

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 牧草共生糸状菌の共生確立に関与する活性酸素生成制御因子の機能解析
氏名 榎野友香

論文内容の要旨

植物体内で共生的に生活している細菌や糸状菌を総称してエンドファイト（endo=内部、phyte=植物）と呼ぶ。*Epichloë* 属エンドファイトは牧草や芝草の細胞間隙で生育する糸状菌エンドファイトであり、本菌の感染により宿主植物には哺乳動物による捕食の抑制、害虫の忌避作用、耐病性の向上などの効果がもたらされる。*Epichloë festucae* の宿主植物への共生的感染の確立には活性酸素生成酵素（NoxA）が不可欠であり、*noxA* 変異株は感染植物の矮化を引き起こし、やがて植物体を枯死させてしまう。さらに、NoxA の制御因子として NoxR および低分子量 G タンパク質 RacA が同定されており、これら制御因子の変異株においても共生確立能が失われる。また、NoxR と相互作用する因子として BemA および Cdc24 が同定されている。*bemA* 変異株においては、感染植物に軽度の矮化を引き起こすことが報告されている。また、Cdc24 は低分子量 G タンパク質の活性化に関与する GEF（Guanine nucleotide exchange factor）に特徴的なモチーフを持つため、RacA などの低分子量 G タンパク質の活性化に関与すると考えられる。以上のことから、*E. festucae* の菌糸成育および共生関係の確立において、上述の因子が構成する Nox 複合体による適切な活性酸素の生成が、重要な機能を担っていると考えられる。また、Nox 制御因子の 1 つである RacA と構造的に非常に類似している低分子量 G タンパク質として Cdc42 がある。RacA が NoxR と特異的に相互作用する一方で、Cdc42 は BemA と特異的に相互作用していることから、Cdc42 も Nox 複合体による共生確立の制御に関与している可能性が考えられる。

本学位論文では、*Epichloë* 属エンドファイトの形態形成や共生関係の確立における活性酸素生成酵素およびその制御因子の役割を明らかにすることを最終目的とし、RacA と Cdc42 の機能分化に関する解析を中心に、活性酸素生成酵素およびその制御因子の機能解析を行った。

まず、活性酸素生成酵素とその制御因子の遺伝子破壊株群を用いて、培養時および

宿主植物感染時における様々な表現型について比較解析を行った。Nox および Nox 制御因子の遺伝子破壊株 (*noxA*、*noxB*、*noxA/noxB*、*noxR*、*racA* および *bemA* 破壊株) を富栄養条件である PDA 培地上において成育させた場合には、*racA* 破壊株においてのみ分岐の増加や菌糸形態の顕著な異常が観察された。一方で、貧栄養条件となる 3% 寒天培地上で成育させた場合には、*noxB* 破壊株を除く全ての菌株において、菌糸形態の異常が観察され、野生株において多く観察される菌糸融合が著しく減少していた。また薄層 PDA での培養において、*noxA/noxB* 破壊株では分生子形成能の著しい増加、*noxA* 破壊株では分生子形成の増加が観察された。一方で、*noxR*、*racA*、*bemA* 破壊株においては、分生子形成の増加は認められなかった。さらに、カゼインを用いたプロテアーゼ分泌能の解析においては *noxB* 破壊株を除いた菌株において分泌の増加が認められ、*noxA/noxB* および *racA* 破壊株で著しく増加していた。宿主植物感染時には、*noxA*、*noxA/noxB*、*noxR* 変異株において著しい宿主植物の矮化が引き起こされ、*bemA* 変異株において軽度の矮化が引き起こされる。以上のように、さまざまな Nox および Nox 制御因子の遺伝子破壊株において、表現型の違いが認められた。この結果は、Nox 複合体構成因子は目的や状況により使い分けられており、異なった機能を保持していることを示唆していると考えられる。

Cdc42 は Nox の制御因子である *RacA* と高い相同性を示す低分子量 G タンパク質であり、酵母において細胞極性の決定因子として知られている。両者はいずれも低分子量 G タンパク質の中でも Rho GTPase と呼ばれるグループに属するが、Rho GTPase の中でも Nox 複合体構成因子である *NoxR* および *BemA* は *Cdc42* および *RacA* とそれぞれ特異的に結合することが Yeast Two Hybrid 法による結合解析によって明らかとなった。そこで、*cdc42* 破壊株および *racA* 破壊株を作出したところ、両破壊株のコロニー形態および菌糸形態は異なっており、3%寒天培地上の菌糸融合に関しても、*racA* 破壊株では菌糸融合が観察されないのに対し、*cdc42* 破壊株では野生株と同様に菌糸融合の形成が認められた。活性酸素生成においては両者が拮抗して機能している可能性が示され、宿主植物感染時には、宿主植物に矮化を引き起こす *racA* 破壊株に対し、*cdc42* 破壊株ではエンドファイト側の全身的感染能に異常が認められた。以上の結果は、*RacA* と *Cdc42* は構造的に非常に類似しているにも関わらず、両者は機能的に分化していることを示している。この機能分化に関わる要因の 1 つとして、両者が異なった Nox 複合体構成因子と結合していることが考えられるため、*Cdc42* および *RacA* の相互作用因子の特異性と、両低分子量 G タンパク質の機能分化について解析を行った。

RacA と *Cdc42* のキメラ遺伝子および変異遺伝子を作出し、結合特異性を決定するアミノ酸の特定を試みた。その結果、*Cdc42* と *BemA* の相互作用には、少なくとも 61 番目のフェニルアラニンが、*RacA* と *NoxR* の相互作用には、32 番目のアラニン及び 35 番目のグリシンが必須であることを明らかとなった。*Cdc42* における *NoxR* との結合能は上述の 2 アミノ酸置換により獲得されたが、*Cdc42* の 61 番目のフェニルアラニンに対応するアミノ酸を *RacA* において、単独で置換しても *BemA* との結合能は獲得されなかった。さらに解析を重ねたところ、*RacA* において 47 番目のアラニンおよび 52

番目のバリン、61番目のトリプトファンを、バリンおよびイソロイシン、フェニルアラニンに置換することにより、RacAにBemAとの相互作用能が付与されることが明らかとなった。これらの結果を元に、NoxRおよびBemAへの特異的結合能がCdc42とRacAの機能分化に与える影響の解析を行った。まず、NoxR非結合RacAおよびNoxR結合Cdc42を*racA*破壊株において発現し、その相補能を解析した。その結果、NoxR非結合RacAでの相補株では、PDA培地上でのコロニー成育が回復したものの、菌糸融合能および共生確立能は回復せず、一方でNoxR結合Cdc42での相補株は、PDA培地上でのコロニー成育はほとんど回復しなかったものの、菌糸融合能および共生確立能の回復が認められた。この結果から、RacAおよびCdc42の共生確立における機能分化はNoxR結合性によって特徴付けられていることが示唆された。さらに、BemA非結合Cdc42およびBemA結合RacAを*cdc42*破壊株において発現し、その相補能を解析した。その結果、界面活性剤添加時のコロニー形態はBemA非結合Cdc42相補株において回復傾向が認められた一方で、菌糸形態はBemA結合RacA相補株において回復傾向が認められた。共生確立能においては、相補程度の違いはあるものの、いずれの菌株においても回復傾向が観察され、共生確立におけるCdc42の機能はBemAとの相互作用により特徴付けられている面があるものの、他にも重要となる相互作用因子が存在すると考えられた。

当研究室で行なわれている*E. festucae*の細胞融合に必要な因子のスクリーニングにより、Pro41が菌糸融合能に関与する候補因子として単離された。Pro41の機能を解析するため、*pro41*破壊株を作出したところ、*pro41*破壊株の培地上でのコロニー成育は野生株と同様であり、培地上での成育には必須ではないことが示された。しかし、*pro41*破壊株では菌糸融合が認められず、宿主植物に接種したところ宿主の矮化を引き起こしたことから、Pro41は菌糸融合形成能および共生確立能に必要とされることが示された。p22^{phox}はヒトの好中球においてNox複合体を構成する因子として知られているが、糸状菌においては同定されていなかった。しかし、近年、Pro41が糸状菌においてp22^{phox}として機能する可能性が示され始めている。Pro41相同遺伝子の菌界での分布を調べたところ、Nox酵素を保持する菌においてのみ共通して保存されていることが明らかとなった。Pro41はヒトのp22^{phox}と類似した膜貫通構造を保持すると推定されたこと、*pro41*破壊株の様々な表現型がNox複合体構成因子破壊株と類似していたことなどから、*E. festucae*においても、Pro41がp22^{phox}の機能を担っている可能性が示された。本研究ではNox複合体構成因子の共生確立や細胞融合を始めとする様々な形態形成における役割を解析した。また構造的に類似した2つの低分子量Gタンパク質RacAとCdc42の機能分化に関して新たな知見を得た。これらの結果は作物生産に有用に活用できるエンドファイトと宿主植物の共生確立の分子機構の解明に役立つと考えられる。