



植物病原糸状菌の宿主接着に関する細胞学・生化学・分子生物学的解析

井上, 加奈子

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4552

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004552>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	井上 加奈子
博士の専攻分野の名称	博士（農学）
学 位 記 番 号	博い第 4552 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

植物病原糸状菌の宿主接着に関する細胞学・生化学・分子生物学的解析

審 査 委 員

主 査	教 授	朴	杓允
	教 授	土佐	幸雄
	教 授	杵本	敏男
	教 授	大野	隆

(別紙1)				論文審査の結果の要旨			
氏名		井上 加奈子					
論文 題目		植物病原糸状菌の宿主接着に関する細胞学・生化学・分子生物学的解析					
審査 委員	区 分	職 名		氏 名			
	主 査	教授		朴 杓允			
	副 査	教授		土佐 幸雄			
	副 査	教授		杉本 敏男			
	副 査	教授		大野 隆			
	副 査						
要 旨							
病原糸状菌の宿主接着は菌の病原性因子の1つである。宿主接着を引き起こす具体的構造として菌の細胞外物質（ECM）が挙げられる。しかし、菌から分泌されたこの ECM による宿主接着機構については殆ど明らかとされていない。本研究では、菌の病原性発現機構の理解のため、植物病原糸状菌の宿主接着について細胞学・生化学・分子生物学的手法を使って調査した結果を報告する。 第1章では研究の背景と目的を記述した。イネ科栽培作物の重要病原菌である「いもち病菌」を実験材料として選んだ。宿主上で胞子は発芽管と付着器を分化させ、付着器下部より生じた侵入菌糸を使って宿主細胞に侵入する。この侵入行動には宿主接着の成否が感染を決定すると言われている。分化に伴って菌は発芽管と付着器から ECM を生成するが、この ECM が宿主接着に貢献する物質であると予測された。そのため最初に ECM 中の成分を免疫組織化学的に解析を行うこととした。 第2章では、ECM の機能が動物の細胞接着因子と類似しているため、哺乳類の細胞接着因子に対する抗体を用いて菌感染器官に対して免疫組織学的解析を行った。その結果、collagen、fibronectin、laminin、vitronectin といった細胞接着因子に対する抗体を処理した感染器官で陽性反応が認められた。次に、免疫電顕法により解析を行ったところ、発芽管と付着器表面に分布する ECM に陽性反応が認められた。この結果から感染器官から分泌された ECM に細胞接着因子と類似性のある糖タンパク質が存在することが分かった。 第3章では、ECM の糖タンパク質の特性について調査した。初めに、4種類の阻害剤を用いて接着性を調べたところ、mannose 合成阻害剤や糖タンパク質輸送阻害剤を感染器官に前処理することで接着阻害効果が認められた。次に、3種類のレクチンを感染器官に前処理して菌の宿主接着を調べた。その結果、β-1.6 mannose 結合型レクチン処理区では接着性に影響はなかったが、β-1.3/β-1.6 mannose 結合型或いはキチン結合型レクチン処理により菌の宿主接着が著しく低下した。以上の結果から、ECM は感染器官形成時に合成され、β-1.3 mannose を持つ糖タンパク質を豊富に含むと考えられた。 次に、いもち菌の細胞表層構成因子としてハイドロフォビンタンパク質が存在し、Mpg1 と Mhp1 がその関連遺伝子であることが明らかとされてきた。ここでは関連遺伝子のサイレンシング株を作成して変異株の宿主接着を調べた。その結果、Mpg1 サイレncing株でのみ、菌の接着性の低下が確認できた。 3つ目の実験として、接地面の疎水性程度の違いによって菌の接着性がどのように変わるのかを細胞学に調査した。胞子を人工膜で培養すると、培養経過とともに疎水性あるいは親水性膜を問わず菌の付着性は増加し、発芽管の伸長時には殆どどの感染器官が接着した。以上の結果は、付着器だけが強い接着性を有するのではなく、発芽管でも十分に接着できることを示唆した。 4つ目の実験として、栄養条件の変化によって菌の接着性が影響を受けるのかを調べた。その結果、yeast extract や beef extract 中で培養した菌は、接着力が著しく低下した膨潤・多分岐の異常菌糸を伸長させることが明らかとなった。これら栄養源を除去すると接着性は回復した。以上の結果から、培養条件により菌は接着物質の外分泌を抑制する機構を有することが分かった。 第4章では、ECM に存在する糖タンパク質が宿主接着に関与することを証明するため、数種類の酵素を用いて接着阻害効果を解析した。その結果、人工膜上に接着した菌に糖タンパク質分解酵素に属する collagenase や gelatinase B を処理することで特異的に剥離させることができた。加えて、これら酵素を宿主上で培養した菌に処理すると、病斑が抑制された。これら結果は、ECM 中の糖タンパク質はこれらの酵素によって分解される化学成分から構成され、接着に貢献していることが示されたと同時に、糖タンパク質分解酵素による病害防除に貢献できる可能性を示唆した。							

氏名	井上 加奈子
第5章は、研究結果を総括して考察を行った。本研究は、菌の感染過程において菌体内で合成された β-1.3 mannose や <i>MpgI</i> ハイドロフォビンタンパク質などを含む糖タンパク質が細胞外へ分泌されることで、菌は発芽管を伸長させた時点で植物表面へ接着することが可能となることを明らかとした。また、接着するための要因として、感染器官の表面がそれら糖タンパク質と結合できる構造をとることが重要であると結論付けられた。 本研究は植物病原系状菌について、その宿主接着機構を研究したものであり病理学的役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の 井上 加奈子 は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。	

(別紙様式 3)

(氏名： 井上 加奈子 NO. 1)

論文内容の要旨

氏 名 井上 加奈子

専 攻 資源生命科学

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

植物病原糸状菌の宿主接着に関する

細胞学・生化学・分子生物学的解析

指導教員 朴 杓允

(注) 2, 000 字～4, 000 字でまとめること。

病原糸状菌の宿主接着は菌の病原性因子の 1 つである。宿主接着を引き起こす具体的構造として菌の細胞外物質 (ECM) が挙げられる。しかし、菌から分泌されたこの ECM による宿主接着機構については殆ど明らかとされていない。本研究では、菌の病原性発現機構の理解のため、植物病原糸状菌の宿主接着について細胞学・生化学・分子生物学的手法を使って調査した結果を報告する。

第 1 章では研究の背景と目的を記述した。イネ科栽培作物の重要病原糸状菌である「いもち病菌」を実験材料として選んだ。宿主上で胞子は発芽管と付着器を分化させ、付着器下部より生じた侵入菌糸を使って宿主細胞に侵入する。この侵入行動には宿主接着の成否が感染を決定すると言われている。分化に伴って菌は発芽管と付着器から ECM を分泌するが、この ECM が宿主接着に貢献する物質であると予測された。そのため、最初に免疫組織化学的手法を用いて ECM 構成成分の解析を行うこととした。

第 2 章では、ECM の機能が動物の細胞接着因子と類似しているため、哺乳類の細胞接着因子に対する抗体を用いて菌感染器官に対して免疫組織学的解析を行った。その結果、collagen、fibronectin、laminin、vitronectin といった細胞接着因子に対する抗体を処理した感染器官で陽性反応が認められた。次に、免疫電顕法により解析を行ったところ、発芽管と付着器表面に分布する ECM で陽性反応が認められた。この結果から、感染器官周囲に分泌される ECM には細胞接着因子と類似性のある糖タンパク質が含まれると考えられた。

第 3 章では、ECM の糖タンパク質の特性について調査した。初めに、4 種類の糖たんばく質合成機構の阻害剤を用いて接着性への影響を調べたところ、mannose 合成阻害剤や糖タンパク質輸送阻害剤を感染器官に前処理することで接着阻害効果が認められた。次に、特定の糖鎖と結合する 3 種類のレクチンを感染器官に前処理して菌の宿主接着を調べた。その結果、 α -(1,6)-D-mannose 結合型レクチン処理区では接着性に影響はなかったが、 α -(1,3)- α -(1,6)-D-mannose 結合型或いは chitin 結合型レクチン処理により菌の宿主接着が著しく低下した。以上の結果から、ECM は感染器官形成時に合成され、 α -(1,3)-D-mannose を持つ糖タンパク質を豊富に含むと考えられた。

次に、いもち病菌の細胞表層構成因子としてハイドロフォビタンパク質が存在し、*Mhpl* と *Mgpl* がその関連遺伝子であることが明らかとされてきた。ここでは関連遺伝子のサイレンシング株を作出して変異株の宿主接着性を調べた。その結果、*Mgpl* サイレncing 株でのみ、菌の接着性の低下が確認できた。

3 つ目の実験として、接地面の疎水性程度の違いによって菌の接着性がどのように変わるのかを細胞学に調査した。胞子を人工膜で培養すると、培養経過とともに疎水性あるいは親水性膜を問わず菌の付着性は増加し、発芽管の伸長時にはほとんどの感染器官が接

着し（氏名： 井上 加奈子 NO. 2 ）

た。以上の結果は、付着器だけが強い接着性を有するのではなく、発芽管でも十分に接着できることを示唆した。

4 つ目の実験として、栄養条件を変化させることで菌の接着性に影響が生じるのかを調べた。その結果、yeast extract や beef extract を添加した培養液中で生育した菌は、接着力が著しく低下した膨潤・多分岐の異常菌糸を伸長させることが明らかとなった。また、これら栄養源を除去すると接着性は回復することが確認された。以上の結果から、培養条件により菌は接着物質の外分泌を抑制する機構を有することが分かった。

第 4 章では、ECM に存在する糖タンパク質が宿主接着に関与することを証明するため、数種類の酵素を用いて接着阻害効果を調査した。その結果、人工膜上に接着した菌に糖タンパク質分解酵素に属する collagenase や gelatinase B を処理することで特異的に剥離させることができた。加えて、これら酵素を宿主上で培養した菌に処理すると、病斑が抑制された。以上の結果から、ECM に含まれる糖タンパク質の中でも collagenase や gelatinase B によって分解される成分が接着機能を持つことが明らかとなったと同時に、これらの分解酵素が病害防除に貢献できる可能性を示唆した。

第 5 章は、研究結果を総括して考察を行った。本研究は、菌の感染過程において菌体内で合成された α -(1,3)-D-mannose や *Mpg1* ハイドロフォビントタンパク質などを含む糖タンパク質が細胞外へ分泌されることで、菌は発芽管を伸長させた時点で植物表面へ接着することが可能となることを明らかにした。また、接着するための要因として、感染器官の表面がそれら糖タンパク質と結合できる構造をとることが重要であると結論付けられた。ここで得られた知見は病原糸状菌の宿主接着機構の一端を証明し、その病理学的役割を深く理解できる情報を提供している。