

学位論文題名

# Functional Studies on NSL2 Involved in Plant Immunity of Arabidopsis

(植物免疫に関与するシロイヌナズナ NSL2に関する機能解析)

## 学位論文内容の要旨

抗体や免疫に特化した細胞を持たない植物は、哺乳類とは異なる免疫システムを発達させている。例えば、細菌やウイルスが植物体内に侵入した場合、病原体の侵食や増殖を抑制するために、植物は感染部位を含んだ周辺細胞がプログラム細胞死(PCD)を起こすことが知られている。過敏細胞死(HR)と呼ばれるこのPCDの詳細な分子メカニズムは解明されていない。私の研究室では、このHRを恒常的に起こすシロイヌナズナの変異体 *nsl2* (*necrotic spotted lesion 2*) を単離しており、またこの原因遺伝子 *NSL2* の同定にも成功している(既報では旧名として *cad1* 変異体と *CAD1* 遺伝子として報告している)。私は、この変異体を用いた研究を通して、HRを制御する分子機構の実体解明を目指し研究を行った。

### 1. シロイヌナズナ *NSL2* の制御下にある転写因子 ERF の解析

植物免疫は植物ホルモンであるサリチル酸(SA)、ジャスモン酸(JA)、エチレンなどによって制御されていることが知られている。過去の知見から *nsl2* の表現型に SA が関わっていることが報告されている。その一方で、JA およびエチレンに関する検討がされていなかったことから、これらの植物ホルモンのシグナル伝達系に関わる変異体を用いた遺伝学的解析を行った。その結果、エチレンのシグナル伝達系変異体である *ethylene insensitive 2* と二重変異体を作製することで *nsl2* の表現型である HR や加速する老化現象における部分的な復帰が観察された。さらに、microarray 解析の結果より *nsl2* においてエチレンのシグナル伝達系に関わる転写因子 ERF (ETHYLENE RESPONSE FACTOR) の発現が亢進していることが明らかとなった。そこで、最も発現が上昇していた *ERF94* の過剰発現体を作製して解析を進めた。結果、エチレンのシグナル伝達のマーカー遺伝子 *PDF1.2* の発現が上昇し、病原性灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* に対する抵抗性が亢進した。これらの結果から、*NSL2* は *ERF94* を介してエチレンに制御されている植物免疫を制御していることが示された。

## 2. シロイヌナズナにおける全身獲得抵抗性の解析

病原体の感染を受けた植物細胞は未感染の組織に情報を伝達し、植物個体全体で病原体に対する抵抗性を亢進させる。全身獲得抵抗性 (SAR) と呼ばれるこの現象は、SA と関連していることが知られており、NSL2 が不活性化あるいは分解されることで SAR を活性化していると考えられた。しかし、恒常的に HR を示している *nsl2* 変異体を用いた解析では任意の生育ステージや任意の組織での NSL2 の挙動の再現は不可能である。そこで、dexamethasone (DEX)-誘導型の knock-down 形質転換植物体を作製することで解決を試みた。局所的な DEX のシグナルが全身的に広がらないことを確認した後、処理葉と同じ個体内の非処理葉に分けて発現解析と感染実験を行った。結果、非処理葉でも SA シグナルの活性化と抵抗性の亢進が確認された。これらの結果より、NSL2 は、HR とともに SAR の制御に関与していることが示された。

## 3. NSL2 と相互作用するタンパク質の同定と *nsl2* における老化現象の解析

NSL2 の分子的機能の解明を目指し、酵母 two-hybrid による相互作用タンパク質のスクリーニングを進めた。その結果、シロイヌナズナの老化を制御する ABC タンパク質である AtNAP1 (*Arabidopsis thaliana* non-intrinsic ABC protein 1) が同定された。NSL2 と老化の関連性を解析するため、*nsl2* を暗処理しクロロフィルの分解の解析を行った。その結果、*nsl2* 変異体では野生型の植物体より早いクロロフィルの分解が確認され、同時に分解の中間体である pheophorbide *a* が蓄積していることが示された。発現解析によりクロロフィル結合タンパク質群の減少、クロロフィル分解酵素の蓄積、pheophorbide *a* 分解酵素の減少が示された。さらに、AtNAP1 変異体と *nsl2* の二重変異体を作製した。作出した二重変異体を解析した結果、クロロフィルの内生量の減少およびイオン流出によりモニターされる老化現象由来の細胞死は亢進したが、*nsl2* で見られた HR は抑制された。これらの結果、NSL2 と AtNAP1 の相互作用は老化現象を制御するが、HR は制御しないことが示唆された。

上記の研究を通して、私は NSL2 が 1)エチレンのシグナル伝達系を制御していること、2)SAR を制御していること、3)別々の制御を受けている植物の抵抗性と老化の共通因子であること、を明らかにした。特に、2)における誘導型形質転換体の作出は細胞死を誘導する他の遺伝子での応用が期待される。さらに、植物抵抗性と老化が類似の制御を受けているという発現解析レベルに留まる既知の研究に対して、老化現象を詳細に解析した 3)での知見はユニークなものである。これらの結果を基に、不明な点が多い老化現象を含めた植物抵抗性制御のネットワークの全容解明が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 口 淳 二  
副 査 教 授 加 藤 敦 之  
副 査 教 授 田 中 歩  
副 査 特任助教 千 葉 由佳子

学位論文題名

## Functional Studies on NSL2 Involved in Plant Immunity of Arabidopsis

(植物免疫に関与するシロイヌナズナ NSL2に関する機能解析)

抗体や免疫に特化した細胞を持たない植物は、哺乳類とは異なる免疫システムを発達させている。例えば、細菌やウイルスが植物体内に侵入した場合、病原体の侵食や増殖を抑制するために、植物は感染部位を含んだ周辺細胞がプログラム細胞死 (PCD) を起こすことが知られている。過敏感細胞死 (HR) と呼ばれるこの PCD の詳細な分子メカニズムは解明されていない。私の研究室では、この HR を恒常的に起こすシロイヌナズナの変異体 *ns12* (*necrotic spotted lesion 2*) を単離しており、またこの原因遺伝子 *NSL2* の同定にも成功している (既報では旧名として *cad1* 変異体と *CAD1* 遺伝子として報告している)。私は、この変異体を用いた研究を通して、HR を制御する分子機構の実体解明を目指し研究を行った。

### 1. シロイヌナズナ NSL2 の制御下にある転写因子 ERF の解析

植物免疫は植物ホルモンであるサリチル酸 (SA)、ジャスモン酸 (JA)、エチレンなどによって制御されていることが知られている。過去の知見から *ns12* の表現型に SA が関わっていることが報告されている。その一方で、JA およびエチレンに関する検討がされていなかったことから、これらの植物ホルモンのシグナル伝達系に関わる変異体を用いた遺伝学的解析を行った。その結果、エチレンのシグナル伝達系変異体である *ethylene insensitive 2* と二重変異体を作製することで *ns12* の表現型である HR や加速する老化現象における部分的な復帰が観察された。さらに、microarray 解析の結果より *ns12* においてエチレンのシグナル伝達系に関わる転写因子 ERF (ETHYLENE RESPONSE FACTOR) の発現が亢進していることが明らかとなった。そこで、最も発現が上昇していた *ERF94* の過剰発現体を作製して解析を進めた。結果、エチレンのシグナル伝達のマーカー遺伝子 *PDF1.2* の発現が上昇し、病原性灰色かび菌 *Botrytis cinerea* に対する抵抗性が亢進した。これらの結果から、NSL2 は ERF94 を介してエチレンに制御されている植物免疫を制御していることが示された。

### 2. シロイヌナズナにおける全身獲得抵抗性の解析

病原体の感染を受けた植物細胞は未感染の組織に情報を伝達し、植物個体全体で病原体に対する抵抗性を亢進させる。全身獲得抵抗性 (SAR) と呼ばれるこの現象は、SA と関連していることが知られており、NSL2 が不活性化あるいは分解されることで SAR を活性化していると考えられた。しかし、恒常的に HR を示している *ns12* を用いた解析では任意の生育ステージや任意の組織での NSL2 の挙動の再現は不可能である。そこで、dexamethasone (DEX)-誘導型の knock-down 形質転換植物体を作製することで解決を試みた。局所的な DEX のシグナルが全身的に広がらないことを確認した後、処理葉と同じ個体内の非処理葉に分けて発現解析と感染実験を行った。結果、非処理葉でも SA シグナルの活性化と抵抗性の亢進が確認された。これらの結果より、NSL2 は、HR とともに SAR の制御に関与していることが示された。

### 3. NSL2 と相互作用するタンパク質の同定と *nsl2* における老化現象の解析

NSL2 の分子的機能の解明を目指し、酵母 two-hybrid による相互作用タンパク質のスクリーニングを進めた。その結果、シロイヌナズナの老化を制御する ABC タンパク質である AtNAP1 (*Arabidopsis thaliana* non-intrinsic ABC protein 1) が同定された。NSL2 と老化の関連性を解析するため、*nsl2* を暗処理クロロフィルの分解の解析を行った。その結果、*nsl2* 変異体では野生型の植物体より早いクロロフィルの分解が確認され、同時に分解の中間体である pheophorbide *a* が蓄積していることが示された。発現解析によりクロロフィル結合タンパク質群の減少、クロロフィル分解酵素の蓄積、pheophorbide *a* 分解酵素の減少が示された。さらに、AtNAP1 変異体と *nsl2* の二重変異体を作製した。作出した二重変異体を解析した結果、クロロフィルの内生量の減少およびイオン流出によりモニターされる老化現象由来の細胞死は亢進したが、*nsl2* で見られた HR は抑制された。これらの結果、NSL2 と AtNAP1 の相互作用は老化現象を制御するが、HR は制御しないことが示唆された。

これを要するに、著者は、NSL2 が、1)エチレンのシグナル伝達系を制御していること、2)SAR を制御していること、3)別々の制御を受けている植物の抵抗性と老化の共通因子であること、を明らかにした。特に、2)における誘導型形質転換体の作出は細胞死を誘導する他の遺伝子での応用が期待される。さらに、植物抵抗性と老化が類似の制御を受けているという発現解析レベルに留まる既知の研究に対して、老化現象を詳細に解析した 3)での知見はユニークなものである。これらの結果を基に、不明な点が多い老化現象を含めた植物抵抗性制御のネットワークの全容解明が期待される。以上のように、著者の研究は植物抵抗性と老化現象の関連性に関する新知見を得たものであり、今後の植物免疫研究に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。