類炭疽病菌において発現させた場合、ウリ科作物の抵抗反応が誘導され、菌の感染が阻害されることを明らかにした。また、本結果は、誤発現されたエフェクターNLP1が、ウリ科作物に認識され、その結果として、植物抵抗性が誘導されることを示唆した。2. NLP1を一過的にベンサミアナタバコに発現させた場合、発現部位に壊死斑が形成された。この結果より、NLP1はベンサミアナタバコにおいて細胞死を誘導する活性を有することを明らかにした。127番目のヒスチジンをアラニンに置換した変異NLP1では、細胞死誘導能を消失することが見出された。当該変異NLP1を恒常的に発現させたウリ類炭疽病菌の形質転換株は、野生型株とは対照的に、そして野生型NLP1を恒常的に発現する株と同様にキュウリに感染することはできなかった。本結果より、			

NLP1の細胞死誘導能は、ウリ科作物における抵抗性誘導には必須でないことがわかった。また、エフェクターNLPの中央領域にはシロイヌナズナがPAMPとして認識し、抵抗性を誘導するアミノ酸配列があることが近年になり報告されており、本配列がNLP1にも見出された。この配列を改変した変異NLP1を恒常的に発現させた場合においても、ウリ類炭疽病菌はキュウリに感染することはできなかった。したがって、NLP1の恒常的発現によるキュウリの抵抗性誘導には、シロイヌナズナが認識するNLP1中央領域に存在するPAMP配列も必須ではないことが判明した。

3. NLP1に対する欠失解析を実施した結果、NLP1のカルボキシル末端側の欠失により、キュウリへの抵抗性誘導能が消失することを明らかにした。さらに赤色蛍光タンパク質であるmCherryにNLP1のカルボキシル末端の32アミノ酸を付加した融合タンパク質をウリ類炭疽病菌において恒常的に発現させた場合、ウリ科作物に対する明確な感染阻害が見出された。この結果より、NLP1のカルボキシル末端の32アミノ酸からなる領域をウリ科作物はPAMPとして認識し、その結果として、本菌の感染を完全に抑止するような強度抵抗性を発動していることを明らかにした。つまり、エフェクターNLP1は、アブラナ科のシロイヌナズナとウリ科作物が共通してPAMPとして認識するが、その認識部位は全く異なっていることが判明した。この結果は両植物が独立にNLP1を認識できるように進化したことを示唆した。

4. ウリ類炭疽病菌におけるNLP1遺伝子の標的破壊株を、相同性組換えを用いた遺伝子置換法で作出した。作出した破壊株について病原性試験をおこなった結果、破壊株は野生型株と同等の病原性を示した。この結果より、NLP1遺伝子は本菌の宿主感染戦略に必須ではないことが示唆された。ウリ類炭疽病菌においてはNLP1以外にも6種のNLP様遺伝子が存在しており、これらの中で機能重複が存在する可能性が示唆された。また、そのうちの2つのNLP様遺伝子はNLP1とは異なり、本菌の感染初期で発現することを見出した。これらについて、ウリ類炭疽病菌の恒常的発現株を作出した結果、いずれにおいても、NLP1の場合とは異なり、ウリ科作物への感染阻害は見出されなかった。また、カルボキシル末端32アミノ酸の配列については、NLP1との明確な相違性が見出された。以上の結果より、感染初期で発現する2つのNLP様タンパク質は、NLP1とは異なりウリ科作物にPAMPとして認識されないことが明らかとなった。

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)

植物が病原微生物のどのような分子をPAMPとして異物認識することにより、生体防御反応を活性化するのか？ これは植物と微生物の相互作用研究において非常に重要な問題である。植物に細胞死を誘導するエフェクターであるNLPは、病原菌において広く保存されており、その感染後期において特異的に発現する特徴がある。本研究は、ウリ類炭疽病菌が有するNLPの一つであるNLP1における厳密な発現制御の意義について、NLP1を誤った時期に発現する病原菌を人為的に作出し解析することで調査した。その結果として、感染初期において発現されたNLP1を、ウリ科作物がPAMPとして認識することによって、抵抗反応を誘導し病原菌の感染を阻害することを明らかにしている。本研究の評価できる点は以下の通りである。

1. 感染後期において限定的に発現しているエフェクターNLP1をウリ類炭疽病菌において恒常的に発現させた場合、ウリ科作物はNLP1を認識し、抵抗反応を活性化させ、菌の感染を阻止することを発見した。この結果は、エフェクターの厳密な発現制御の生物学的意義を明確に示したものである。

2. ウリ科作物はNLP1のカルボキシル末端をPAMPとして認識して抵抗反応を誘導することを明らかにした。一方でアブラナ科植物であるシロイヌナズナは、NLP1の中央部分を認識する。このことは、エフェクターNLP1はアブラナ科植物、ウリ科植物において、共にPAMPとして認識されるが、その認識機構は独立に獲得されたことを強く示唆し、本分子をPAMPとして認識することの必然性、重要性が示唆された。

3. 厳密な発現制御をうけているエフェクターを、病原菌において恒常的に発現させることにより、エフェクターに存在する新規のPAMPを発見できることが示され、病原微生物における今後のPAMP研究を推進する新たな方法論の提示に成功している。

以上のように、本論文は感染後期で発現している病原菌エフェクターNLP1がPAMPとして認識されること、さらにその認識部位は植物によって異なっているという、エフェクターとPAMPが形作る植物・病原微生物間相互作用における新たな知見を提供するものであり、植物病理学、植物免疫学、微生物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30年5月17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）