

論文内容の要旨

申請者氏名 藤原 沙都姫

単子葉植物を宿主とする植物病原細菌 *Acidovorax avenae* は厳密な宿主特異性を持ち、一菌株が感染しうる植物種は限定されている。これまでにイネ親和性菌とイネ非親和性菌を用いて宿主特異性決定機構の解析が進められ、イネが非親和性菌の侵入を特異的に感知し、活性酸素の発生、過敏感細胞死の誘導、抵抗性関連遺伝子の発現誘導などの一連の免疫反応を誘導し、感染を防いでいる実態が明らかにされてきた。さらに、これら免疫反応の多くが、非親和性菌の鞭毛構成タンパク質フラジェリンにより誘導されることが明らかにされてきた。しかし、このフラジェリン認識以降の免疫反応誘導に至るまでのイネ細胞内の情報伝達経路は全く明らかにされておらず、申請者はその解明を目的として本研究を行った。

第1章では、独自に作製したイネ cDNA マイクロアレイ、22K イネオリゴアレイ、real time RT-PCR 法を用いて、フラジェリン認識後にイネ培養細胞内で誘導されてくる遺伝子類を網羅的に探索した。イネ親和性菌接種、非親和性菌接種、非親和性菌のフラジェリン欠損株接種、非親和性菌の精製フラジェリン処理など複数の処理をイネ培養細胞に対して行い、非親和性菌のフラジェリン認識の下流に位置すると推定される遺伝子を約 150 同定した。次に、同定された下流候補遺伝子の多くが、 Ca^{2+} シグナリングに関わる因子類、キナーゼ類をコードしていることに着目して以下の実験を進めた。まず、細胞外 Ca^{2+} キレート剤や Ca^{2+} チャネル遮断剤処理により、多くの下流候補遺伝子類の発現誘導が抑制されることを示した。また、これらの処理に加え、K252a 等のキナーゼ阻害剤処理により、活性酸素発生や過敏感細胞死の誘導が抑制されることを示し、これらの免疫反応誘導に Ca^{2+} とタンパク質リン酸化反応が関与することを明らかにした。第2章では、まず yellow camaleon 3.6 を発現させたイネ培養細胞を用い、非親和性菌のフラジェリン接種により、細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ が特異的かつ一過的に上昇することを証明した。さらに Ca^{2+} シグナリングとリン酸化反応を結びつける候補として Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼ (CPK) に着目して全 CPK 類の発現解析を行い、6 種類の CPK 類が非親和性菌接種時に特異的に発現誘導されてくることを示した。さらに、一過的発現誘導アッセイ法を用い、その内の *OsCPK8* と *OsCPK13* が抵抗性関連遺伝子 *OsWRKY70* の発現誘導に関わることを証明した。また、ウィルス発現系を用いて *OsCPK13* を過剰発現させた *Nicotiana benthamiana* が、生育阻害を示すと同時に、過敏感細胞死誘導に関して高感受性を示すことを観察した。以上の結果から、イネは非親和性菌株のフラジェリンを認識すると、一過的な細胞内への Ca^{2+} 流入を誘導し、この細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇を介して *OsCPK13* などのキナーゼ類を活性化し、活性酸素発生、過敏感細胞死、抵抗性遺伝子類発現などの免疫反応を誘導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 藤原 沙都姫

植物は多くの病原菌の侵入を感知し、一連の免疫反応を誘導することで感染を未然に防いでいる。単子葉植物を宿主とする植物病原細菌 *Acidovorax avenae* は厳密な宿主特異性を持ち、例えばイネに感染しうる菌株はその一部に限定される。これは、イネが大多数の非親和性菌の侵入を感知し、免疫反応を誘導する能力を有しているためであると考えられている。実際、これまでの研究により、非親和性菌のフラジェリン接種により、活性酸素の発生、過敏感細胞死の誘導、抵抗性関連遺伝子の発現誘導などの一連の免疫反応がイネ細胞内に誘導されることが示されてきたが、フラジェリン認識から免疫反応誘導に至るまでの情報伝達系に関しては全く未解明の状態であった。

申請者は、マイクロアレイを駆使し、このイネによる非親和性菌のフラジェリン認識の下流に位置すると推定される発現誘導遺伝子類を多数同定した。同定された遺伝子類の中には、すでに病原菌に対する免疫反応との関連が示唆されてきた遺伝子類に加え、他の情報伝達に関与することが指摘されてきたもの、機能未知のものが多く含まれ、今後の情報伝達系解明に大きく貢献することが期待される。さらに、申請者は、これら遺伝子類の多くが Ca^{2+} シグナリングに関わる因子をコードしていることに着目して、さらに研究を進展させた。イネ細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ モニター系を確立し、非親和性菌のフラジェリン接種時に特異的に細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の一過的な上昇が起きることを明確に証明した。また、EGTA 処理や nifedipine 処理によりこの一過的上昇が抑制されること、同時に抵抗性関連遺伝子類の発現誘導、活性酸素の発生、過敏感細胞死の誘導がすべて抑制されることを示し、細胞外からの Ca^{2+} 流入がフラジェリン認識と免疫反応誘導を結ぶ鍵を握っていることを明らかにした。さらに、キナーゼ阻害剤を用いた実験よりタンパク質のリン酸化反応が免疫反応誘導に必須であることを示すと共に、 Ca^{2+} シグナリングとリン酸化を結びつける候補因子として、特定の CPK 類の関与を示唆することに成功した。今後の免疫反応誘導経路の全容解明の基礎となることが期待される。

以上のように、本論文は免疫反応誘導時におけるイネ細胞内の情報伝達機構に関して多くの新知見を提示したのもので、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。