

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 榎野友香

論 文 題 目

牧草共生糸状菌の共生確立に關与する活性酸
素生成制御因子の機能解析

論文審査担当者

主 査	名古屋大学准教授	竹 本	大 吾
委 員	名古屋大学教授	川 北	一 人
委 員	名古屋大学教授	柘 植	尚 志
委 員	名古屋大学教授	中 園	幹 生
委 員	名古屋大学助教	佐 藤	育 男

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。NoxA の制御因子として NoxR および低分子量 G タンパク質 RacA が同定されている。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。また、Cdc24 は低分子量 G タンパク質の活性化に関与する GEF 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* の共生確立において、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、貧栄養条件では、*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。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、両者はいずれ 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、*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。

RacA と Cdc42 のキメラ遺伝子および変異遺伝子を作成し、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、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。次に、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、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、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。

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、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。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から、*E. festucae* において、Pro41 が p22^{phox} の機能を担っている可能性が示された。

以上のように、榎野友香は *epichloae* エンドファイトの共生的感染における活性酸素生成制御因子群の機能を明らかにした。これらの研究成果は、この学問領域に新たな知見を提供し、学術と応用の両面において植物病理学分野の進展に資するものである。よって、本審査委員会は本論文の内容が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。

