

学 位 論 文 題 名

Studies on relationship between carbon/nitrogen
response and defense response in Arabidopsis
(シロイヌナズナを用いた炭素/窒素応答と防御応答の関係に関する研究)

学位論文内容の要旨

生物にとって、栄養の獲得は自らの生育のためのみならず、病害への抵抗性獲得にも重要である。植物の二大栄養素である糖（C：炭素源）と窒素（N）はクロストークしており、両者の比（C/N）を生育段階や生育環境に応じて制御することで、生育の最適化がなされている。興味深いことに、一般的に病害に対して C の増強は抵抗性増加に、N の増強は抵抗性減少にはたらくことが報告されており、C/N は病害抵抗性をも制御していることが示唆されているが、その詳細は殆ど未知である。そこで私は、C/N 応答制御因子として解析がなされている *ATL31* 遺伝子を用いて C/N 応答と病害抵抗性の関係について明らかにすべく以下の研究を行った。

1. C/N 応答制御因子 *ATL31* 及び *ATL6* の病害抵抗性への関与

ATL31 の過剰発現体は極度の C/N ストレス条件にも耐性を示し、また *atl31* 変異体ではその逆に C/N ストレスに過剰応答する。*ATL31* が属している *ATL* ファミリーは、シロイヌナズナで 80 種あり、全てに共通して膜貫通領域及びユビキチンリガーゼ活性に重要な RING ドメインをもっている。実際に *ATL31* が主に細胞膜に局在し、ユビキチン化活性を持つことが分かっている (Sato et al. 2009 Plant J)。

ATL ファミリーの多くは、栄養応答ではなく、病害抵抗性に関わる因子として多数報告されている。このことから *ATL31* 及び *ATL6* に最も相同性の高い *ATL6* について、病害抵抗性への関与を以下の実験により検証した。まず病原体の鞭毛由来のペプチド (*flg22*) を植物に処理すると、*ATL31/6* の遺伝子発現が大きく上昇した。次に、*ATL31* の過剰発現体は野生型に比べ、*flg22* を処理した後の防御反応が亢進していること、また、それと逆に *atl31 atl6* では防御反応が抑えられていることが分かった。そして、これらを支持するように、*ATL31/6* 両過剰発現体は、病原菌である *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 への抵抗性が増

大しており、逆に *atl31 atl6* では抵抗性が減少していた。加えて、防御応答に関わる遺伝子の発現量が、植物の生育 C/N 条件に応じて変動することが分かった。以上のことから、ATL31/6 が C/N 応答だけでなく防御応答をも制御していることが明らかになった。それと共に、ATL31/6 は、病原体感染に応答して細胞内 C/N を制御することによって、防御応答にも寄与していることが示唆された。

2. ATL31 の SYP121 を介したうどんこ病菌抵抗性への関与

次に、ATL31 の新規相互作用因子の探索を行った。ユビキチンリガーゼ活性を失わせた ATL31 に、FLAG タグを融合させ、過剰発現させた培養細胞を材料にして、架橋処理を施した後に抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、共沈降してきたタンパク質を MS 解析により同定した。その結果得られた相互作用タンパク質候補群の中から、SNARE の一つである SYP121 について、ATL31 との相互作用が確認できた。SYP121 は、うどんこ病菌への応答に重要な機能を果たしている。植物はうどんこ病菌が侵入しようとする部位にパピラと呼ばれる物理的障壁を作ることによってその侵入を阻止しようとするが、SYP121 はそのパピラ形成部位に集合し、パピラ構成成分を運ぶ輸送小胞を特異的に受け止めるはたらきをしている。ATL31 はこの SYP121 と相互作用していることから、このパピラ形成及びうどんこ病菌抵抗性への ATL31 の関与について解析を進めた。その結果、ATL31 はうどんこ病菌侵入部位に特異的に集合すること、及び *ATL31* 過剰発現体ではパピラ形成の速度が増加しており、その結果うどんこ病菌の侵入率が減少していることを証明した。さらに、*SYP121* 変異体は C/N ストレスに過剰応答することも明らかにした。また、SYP121 は ATL31 のユビキチン化の標的ではなかった。これらの結果より、ATL31 と SYP121 の両者はうどんこ病菌の侵入に応答したパピラ形成及び、C/N 応答のどちらにも重要な機能を果たしていることが示された。

上記の研究を通して、私は、C/N 応答制御因子が病害抵抗性にも機能することを初めて明らかにした。さらに ATL31 がパピラ形成に関与していたことは、C/N 応答制御と病害抵抗性をつなぐ新たな分子メカニズムの存在を示唆している。これを基に、C/N 応答制御がどのように病害抵抗性に関与しているかについて、全容解明が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山口	淳二
副査	教授	山本	興太郎
副査	教授	加藤	敦之
副査	助教	佐藤	長緒

学位論文題名

Studies on relationship between carbon/nitrogen response and defense response in Arabidopsis

(シロイヌナズナを用いた炭素/窒素応答と防御応答の関係に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

生物にとって、栄養の獲得は自らの生育のためのみならず、病害への抵抗性獲得にも重要である。植物の二大栄養素である糖 (C:炭素源) と窒素 (N) はクロストークしており、両者の比 (C/N) を生育段階や生育環境に応じて制御することで、生育の最適化がなされている。興味深いことに、一般的に病害に対して C の増強は抵抗性増加に、N の増強は抵抗性減少にはたらくことが報告されており、C/N は病害抵抗性をも制御していることが示唆されているが、その詳細は殆ど未知である。そこで私は、C/N 応答制御因子として解析がなされている *ATL31* 遺伝子を用いて C/N 応答と病害抵抗性の関係について明らかにすべく以下の研究を行った。

1. C/N 応答制御因子 *ATL31* 及び *ATL6* の病害抵抗性への関与

ATL31 の過剰発現体は極度の C/N ストレス条件にも耐性を示し、また *atl31* 変異体ではその逆に C/N ストレスに過剰応答する。*ATL31* が属している *ATL* ファミリーは、シロイヌナズナで 80 種あり、全てに共通して膜貫通領域及びユビキチンリガーゼ活性に重要な RING ドメインをもっている。実際に *ATL31* が主に細胞膜に局在し、ユビキチン化活性を持つことが分かっている (Sato et al. 2009 Plant J)。

ATL ファミリーの多くは、栄養応答ではなく、病害抵抗性に関わる因子として多数報告されている。このことから *ATL31* 及び *ATL6* に最も相同性の高い *ATL6* について、病害抵抗性への関与を以下の実験により検証した。まず病原体の鞭毛由来のペプチド (flg22) を植物に処理すると、*ATL31/6* の遺伝子発現が大きく上昇した。次に、*ATL31* の過剰発現体は野生型に比べ、flg22 を処理した後の防御反応が亢進していること、また、それと逆に *atl31 atl6* では防御反応が抑えられていることが分かった。そして、これらを支持するように、*ATL31/6* 両過剰発現体は、病原菌である *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 への抵抗性が増大しており、逆に *atl31 atl6* では抵抗性が減少していた。加えて、防御応答に関わる遺伝子の発現量が、植物の生育 C/N 条件に応じて変動することが分かった。以上のことから、*ATL31/6* が C/N 応答だけでなく防御応答をも制御していることが明らかになった。それと共に、*ATL31/6* は、病原体感染に応答して細胞内 C/N を制御することによって、防御応答にも寄与していることが示唆された。

2. *ATL31* の SYP121 を介したうどんこ病菌抵抗性への関与

次に、*ATL31* の新規相互作用因子の探索を行った。ユビキチンリガーゼ活性を失わせた

ATL31 に、FLAG タグを融合させ、過剰発現させた培養細胞を材料にして、架橋処理を施した後に抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、共沈降してきたタンパク質を MS 解析により同定した。その結果得られた相互作用タンパク質候補群の中から、SNARE の一つである SYP121 について、ATL31 との相互作用が確認できた。SYP121 は、うどんこ病菌への応答に重要な機能を果たしている。植物はうどんこ病菌が侵入しようとする部位にパピラと呼ばれる物理的障壁を作ることでその侵入を阻止しようとするが、SYP121 はそのパピラ形成部位に集合し、パピラ構成成分を運ぶ輸送小胞を特異的に受け止めるはたらきをしている。ATL31 はこの SYP121 と相互作用していることから、このパピラ形成及びうどんこ病菌抵抗性への ATL31 の関与について解析を進めた。その結果、ATL31 はうどんこ病菌侵入部位に特異的に集合すること、及び *ATL31* 過剰発現体ではパピラ形成の速度が増加しており、その結果うどんこ病菌の侵入率が減少していることを証明した。さらに、*SYP121* 変異体は C/N ストレスに過剰応答することも明らかにした。また、SYP121 は ATL31 のユビキチン化の標的ではなかった。これらの結果より、ATL31 と SYP121 の両者はうどんこ病菌の侵入に応答したパピラ形成及び、C/N 応答のどちらにも重要な機能を果たしていることが示された。

上記の研究を通して、私は、C/N 応答制御因子が病害抵抗性にも機能することを初めて明らかにした。さらに ATL31 がパピラ形成に関与していたことは、C/N 応答制御と病害抵抗性をつなぐ新たな分子メカニズムの存在を示唆している。これを基に、C/N 応答制御がどのように病害抵抗性に関与しているかについて、全容解明が期待される。

これを要するに、著者は、植物ユビキチンリガーゼ ATL31 の病害抵抗性に関する新規機能を明らかとした。これは、植物ユビキチンリガーゼの機能性に関する新知見を得たものであり、今後の細胞生物学ならびに植物科学研究に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。