

学 位 論 文 題 名

Functional Studies on Arabidopsis CAD1 in Plant Immunity

(植物免疫を制御するシロイヌナズナ CAD1の機能解析)

学位論文内容の要旨

植物は、生涯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、環境科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。本研究は、シロイヌナズナにおいて病原体が侵入した際に引き起こされる免疫過程という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分子遺伝学的解析を試みたものである。

シロイヌナズナ恒常的細胞死活性化変異体 (*cad1*) の解析

植物が病原体に対して抵抗性を示す機構、すなわち植物が病原体から自己を守るしくみは、現在「植物免疫」と総称されている。植物は、動物のような免疫に特化した可動細胞をもたない。そのため、植物では個々の細胞が病原体の認識から防御反応の誘導や隣接細胞への警告シグナルの伝達までも行ない、またときには、プログラム細胞死を誘発し、病原体の全身感染を妨げる。このようなプログラム細胞死や植物免疫を制御する分子実体を解明するため、私は、病原体感染時に観察されるような細胞死形質を示す変異体 *cad1* (*constitutively activated cell death 1*) を単離した。*cad1* 変異体は、細胞死形質に加えて、病原体感染時に特異的に発現する *PR* 遺伝子群の恒常的な発現誘導が観察され、植物免疫の活性化に必要であるサリチル酸が顕著に蓄積していた。また、この変異体は、シロイヌナズナ病原性細菌であるトマト斑葉細菌病菌に対する抵抗性を獲得し、クローバー黄化葉脈ウイルスの長距離移行を抑制した。これらの知見より、*cad1* 変異体では恒常的に植物免疫機構が活性化していると結論した。原因遺伝子同定の結果、*CAD1* 遺伝子は *MACPF* (*Membrane Attack Complex and Perforin*) ドメインをもつ新規タンパク質をコードしていた。さらに、恒常的にサリチル酸を分解する遺伝子を導入した形質転換体と *cad1* 変異体との二重変異体は、*cad1* 変異体で観察された細胞死形質が抑制されることが示された。このような結果から、*CAD1* は、プログラム細胞死やサリチル酸合成、すなわち植物免疫過程を負に制御する新規因子と結論づけた。

植物免疫活性化時における *CAD1* 遺伝子の発現制御機構

CAD1 遺伝子の上流域には、植物免疫応答に関与するシス因子 W-box が存在する。本研究では、サリチル酸とエリシター応答に着目し、植物免疫活性化時における *CAD1* 遺伝子発現制御に関する解析を試みた。

CAD1 遺伝子は、サリチル酸の添加によって発現が促進された。また、CAD1 遺伝子は、サリチル酸と同様に、精製エリシターであるキチンオリゴ糖の添加によっても発現促進が示された。しかしながら、この発現促進はサリチル酸の内生量が低下した 35S*nahG* 形質転換体やサリチル酸のシグナル伝達活性が低下した *npr1* 変異体においても観察された。すなわち、エリシターによる CAD1 遺伝子の発現誘導は、サリチル酸シグナルとは異なる制御経路によることを明らかにした。これらの結果より、CAD1 遺伝子の発現は、サリチル酸依存経路だけでなくサリチル酸非依存経路によっても制御されていると結論した。

CAD1 が関与する植物免疫ネットワークに関する分子遺伝学的解析

cad1 変異体は、恒常的な細胞死形質やサリチル酸の顕著な蓄積が観察される。そこで、CAD1 とサリチル酸合成系の制御シグナル伝達経路との関係に着目し、分子遺伝学的解析を試みた。サリチル酸合成を正に制御するタンパク質が欠損した *pad4* 変異体およびサリチル酸合成酵素が欠損した *sid2* 変異体について *cad1* 変異体との二重変異体をそれぞれ作製した。その結果、両二重変異体では *cad1* 変異体の細胞死形質は完全に抑制されなかった。また、これら二重変異体における病原性細菌に対する抵抗性を検討した結果、*cad1* 単独の変異体と同様の抵抗性を維持していた。従って、CAD1 は、サリチル酸生合成の抑制に関与するだけでなく、これ以外にも植物免疫に対する正の因子を抑制していることが示唆された。

そこで、*sid2 cad1* 二重変異体に変異原処理を施し、*cad1* 形質から野生型への復帰変異体の単離を行った。その結果、細胞死形質が抑制され、病原性細菌に対する抵抗性が野生型よりも低下した変異体、*can1 (sid2 cad1 double mutant non-resistance 1)* を単離した。CAN1 は CAD1 制御下の新たな植物免疫機構の正の制御因子であると結論した。

植物免疫を負に制御するシロイヌナズナ転写因子 DEAR1 の解析

FOX Hunting System を用いてシロイヌナズナの gain-of-function 型細胞死形質変異体を単離した。本過剰発現体 (*OxDEAR1*) は、ロゼット葉に病斑様の細胞死が恒常的に引き起こされ、セネッセンスが促進される特徴を持つ。*OxDEAR1* の導入遺伝子 *DEAR1* (DREB and EAR motif protein) は、DREB ドメインと EAR ドメインを持つ転写抑制因子をコードしており、これが過剰発現していることを確認した。

DEAR1 の遺伝子発現は病原体感染シグナルによって誘導された。*OxDEAR1* では、1) 病原体抵抗性遺伝子の発現上昇、2) サリチル酸の内生量の増大が観察された。これらの結果より *OxDEAR1* が示す細胞死は、病原体に対する抵抗性獲得を目的とした戦略的細胞死であると結論した。*DEAR1* の遺伝子発現は低温処理によっても誘導された。*OxDEAR1* では、1) *DREB1A* および *rd29A* などの低温誘導性遺伝子の多くが抑制され、2) 耐凍性が低下していることが観察された。これらの結果から DEAR1 は低温応答のホメオスタシスを保つ役割も担っていると考えられた。以上の結果から、DEAR1 は病原体応答と低温応答の両方に関与することが明らかとなった。すなわち、DEAR1 は生物的ストレスおよび非生物的ストレスに関するシグナル伝達経路のクロストークの鍵となる抑制型転写制御分子と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 口 淳 二

副 査 教 授 山 本 興太朗

副 査 助教授 池 内 亮

副 査 教 授 上 田 一 郎 (農学研究院)

学 位 論 文 題 名

Functional Studies on Arabidopsis CAD1 in Plant Immunity

(植物免疫を制御するシロイヌナズナ CAD1の機能解析)

植物は、生涯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、環境科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。本研究は、シロイヌナズナにおいて病原体が侵入した際に引き起こされる免疫過程という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分子遺伝学的解析を試みたものである。

シロイヌナズナ恒常的細胞死活性化変異体 (*cad1*) の解析

植物が病原体に対して抵抗性を示す機構、すなわち植物が病原体から自己を守るしくみは、現在「植物免疫」と総称されている。植物は、動物のような免疫に特化した可動細胞をもたない。そのため、植物では個々の細胞が病原体の認識から防御反応の誘導や隣接細胞への警告シグナルの伝達までも行ない、またときには、プログラム細胞死を誘発し、病原体の全身感染を妨げる。このようなプログラム細胞死や植物免疫を制御する分子実体を解明するため、私は、病原体感染時に観察されるような細胞死形質を示す変異体 *cad1* (*constitutively activated cell death 1*) を単離した。*cad1* 変異体は、細胞死形質に加えて、病原体感染時に特異的に発現する *PR* 遺伝子群の恒常的な発現誘導が観察され、植物免疫の活性化に必要であるサリチル酸が顕著に蓄積していた。また、この変異体は、シロイヌナズナ病原性細菌であるトマト斑葉細菌病菌に対する抵抗性を獲得し、クローバー黄化葉脈ウイルスの長距離移行を抑制した。これらの知見より、*cad1* 変異体では恒常的に植物免疫機構が活性化していると結論した。原因遺伝子同定の結果、*CAD1* 遺伝子は MACPF (Membrane Attack Complex and Perforin) ドメインをもつ新規タンパク質をコードしていた。さらに、恒常的にサリチル酸を分解する遺伝子を導入した形質転換体と *cad1* 変異体との二重変異体は、*cad1* 変異体で観察された細胞死形質が抑制されることが示された。このような結果から、*CAD1* は、プログラム細胞死やサリチル酸合成、すなわち植物免疫過程を負に制御する新規因子と結論づけた。

植物免疫活性化時における *CAD1* 遺伝子の発現制御機構

CAD1 遺伝子上流域には、植物免疫応答に関与するシス因子 W-box が存在する。本研究では、サリチル酸とエリシター応答に着目し、植物免疫活性化時における CAD1 遺伝子発現制御に関する解析を試みた。

CAD1 遺伝子は、サリチル酸の添加によって発現が促進された。また、CAD1 遺伝子は、サリチル酸と同様に、精製エリシターであるキチンオリゴ糖の添加によっても発現促進が示された。しかしながら、この発現促進はサリチル酸の内生量が低下した 35SnahG 形質転換体やサリチル酸のシグナル伝達活性が低下した *npr1* 変異体においても観察された。すなわち、エリシターによる CAD1 遺伝子の発現誘導は、サリチル酸シグナルとは異なる制御経路によることを明らかにした。これらの結果より、CAD1 遺伝子の発現は、サリチル酸依存経路だけでなくサリチル酸非依存経路によっても制御されていると結論した。

CAD1 が関与する植物免疫ネットワークに関する分子遺伝学的解析

cad1 変異体は、恒常的な細胞死形質やサリチル酸の顕著な蓄積が観察される。そこで、CAD1 とサリチル酸合成系の制御シグナル伝達経路との関係に着目し、分子遺伝学的解析を試みた。サリチル酸合成を正に制御するタンパク質が欠損した *pad4* 変異体およびサリチル酸合成酵素が欠損した *sid2* 変異体について *cad1* 変異体との二重変異体をそれぞれ作製した。その結果、両二重変異体では *cad1* 変異体の細胞死形質は完全に抑制されなかった。また、これら二重変異体における病原性細菌に対する抵抗性を検討した結果、*cad1* 単独の変異体と同様の抵抗性を維持していた。従って、CAD1 は、サリチル酸生合成の抑制に関与するだけでなく、これ以外にも植物免疫に対する正の因子を抑制していることが示唆された。

そこで、*sid2 cad1* 二重変異体に変異原処理を施し、*cad1* 形質から野生型への復帰変異体の単離を行った。その結果、細胞死形質が抑制され、病原性細菌に対する抵抗性が野生型よりも低下した変異体、*can1* (*sid2 cad1 double mutant non-resistance 1*) を単離した。CAN1 は CAD1 制御下の新たな植物免疫機構の正の制御因子であると結論した。

植物免疫を負に制御するシロイヌナズナ転写因子 DEAR1 の解析

FOX Hunting System を用いてシロイヌナズナの gain-of-function 型細胞死形質変異体を単離した。本過剰発現体 (*OxDEAR1*) は、ロゼット葉に病斑様の細胞死が恒常的に引き起こされ、セネッセンスが促進される特徴を持つ。*OxDEAR1* の導入遺伝子 *DEAR1* (DREB and EAR motif protein) は、DREB ドメインと EAR ドメインを持つ転写抑制因子をコードしており、これが過剰発現していることを確認した。

DEAR1 の遺伝子発現は病原体感染シグナルによって誘導された。*OxDEAR1* では、1) 病原体抵抗性遺伝子の発現上昇、2) サリチル酸の内生量の増大が観察された。これらの結果より *OxDEAR1* が示す細胞死は、病原体に対する抵抗性獲得を目的とした戦略的細胞死であると結論した。*DEAR1* の遺伝子発現は低温処理によっても誘導された。*OxDEAR1* では、1) *DREB1A* および *rd29A* などの低温誘導性遺伝子の多くが抑制され、2) 耐凍性が低下していることが観察された。これらの結果から *DEAR1* は低温応答のホメオスタシスを保つ役割も担っていると考えられた。以上の結果から、*DEAR1* は病原体応答と低温応答の両方に関与することが明らかとなった。すなわち、*DEAR1* は生物学的ストレスおよび非生物学的ストレスに関するシグナル伝達経路のクロストークの鍵となる抑制型転写制御分子と考えられる。

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。