

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	ZHANG RU
論文題目	Studies on virulence-related effectors and transcription factors preferentially expressed at the pre-invasion stage in <i>Colletotrichum orbiculare</i> (ウリ類炭疽病菌の侵入前に優先的に発現する病原性関連エフェクターおよび転写因子の研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>植物病原性の糸状菌 (以下、植物病原菌) は、自身の宿主植物への感染のために、病原性に関係する様々なタンパク質を分泌する。その中で、宿主植物が発揮する防御反応を抑制する分泌タンパク質群は、エフェクターと総称される。したがって、エフェクターは植物病原菌の感染機構を理解する上で、非常に重要な位置付けにあるが、その知見は限られている。</p> <p>炭疽病菌 (<i>Colletotrichum</i>属菌) は、属全体として様々な植物に深刻な病害を引き起こすことが知られている。そのうちのウリ類炭疽病菌 (<i>C. orbiculare</i>) は、キュウリ、スイカなどのウリ科作物に深刻な病害を引き起こしている。興味深いことに、本菌はナス科に属するベンサミアナタバコと呼ばれる植物にも感染し、病害を引き起こす。本研究では、ウリ類炭疽病菌を対象として、植物病原菌の植物免疫抑制能を有する新規エフェクターを発見し、植物病原菌エフェクターに関する新たな知見を得ることを第一の目的とした。また、エフェクターをコードする遺伝子の多くは、感染時に優先的に転写されることが知られている。しかし、その転写制御機構の詳細は不明な点が多い。そこで、エフェクター遺伝子の転写制御機構に関する新たな知見を得ることを本研究の第二の目的とした。</p> <p>第1章では、ウリ類炭疽病菌の植物免疫抑制能を有する新規エフェクターを同定するために、本菌のベンサミアナタバコへの感染初期ステージなどにおけるRNAシーケンス解析を実施し、本菌の感染初期ステージにおいて優先的に発現するエフェクター様タンパク質をコードする8遺伝子を選抜した。続いて、選抜した候補が植物免疫抑制能を有するかを調査するために、当該候補をベンサミアナタバコにおいて一過的に発現させ、続いてウリ類炭疽病菌を発現部位に接種し、その病斑形成が増大するかを調査した。その結果、2遺伝子について、その発現によりウリ類炭疽病菌の病斑形成が増大することを明らかにし、この2遺伝子が植物免疫抑制能を有すると推察された。2遺伝子のうち、<i>SIB1</i>と命名した遺伝子について、さらなる機能解析を実施した。まず、<i>SIB1</i>遺伝子がコードするエフェクターが、病原体特異的分子パターン(PAMP)が誘導する植物の防御応答を抑制するかを調査するため、<i>SIB1</i>タンパク質をベンサミアナタバコにおいて一過的に発現させ、続いてPAMPを処理し、PAMP処理が誘導する活性酸素生成への影響を調査した。その結果、<i>SIB1</i>タンパク質は複数のPAMPが誘導する植物防御応答を抑制する活性を有することを明らかにした。一方で、<i>SIB1</i>遺伝子を標的破壊したウリ類炭疽病菌を作出した結果、破壊株は野生株と同等の病原性を示した。本結果の原因として、<i>SIB1</i>タンパク質と他のエフェクター間の機能重複が推察された。</p> <p>第2章では、ウリ類炭疽病菌のエフェクター遺伝子の転写制御機構に焦点を当てた。また、本アプローチは、第1章で浮き彫りになったエフェクター間の機能重複性の問題に取り組む上でも有効であると期待された。本菌のキュウリへの感染初期ステージなどにおけるRNAシーケンス解析を実施し、感染初期ステージにおいて優先的に発現する転写因子様タンパク質をコードする9遺伝子を選抜した。続いて、選抜した遺伝子について標的遺伝子破壊株を作出し、当該破壊株のキュウリへの病原性を調査した。その結果、一つの遺伝子の破壊株において、野生株と比較して病原性の有意な低下が観察された。そこで本遺伝子を<i>TFVI</i>と命名した。さらにウリ類炭疽病菌内において<i>TFVI</i>と最も高い相同性を有する<i>TVLI</i>との二重破壊株を作出した結果、<i>TFVI</i> <i>T</i></p>			

*VLI*二重遺伝子破壊株においては、*TFVI*遺伝子破壊株よりもさらにその病原性が低下することを明らかにした。興味深いことに、*TFVI TVLI*二重破壊株はキュウリなどのウリ科作物への病原性は顕著に低下している一方、ベンサミアナタバコへの病原性は野生株と同等であった。本結果は、本菌のウリ科作物への宿主特異性に*TFVI*遺伝子および*TVLI*遺伝子が関与することを強く示唆した。さらに野生株、*TFVI*破壊株、および*TFVI TVLI*二重破壊株のRNAシーケンス比較解析およびRT-qPCR解析により、ウリ科作物への病原性に必要なエフェクター遺伝子*EPC1*~*EPC4*の発現が、両遺伝子破壊株において共通して顕著に低下することを明らかにした。また、*TFVI TVLI*二重破壊株で特異的に発現低下を示すフェクター様遺伝子群も同定した。これらの結果は、*TFVI*遺伝子および*TVLI*遺伝子がコードする転写因子は、ウリ類炭疽病菌のウリ科作物への感染に必要なエフェクター遺伝子群の発現を制御している重要因子であることを強く示唆した。

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)

植物病原菌はエフェクターと総称される様々なタンパク質を分泌し、宿主植物の防御反応を抑制することで、その感染を可能にしている。しかし、どのようなエフェクターが宿主への感染において重要な役割を担っているのか、また、エフェクターをコードする遺伝子の転写制御はどのようになされているのか、不明な点が多い。本研究においては、まずウリ類炭疽病菌における重要エフェクターの発見を目的として、RNAシーケンスの解析による候補選抜、続く植物細胞におけるタンパク質一過的発現系による候補の機能解析を実施し、新規エフェクターSIB1の発見に成功している。さらに、エフェクター遺伝子の転写制御を研究する目的で、ウリ類炭疽病菌のウリ科作物への病原性に関与する転写因子を探索し、TFV1およびTVL1と名付けた重要転写因子の発見に成功している。さらにTFVI遺伝子破壊株、およびTFVI TVL1二重遺伝子破壊株に対するRNAシーケンス解析より、これらの転写因子がエフェクター遺伝子群の転写制御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。本研究の評価できる点は以下の通りである。

1. ウリ類炭疽病菌の新規エフェクターSIB1を同定し、同エフェクターがPAMPが誘導する植物の防御応答を抑制する活性を有することを明らかにした。
2. 一方で、SIB1遺伝子を標的破壊したウリ類炭疽病菌は病原性を維持していることを示し、このことより、本菌のエフェクター間の機能重複性を示唆した。
3. ウリ類炭疽病菌のキュウリ感染時などのRNAシーケンス解析より、病原性に関わる転写因子候補を選抜し、標的破壊解析より、本菌のウリ科作物への病原性に特異的に関与する新規転写因子TFV1を発見した。
4. TFV1およびTFV1と高い相同性を示すTVL1が、ウリ類炭疽病菌のウリ科作物への宿主特異性に関与すること、さらにエフェクター遺伝子群の転写制御において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

以上のように、本論文は植物病原菌のRNAシーケンス解析による候補選抜と続く機能解析により、植物免疫抑制能を有する新規エフェクターの発見に成功している。さらにエフェクター遺伝子の転写制御に関わる植物病原菌の新規転写因子の発見に成功しており、この研究により、転写因子によるエフェクター遺伝子の制御と植物病原菌の宿主特異性のリンクを明らかにしている。これらの成果は、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、令和4年8月5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）