学 位 論 文 題 名

「Molecular and Genetic Studies on Sugar Signaling during Shoot Development and Defense Activation Mechanism depend on Negative Regulator of Cell Death, *CADI* gene, in *Arabidopsis*」

(シロイヌナズナにおける栄養成長期の糖応答機構と細胞死を負に制御する *CADI* 遺伝子に着目した植物免疫機構に関する分子遺伝学的研究)

学位論文内容の要旨

植物は、発芽から開花結実まで移動することなく一つの場所で生息するため、動物に比べより環境への適応能力が求められる。植物の環境適応メカニズムを研究し解明することは、生命現象の解明のみならず、農学的、環境学的にも重要な課題であり、今後、植物の機能を有効利用し、人類や地球環境に役立てていくためにも必須と考えられる。本論文は、シロイヌナズナの発芽時における糖応答機構と植物の免疫機構という二つの植物の環境適応現象に着目し、それらの分子機構に関する遺伝学的解析を試みたものである。

シロイヌナズナの発芽時における糖応答の解析

シロイヌナズナの芽生えにおいて、本葉の展開を停止する休眠現象が観察されることがある。すなわち、シロイヌナズナの芽生えには、環境に応じて茎頂分裂組織の分裂活性を制御する機構の存在が想定される。植物細胞の分裂には、植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) と糖が拮抗的に作用することが知られている。本研究では、シロイヌナズナにおいて糖の内生量低下が ABA の生合成上昇を促進すると共に、茎頂分裂組織の分裂活性の低下を誘導すること明らかにし、発芽時の子葉の展開に続く形態形成過程において、糖と ABA が茎頂分裂の分裂活性制御に拮抗的に作用することを示した。

シロイヌナズナ糖高感受性変異体 *ghs1* (glucose hyper-sensitive 1) の遺伝学的・生理学的解析

糖シグナリング機構を明らかにするためシロイヌナズナの糖高感受性変異体 *ghs1* (glucose hyper-sensitive 1) の遺伝学的・生理学的解析を行った。野生株コロンビアは 7% のグルコースを含んだ培地上において本葉展開の阻害やアントシアニンの蓄積、クロロ

フィル合成の抑制などの糖応答を示す。これに対して、*ghs1* 変異体では 5%以上のグルコースを含んだ培地上でこれらの応答が観察された。原因遺伝子単離の結果、*GHS1* 遺伝子は色素体 30S リボソームタンパク質 S21 をコードした遺伝子に T-DNA が挿入されることで生じた劣性変異体であることを明らかにした。この変異体において、1) RBCL と RBCS のタンパク量の減少、2) 光合成活性の減少、3) 発芽初期における葉緑体の発達障害が観察された。これらの結果から、*GHS1* 遺伝子は色素体のタンパク質合成や光合成機能に関与することが示された。また、葉緑体機能と糖シグナリングとクロストーク機構の存在が示唆された。

植物免疫機構活性化経路の解明

免疫システムは、その様式は様々であるが、生物界に広く保存された共通の生存戦略である。一見、無抵抗の植物さえも、その例外ではなく、固有の免疫システムを進化させてきた。高等植物は、病原体の侵入に対して、様々な防御システムを発動させ、病原体の増殖を積極的に抑制する機構を備えている。しかし、病原体の侵入から、抵抗性の発動までにかかわる過程についての詳細は、未だに解明されていない部分が多い。この分野の進展を目的とし、本研究を遂行した。

植物の病原体に対する抵抗性は、病斑形成という過敏感細胞死を伴うことが多い。この細胞死は、病原体の侵入をそれ以上広げないといった役割があり、戦略的な細胞死と考えられている。シロイヌナズナの T-DNA 挿入変異体ライブラリーのスクリーニングにより恒常的に過敏感細胞死が引き起こされる劣性の *cad1* (*constitutively activated cell-death 1*) 変異体を単離した。病原体が感染した際に発現誘導される PR 遺伝子の発現が恒常的に観察されたことから、この変異体の形質は、植物免疫機構の過剰な活性化の結果と推測された。植物の抵抗性は、病原体の認識と共に植物ホルモンであるサリチル酸 (SA) の上昇が必要であることがこれまでの研究で明らかにされている。遺伝学的な解析から、*cad1* 変異体の原因遺伝子 *CAD1* は、既存の SA シグナル伝達機構を介さない植物免疫機構経路の活性抑制に機能することが示された。

CAD1 遺伝子は、新規のタンパク質をコードし、動物の免疫機構に関わる補体やパーフォリンタンパク質で保存される MACPF ドメインを有することが明らかになった。一般に、これら MACPF を有する遺伝子群は、進化過程で共通のプロトタイプからパラログ成分を増やすと同時に新たな機能を獲得してきたと考えられている。*cad1* 変異体の解析から、シロイヌナズナにおける新たな植物免疫機構ならびに細胞死活性化抑制機構が解明された。さらに、MACPF ドメインを持つ遺伝子が、高等植物であるシロイヌナズナにおいても免疫機構の制御に関与することを示し、生物界における自然免疫の進化・獲得機構における研究に貢献した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 口 淳 二
副 査 教 授 山 本 與 太 朗
副 査 助 教 授 池 田 亮
副 査 教 授 田 中 歩 (低温科学研究所)

学位論文題名

「Molecular and Genetic Studies on Sugar Signaling during Shoot Development and Defense Activation Mechanism depend on Negative Regulator of Cell Death, *CAD1* gene, in *Arabidopsis*」

(シロイヌナズナにおける栄養成長期の糖応答機構と細胞死を負に制御する *CAD1* 遺伝子に着目した植物免疫機構に関する分子遺伝学的研究)

植物は、発芽から開花結実まで移動することなく一つの場所で生息するため、動物に比べより環境への適応能力が求められる。植物の環境適応メカニズムを研究し解明することは、生命現象の解明のみならず、農学的、環境学的にも重要な課題であり、今後、植物の機能を有効利用し、人類や地球環境に役立てていくためにも必須と考えられる。本論文は、シロイヌナズナの発芽時における糖応答機構と病原体が侵入した際に引き起こされる植物の免疫機構という二つの植物の環境適応現象に着目し、それらの分子機構に関する遺伝学的解析を試みたものである。

シロイヌナズナの発芽時における糖応答の解析

シロイヌナズナの芽生えにおいて、本葉の展開を停止する休眠現象が観察されることがある。すなわち、シロイヌナズナの芽生えには、環境に応じて茎頂分裂組織(SAM)の分裂活性を制御する機構の存在が想定される。植物細胞の分裂には、植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) と糖が拮抗的に作用することが知られている。本研究では、シロイヌナズナにおいて糖の内生量低下が ABA の生合成上昇を促進すると共に、SAM の分裂活性の低下を誘導すること明らかにし、発芽時の子葉の展開に続く形態形成過程において、糖と ABA が SAM の分裂活性制御に拮抗的に作用することを示した。

シロイヌナズナ糖高感受性変異体 *ghs1* (glucose hyper-sensitive 1) の遺伝学的・生理学的解析

糖シグナリング機構を明らかにするためシロイヌナズナの糖高感受性変異体 *ghs1*

(glucose hyper-sensitive 1)の遺伝学的・生理学的解析を行った。野生株コロンビアは7%のグルコースを含んだ培地上において本葉展開の阻害やアントシアニンの蓄積、クロロフィル合成の抑制などの糖応答を示す。これに対して、*ghs1*変異体では5%以上のグルコースを含んだ培地上でこれらの応答が観察された。原因遺伝子単離の結果、*GHS1*遺伝子は色素体30Sリボソームタンパク質S21をコードした遺伝子にT-DNAが挿入されることで生じた劣性変異体であることを明らかにした。この変異体において、1) RBCLとRBCSのタンパク量の減少、2) 光合成活性の減少、3) 発芽初期における葉緑体の発達障害が観察された。これらの結果から、*GHS1*遺伝子は色素体のタンパク質合成や光合成機能に関与することが示された。また、葉緑体機能と糖シグナリングとクロストーク機構の存在が示唆された。

植物免疫機構活性化経路の解明

免疫システムは、その様式は様々であるが、生物界に広く保存された共通の生存戦略である。一見、無抵抗の植物さえも、その例外ではなく、固有の免疫システムを進化させてきた。高等植物は、病原体の侵入に対して、様々な防御システムを発動させ、病原体の増殖を積極的に抑制する機構を備えている。しかし、病原体の侵入から、抵抗性の発動までにかかわる過程についての詳細は、未だに解明されていない部分が多い。この分野の進展を目的とし、本研究を遂行した。

植物の病原体に対する抵抗性は、病斑形成という過敏感細胞死を伴うことが多い。この細胞死は、病原体の侵入をそれ以上広げないといった役割があり、戦略的な細胞死と考えられている。シロイヌナズナのT-DNA挿入変異体ライブラリーのスクリーニングにより恒常的に過敏感細胞死が引き起こされる劣性の*cad1*(*constitutively activated cell-death 1*)変異体を単離した。病原体が感染した際に発現誘導されるPR遺伝子の発現が恒常的に観察されたことから、この変異体の形質は、植物免疫機構の過剰な活性化の結果と推測された。植物の抵抗性は、病原体の認識と共に植物ホルモンであるサリチル酸(SA)の上昇が必要であることがこれまでの研究で明らかにされている。遺伝学的な解析から、*cad1*変異体の原因遺伝子*CAD1*は、既存のSAシグナル伝達機構を介さない植物免疫機構経路の活性抑制に機能することが示された。

*CAD1*遺伝子は、新規のタンパク質をコードし、動物の免疫機構に関わる補体やパーフォリンタンパク質で保存されるMACPFドメインを有することが明らかになった。一般に、これらMACPFを有する遺伝子群は、進化過程で共通のプロトタイプからパラログ成分を増やすと同時に新たな機能を獲得してきたと考えられている。*cad1*変異体の解析から、シロイヌナズナにおける新たな植物免疫機構ならびに細胞死活性化抑制機構が解明された。さらに、MACPFドメインを持つ遺伝子が、高等植物であるシロイヌナズナにおいても免疫機構の制御に関与することを示し、生物界における自然免疫の進化・獲得機構における研究に貢献した。

これらの研究業績により、著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認める。