

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	住田 卓也
論文題目	Studies on intracellular protein degradation pathways on plant fungal pathogens (植物病原菌における細胞内タンパク質分解系の研究)		
(論文内容の要旨)			
オートファジーとユビキチン・プロテアソーム系（UPS）は、真核生物の主要な細胞内タンパク質分解システムであり、オートファジーは一部の半活物寄生性菌の宿主感染に必須であることが報告されている。しかし、殺生寄生菌における宿主感染や感染サイクルへのオートファジーの関与については、ほとんど知見が得られていない。またUPSについては、植物病原糸状菌における研究例が非常に少なく、宿主感染過程等におけるその関与はほとんど解明されていなかった。本論文では、二種の殺生寄生菌（灰色かび病菌ならびにトウモロコシごま葉枯病菌）を用いて生活環におけるオートファジーの役割を解明するとともに、UPSの宿主感染への関与について、宿主侵入メカニズムと宿主病原菌相互作用に関する知見が蓄積されているウリ類炭疽病菌を主な実験材料として研究した。論文内容は以下の通りである。 第1章は、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。 第2章では、灰色かび病菌のオートファジー関連遺伝子<i>BcATG1</i>の遺伝子破壊株を作出し、その表現型解析によって同菌の生活環におけるオートファジーの関与を調査した。この調査により、<i>BcATG1</i>は窒素飢餓条件下での生育に必要なほか、分生子の形成に極めて重要であり、さらに分生子の発芽、気中菌糸の形成や菌核の発達にも関与していることを示した。<i>BcATG1</i>遺伝子破壊株は野生株と同等の密度で分生子柄を形成したが、その発達は顕著に貧弱であり、オートファジーは分生子柄の成熟への関与を通じて分生子の形成に決定的に重要な役割を果たしていると考えられた。一方、宿主上での病斑形成能においては<i>BcATG1</i>遺伝子破壊株と野生株の間に有意な差異は認められなかった。 第3章では、トウモロコシごま葉枯病菌のオートファジー関連遺伝子<i>BmATG8</i>の機能解析を行い、同菌の生活環におけるオートファジーの関与を調査した。この調査により、<i>BmATG8</i>が栄養欠乏条件下での分生子の発芽と生存性の維持、さらに偽子囊殻の形成と子嚢胞子の分化後の成熟に必須であることを明らかにした。eGFPと<i>BmATG8</i>の融合タンパク質発現株を用いた解析により、<i>BmATG8</i>は栄養欠乏条件で発芽直前および発芽中の分生子の両端の細胞に強く発現することが観察された。また、<i>BmATG8</i>遺伝子破壊株は栄養欠乏条件下で顕著な分生子発芽率の低下を示したことから、オートファジーは栄養欠乏条件下での分生子において発芽に必要なリソースの供給を担っていると考えられた。これらの結果に加えて、<i>BmATG8</i>が気中菌糸の形成と分生子形成にも関与していることも明らかにした。一方、宿主への病原性においては、<i>BmATG8</i>遺伝子破壊株は付着器による侵入や宿主内での菌糸伸展等の能力を失っていないことを見出した。 第4章では宿主感染におけるUPSの関与を調査するため、出芽酵母<i>RPN10</i>遺伝子のウリ類炭疽病菌におけるホモログ<i>CoRPN10</i>の機能解析を行った。モデル真菌である出芽酵母のプロテアソームサブユニット<i>RPN10</i>はユビキチン受容体としての機能を有			

し、その欠損は多くのUPSの基質タンパク質の分解を阻害する。ウリ類炭疽病菌において、*CoRPN10*欠損は出芽酵母やシロイヌナズナの*RPN10*ホモログにおける報告と同様、ユビキチン化タンパク質の蓄積を引き起こした。また、*CoRPN10*は出芽酵母*RPN10*破壊株のアミノ酸アナログ感受性を相補した。これらの結果から*CoRPN10*は出芽酵母*RPN10*の機能的オルソログであることが示唆された。*CoRPN10*破壊株は病原性および宿主上で形成する感染器官・付着器からの侵入菌糸の形成頻度が著しく低下した。その一方、破壊株は抵抗性を抑制する一過的熱処理を施した宿主上においては野生株同様に病斑および侵入菌糸を形成したことから、*CoRPN10*は宿主の防御応答の打破に関与することが示唆された。破壊株の病原性低下の原因を探る中で、付着器による宿主侵入に重要とされる細胞骨格について調査を行った。アクチン結合配列Lifeactを付加した赤色蛍光タンパク質遺伝子*RFP*を導入しアクチンの挙動を可視化した菌株を作出し観察したところ、野生株では付着器底部の付着器孔に塊状あるいはリング状に強い*RFP*蛍光が局在する付着器が大半を占めた。一方破壊株では付着器孔付近においてフィラメント状あるいは点状に弱い蛍光が局在する例が大半を占めた。これらの結果から、付着器孔におけるアクチン集積に*CoRPN10*を介したUPSによる制御が関与していることが示唆された。

第5章では、以上明らかとなった生活環におけるオートファジーの役割ならびに宿主感染におけるUPSの関与について植物寄生性糸状菌の感染戦略と併せて議論を行なった。

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)

真核生物の主要な細胞内タンパク質分解システムであるオートファジーは貧栄養環境への適応と細胞の恒常性維持に普遍的な役割を持つものと考えられている。植物病原菌の感染サイクルにおける栄養調達ならびにリソース分配に本機構は重要な役割を持つものと思われるが、殺生寄生菌の生活史と本機構の役割を関連付けた研究はほとんどない。一方、もう一つのタンパク質分解システムであるUPSは制御因子の調節やタンパク質の品質管理に重要な働きを担う普遍的機構であると考えられているが、植物病原菌の感染サイクルへの関与は明らかにされていない。本論文では、二種の殺生寄生菌生活史におけるオートファジーならびにウリ類炭疽病菌感染過程におけるUPSの関与を調べた。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 出芽酵母 *ATG1* の灰色かび病菌ホモログ *BcATG1* 遺伝子の破壊株を作出し、本遺伝子が本菌オートファジーに関与すること、栄養生長から生殖器官形成への分化過程でオートファジーが必要であることを見出した。また、分生子生存性ならびに分生子発芽過程にもオートファジーが関与していることを明らかにするとともに、宿主感染過程ではオートファジーを特に必要としていないことを見出した。
2. 出芽酵母 *ATG8* のトウモロコシごま葉枯病菌ホモログ *BmATG8* 遺伝子の破壊株を作出し、本遺伝子が本菌オートファジーに関与すること、本菌においても灰色かび病菌とほぼ同様の過程でオートファジーを必要としていることを明らかにした。また、偽子嚢殻の形成と子嚢胞子の成熟過程への関与も見出した。
3. eGFP と *BmATG8* の融合タンパク質発現株を用いた解析により、オートファジーは分生子発芽ならびにその後の菌糸生長に必要なリソースの供給を担っていることを明らかにした。また、宿主侵入過程で、侵入菌糸は十分な栄養リソースを確保している可能性が示唆された。
4. 出芽酵母 *RPN10* のウリ類炭疽病菌におけるホモログ *CoRPN10* がユビキチン化タンパク質の分解に関わる事を明らかにし、本タンパク質が本菌宿主感染過程において、付着器孔におけるアクチン集積制御に関わる事を見出した。

以上のように、本論文は、殺生寄生菌の生活史におけるオートファジーの関与を明らかにすることで、これら菌類の感染行動に関わる栄養リソース分配の新たな知見をもたらすとともに、植物病原系状菌の宿主感染過程においてUPSによる細胞機能の制御が働いていることを示したものであり、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、平成31年2月15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）