

|      |   |   |   |
|------|---|---|---|
| 報告番号 | ※ | 第 | 号 |
|------|---|---|---|

## 主論文の要旨

論文題目 植物免疫に関与する WRKY 型転写因子群による  
活性酸素生成機構

氏名 安達 広明

## 論文内容の要旨

植物には、PTI (pattern-triggered immunity) と ETI (effector-triggered immunity) の 2 段階の免疫応答が存在する。MAPK カスケードは、両応答において中心的な役割を果たしている。タバコ植物では、MEK2-SIPK/WIPK カスケードの活性化が活性酸素種 (ROS) の生成および過敏感反応 (HR) 様細胞死を誘導する。しかし、MAPK 経路下流のシグナル伝達機構については不明な点が多い。本研究では、MAPK によってリン酸化される WRKY 型転写因子に着目し、MAPK-WRKY 経路が制御する ROS 生成および細胞死誘導機構を調べた。また、生体内での MAPK 活性を可視化するバイオセンサーを新たに開発し、免疫シグナルによる MAPK の活性化を時空間的に解析するライブイメージングシステムを構築した。

MEK2-SIPK/WIPK カスケードは、NADPH オキシダーゼである RBOHB をコードする遺伝子の発現を正に制御し、RBOHB に依存した ROS 生成を誘導する。RBOHB プロモーターには免疫シグナルに応答するシス配列が存在し、そのシス配列には WRKY 型転写因子が結合する W-box が含まれている。また、SIPK/WIPK の基質としてベンサミアタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の WRKY8 が同定されており、WRKY が RBOHB 遺伝子の発現を制御する可能性が考えられた。SIPK/WIPK によってリン酸化される WRKY の疑似リン酸化変異体である WRKY7<sup>5D</sup>、WRKY8<sup>5D</sup>、WRKY9<sup>5D</sup>、WRKY11<sup>4D</sup> をベンサミアタバコ葉に一過的に発現させると、RBOHB 遺伝子の発現が顕著に誘導された。植物体内において、RBOHB プロモーターのシス配列に対する WRKY の結合を評価するため、WRKY8<sup>5D</sup> を過剰発現させて ChIP-qPCR を行った。その結果、RBOHB プロモーターのシス領域と WRKY8<sup>5D</sup> との直接的な結合が示された。さらに、WRKY7/8/9/11 を同時にサイレンシングすると、免疫シグナルにより誘導される RBOHB 遺伝子の活性化が著しく抑制されたが、WRKY の単独サイレンシングでは抑制されなかった。以上の結果より、SIPK/WIPK によってリン酸化される複数の WRKY 型転写

因子が *RBOHB* 遺伝子の発現を直接制御することが明らかになった。

免疫応答において、アポプラストでは 2 相性の ROS 生成が誘導される。その ROS 生成パターンは PTI と ETI に対応しており、PTI-ROS バーストは迅速で一過的であるのに対し、ETI-ROS バーストは持続的であることが知られている。本研究では、PTI を誘導する flg22、ETI を誘導する R3a/AVR3a、および両者の応答を誘導する INF1 を用いることによって、2 相性の ROS 生成に対する MAPK-WRKY 経路に依存した *RBOHB* の転写制御の役割を評価した。WRKY7/8/9/11 をサイレンシングした結果、flg22 誘導による ROS 生成は抑制されなかったが、INF1 および R3a/AVR3a 誘導による ROS 生成は顕著に抑制された。flg22 とは異なり、INF1 と R3a/AVR3a のシグナルは持続的な ROS 生成パターンを誘導することから、*RBOHB* 遺伝子の転写レベルでの活性化は、ETI-ROS バーストの持続性に貢献するものと考えられた。

一般に、ETI は HR 細胞死を伴う。この細胞死誘導過程には、MAPK カスケードが関与していることが知られている。WRKY の過剰発現解析の結果、WRKY7、WRKY8、WRKY9、WRKY11、WRKY12 および WRKY14 は、細胞死誘導活性を有することが示された。また、これら WRKY を同時にノックダウンすると、活性型の MEK2<sup>DD</sup> 誘導による細胞死が抑制されることから、MEK2-SIPK/WIPK カスケードは複数の WRKY を介して細胞死を誘導するものと思われた。細胞死を誘導する WRKY の過剰発現葉を用いてトランスクリプトーム解析を行ったところ、これら WRKY の下流では多くの光合成関連遺伝子の発現が抑制されていた。光合成速度を測定した結果、これら WRKY の発現区では光合成速度が有意に低下していた。一般に、光合成速度の低下は葉緑体において過剰な還元エネルギーを発生させ、光化学系にて ROS 生成を誘発させる。葉緑体での ROS 生成を評価するため、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と反応する DAB で染色した。WRKY 発現に反応した表皮細胞の葉緑体では、DAB の酸化による褐色が観察された。さらに、葉緑体における ROS 蓄積の細胞死に及ぼす影響を調べる目的で遮光実験を行ったところ、WRKY による葉緑体での H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 蓄積および細胞死が抑制された。表皮細胞の葉緑体における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 蓄積は ETI で誘導され、WRKY サイレncing すると抑制された。以上の結果は、MAPK-WRKY 経路が光合成を阻害し、葉緑体に ROS 生成を誘発すること、そして葉緑体での ROS 蓄積は細胞死の誘導に関与することを示している。しかし、MAPK の活性化は葉肉細胞の葉緑体にも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 蓄積を誘導するが、WRKY の疑似リン酸化変異体を過剰発現させても葉肉細胞での変化は認められなかった。この結果は、MAPK による WRKY 非依存的なシグナルが、葉肉細胞の葉緑体での ROS 生成に必要であることを示唆している。

MAPK は、PTI および ETI のいずれの応答においても活性化するが、生細胞での MAPK の動態および活性は、従来の生化学的手法では評価できない。本研究では、SIPK サイレncing した植物に SIPK プロモーターを用いて GFP と連結した合成 SIPK (SIPK<sup>syn</sup>) を発現させ、SIPK の細胞内動態を観察した。flg22 処理では、GFP-SIPK<sup>syn</sup> は主にサイトゾルで観察され、核への移行はほとんど認められなかった。一方、INF1 および R3a/AVR3a シグナルを誘導すると、GFP-SIPK<sup>syn</sup> はサイトゾルから核へ移行し、

さらに葉緑体での局在も観察された。この結果は、**SIPK** は核内だけではなく、葉緑体においても機能する可能性を示している。さらに、細胞内における **MAPK** 活性の可視化を可能にするバイオセンサー (**MAPK** センサー) を開発した。**MAPK** センサーは、**MAPK** によるリン酸化に伴い蛍光タンパク質間で **FRET** が起こるよう設計した。また、細胞内局在シグナルの付加により、生細胞内での **MAPK** センサー局在部位を任意に調節することに成功した。本研究では、**flg22** および **INF1** で処理した際の **MAPK** センサーの応答を観察することができた。今後、**MAPK** センサーを導入したモニター植物を作出し、**FRET** をライブイメージングすることで、**PTI** および **ETI** における **MAPK** 活性の時空間的情報の詳細が得られるものと期待される。