

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	大坪 由佳
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2016年（平成28年）3月16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	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
審査委員 主査	教授 蔡 晃植
副査	教授 山本 博章
副査	教授 齊藤 修

論文内容要旨

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ァイルをイネ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Ca²⁺とMg²⁺あるいはCa²⁺とMn²⁺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Ca²⁺とMg²⁺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。この様な生育の抑制は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。

論文審査結果要旨

本論文には、植物の免疫反応の一つである過敏感細胞死の誘導機構に関する研究内容が記載されている。論文ではまず、植物に非病原性菌株を接種すると誘導される過敏感細胞死に植物の転写因子であるOsNAC4が関与することを明らかにしている。さらに、このOsNAC4が過敏感細胞死誘導時に核において新しい転写因子であるOsNAC3と相互作用することを見いだした。また、このOsNAC3をイネ細胞で過剰発現させると核DNAの断片化と細胞膜透過性の喪失を伴った過敏感細胞死が誘導されることを複数の実験で明らかにし、このOsNAC4とOsNAC3は核内で複合体を形成することで過敏感細胞死を誘導することを証明した。また、この転写因子によって制御されているIRENというエンドヌクレアーゼについても初めて同定し、このIRENが過敏感細胞死誘導時の核DNAの断片化を実行している因子であることを明らかにすると共に、このエンドヌクレアーゼの酵素学的な特徴を詳細に調べている。

本研究は、その誘導機構がほとんど明らかにならなかった植物の過敏感細胞死の誘導機構について研究を行い、この過敏感細胞死がOsNAC4とOsNAC3という二つの転写因子の複合体によって誘導されていることを明らかにし、また、この過敏感細胞死の核DNAの断片化の実行因子についても初めて明らかにしたものであり、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、学会発表も数十回行っている。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。