

## 主論文の要約

生命農学研究科 生物機構・機能科学専攻  
資源生物機能科学講座 植物病理学研究分野  
水野 邑里

ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) は、世界4大作物の1つであるジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の最重要病原菌であり、その被害総額は年間27.5億ドルと試算されている。ジャガイモの疫病菌抵抗性には品種特異的な抵抗性 (*R*) 遺伝子が関与しており、これまでジャガイモ疫病菌の認識に関わる *R* 遺伝子の導入が疫病菌抵抗性ジャガイモ品種の育種の中心を担っていた。しかし *R* 遺伝子の導入に基づく抵抗性は、病原菌の新レースの出現により比較的短期間で打破されてしまうため、持続的な疫病菌抵抗性ジャガイモ品種の作出には殆ど利用出来ていない。そのため、植物の病害抵抗性を最大限に活用した恒久的な疫病菌防除法の確立には、抵抗性発現にいたる情報伝達や疫病菌の感染の阻止に直接関与する因子の総合的理解が重要であると考えられる。

ジャガイモ疫病菌はジャガイモやトマトの感受性品種に感染し病気を引き起こす一方で、同じナス科植物のタバコやピーマンは品種に限らず強い抵抗性を示す。そこで当研究室では、ナス科のモデル植物ベンサミアナ (*Nicotiana benthamiana*) を用いて、ジャガイモ疫病菌抵抗性に必須な遺伝子の探索を行っている。タバコ茎えそウイルス (TRV) を用いたウイルス誘導型ジーンサイレンシング (VIGS) を利用して遺伝子をランダムにサイレンシングしたベンサミアナを作出され、疫病菌に対する抵抗性の調査が行なわれた。これまでに、ジャガイモ疫病菌に対する抵抗性に必須な因子の1つとして、核膜孔の構成因子 Nucleoporin の一つである NbNup75 が単離されており、核膜孔を介した因子の輸送が植物の病害抵抗性に重要な役割を担っていることが示唆されている。外界ストレスを認識した植物細胞では、情報伝達因子の活性化と核輸送、抵抗性関連遺伝子の発現誘導、mRNA の核外輸送を経て、ストレス応答に必須なタンパク質群が生産される。この過程には幾つかの段階で核膜孔を介した物質輸送に関わるが、その調節機構は殆ど解っていない。

本学位論文では、スクリーニングによって単離されたベンサミアナのジャガイモ疫病菌抵抗性に必須な因子 Ran binding protein 1 (NbRanBP1) および低分子量 G タンパク質 Ran の病害抵抗性誘導における役割について解析した。RanBP1 は核膜孔を介した物質輸送に関与することが知られている。ベンサミアナの *NbRanBP1-1* サイレンシング株では植物体が矮化し、対照株と比較して細胞質における mRNA の蓄積の低下が認められた。また、*NbRanBP1-1* サイレンシング株では、ジャガイモ疫病菌由来の分泌エリシタ

一である INF1 の処理によって誘導されるファイトアレキシン生成誘導が対照株と比較して顕著に遅延することが示された。

低分子量 G タンパク質 Ran は、核膜孔を介した核-細胞質間輸送を司る主要な因子である。Ran を介した物質輸送は、核に局在する GTP 結合型と細胞質に局在する GDP 型の変換を介して行われ、RanBP1 は GDP 型への変換を介して物質の核外への輸送を促進する。ベンサミアナでは 2 種類の *NbRan* 遺伝子 (*NbRan1* および *NbRan2*) が発現しており、*NbRan1* および *NbRan2* サイレンシング株は対照株と同様の生育を示したが、*NbRan1/NbRan2* サイレンシング株では *RanBP1-1* サイレンシング株と類似した植物体の矮化が認められた。さらに、*NbRan1*、*NbRan2* サイレンシング株および *NbRan1/NbRan2* サイレンシング株においても、mRNA の核への蓄積、疫病菌抵抗性の低下、ファイトアレキシン生成量の減少が認められた。*RanBP1* サイレンシング株では、ファイトアレキシン生成誘導が遅延していたのに対して、*NbRan1/NbRan2* サイレンシング株では、ファイトアレキシン生成量が減少しており、抵抗性誘導能の低下がより顕著であった。

さらに、RanBP1、Nup75 および Nup75 と同じ Nup107-160 サブコンプレックスの因子である Nup160 の、Ran の核-細胞質間輸送における役割を調べるため、*NbRanBP1-1* サイレンシング株および *Nup75*、*Nup160* サイレンシング株における GFP-NbRan の細胞内局在の解析を行った。対照株では病害抵抗性の発動に応じて Ran の核外輸送が活性化されていたのに対し、*NbRanBP1* サイレンシング株では Ran の核外輸送効率の低下が、*NbNup75* および *NbNup160* サイレンシング株では INF1 処理による Ran の核外輸送の阻害が認められた。以上の結果から、*RanBP1-1* および Ran が制御する抵抗性誘導時の核膜孔を介した mRNA の効率的な核外輸送が、迅速な病害抵抗性誘導に重要な役割を担っていることが示唆された。

核から細胞質への輸送に機能する Exportin (*NbXpo*) 遺伝子の抵抗性における役割について解析を行った。Exportin は核-細胞質間輸送の主要な受容体である Karyopherin  $\beta$  ファミリーに属するタンパク質であり、核内から細胞質への輸送の流れをつくる GTP 結合型の Ran と協調的に働き、RNA やタンパク質を核内から細胞質へ輸送することが知られている。核外輸送シグナルを持つタンパク質や、タンパク質-RNA 複合体の輸送に関わる *NbXpo1*、核局在シグナルを認識し、核内へ輸送する importin  $\alpha$  を核外輸送する *NbXpo2* に着目して疫病菌抵抗性への影響を解析した。*NbXpo1* サイレンシング株ではジャガイモ疫病菌に対する抵抗性が低下し、INF1 処理によるファイトアレキシン生成や細胞死誘導などの防御応答が抑制された一方で、ジャスモン酸によって発現が誘導される Defensin や Thionin といった抗菌タンパク質をコードする複数の遺伝子の発現が強く誘導された。対照的に、*NbXpo2* サイレンシング株ではファイトアレキシン生成や

細胞死がむしろ促進される傾向が認められた。RNA-seq を用いて遺伝子発現の比較解析を行ったところ、*NbXpo2* サイレンシング株では水処理において抗菌タンパク質をコードする複数の遺伝子の発現が強く誘導されており、それらの遺伝子は INF1 処理によって発現が抑制されていた。また、*NbXpo2* サイレンシング株の INF1 処理区ではサリチル酸生合成遺伝子やエチレン制御下にある複数の遺伝子の発現誘導が促進された。以上の結果から、核から細胞質への輸送を担う因子が、植物ホルモンの生合成を制御することで、病害抵抗性応答を特異的に、かつ対照的に制御していることが示唆された。本研究ではこれまで植物では殆ど明らかにされていなかった、ストレス応答における mRNA やタンパク質の選択的輸送のメカニズムの一端を解明した。今後、植物細胞の病害抵抗性誘導時における能動的な mRNA 輸送機構が明らかになれば、病害抵抗性応答だけでなく、様々な環境ストレスによる mRNA 輸送機構の研究に発展できる可能性があり、植物科学の研究進展にも大きく貢献できると考えられる。