

OsNAC 転写因子を介した植物免疫反応である過敏感細胞死の誘導機構に関する研究

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科

バイオサイエンス専攻 バイオ科学技術領域

植物分子環境生理学研究室

氏名 大坪 由佳

【要旨】 過敏感細胞死は、病原菌の侵入後早期に、また侵入部位に限局して誘導されるプログラム細胞死であり、植物免疫反応の一つである。これまでの研究で、イネに対して非病原性である *Acidovorax avenae* N1141 菌株をイネ培養細胞に接種すると、核 DNA の断片化や細胞質の凝集といった特徴的な形態変化を伴う過敏感細胞死が誘導されることが明らかになった。さらに、この非病原性菌株を接種したときにのみに認められる過敏感細胞死の誘導は OsNAC4 という植物特有の転写因子によって制御されていることが示された。また、*OsNAC4* RNAi ノックダウン形質転換体を用いたマイクロアレイ解析の結果から、139 個の遺伝子が過敏感細胞死誘導時に実際に OsNAC4 によって転写制御されていることが示されており、OsNAC4 転写因子はこれらの遺伝子の転写制御を介して過敏感細胞死を誘導している可能性が高いと考えられる。しかし、OsNAC4 がどのような機構でこれら遺伝子を転写制御し、過敏感細胞死を誘導しているのかについてはほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、OsNAC4 による過敏感細胞死実行因子をコードする遺伝子の発現制御機構や過敏感細胞死誘導の実行に関わる因子の作用機序を調べることで、植物の過敏感細胞死の誘導機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

第 1 章 OsNAC 転写因子の過敏感細胞死誘導への関与

植物の過敏感細胞死誘導に転写活性が必要ということは明らかになっているが、OsNAC4 がどのような機構で過敏感細胞死の実行因子をコードする遺伝子を転写制御しているのかについてはほとんど知見が得られていない。そこでまず、このような OsNAC 転写因子がどのようにして過敏感細胞死を誘導するのかについて解析を試みた。

まず、実際にイネ細胞内で *OsNAC4* を過剰発現することで、過敏感細胞死が引き起こされるかどうかを調べるため、イネ細胞内で *OsNAC4* を一過的に過剰発現させたところ、核 DNA の断片化を伴う過敏感細胞死が誘導された。そこで、OsNAC4 が細胞内のどこに局在して機能しているかを調べるため、OsNAC4-DsRed をイネ細胞内で発現させたところ、核に局在していることが明らかとなった。実際に、*A. avenae* N1141 菌株を接種して過敏感細胞死を誘導した細胞においても

OsNAC4 が核に存在しているかどうかをウエスタンブロットで解析したところ、非病原性 *A. avenae* N1141 菌株を認識することで OsNAC4 は発現誘導され、その後、細胞質から核に移行することが確認された。次に、このような OsNAC4 の核への蓄積は、過敏感細胞死誘導に必須であるかどうかを調べるため、核外輸送シグナルである NES を付加した OsNAC4-DsRed をイネプロトプラスト内で発現させたところ、OsNAC4 の多くが細胞質に存在しており、この時には過敏感細胞死はほとんど誘導されないことが明らかになった。このことは、過敏感細胞死誘導において OsNAC4 の核移行が必須であることを示している。次に、この様に過敏感細胞死誘導に必須となる OsNAC4 の核移行の制御機構について Ser/Thr protein kinase の強力な阻害剤である Staurosporine や様々な変異 OsNAC4 を用いて調べたところ、OsNAC4 は NAC ドメインに存在する 5 つのセリン残基がリン酸化されることで核に移行することが初めて明らかとなった。事実、過敏感細胞死誘導時に核に存在する OsNAC4 はセリン残基がリン酸化されているが、細胞質に存在する OsNAC4 はリン酸化されていないことが抗リン酸化セリン抗体を用いたウエスタンブロット解析で示された。以上の結果から、OsNAC4 は過敏感細胞死誘導時に NAC ドメイン内のセリン残基がリン酸化され、これにより核へ移行し過敏感細胞死を正に制御することが明らかとなった。

次に、核に存在する OsNAC4 による過敏感細胞死関連遺伝子の転写制御機構について調べるため、Yeast two-hybrid 法を用いて、OsNAC4 と相互作用するタンパク質の探索を行ったところ、同じ NAC ファミリーに属する OsNAC3 と OsNAC6 が同定された。そこで、OsNAC3 と OsNAC6 が過敏感細胞死に関与するのかを明らかにするため、*OsNAC3* と *OsNAC6* をイネ細胞で一過的に過剰発現させた。その結果、OsNAC3 を過剰発現させたイネ細胞においては核 DNA の断片化を伴う過敏感細胞死が誘導されたのに対し、OsNAC6 を過剰発現させたイネ培養細胞ではこのような細胞死は全く誘導されなかった。そこで次に、OsNAC3 の過敏感細胞死への関与を明確にするため、*OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体を作製した。作製した *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体に *A. avenae* N1141 菌株を接種したところ、過敏感細胞死が認められず、過敏感細胞死の特徴である核 DNA の断片化も確認できなかった。これらの結果から、転写因子と推定される OsNAC3 は OsNAC4 と同じく過敏感細胞死を正に制御することが明らかとなった。

次に、OsNAC3 の過敏感細胞死誘導時における細胞内局在について調べたところ、過敏感細胞死誘導に伴ってやはり核に蓄積することが示された。そこで、OsNAC3 が核内で OsNAC4 と実際に相互作用しているかどうか BiFC 法で調べたところ、OsNAC4 と OsNAC3 は核内で相互作用していることが明らかとなった。そこで、OsNAC3 と OsNAC4 の相互作用が過敏感細胞死誘導において重要かどうかを調べるため、イネ培養細胞に OsNAC3 と OsNAC4 を共発現させたところ、

それぞれを単独で発現させたときよりも明らかに強い細胞死が誘導された。このことは OsNAC3 と OsNAC4 は相互作用することで、過敏感細胞死誘導に関与する遺伝子の発現を制御する可能性を示す。事実、OsNAC3 RNAi ノックダウン形質転換体における過敏感細胞死誘導時の遺伝子プロフィールをイネ 44K オリゴマイクロアレイで解析したところ、これまでに過敏感細胞死に関与する遺伝子として同定されている分子シャペロンをコードしている *OsHSP90* とエンドヌクレアーゼ様分子をコードしている *IREN* が OsNAC4 と OsNAC3 の両方によって発現制御されていることが示された。以上のことから、過敏感細胞死誘導時には *OsNAC3* と *OsNAC4* が同時に発現誘導された後、核に移行し、核内で相互作用することによって *IREN* や *OsHSP90* などの過敏感細胞死誘導に関与する遺伝子の発現を制御することが初めて明らかとなった。

第 2 章 新規エンドヌクレアーゼ *IREN* の同定と過敏感細胞死特異的な核 DNA 断片化への関与

OsNAC3 と *OsNAC4* の RNAi ノックダウン形質転換体を用いたマイクロアレイ解析によって *IREN* (*Immune Related Endonuclease*) というエンドヌクレアーゼ様分子が両タンパク質の下流で発現制御されていることが明らかになった。このことは、この *IREN* が過敏感細胞死特異的な核 DNA の断片化に関与している可能性を示している。そこで、本章では、イネの過敏感細胞死特異的な核 DNA の断片化に *IREN* が実行因子として機能しているのか、また、*IREN* がどのようにして核 DNA の断片化を引き起こしているのかなどについて酵素科学的、細胞生物学的、分子生物学的、生化学的手法を用いて明らかにすることにした。

まず、イネ細胞内で *IREN* を一過的に過剰発現させたところ、*IREN* は主に核に局在し、核 DNA のヌクレオソーム単位での分解を引き起こすことが明らかになった。さらに、このような *IREN* の核移行は分子内に存在する二つの核移行シグナル (NLS) によって制御されていることも明らかになると共に、実際に *IREN* は過敏感細胞死誘導時にこの NLS を用いて核に移行し、核で蓄積することも明らかとなった。次に、*IREN* の発現誘導が過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化の実行因子かどうかを明らかにするため、*IREN* RNAi ノックダウン形質転換体を作製し、*A. avenae* N1141 菌株を接種した時の核 DNA の断片化について解析した。その結果、*IREN* RNAi ノックダウン形質転換体では、N1141 菌株を接種しても核 DNA の断片化がほとんど起きないことが示され、N1141 菌株を接種したときに認められる核 DNA の断片化は *IREN* によって引き起こされていることが明らかとなった。

次に、*IREN* のヌクレアーゼ活性について調べるため、*IREN* を大腸菌で発現させてリコンビナ

ント IREN を作製した。作製したリコンビナント IREN に環状の *pBluescript* と各種の金属イオンを加えて反応させると *pBluescript* の分解が認められたことから、IREN はエンドヌクレアーゼ活性を有することが示された。次に、リコンビナント IREN の様々な金属イオンの要求性について調べたところ、IREN は Ca^{2+} と Mg^{2+} あるいは Ca^{2+} と Mn^{2+} を加えることで活性化することが示された。次に、至適 pH について調べたところ、リコンビナント IREN は Ca^{2+} と Mg^{2+} の存在下において pH9.0 で最も強い活性を示すことが明らかとなった。さらに、IREN による核 DNA の断片化が細胞膜透過性喪失を含む細胞死の引き金になるかどうかを調べるため、イネ培養細胞に IREN を過剰発現させたときの過敏感細胞死について GUS 活性とエバンスブルー染色を指標に解析したところ、IREN を過剰発現しても細胞膜透過性喪失を含む細胞死は誘導されないことが示され、IREN によって引き起こされる核 DNA の断片化は過敏感細胞死のような急速な細胞死の引き金にはならないことが示された。次に、IREN による DNA の断片化が他の生物でも認められるのかを調べるため、酵母に IREN を発現させ、TUNEL 法を用いて解析した結果、IREN を発現させた酵母細胞で DNA の断片化が誘導された。また、このときの酵母の生育についても解析したところ、IREN を発現した酵母では生育の抑制が認められた。このような生育の抑制は NLS を欠損させた IREN を発現させた酵母細胞では認められないことから、IREN によって誘導される核 DNA の断片化は細胞の生育を抑制することが示された。これは、DNA の分解は早期の自発的細胞死の引き金にはなっていないが、DNA の分解により細胞の生育を抑制させることによると思われる。