

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 新奇無細胞タンパク質合成系の開発と本法を用いた
植物の全身獲得抵抗性の解析

氏 名 野元 美佳

論 文 内 容 の 要 旨

植物は、寄生菌を認識すると、感染部位において自然免疫による防御応答を誘導すると同時に、緊急シグナル（長距離シグナル）を生成し、全身にこれを伝達する。同シグナルを認識した非感染葉においては、植物ホルモンであるサリチル酸（SA）を生成し、SA 応答性の免疫反応（全身獲得抵抗性：SAR）を誘導する。SAR には、SA シグナルの鍵転写補助因子である NPR1 の活性化が必須であり、NPR1 は SA 応答性遺伝子群の 99%以上を直接的或いは間接的に制御するが、その分子機構は不明である。一方、虫害や腐生菌に対しては、植物ホルモンであるジャスモン酸（JA）を合成し、JA 応答性の防御応答を誘導する。古くから、SA と JA シグナルは拮抗的に作用し、寄生菌が感染した葉では、虫害や腐生菌の被害が増大することが知られているが、本分子機構も明らかになっていない。そこで、NPR1 が制御する SAR の誘導機構と、SAR による JA シグナル抑制機構を明らかにするための基盤技術として、まず高効率なタンパク質合成を可能にする、「コムギ胚芽由来の無細胞タンパク質合成系と、その転写鋳型作製技術」を開発した。

従来の無細胞タンパク質合成系では、翻訳溶液に添加する mRNA を安定化するために、open reading frame の直後に 1000 nt 以上の長い 3'-UTR を付加する必要があった。このため、転写鋳型の作成は煩雑であり、またタンパク質合成効率にも問題があった。そこで、mRNA を安定化する比較的短い 3'-UTR (50 nt) を同定し、本 short 3'-UTR を用いた two-step PCR 法による転写鋳型作製技術を構築した。これにより、クローニングしていない cDNA からでも、効率良く、迅速にタンパク質を合成することが可能になった。さらに、コムギ胚芽抽出液を改良することで、従来法の 50 倍程度の合成力を示す翻訳系を確立した。

SAにより活性化される転写補助因子 NPR1 が、どのような分子機構で JA シグナルを抑制するかを明らかにするために、まずシロイヌナズナの野生型及び *npr1* 植物を用いた RNA-seq 解析を行った。その結果、NPR1 は JA シグナルのアクチベーターである MYC 転写因子を標的とすることが示唆された。実際、先に述べた無細胞タンパク質合成系を用いて NPR1 と MYC 転写因子ファミリーを合成し、相互作用の有無を調査した結果、両者は明確に結合し、また NPR1 は MYC の転写活性化能を抑制することが明らかになった。さらに、*35S::NPR1-GFP* 植物を用いて ChIP-seq 解析を行った結果、NPR1 は SA 応答性遺伝子群のプロモーター上で複合体を形成するが、JA 応答性遺伝子群のプロモーター上には検出されなかった。NPR1 は MYC 転写因子の分解を誘導しないことより、NPR1 は MYC のシス結合能を抑制することが強く示唆された。本研究によって、長く不明であった寄生菌抵抗性が腐生菌の感染や虫害を増大させる分子機構が明らかになったものとする。

SAR 誘導機構において NPR1 活性化以降の情報伝達経路は殆ど不明である。そこで、まずシロイヌナズナにおける SA/NPR1 制御遺伝子群のプロモーター解析を行った結果、大部分の遺伝子は植物特異的な WRKY 転写因子に調節されることが示唆された。先に述べた無細胞タンパク質合成系を用いて NPR1 と WRKY ファミリーに属する 74 転写因子を合成し、NPR1-WRKY 群の相互作用の有無を調査した。その結果、NPR1 は WRKY の中でも N 末端に α ヘリックスを有するものと結合し、WRKY のシス配列結合能を抑制することを明らかにした。そして、NPR1 が結合する WRKY は、SA シグナルのリプレッサーとして働くことが遺伝学的な解析からも支持された。一方、JA シグナルのリプレッサーである JAZ は、MYC の転写活性化能を抑制することで知られているため、JAZ もまた WRKY 転写因子と結合して SA シグナルを直接制御するのではないかと仮定した。実際、JAZ は NPR1 が標的とする WRKY と *in vitro* 及び *in vivo* で結合すること、そして WRKY のシス結合能を抑制すること、さらに JAZ が高蓄積する変異体では SA 応答性遺伝子の発現が増強することを明らかにした。以上より、NPR1 及び JAZ は、SA シグナルのリプレッサーである WRKY を脱抑制することでアクチベーターとして機能することが示された。

本研究により、寄生菌と虫害（腐生菌）への応答は、SA と JA シグナルを制御する鍵転写補助因子が、互いの情報伝達系の転写活性化能に相互に影響を及ぼした結果生じることが明らかになった。