

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	川口 雄正
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2021年（令和3年）2月26日
学位授与の要件	本学学位規程第18条第2項該当者（学位規則第4条第2項）
学位論文の題名	植物病原性細菌 <i>Acidovorax avenae</i> によるイネ免疫反応の抑制に関する研究
審査委員 主査	蔡 晃植 教授
副査	齊藤 修 教授
副査	伊藤 正恵 教授

論文内容要旨

植物は多くの植物病原細菌に共通して存在するフラジェリンなどの Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識し、活性酸素の発生やカロースの沈着などの PAMP-triggered immunity (PTI) と呼ばれる免疫反応を誘導する。これに対して植物病原細菌は、細菌の持つ Type III 分泌装置 (type III secretion system ; T3SS) を介して様々なエフェクタータンパク質を植物細胞内に分泌し、植物の PTI を抑制する Effector-triggered susceptibility (ETS) と呼ばれる機構を有する。単子葉植物を宿主とする植物病原性細菌 *Acidovorax avenae* の菌株間には厳密な宿主特異性が存在し、例えば、イネを宿主とする K1 菌株はイネにのみ感染できるが、シコクビエを宿主とする N1141 菌株はイネに感染できない。このような *A. avenae* の宿主特異性に ETS が関与する可能性が考えられるが、これまでにこの菌に宿主植物の免疫反応を抑制する能力があるのかどうか、また、抑制能力がある場合、その抑制に特定のエフェクタータンパク質があるのかも全く明らかになっていない。そこで、*A. avenae* イネ病原性 K1 菌株と宿主であるイネを用いて ETS とその機構について研究を行なった。

イネ培養細胞に PAMP であるフラジェリンを処理すると活性酸素の発生、*PAL* や *OsWRKY70* などの PTI 関連遺伝子の発現、カロースの沈着などが誘導される。そこでまず、イネ培養細胞に K1 菌株を接種した後、フラジェリンを処理したところ、これらの

PTI 反応誘導が認められないか抑制されることが明らかになった。このような K1 菌株による PTI 反応の抑制は、K1 菌株の T3SS を欠損させた *KΔT3SS* では認められないことから、K1 菌株はイネの PTI 反応を抑制する機構を有しており、この機構には T3SS が関与することが示された。

そこで、K1 菌株による PTI 抑制に関わる因子を同定するため、K1 菌株のゲノム上にトランスポゾンランダムに挿入した変異株ライブラリーを作製し、PTI 抑制能を失った変異株を選抜した。4,562 株をイネ培養細胞に接種し、フラジェリン処理 1 時間後の活性酸素発生量を調べたところ、PTI 抑制能を失った変異株が 156 株得られた。そこで、この 156 株のトランスポゾン挿入部位について RATE 法を用いて解析したところ、68 個のトランスポゾンが挿入された遺伝子を同定した。

これまでの研究で、いくつかのエフェクタータンパク質は植物病原性細菌が植物細胞に感染した後、その発現量が増加することが明らかになっている。そこで、この 68 個の遺伝子の中からエフェクター分子をコードする遺伝子を選抜するために、イネに感染した後に発現が増加する K1 菌株の遺伝子を RNA-seq で解析したところ、1,240 個の遺伝子がイネ培養に接種した後、5 倍以上に増加することが示された。選抜した遺伝子には、PTI 抑制能スクリーニングで同定された遺伝子のうち 16 遺伝子が含まれていたため、この 16 個の遺伝子産物について、T3SS から分泌される可能性を *in silico* で解析した。その結果、DNA polymerase III beta subunit N 末端ドメインに類似した配列を分子内に有する 208 アミノ酸残基で構成されるタンパク質が T3SS から分泌される可能性が高いことが示されたので、このタンパク質を *A. avenae* K1 suppression factor 1 (AKSF1) と名付けた。そこでこの AKSF1 が実際に T3SS を介してイネ細胞内に輸送されるかどうかを調べるため、AKSF1 とカルモジュリン依存性アデニル酸シクラーゼである CyaA の融合タンパク質 AKSF1-CyaA と AKSF1-venus 融合タンパク質を用いた実験を行ったところ、AKSF1 は T3SS を介してイネ細胞内に輸送され、イネ細胞の核および細胞質に局在することが示された。

次に AKSF1 が実際に PTI を抑制する能力があるかを調べるため、*AKSF1* ベクター挿入破壊株 (*SF1DM*) と *AKSF1* 欠損株 (*KΔSF1*) を作製しイネに接種したところ、フラジェリン処理による活性酸素の発生や PTI 関連遺伝子 *PAL*、*OsWRKY70* の発現誘導、カロースの沈着などが抑制されないことが示された。一方、*KΔSF1* に *AKSF1* を再導入した *AKSF1* 相補株においてはフラジェリンによる PTI 反応を抑制することも明らかになり、AKSF1 はイネ PTI を抑制する能力を持ったエフェクターであることが確認された。そこで、AKSF1 が K1 菌株の病原性に関与しているかどうかを調べるため、*SF1DM* と *KΔSF1* をイネ植物体に接種し、発生する病徴を観察した。その結果、*SF1DM* と *KΔSF1*

を接種したイネでは K1 菌株を接種したイネと比べて病徴が減少した。また、接種 4 日後のイネ内に存在する菌体数を測定したところ、*SF1DM* と *KΔSF1* を接種したイネでは K1 菌株を接種したイネと比べて菌体数が減少していたことから、*AKSF1* は宿主のイネに対して病徴因子として機能していることも明らかとなった。

イネにフラジェリンを処理すると数分以内に MAPK のリン酸化が認められる。そこで、フラジェリンによる MAPK リン酸化への *AKSF1* の影響を調べるために K1、*KΔT3SS*、*SF1DM* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理して、リン酸化された MAPK をウエスタンブロットで調べたところ、K1 菌株はフラジェリンによる MAPK リン酸化を抑制するが、*KΔT3SS* と *SF1DM* はこの MAPK のリン酸化を抑制しないことが示され、*AKSF1* はイネのフラジェリン受容体である FliRK2 から MAPK に至る経路に存在するキナーゼをターゲットとしている可能性が示された。そこで、*AKSF1* と相互作用するイネキナーゼタンパク質を Yeast two-hybrid 法で探索したところ、*OSK4* (Oryza S-phase kinase associated protein 1-like 4) と *STY46* (Protein kinase Ser/Thr/Tyr 46) というキナーゼをコードする遺伝子が選抜された。このうち、*STY46* は MAPKKK としての活性を有することが報告されていることから、イネプロトプラストにおける *AKSF1* との相互作用を BiFC 法で調べたところ、細胞質において相互作用していることが示された。以上の結果から、*AKSF1* は MAPKKK として機能すると考えられる *STY46* をターゲットとして、フラジェリンの認識情報を抑制している可能性が示唆された。

論文審査結果要旨

本博士論文では、*Acidovorax avenae* イネ病原性 K1 菌株を宿主であるイネ培養細胞に接種すると、フラジェリンなどの PAMP で誘導される PTI と呼ばれる免疫反応が抑制されることを見いだした。また、この PTI の抑制はこの菌の Type III 分泌装置からイネ細胞内に輸送されるエフェクタータンパク質が関与することも明らかにした。そこで、このエフェクターを同定するため、K1 のトランスポゾン挿入ライブラリーの PTI 抑制能を指標としたスクリーニング、接種後発現上昇する遺伝子のプロファイリング、Type III 分泌装置から分泌されるかどうかの *in silico* 解析を行い、*AKSF1* という新規なエフェクターを見いだした。そこで、この *AKSF1* が実際に PTI 誘導を抑制することを *AKSF1* の K1 欠損株やその相補株を作製することで証明した。また、本研究では、*AKSF1* のターゲット候補タンパク質を酵母 Two-hybrid 法を用いて調べ、*AKSF1* が Protein kinase Ser/Tyr 46 (*STY46*) と相互作用することを見だし、これにより MAPK カスケードが阻害されることで PTI が抑制されている可能性を提唱した。

本研究は、AKSF1 がエフェクターとして PTI を抑制することを初めて明らかにしたものであり、その研究結果は大いに評価できる。また、研究も論理的に構成されており、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。論文審査の口頭試問においてもこの分野における高い知識を有していることが確認された。さらに、英語論文としては筆頭著者で 1 報、共著者で 1 報、学会等での発表は 10 回以上行っており、プレゼンテーション能力は高いと判断できる。以上のことから、審査員は全員一致で、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。