

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 安 達 広 明

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

論文審査担当者

主 査	名古屋大学准教授	吉 岡	博 文
委 員	名古屋大学教授	柘 植	尚 志
委 員	名古屋大学教授	中 園	幹 生
委 員	名古屋大学教授	多 田	安 臣
委 員	名古屋大学准教授	白 武	勝 裕
委 員	名古屋大学准教授	竹 本	大 吾

論文審査の結果の要旨

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。タバコ植物における MEK2-SIPK カスケードの活性化は、活性酸素種 (ROS) 生成および過敏反応 (HR) 様細胞死を誘導する。しかし、MAPK 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 が制御する ROS 生成および細胞死誘導機構の解明を目的として、MAPK によってリン酸化される WRKY 型転写因子の機能を解析し、MAPK-WRKY 経路が NADPH オキシダーゼである RBOH と葉緑体での ROS 生成を制御することを明らかにした。さらに、生体内で MAPK 活性を可視化するバイオセンサーを開発し、免疫シグナルによる MAPK の活性化を時空間的に解析するイメージングシステムを構築した。本研究の概要を以下に述べる。

MEK2-SIPK カスケードは、RBOHB をコードする遺伝子の発現を正に制御し、RBOHB 依存的な 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 が結合する W-box が含まれていた。SIPK によってリン酸化される WRKY の疑似リン酸化変異体 WRKY7^{5D}、WRKY8^{5D}、WRKY9^{5D}、WRKY11^{4D} をベンサミアナ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。植物体内での *RBOHB* プロモーターに対する WRKY の結合を評価するため ChIP-qPCR 解析を行ったところ、*RBOHB* プロモーターと WRKY8^{5D} の直接的な結合が示された。さらに、WRKY7/8/9/11 を同時にノックダウンすると、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 の単独ノックダウンでは抑制されなかった。以上の結果より、SIPK 下流で複数の WRKY 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。

免疫応答においては、アポプラストで 2 相性の ROS 生成が誘導される。この 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。MAPK-WRKY 経路による *RBOHB* 転写制御の 2 相性 ROS 生成における役割を評価した。WRKY7/8/9/11 ノックダウン植物では、PTI-ROS バーストは抑制されなかったが、ETI-ROS バーストは顕著に抑制された。PTI と異なり、ETI シグナルは持続的な ROS 生成を誘導することから、*RBOHB* の転写レベルでの活性化は、ROS 生成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。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。これら WRKY を同時にノックダウンすると、活性型の MEK2^{DD} 誘導による細胞死が抑制され、MEK2-SIPK 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_2O_2 と反応する **DAB** で染色した。表皮細胞の葉緑体では、**WRKY** 発現に応答して H_2O_2 蓄積が観察された。表皮細胞の葉緑体における H_2O_2 蓄積は **ETI** でも誘導され、**WRKY** のノックダウンにより抑制された。遮光実験を行ったところ、**WRKY** による葉緑体での H_2O_2 蓄積および細胞死が抑制され、**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が示唆された。一方で、**WRKY** 発現葉と異なり、**MAPK** の活性化は葉肉細胞の葉緑体にも H_2O_2 蓄積を誘導した。したがって、**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** 生成に必要であると考えられた。

免疫応答における **MAPK** の活性化動態の解析は、従来の生化学的手法では困難である。**SIPK** の細胞内動態を観察する目的で、**SIPK** ノックダウン植物に **SIPK** プロモーターを用いて **GFP** と連結した合成 **SIPK** (**SIPK^{syn}**) を発現させたところ、**GFP** 蛍光は主にサイトゾルで観察された。同植物において、**ETI** シグナルを誘導すると、**GFP-SIPK^{syn}** 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。この結果から、**SIPK** が核内だけでなく、葉緑体においても機能する可能性が考えられた。さらに、生細胞での **MAPK** 活性を可視化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、細胞内での **MAPK** センサーの局在部位を任意に調節することに成功した。センサー発現葉において、**PTI** および **ETI** シグナルに応答した **FRET** が観察され、本センサーが **MAPK** 活性の時空間的解析において有用なツールであることが示された。

結論として、本論文は、**MAPK-WRKY** 経路が **RBOH** 遺伝子の発現を制御するメカニズムを解明し、**RBOH** の転写活性化が持続的な **ROS** 生成に必要であることを示した。**WRKY** が重複的に制御する遺伝子を調べた結果、細胞死の誘導過程において、**MAPK-WRKY** 経路は葉緑体の機能も制御し、**ROS** 生成を誘導することが明らかになった。本結果は、植物免疫機構における複雑な転写ネットワークを理解する上で重要な知見であり、作製に成功した **MAPK** センサーは、植物の **MAPK** 研究に大きく貢献し、**MAPK** 活性の詳細な時空間的情報が得られるものと期待される。

本審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判断した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	安達広明
試験担当者	主査 吉岡博文 柘植尚志、中園幹生、多田安臣、白武勝裕、竹本大吾			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成29年 2月 2日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				