

## 学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏 名	古川 岳人
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	イネ免疫反応を誘導する新規Pathogen-Associated Molecular Pattern（PAMP）の同定とその認識機構に関する研究
審 査 委 員	主査 教授 蔡 晃植 副査 教授 河合 靖 副査 教授 白井 剛

## 論 文 内 容 要 旨

植物は、病原菌が共通して持つPathogen-Associated Molecular Pattern（PAMP）と呼ばれる分子群を認識し、PAMP-Triggered Immunity（PTI）を誘導する。これまでに、イネは非病原性*Acidovorax avenae* N1141 菌株の鞭毛構成タンパク質フラジェリンを PAMP として認識することが明らかとなっている。しかし、N1141 菌株のフラジェリン遺伝子欠損株（ $\Delta$ fla1141）をイネに接種すると、未だ一部のPTI が誘導されることから、*A. avenae* N1141 菌株にはフラジェリン以外のPAMP が存在することが示唆された。しかし、*A. avenae* N1141 菌株に存在するフラジェリン以外のPAMP については構造だけでなく、その物性や特徴についても全く明らかになっていない。そこで、*A. avenae* N1141 菌株に存在するフラジェリン以外のPAMP を同定し、その分子の認識によるPTI 誘導機構を分子レベルで明らかにすることを目的として研究を行った。

フラジェリン以外の新たなPAMP を同定するために、フラジェリン遺伝子を欠損した  $\Delta$ fla1141 株の菌体を超音波で破碎し、破碎物を10,000 g、1 時間の遠心分離を行うことで、 $\Delta$ fla1141 菌体破碎液を得た。これをイネに処理すると活性酸素の発生やカロースの沈着、PTI 関連遺伝子の発現といったPTI 反応が認められたことから、 $\Delta$ fla1141 菌体破碎液には、フラジェリンとは異なるPAMP 活性物質が存在することが示された。さらに、このPAMP 活性はトリプシンで消化することにより失活することから、タンパク

質性の分子であることが示唆された。そこで、この菌体破碎液を陰イオン交換クロマトグラフィーと二次元電気泳動で分離し、得られたスポットに含まれているタンパク質をペプチドマスフィンガープリンティング法で推定した。推定した6種のタンパク質の中には、アブラナ科植物に対してのみPAMPとして機能することが知られていた

Elongation Factor Tu (EF-Tu) が含まれていた。そこで、*A. avenae* N1141 菌株のEF-Tu 発現タンパク質を作製してPAMP 活性を測定したところ、発現EF-Tu-a を処理したイネにおいてPTI 反応が誘導され、N1141 菌株のEF-Tu-aがイネに対するPAMPとして機能することが初めて明らかとなった。次に、イネにおけるEF-Tu 認識機構とシロイヌナズナのEF-Tu 認識機構との相同性を調べるため、シロイヌナズナEF-Tu 認識領域elf18 をイネに処理してPTI 誘導の有無を調べた。その結果、elf18 を処理したイネはPTI を誘導せず、シロイヌナズナとイネは異なるEF-Tu 認識機構を持つことが示された。そこで、イネのEF-Tu 認識領域を明らかにするために、様々な発現EF-Tu-a ペプチドを作製してイネに処理した。その結果、イネはEF-Tu-a の中央50 アミノ酸で構成されたEFa50 を認識してPTI 反応を誘導することが明らかとなった。一方、EFa50 をシロイヌナズナに処理してもPTI は誘導されないことから、イネとシロイヌナズナにおけるEF-Tu 認識機構は異なることが示された。次に、イネにおけるEF-Tu 受容機構とその情報伝達機構を明らかにするために、EF-Tu-a 101-300 を処理したイネにおいて発現変動する遺伝子をマイクロアレイによって網羅的に解析した。その結果、EF-Tu-a 認識によって発現誘導される遺伝子の多くが、フラジェリンを認識した後に発現上昇する遺伝子と共通であることが示された。このことは、イネEF-Tu 認識後の情報伝達経路はフラジェリン認識後の情報伝達経路と同じである可能性を示している。次に、イネに存在するであろうEF-Tu 受容体の同定を試みた。植物の膜結合型受容体をコードする遺伝子は、リガンド認識によって発現誘導される場合が多いことが報告されている。そこで、EF-Tu-a 101-300 処理1 時間後に4 倍以上発現量の上昇が認められた2,453 遺伝子の中で、受容体型キナーゼをコードする遺伝子を探索したところ、イネEF-Tu 受容体候補遺伝子として10 個の遺伝子を選抜した。次に、イネEF-Tu 受容体を同定するため、EF-Tu-a 101-300 認識能を持たないシロイヌナズナにおける機能相補試験を行った。それぞれのイネEF-Tu 受容体候補遺伝子をシロイヌナズナプロトプラストで発現させ、EF-Tu-a 101-300 処理によってシロイヌナズナPTI 関連遺伝子AtWRKY29 のプロモーター活性が上昇するかどうかをレポーターアッセイで調べた。その結果、二つの遺伝子を発現させたシロイヌナズナプロトプラストでEF-Tu-a101-300 に対する認識能が付与されていた。このことは、この二つの遺伝子がEF-Tu-a 101-300 の受容体をコードしている可能性を示すものである。本研究により、イネがEF-Tu をPAMP として認識することを示すと共に、イネはシ

ロイヌナズナとは異なりEF-Tu の中央領域EFa50 を認識していることを世界で初めて明らかにすることが出来た。さらに、EF-Tu 認識後の情報伝達はフラジェリン認識後の情報伝達と共通の経路であることや、イネのEF-Tu-a 101-300 の受容体をコードする可能性のある二つの遺伝子を同定することが出来た。

## 論文審査結果要旨

本論文には、*Acidovorax avenae* N1141 菌株に存在する新たな PAMP を同定し、その分子の認識による免疫反応誘導機構を明らかにすることを目的として行った研究が記載されている。フラジェリン遺伝子を欠損した  $\Delta$ fla1141 株の菌体破砕物からイネの免疫反応を指標として精製を行い、Elongation Factor Tu (EF-Tu) を同定した。そこで、*A. avenae* N1141 菌株の EF-Tu 発現タンパク質を作製したところ、イネに対して免疫反応を誘導することが明らかになり、N1141 菌株の EF-Tu-a がイネに対する PAMP として機能することを初めて明らかにした。次に、イネの EF-Tu 認識領域を明らかにするために、様々な発現 EF-Tu-a ペプチドを作製したところ、イネは EF-Tu-a の中央 50 アミノ酸で構成された EFa50 を認識して免疫反応を誘導することが明らかとなった。一方、シロイヌナズナは EFa50 を認識せず、N 末端領域の elf18 を認識することが示され、イネとシロイヌナズナにおける EF-Tu 認識機構は異なることを明らかにした。また、イネにおける EF-Tu 受容機構とその情報伝達機構を明らかにするために、EF-Tu-a 101-300 処理により発現変動する遺伝子をマイクロアレイで解析し、EF-Tu-a 認識によって発現誘導される遺伝子の多くが、フラジェリン処理により発現上昇する遺伝子と共通であることを示した。さらに、イネに存在するであろう EF-Tu 受容体をマイクロアレイとレポーターアッセイで調べ、2 つの受容体型キナーゼをイネ EF-Tu 受容体候補として同定した。

本研究は、イネがEF-Tuの50アミノ酸を認識して免疫反応を誘導することを世界で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。研究は膨大な実験量に裏打ちされた論理性が高いものであり、本論文の研究結果に異を唱える余地がないほど完成度が高い。論文審査におけるプレゼンテーションも質が高く、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、学会等での発表は国際学会での英語発表も含め、8回行っており、語学力を含めたプレゼンテーション能力は高いと判断できる。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。