

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	齋藤 ・ 一
論文題目	Studies on heavy-metal ATPases in phytopathogenic filamentous fungi (植物病原糸状菌におけるheavy-metal ATPase に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
銅は様々な酸化酵素の補因子として働く、あらゆる生物にとっての必須元素である。一方、細胞内における過剰量の銅は、活性酸素種発生の原因となり、細胞に対し有毒性も示す。そのため細胞は細胞内銅イオン濃度を厳密に制御し、銅イオン濃度の恒常性を維持しなければならない。その細胞内の銅濃度の恒常性機構に重要な働きをしているのが、Heavy-metal ATPase(以下、HMAと略記)とよばれるタンパク質である。HMAは細菌から高等動植物にいたるまで広く存在し、ヒトにおいては銅の細胞内輸送ならびに排出の双方に関わり、その欠失は先天性銅代謝異常疾患を引き起こすことが知られている。しかしながら、真菌類、特に糸状菌におけるHMAの研究例は少なく、その役割については、これまでほとんどわかっていなかった。本論文では真菌類HMAについて、植物病原糸状菌におけるその役割の調査を中心に研究をおこない、このタンパクが病原糸状菌の病原性や分生子形成、メラニン化に必要とされ、極めて重要であることを明らかにした。本論文の内容は以下に示す通りである。 第2章では、まず真菌類のゲノム情報を用い、HMAを網羅的に探索し、系統解析による分類を行った。その結果、ヒトとは異なり、真菌類はゲノム中に複数のHMA遺伝子を有すること、そして真菌類HMAは銅の排出に関わるグループと、含銅タンパク質に銅を補酵素として供給するグループ(以下、CCC2と略記)に分かれることを見出した。さらに糸状菌でほとんど研究例のないCCC2の役割を明らかにするため、植物病原糸状菌であるトウモロコシごま葉枯病菌を用いてCCC2遺伝子の破壊を行った。その結果、CCC2はトウモロコシごま葉枯病菌のメラニン化、分生子形成、さらには病原性において重要な役割を担っていることを明らかにした。 第3章ではCCC2の役割について、灰色かび病菌を用いて調査し、トウモロコシごま葉枯病菌同様、CCC2が灰色かび病菌のメラニン化、分生子形成、および病原性に重要な役割を持つことを明らかにした。トウモロコシごま葉枯病菌と灰色かび病菌は系統分類学的に遠縁の糸状菌である。このことから、病原性を含む重要かつ多面的な性質を制御するCCC2の役割は、広範な植物病原糸状菌に保存されている可能性が示唆された。 第4章では、第2章ならびに第3章で明らかとなった、CCC2の多面的な役割をさらに解析するため、CCC2の標的である含銅タンパク質に着目した。真菌類のゲノム情報の探索ならびに系統解析の結果、糸状菌は酵母菌とは異なり多様なクラスの含銅タンパク質を有することが明らかになった。また、系統分類の結果、糸状子嚢菌に特異的な含銅タンパク質(MCO1)のクラスを新たに発見した。MCO1の機能を調べるため、トウモロコシごま葉枯病菌を用いて遺伝子破壊実験を行った。その結果、Mco1遺伝子破壊株では、Ccc2遺伝子破壊株が示す多様な形質変化のうち、メラニン欠損のみが認められた。このことから、MCO1はCCC2下流でメラニン化を担っているものと考えられた。また、従来メラニンの生合成にはラッカーゼが関与するとされていたが、糸状子嚢菌では、ラッカーゼとはクラスの異なる含銅タンパク質MCO1がメラニンの生合成に関与していることが明らかになった。			

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。

(論文審査の結果の要旨)

銅は活性酸素種の発生原因となるなど強い細胞毒性をもつが、その一方で、生物の様々な酸化酵素の補酵素として働く必須微量元素でもある。このため、生物は銅を補酵素として有効利用するための厳密な制御機構を有している。Heavy-metal ATPase(HMA)は細菌から高等動植物に至るまで広く存在しているタンパクであり、哺乳類においては細胞内の銅濃度の制御や、銅の細胞内輸送において重要な働きをしていることが知られている。しかしながら真菌類、特に糸状菌におけるHMAの働きについては、殆ど研究されてこなかった。本論文は真菌類のHMAに着目した研究を行い、このタンパクが植物病原糸状菌において、病原性を含む様々な性質の発現に重要な働きをしていることを明らかにした。本論文の評価すべき点は以下のとおりである。

1. 真菌類HMAの網羅的分子系統解析により、真菌類HMAが、細胞内の過剰な銅イオンの排出に関わる2つのグループと、補酵素としての銅を様々な酸化酵素群に輸送する機能をもつ1つのグループの計3グループに分類できることを示した。また、ほぼすべての真菌類がこれら3グループのHMAをコードする3種の遺伝子を有していることを明らかにした。真菌類HMAについての分類学的研究は本論文が初例であり、真菌類においては、銅排出と細胞内の銅輸送に異なるグループのHMAが用いられている可能性を初めて明らかにした。

2. 系統解析により明らかとなった3種のHMAのうち、様々な酸化酵素群に銅を補酵素として供給するHMA(以下CCC2)の役割について植物病原糸状菌であるトウモロコシごま葉枯病菌を用いて調査し、CCC2がトウモロコシごま葉枯病菌のメラニン化、分生子形成、さらには病原性の発現に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、トウモロコシごま葉枯病菌の病原性発現において、菌糸が宿主表皮を貫通し宿主組織内に到達する侵入過程、および侵入後に宿主組織内で菌糸が伸張をおこなう伸展過程、の両過程にCCC2が関与していることも突き止め、CCC2がトウモロコシごま葉枯病菌の病原性発現に極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした。

3. 2. で得られた知見が、植物病原糸状菌一般に当てはまるか否かを検証するため、トウモロコシごま葉枯病菌とは系統分類学的に遠縁の灰色かび病菌を供試し、CCC2の役割を比較した。その結果、同菌においても、CCC2がメラニン化、分生子形成、病原性発現において必須であることを示し、植物病原糸状菌におけるCCC2の役割の普遍性を示した。

4. CCC2遺伝子破壊株が示す多様な表現型をより詳細に明らかにするため、CCC2より補酵素・銅の供給を受けると考えられる含銅タンパク質について真菌ゲノム情報を用いた分子系統解析を試みた。その結果、これら含銅タンパク質群は機能を反映した多様なクラスに分かれ、糸状菌は酵母菌とは異なり多様なクラスの含銅タンパク質を有することを明らかにした。さらに、子嚢糸状菌に特異的な、新規クラスの含銅タンパク質MCO1を発見した。

5. 上述の新規クラス含銅タンパク質について、トウモロコシごま葉枯病菌を用いて機能解析を行い、これが本菌のメラニン化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。本結果は、CCC2破壊株に認められた多様な表現型のうち、メラニン欠損は、CCC2からの銅供給不全によって引き起こされた、MCO1の失活により生じたことを示唆している。さらに、従来、メラニン前駆体からメラニンへの酸化重合反応にはラッカーゼが関与するとされていたが、糸状子嚢菌ではラッカーゼとは異なるクラスの含銅タンパク質であるMCO1が関与することを初めて明らかにした。

以上のように、本論文は従来ほとんど研究されてこなかった糸状菌のHMAに着目

し、その役割の解明をおこなった。特に、真菌類HMAの中で酸化酵素群に銅を供給するCCC2が広範な植物病原糸状菌のメラニン化、分生子形成、病原性発現などにおいて重要な役割を持つことを新たに見いだすとともに、殺菌剤のターゲットでもある糸状子囊菌のメラニン生合成系に関する新たな知見を加えたものであり、微生物環境制御学、植物保護科学、菌類生態学など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 22 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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開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