

論文内容の要旨

申請者氏名 金田 隆志

植物は様々な病原菌の侵入を感知し、その感染を防御するための免疫応答機構を有している。過敏感細胞死 (hypersensitive cell death) は、その一つと考えられており、細胞質の収縮や核 DNA のラダー化等、動物のアポトーシスと類似した形態変化を伴うことなどが明らかとされてきているが、その誘導機構に関しては殆ど明らかにされていない。本研究では、植物病原細菌 *Acidovorax avenae* の非親和性 N1141 菌株をイネに接種した際に観察される過敏感細胞死を対象として、過敏感細胞死の誘導機構を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、まず、過敏感細胞死誘導能を持つ N1141 菌株と過敏感細胞死誘導能を失ったフラジェリン欠損 N1141 菌株をイネ培養細胞に接種して、前者において特異的に発現誘導されてくる遺伝子を PCR-subtraction 法を用いて探索した。同定された 42 個の候補遺伝子の中から NAC ドメインを持つ植物特有の転写因子 *OsNAC4* に着目して解析を進めた。*OsNAC* 類はファミリーを形成するが、その中で *OsNAC4* が N1141 菌株接種約 3 時間後に特異的に発現誘導されてくることを明らかにした。さらに、*OsNAC4* を一過的に過剰発現させるとイネ細胞に核 DNA の断片化を伴う細胞死が誘導されることが示された。逆に、RNAi 法により *OsNAC4* の発現を抑制すると N1141 菌株接種による過敏感細胞死が有意に抑制されることが示され、*OsNAC4* が過敏感細胞死誘導の positive regulator として機能することが明かとなった。第 2 章では、*OsNAC4* が N1141 菌株接種約 6 時間後に特異的に核に蓄積することを見出し、本転写因子の核移行が過敏感細胞死誘導に関わっている可能性を明らかにした。さらに、マイクロアレイ解析により、N1141 菌株接種後に発現誘導されてくる遺伝子の内、*OsNAC4* の RNAi 発現抑制株中では発現誘導されなくなる遺伝子を 139 個見出した。その中に endonuclease の活性ドメインを持つ分子を見出し、*OsHEN* (*Oryza sativa* HR-cell death-related endonuclease) と命名した。さらに、*OsHEN* をイネ細胞内に強制発現させると核 DNA の断片化が誘導されることが示された。以上の結果は、*OsNAC4* により発現誘導される *OsHEN* が、過敏感細胞死誘導時における核 DNA 断片化に直接的に関与する可能性を示唆するものである。

以上の結果から、非親和性菌株接種により誘導された *OsNAC4* は、核内への移行を介して *OsHEN* を発現誘導し、過敏感細胞死誘導時に特徴的な核 DNA の断片化を引き起こしている可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 金田 隆志

植物が病原菌の侵入を感知して誘導する様々な免疫反応の中で、過敏感細胞死は、oxidative burst と呼ばれる活性酸素種の発生、ファイトアレキシンの生成、PR-タンパク質の合成などと共に、最も良く観察されてきた現象である。また、これまで動物のアポトーシスとの形態的異同や関与するプロテアーゼの異同など多くの比較解析が行われてきているにも関わらず、植物における過敏感細胞死の誘導経路の多くは未解明のまま残されている。

申請者は、植物病原細菌 *Acidovorax avenae* の非親和性菌株の接種により誘導されるイネの過敏感細胞死が、新規タンパク質合成を必要とするユニークな細胞死であることを示すと共に、この細胞死誘導に関与する因子を独自の手法で探索し、転写因子 OsNAC4 を発見した。さらに、過剰発現実験および発現抑制実験を通じて、OsNAC4 が核 DNA の断片化を伴う過敏感細胞死誘導の positive regulator として機能していることを証明した。これまで、こうした転写因子が過敏感細胞死誘導に直接的に関与していることが示された例はなく、本発見は独自性の高いものと言える。さらに、申請者は、OsNAC4 が、イネの過敏感細胞死に先だって、核内に移行・蓄積することを、生化学的に、また免疫電子顕微鏡観察により明らかにした。これは、本転写因子の核移行が過敏感細胞死誘導の引き金となっている可能性を示唆するものである。さらに転写因子としての機能を類推して、過敏感細胞死誘導時に OsNAC4 の下流で発現誘導される遺伝子類を、イネオリゴアレイを用いて探索し、多くの候補遺伝子類を見出した。これら遺伝子類は、過敏感細胞死の誘導経路解明の基礎となることが期待される。実際、得られた候補遺伝子の一つでヌクレアーゼをコードしていると予測された *OsHEN* に着目し、さらなる研究を展開した。*OsHEN* をイネ細胞内に強制発現させると核 DNA の断片化が誘導されることが示され、*OsHEN* が過敏感細胞死誘導時における核 DNA 断片化に直接的に関与する可能性が示唆された。

以上のように、本論文はイネの過敏感細胞死誘導経路に関わる 2 種類の鍵分子の発見とその機能解析を記したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。