

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 張 莉 (ZHANG, Li)

論 文 題 目

Basic studies for characterizing *Phytophthora* mating hormone receptor

(疫病菌交配ホルモン受容体の解析に向けた基盤的研究)

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	小鹿 一
委員	名古屋大学教授	内田 浩二
委員	名古屋大学准教授	中川 優
委員	名古屋大学助教	近藤 竜彦

論文審査の結果の要旨

疫病菌はジャガイモなど重要農作物に感染し甚大な被害を与える *Phytophthora* 属の植物感染糸状菌で、世界3大植物病害の1つに数えられる。疫病菌の多くは有性生殖を行うことで耐久性と遺伝的多様性を獲得した有性胞子（卵胞子）を作ることが知られており、このことが疫病菌の急速な変異（悪性化）や農産物輸送に伴う世界規模の蔓延の要因とされる。したがって、有性生殖の分子メカニズムの解明は農林業分野にとって疫病菌制御に繋がる重要課題である。有性生殖は異なる交配型が分泌する交配ホルモン（ $\alpha 1$ と $\alpha 2$ ）の認識により開始されると推定され、その解明は長年の懸案であったが、2005年に $\alpha 1$ が、2011年に $\alpha 2$ が当研究室で解明された。構造解明に加え、これまでに両ホルモンの生合成経路、構造活性相関、普遍性が検討され化学的解析がほぼ完了している。今後、ケミカルパイオロジー的な研究、すなわち交配ホルモンの受容体の同定、性分化へ至るシグナル伝達機構、ホルモン生合成機構の解明などが疫病菌有性生殖の分子基盤の解明にとって重要課題となる。本研究では $\alpha 1$ 受容体の同定を目指した。

有性生殖に相手交配型を要求するヘテロタリックな疫病菌では、A1交配型が分泌する $\alpha 1$ がA2交配型の有性生殖を、A2交配型が分泌する $\alpha 2$ がA1型の有性生殖を誘導する。この応答はピコモルレベルのホルモン量で起き、交差活性は観測されないのので、各交配型が相手ホルモンを特異的に認識する受容体をもつと予想される。ところがホルモン実験の過程で、 $\alpha 1$ に誘導されるA2型の有性生殖が $\alpha 2$ 共存下で抑制されるという予想外の現象を見出した。すなわち、A2交配型は自身の分泌するホルモン $\alpha 2$ により、自身の持つ $\alpha 1$ 受容体の感受性を低下させているように見える。この現象を詳しく解析するため、以下の実験を行った。まず、 $\alpha 1$ (30 ng/disk)と $\alpha 2$ (0~100 ng/disk)をA2型に同時に投与することで、 $\alpha 2$ 濃度依存的に $\alpha 1$ のホルモン活性が阻害されることを確認した。次に、構造活性相関を調べるため7種の $\alpha 2$ 誘導體と3種の $\alpha 1$ のホルモン活性抑制効果を調べたところ、 $\alpha 2$ の両末端の水酸基をアセテートでマスクしても $\alpha 1$ 阻害活性はほぼ保持されたことから、これらの一級水酸基は阻害活性に重要ではないことが判った。一方、三級アルコールをアセチル化したり二重結合を飽和にすると阻害活性が完全に消失することから、これらの官能基の重要性が判明した。また、 $\alpha 1:\alpha 2=1:1$ の時、阻害活性は約50%になったことから、 $\alpha 2$ は $\alpha 1$ 受容体にアンタゴニストとしてほぼ同等の親和性で結合することが予想された。 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ は約80%の構造上の共通性をもつので、恐らく共通構造を介して $\alpha 1$ 受容体に認識されると思われる。しかし、 $\alpha 1$ ではケトン基によりスイッチが入ると思われる下流へのシグナル伝達が、ケトン基のない $\alpha 2$ では進行せず有性生殖が阻害されると推定できる。以上のことから、 $\alpha 1$ 受容体の基質認識機構に関する基礎的知見が得られたと同時に、探索において $\alpha 2$ を理想的なアンタゴニストとして利用できることが初めて明らかになった。

次に、共同研究者により合成された様々なプローブを用いて $\alpha 1$ 受容体の探索を試みた。プローブには、菌体における受容体分布を調べるための3種の蛍光プローブ、アフィニティー精製のための磁気ビーズプローブ、および2種の光親和性標識プローブを用意した。蛍光プローブは $\alpha 1$ と緑色蛍光色素 (Alexa Fluor 488) を3種のリンカーで連結して作成した。これらを用いて生きた菌体を染色したところ A1, A2 両交配型がほぼ同等に蛍光標識された。また、この蛍光強度は遊離の $\alpha 1$ を共存させても減弱しないことから、非特異的染色であることが判った。次に、菌体から種々のタンパク質画分を取得し、 $\alpha 1$ 結合磁気ビーズプローブで結合タンパクの精製を試みたが、電気泳動ゲル上で、 $\alpha 1$ 添加で減弱する特異的バンドは検出できなかった。さらに、 $\alpha 1$ と結合するタンパク質を共有結合で捉えるため、光親和性標識プローブをタンパク質と反応させ、クリックケミストリーにより蛍光標識することで可視化し、電気泳動により解析したが、蛍光バンドは全く観測されなかった。そこで、あらかじめ蛍光標識した光親和性標識プローブを調製し用いたところ、蛍光標識バンドは検出できるようになったが、 $\alpha 1$ の添加で減弱するバンドは無かった。このように特異的結合タンパクが検出できないのは受容体の発現量が極めて低いためと思われたので、まず、前述の磁気ビーズプローブを用いてある程度親和性タンパク質を濃縮した上で、蛍光標識光親和性標識プローブを反応させたが、やはり特異的タンパクを検出することは困難であった。これらの困難さの要因として、受容体タンパク質の量や用いたプローブのホルモン活性の低さ、等が考えられる。今後、高いレベルで受容体を発現する菌体の調製、ホルモン活性を保持したプローブの開発が望まれる。

以上のように張 莉の成果は、未だ誰も解明に至っていない疫病菌有性生殖の分子メカニズムの基盤となるものであり、新規性、独自性等の当該分野における高度の学術的価値を有するものである。よって本審査委員会は、本論文の内容が博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認め、論文審査に合格と判定した。