

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Meenu Gupta
審査委員	主査 木場 章範 副査 曳地 康史 副査 山岡 直人 副査 大西 浩平 副査 田淵 光昭

論文名

Studies on regulatory mechanisms of hypersensitive responses in *Nicotiana benthamiana*.
(*Nicotiana benthamiana* における過敏感反応の制御機構に関する研究)

審査結果の要旨

植物は微生物の攻撃から身を守るための免疫機構を備えている。植物免疫の代表的なものとして過敏感反応がある。過敏感反応は植物のプログラム自己細胞死を伴う防御応答で、世界的に研究が進められてきている。過敏感反応に関する研究は細胞内情報伝達に着目した研究が主流で、活性酸素や一酸化窒素、MAP kinase 経路などが必須であることが解明されつつある。しかしながら、過敏感反応に関するメカニズムの全貌は明らかでないのが現状である。

本研究では、ウイルス誘導ジーンサイレンシング法を利用し、過敏感反応の誘導・抑制機構に関わる植物因子について分子生物学的に解析を行った。その結果、過敏感反応を制御する2種の新規の遺伝子を見出した。

1. NbTCTP (*Nicotiana benthamiana* Translationally Controlled Tumor Protein) は植物の防御応答である過敏感反応を抑制する因子として見出した。ウイルス誘導ジーンサイレンシングによって NbTCTP を抑制した *Nicotiana benthamiana* 植物では、非親和性の青枯病菌 (Rs8107) 接種によって誘導される、過敏感反応の誘導が促進されることを見出した。その際、過敏感反応の指標遺伝子である *hin1* の発現誘導の促進とともに、Rs8107 の著しい増殖抑制が認められた。過敏感反応の誘導促進は Rs8107 の接種のみならず、非親和性の *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*、および *P. cichorii* の接種によっても確認された。さらに、NbTCTP を抑制した植物では、アグロバクテリウムを介した青枯病菌由来のエフェクタータンパク質 AvrA、ジャガイモ疫病由来の INF1 エリシチンの発現、あるいはタバコマイルドグリーンモザイクウイルスの外皮タンパク質とピーマン由来の L1 抵抗性遺伝子の共発現によって誘導される過敏感反応の促進も確認された。NbTCTP を抑制した植物では、Rs8107 接種により活性酸素の過剰生成が生じた。そこで、活性酸素生成の主要な酵素である *NbrbohB* と NbTCTP 遺伝子の二重サイレンシング植物を作製した。NbTCTP・*NbrbohB* の二重サイレンシング植物では、NbTCTP 抑制植物で認められた Rs8107 の接種による活性酸素の過剰生成のみならず、過敏感反応の誘導促進が阻害されることがわかった。そこで、植物免疫応答時に重要な役割を持ち、活性酸素生成の制御にもかかわることが知られている MAP キナーゼ経路に着目した。アグロバクテリウムを介した MAP キナーゼ・キナーゼの恒常活性型である NbMEK2^{DD} の発現によって誘導される過敏感反応は、NbTCTP を抑制した植物では顕著に促進されることが確認された。そこで、NbTCTP と NbMEK2 遺伝子の二重サイレンシング植物を作製した。NbTCTP

・*NbMEK2* の二重サイレンシング植物では、Rs8107 の接種による活性酸素の過剰生成とともに過敏反応の誘導促進が阻害されることがわかった。次に *NbTCTP* による過敏反応抑制機構について着目した。アグロバクテリウムを介して全長 *NbTCTP*、*MCL/Bcl-xL* 領域を発現させる系を構築した。全長 *NbTCTP* のみならず *MCL/Bcl-xL* 領域を発現した植物において、*INF1* で誘導される過敏反応の抑制が確認された。以上の結果から、*NbTCTP* は過敏反応の負の制御因子であり、活性酸素や MAP キナーゼ等の情報伝達経路を制御することにより種々の病原体による過敏反応誘導を抑制していることがわかった。さらに、*NbTCTP* の有する *MCL/Bcl-xL* 領域が過敏反応の抑制に重要であることを明らかにした。

2. *NbARP* (*Nicotiana benthamiana* asparagine-rich protein) は過敏反応を促進する因子として見出した。ウイルス誘導ジーンサイレンシングによって *NbARP* を抑制した *N. benthamiana* 植物では、Rs8107 接種によって誘導される過敏反応の誘導が抑制されることを見出した。その際、過敏反応の指標遺伝子である *hin1* 発現の遅延、活性酸素生成の抑制と MAP キナーゼ活性の抑制が認められた。過敏反応の抑制は Rs8107 の接種のみならず、非親和性の *P. syringae* pv. *syringae*、および *P. cichorii* の接種によっても認められた。さらに、*NbARP* を抑制した植物では、アグロバクテリウムを介した青枯病菌由来のエフェクタータンパク質 PopP1、ジャガイモ疫病由来の *INF1* エリシチンの発現、あるいはタバコマイルドグリーンモザイクウイルスの外皮タンパク質とピーマン由来の L1 抵抗性遺伝子の共発現によって誘導される過敏反応の抑制も確認された。さらに、*NbARP* を過剰に発現する形質転換タバコでは Rs8107 の著しい増殖抑制が認められた。以上の結果から、*NbARP* は過敏反応の正の制御因子であり、活性酸素や MAP キナーゼ等の情報伝達経路を制御することにより、種々の病原体による過敏反応誘導を促進していることがわかった。

以上の結果から、今まで未知の部分が多かった過敏反応の制御に関わる新たな因子を見出した。本成果は、植物免疫の分子メカニズムの解明や植物病の防除に大きく寄与するものと期待される。

学位論文の公開審査会は平成25年8月3日に高知大学農学部で開催され、論文発表と質疑応答が行われた。続いて開催された学位論文審査会において慎重に審査を行った結果、審査委員全員一致して博士(農学)の学位を授与するに値するものと判定した。