

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	神村 麻友
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2014年（平成26年）3月15日
学位授与の要件	本学学位規程第18条第1項該当者（学位規則第4条第1項）
学位論文の題名	植物免疫としての活性酸素発生の制御機構に関する研究
審査委員	主査 教授 蔡 晃植 副査 教授 山本 博章 副査 教授 水上 民夫

論文内容要旨

植物病原体は地球上に約 14,000 種存在すると推定されており、自発的移動手段を持たない植物は自然界において常にこれらの植物病原体との接触の機会にさらされている。しかし、ほとんどの場合、病原菌の接触が感染に至ることはなく、発病することは稀である。これは、植物が独自の病原菌認識機構と免疫反応誘導機構を持ち、病原菌の感染から自己を防衛しているためである。植物の免疫システムの中でも、微生物もしくは病原体分子パターン（MAMPs/PAMPs）を認識し、誘導される免疫反応を PAMP-triggered immunity (PTI) と呼ぶ。MAMPs/PAMPs とは、細菌の鞭毛を構成するタンパク質であるフラジェリンや糸状菌の細胞壁の主成分であるキチンなど、病原菌間での保存性が高く、複数の病原菌が類似の分子を有しているといった特徴を持つ植物の免疫反応を誘導する物質である。植物が病原菌の PAMP を認識すると急速な活性酸素種の生成や、抗菌性物質であるファイトアレキシンの蓄積、防御応答性関連遺伝子群の発現誘導、Pathogenesis-related (PR) タンパク質の合成等の一連の免疫反応を誘導することが明らかとなっている。単子葉植物を宿主とする植物病原細菌 *Acidovorax avenae* のイネに対して非病原性である N1141 菌株の鞭毛を構成するタンパク質フラジェリンをイネに処理すると活性酸素の発生を初めとする様々な免疫反応が誘導されることが明らかになっている。そこで、本研究ではイネが *A. avenae* のフラジェリンを認識し、誘導する活性酸素発生の制御機構を明らかにすることを目的と

した。

まず、*A. avenae* N1141 菌株のフラジェリンによって誘導される活性酸素発生の機構を分子レベルで調べるため、様々な情報伝達阻害剤を用いた解析を行った。その結果、フラジェリン認識後の活性酸素の発生には Ca^{2+} 濃度とタンパク質のリン酸化が関与していることが示唆された。そこで、N1141 菌株のフラジェリン認識後のイネ細胞内における Ca^{2+} 動態を Yellow cameroon3.6 を用いて解析したところ、非病原性の N1141 菌株のフラジェリンでは処理後数分以内に細胞内の Ca^{2+} 濃度が急激に上昇したのに対し、病原性の K1 菌株のフラジェリンではこのような Ca^{2+} 濃度の上昇は見られなかった。次に、N1141 菌株のフラジェリン処理後のリン酸化タンパク質の蓄積を調べたところ、処理後 15 分からリン酸化タンパク質の蓄積が見られ、その中のいくつかは Ca^{2+} 依存的にリン酸化されることが明らかになった。イネには Ca^{2+} 依存的にタンパク質のリン酸化を行う Calcium-dependent protein kinase (CPK) が存在する。そこで、このような Ca^{2+} 依存的なタンパク質リン酸化にこれら CPK が関与すると考え、まず、イネゲノム上に存在する 29 種の *OsCPK* の免疫誘導時における発現パターンを解析した。その結果、6 種の *OsCPK* が免疫反応誘導時特異的に発現誘導されることが示された。そこで、これらの *OsCPK* が免疫反応としての活性酸素の発生に関与しているかを明らかにするため、6 種類の *OsCPK* について *RNAi* 形質転換体を作製した。その結果、*OsCPK12* 抑制形質転換体に非病原性 N1141 菌株のフラジェリンを処理したときに、コントロールに比べ活性酸素の発生が抑制されることが明らかになった。そこで、*OsCPK12* の基質を探索するために、キナーゼとその基質のような一過的タンパク質相互作用でも検出することが出来る、大腸菌 Rosetta-gamiB を用いたスクリーニング系を構築した。構築したスクリーニング系を用いて、*OsCPK12* と相互作用するタンパク質を探索したところ、植物の NADPH オキシダーゼである *OsrbohA* とシンタキシンである *OsSYP13b* が同定された。そこで、これらのタンパク質は植物細胞内においても *OsCPK12* と相互作用するかどうかを BiFC 法で調べた。まず、*OsrbohA* との相互作用について調べたところ、*OsCPK12* は *OsrbohA* の N 末端細胞内領域だけでなく、C 末端細胞内領域とも相互作用することが明らかになった。興味深いことに、*OsCPK* の EF-hand 領域を欠損させ、恒常活性型にした *OsCPK12CA* は *OsrbohA* の N 末端細胞内領域とだけ特異的に結合することが明らかになった。この時、*OsCPK12* においてキナーゼ活性中心である Asp を Asn に置換した *OsCPK12D215N*、*OsCPK12D236N* は *OsrbohA* の N 末端細胞内領域とは相互作用しなかったことから、この相互作用はキナーゼ活性依存的であることが明らかになった。一方、*OsSYP13b* は *OsCPK12CA* とイネ細胞内でも相互作用するが、この相互作

用には OsCPK12 のキナーゼ活性には非依存的であることが示された。以上のことから、OsCPK12 は NADPH オキシダーゼである OsrbohA とシンタキシンである OsSYP13b と直接相互作用し、この分子のリン酸化によって、免疫反応としての活性酸素発生を制御している可能性が高いことが示された。

論文審査結果要旨

本論文には、イネがフラジェリンを認識し誘導する活性酸素発生の制御機構を明らかにすることを目的とした研究結果が記載されている。フラジェリンを処理したイネでは細胞内の Ca^{2+} 濃度がフラジェリン処理によって急激に上昇することを Yellow camereon3.6 で明らかにした。また、 Ca^{2+} 依存的にタンパク質のリン酸化を行う Calcium-dependent protein kinase (CPK) の中で、6種の *OsCPK*が免疫誘導に関与することを示すと共に、*RNAi*形質転換体を作製することで、OsCPK12が活性酸素発生を制御することを明らかにした。そこで、この OsCPK12の基質を明らかにするため、BiFCをベースとした大腸菌検定系を新たに構築し、OsCPK12が植物の NADPH オキシダーゼである OsrbohA とシンタキシンである OsSYP13b と相互作用することを明らかにした。また、OsCPK12の EF-hand 領域を欠損させ恒常活性型にした OsCPK12CA は OsrbohA の N 末端細胞内領域とキナーゼ活性依存的に特異的に相互作用することを示すと共に、OsSYP13b は OsCPK12 とキナーゼ活性に非依存的に相互作用することを明らかにした。

本研究は、OsCPK12が OsrbohA の N 末端の結合することで活性酸素発生を制御することを初めて明らかにしたもので、その研究結果は高く評価できる。また、研究も論理的に構成されており、研究における実験の組み立ても良く、研究データも豊富で、質の高い論文といえる。英語論文としては、筆頭著者で 1 報、学会発表も国際学会での英語発表を含め数十回にのぼっている。論文審査におけるプレゼンテーションもレベルが高く、口頭試問においても豊富な知識量と論理的思考能力の高さが確認された。以上のことから審査員は、本論文が長浜バイオ大学の博士（バイオサイエンス）の学位論文として相応しいものと結論づけた。