

## 学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 柏原 啓太  
Name

学位論文題目： イネ病害抵抗性に重要なジャスモン酸シグナルを制御する複合体に関する研究  
Title of Dissertation

### 学位論文要約： Dissertation Summary

単子葉植物であるイネはトウモロコシ、コムギ、ダイズとともに世界の主要作物の一つであり、アジアを中心に世界の過半数以上の人々の主食とされている。特に東南アジアにおいては人々の摂取カロリーの約80%をイネが占めるともいわれている。世界の人口は増加を続けており、特にアジア圏における人口増加はさらに拡大していくことが予想されるため、イネの生産量の増収や安定化が必要となっている。イネの病害抵抗性研究は世界中で精力的に進められており、これまでに様々な優れた抵抗性品種が作出されている。その際にはgene for gene 説に基づいた真性抵抗性遺伝子が用いられてきた。しかしながら農業技術が進む現在においても毎年予想収穫量の約30%が病害によって失われている。このことから、近年では真性抵抗性だけでなく、より広く安定性のある圃場抵抗性遺伝子を組み合わせた品種開発が重要となってきている。

イネの病原細菌病であるイネ白葉枯病はアジアを中心とした世界の稲作地域で発生が確認されており、罹病したイネでは本病害が生産する増粘多糖類キサンタンガムによって道管が詰まり萎凋症状を引き起こし、枯死することが知られている。イネ白葉枯病は数ある細菌病の中でも経済的社会的な重要度が極めて高く、イネの細菌病の中では最も重要であると報告されている。これまで、真性抵抗性遺伝子を用いたイネ白葉枯病抵抗性品種の作出が行われているが、完全な防除には至っておらず、近年では真性抵抗性遺伝子だけでなく圃場抵抗性関連遺伝子の利用が重要であると考えられてきている。

植物ホルモンの一つであるジャスモン酸(JA)は植物の生長発達などの生理作用に関与することが明らかとなっている他、草食動物から摂食を受けた際の傷害応答を制御することや病害抵抗性に関与することが明らかとなっている。当研究室の先行研究によりJAを処理したイネではイネ白葉枯病による病斑長が短くなることが明らかとなっており、JAによって抵抗性が誘導されることが明らかとなっている(図. 1)。JAによって誘導されるシグナル伝達機構については当研究室の研究により明らかとなりつつあり、JAシグナルがOFFの通常時にはシグナルの負の制御因子であるOsJAZ8が正の転写因子であるOsMYC2の活性を抑制しており、シグナルがONになるとOsJAZ8が分解されることでOsMYC2が活性状態となりOsMYC2応答性防御関連遺伝子の発現誘導を介したイネ白葉枯病抵抗性がおきることが明らかとなっている。しかしながら、それら以外にどのような因子がJAシグナルの制御に関与しているのかについてはほとんど明らかとされていない。そこで、新たなJAシグナル制御因子の機能解明のためOsJAZ8と相互作用するタンパク質のうち、シロイヌナズナNovel

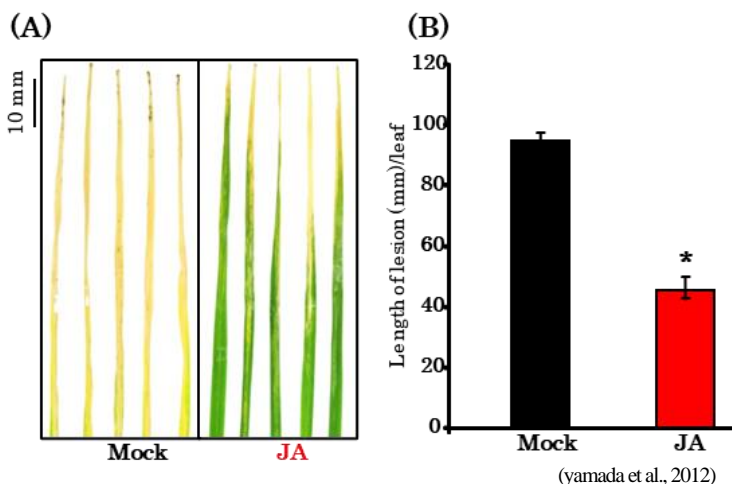


図.1 JA によって誘導されるイネ白葉枯病抵抗性

第5葉完全展開期まで生育させたイネ(左:無処理 右:100 $\mu$ M JA24時間処理)の第5葉の先端0.5cmを切り、イネ白葉枯病菌を接種し、接種後14日目におけるイネの写真(A)と病斑長(B)。(n=12)\* $p$ <0.05(student' t-test)

Interactor of Jaz (NINJA) のイネのホモログを単離しOsNINJA1と命名し、JA誘導性イネ白葉枯病抵抗機構における機能の解明を進めた。

これまでの研究によってイネのJAシグナルは早期応答期(JA処理後0時間~12時間)と後期応答期(JA処理後24時間以降)に分けられることが明らかとなっている。そこでJA処理後におけるOsNINJA1の経時的な発現挙動解析を行ったところ、OsNINJA1はJA処理後8時間の早期において発現のピークをむかえることが明らかとなった。JAシグナルOsNINJA1はイネに15個存在するJAZタンパク質のうち、OsJAZ14、OsJAZ15を除くすべてのJAZと相互作用とCドメインを介して示した。また、OsNINJA1とOsJAZ8との相互作用は植物細胞内においても認められ、シロイヌナズナNINJAと相互作用することが明らかとなっているOsTPR1とも相互作用することが明らかとなった。さらにOsNINJA1過剰発現体ではJA非感受性を示した他、根が短くなる表現型を示した。さらにこの過剰発現体ではイネ白葉枯病抵抗性が低下することが明らかとなった。これらのことから、OsNINJA1がJAZタンパク質やOsTPR1とともに、正の転写因子であるOsMYC2の活性を抑制することで、OsMYC2によって誘導される基礎的なJAシグナルを負に制御している可能性が考えられた。そこでOsNINJA1過剰発現体におけるOsMYC2応答性防御関連遺伝子の発現挙動解析を行ったところ、供試したすべての遺伝子で発現が抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、OsNINJA1はJAZやTPR1と複合体を形成し、OsMYC2を介したJA誘導性イネ白葉枯病抵抗性を不活化するのに重要な因子であることが明らかとなった。

近年、シロイヌナズナにおいてNINJAは1MDaにも及ぶ膨大な複合体を構成することが明らかとなっており、その中にはJAZやMYC2、TPLが含まれていることが明らかとなっている。しかしながらそれら以外の因子については一切明らかとなっていない。そこでOsNINJA1が様々なタンパク質と複合体を形成している可能性が考えられたため、Yeast two hybrid screeningを用いてOsNINJA1と相互作用するタンパク質の探索を行った。その結果24種類のOsNINJA1相互作用タンパク質が得られた。その中にはすでにOsNINJA1と相互作用することが明らかとなっているOsTPR1が含まれていた。そこでその中からシロイヌナズナRadical induced Cell Death1(RCD1)のイネのホモログであり、未だ病理学的役割について明らかとなっていなかったOsSRO1aに着目し機能解析を進めた。

まず、OsSRO1a遺伝子がJAシグナルが誘導された後どのタイムポイントで最もその発現が誘導されるのかを調べたところ、JA処理後24時間で発現のJAシグナルの後期のタイミングで発現のピークを迎えることが明らかとなった。次にOsSRO1aとJAシグナルで機能することが明らかとなっている制御因子との相互作用を調べた。その結果、OsSRO1aはOsNINJA1とOsMYC2と相互作用を示し、両タンパク質は異なる領域を介してOsSRO1aと複合体を形成することが明らかとなった。さらにOsSRO1aの機能について明らかにするため、OsSRO1a過剰発現体を作成した。OsSRO1a過剰発現体の根はWTと比較して有意に短くなり、OsNINJA1過剰発現体と類似した表現型を示していた。さらにこの過剰発現体ではJA非感受性を示し、JAによるイネ白葉枯病抵抗性の誘導がみられないことが明らかとなった。このことから、OsSRO1aはJAによって誘導されるOsMYC2シグナルを負に制御している可能性が考えられたため、JA処理後のOsSRO1a過剰発現体におけるOsMYC2応答性防御関連遺伝子の発現挙動を行ったところ、供試したすべての遺伝子でJAによる発現誘導がみられないことが明らかとなった。以上の結果から、OsSRO1aはJAによって誘導されたOsMYC2シグナルが収束するタイムポイントにおいてOsNINJA1やOsTPR1などの負の制御因子と複合体を形成し、活性化状態にあるOsMYC2の状態を不活性化状態に戻す際の仲介役として機能する可能性が示された。また、OsSRO1a過剰発現体はWTと比較してJA無処理時にもイネ白葉枯病の病徴が短くなることが明らかとなった。近年、OsSRO1aの変異体である*twil*変異体では細胞壁の主成分であるリグニン含量が有意に低くなることが明らかとなっている。そこでOsSRO1a過剰発現体におけるリグニン含量を定量したところこの過剰発現体ではリグニンが高蓄積することが明らかとなり、OsSRO1aは、JA無処理時にはJA非依存的な抵抗性によってイネ白葉枯病抵抗性に関与することが明らかとなった。

さらに得られたOsNINJA1複合体構成タンパク質のうち、最もクローン数が多かったタンパク質をOsFHA1と命名し機能解析をすすめた。OsFHA1はOsNINJA1とOsJAZ2と相互作用することが明らかとなった。また、OsFHA1過剰発現体ではOsNINJA1やOsSRO1aの時と同様根が短くなり、JA非感受性を示した。一方でOsFHA1過剰発現体ではWTと同程度JAによるイネ白葉枯病抵抗性が誘導されることが明らかとなった。そこで、JA処理後のOsMYC2依存的・非依存的防御関連遺伝子の発現挙動を調べたところ、OsFHA1過剰発現体ではOsMYC2依存的防御関連遺伝子のJAによる発現誘導がみられないことが明らかとなった。一方で、OsMYC2非依存的防御関連遺伝子の発現は誘導されることが明らかとなった。以上の結果からOsFHA1はJAによって誘導されたOsMYC2シグナルの負の制御因子として機能する可能性が示された。

本研究により、OsNINJA1はJA誘導性イネ白葉枯病抵抗性機構において通常時においてJAZタンパク質やOsTPR1と複合体を形成することでOsMYC2によるシグナル伝達を負に制御することが明らかとなった。また、OsSRO1aはOsMYC2によって活性化されたJAシグナルが不活化する時期にその

(様式 5) (Style5)

発現がピークとなり、OsNINJA1と複合体を形成し、OsMYC2シグナルを不活化状態に戻すための重要な因子であることが明らかとなった。また、OsFHA1はOsNINJA1やOsJAZ2と複合体を形成し、JAによって誘導されるOsMYC2シグナルを負に制御するのに重要な因子であることが明らかとなった。以上の結果からイネは様々なタンパク質が複合体を形成し、状況に応じてその組み合わせを変えることでJA誘導性病害抵抗性シグナルの緻密な制御を行っている可能性が示された(図. 2)。

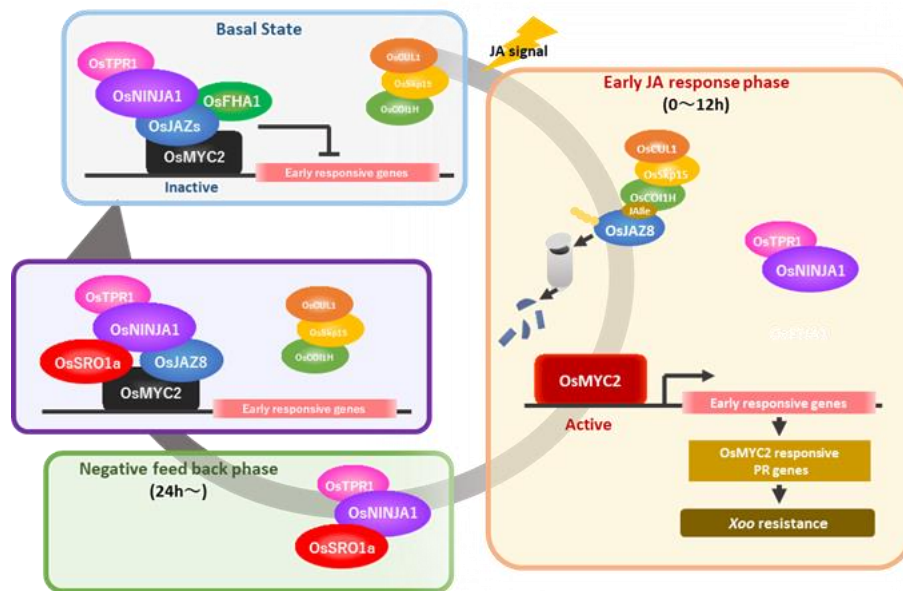


図 2 JA 誘導性イネ白葉枯病抵抗機構における OsNINJA1 が構成する複合体

JA シグナルが OFF の Basal State では OsNINJA1 が OsJAZ や OsTPR1 と負の制御因子複合体を形成し、正の転写因子である OsMYC2 の活性を抑制する。JA シグナルが ON になり、Early JA response phase(0~12h)の段階に入ると、OsJAZ が分解されることで OsMYC2 が活性化状態となり、MYC2 応答性防御関連遺伝子の発現誘導を介したイネ白葉枯病抵抗性がおきる。その後 JA シグナル 24h 以降の MYC2 シグナルが収束する Negative feedback phase をむかえる。この時間帯には OsMYC2 シグナルが収束するタイムポイントであることが分かっており、この際 OsSRO1a が OsNINJA1 や OsTPR1 などの負の制御因子と複合体を形成することで活性状態

(注) 要約の文量は、学位論文の文量の約 10 分の 1 として下さい。図表や写真を含めても構いません。

(Note) The Summary should be about 10% of the entire dissertation and may include illustrations