

氏名（本籍）	かん だ やす かず 神 田 恭 和（埼玉県）
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	甲第 1219 号
学位授与の日付	2020 年 3 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	イネプロテインキナーゼ BSR1 が関わる病虫害 害応答・抵抗性機構の解析

論文審査委員	（主査）教授 鎌倉 高志
	教授 松永 幸大 教授 早瀬 仁則
	教授 島田 浩章 客員教授 森 昌樹

論文内容の要旨

自然界の植物は細菌や糸状菌、害虫といった様々な生物による攻撃にさらされており、こういった病虫害は農業生産を常に脅かしている。植物側の抵抗性を強化するという観点から、植物の病害抵抗性に関わる遺伝子の単離やその分子機構の解明に向けた研究がなされてきた。*BSR1* (*Broad-Spectrum Resistance 1*) は、過剰発現によって病害抵抗性を賦与する遺伝子としてイネから単離された。*BSR1* 過剰発現イネはイネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) やイネもみ枯細菌病菌 (*Burkholderia glumae*) といった病原細菌とイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) やイネごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*) といった病原糸状菌に対して抵抗性を示す。また、*BSR1* による病原細菌と病原糸状菌への抵抗性は双子葉植物のシロイヌナズナにおいても生じる。一つの遺伝子が、系統的にこれほど広い範囲の植物において多様な病原体に対して有効な複合病害抵抗性を与える例は極めて珍しく、病害防除への応用が期待されている。本研究では、植物の有する抵抗性機構において *BSR1* がどのような機能を担っているのかを解明することを目的とした。

はじめに、*BSR1* が receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK) サブファミリー VII に分類されるプロテインキナーゼをコードしていることに注目した。RLCK は、受容体様プロテインキナーゼ (Receptor-Like protein Kinase: RLK) と相同性の高いキナーゼドメイン

をもつ一方で、細胞外ドメインや膜貫通ドメインはもたない細胞質基質タンパク質のファミリーである。モデル植物のシロイヌナズナ等で、微生物関連分子パターン (microbe-associated molecular pattern: MAMP) の認識から初期の防御応答の誘導までの細胞内防御応答シグナル伝達を担う RLCK サブファミリーVII タンパク質の報告がある。そこで、*BSR1* がイネの本来有する初期の防御応答 (オキシダティブバーストと呼ばれる急激な活性酸素種産生、防御関連遺伝子の発現上昇) の誘導に寄与するかどうかを調べた。逆遺伝学的解析のために、CRISPR/Cas9 システムを利用して *BSR1* ノックアウトシステムを作出した。*BSR1* ノックアウトシステムから誘導したカルスからイネ懸濁培養細胞を調製し、キチン (糸状菌細胞壁構成多糖) やペプチドグリカン (細菌細胞壁成分)、リポ多糖 (LPS; グラム陰性細菌外膜成分) といった代表的な MAMP で処理した。MAMP 処理下において、野生型細胞ではオキシダティブバーストが誘導されて培養系の過酸化水素濃度が上昇したのと対照的に、*BSR1* ノックアウト懸濁培養細胞の培養系ではわずかにしか上昇しなかった。さらに、MAMP 認識後に発現が誘導される防御関連遺伝子の転写産物を定量したところ、*BSR1* ノックアウトがこれらの遺伝子の発現上昇を抑制することが明らかになった。これらの結果は MAMP 認識後の防御応答の誘導に *BSR1* が寄与することを示している。これまでの知見と合わせ、*BSR1* が MAMP 受容体下流の細胞内シグナル伝達経路を構成することが示唆された。

BSR1 が MAMP 応答性の防御応答に寄与することから、*BSR1* 過剰発現時の複合病害抵抗性は MAMP 応答が野生型より強く活性化されることで生じるのではないかと仮定した。この仮説の検証のために、*BSR1* 過剰発現 (*BSR1-OX*) システム由来の懸濁培養細胞の MAMP 応答を解析した。その結果、*BSR1-OX* 懸濁培養細胞は MAMP エリシター処理下で野生型と比較して約 2 倍の濃度の過酸化水素を産生した。この条件において防御関連遺伝子発現もまた亢進した。懸濁培養細胞よりも自然界に近い状態で解析することを目的に、葉身からリーフストリップを作製した。*BSR1-OX* システムのリーフストリップは、MAMPs に応答して野生型より顕著に高い濃度の過酸化水素を産生した。これらの結果から、*BSR1* 過剰発現はイネの MAMP 応答を亢進させることが明らかになった。

イネいもち病菌のような植物病原体は、活性酸素種を分解する酵素によって宿主のオキシダティブバーストを抑制することが知られている。このような状況下においても *BSR1-OX* システムと野生型システムの間でオキシダティブバーストに差があるのかどうかを調べるために、リーフストリップとイネいもち病菌分生子を共培養した状態で過酸化水素濃度を定量する実験系を設計した。コントロールシステムの共培養系で過酸化水素濃度が上昇しなかったのに対し、過剰発現システムのものでは有意な濃度上昇が認められた。宿主に由来する活性酸素種を分解することが病原性に必要であるという知見と合わせ、*BSR1* 過剰発現によ

る複合抵抗性の原因は、病原体が分解しきれないほどに過剰産生された活性酸素種であることが示唆された。

本研究は、BSR1 をオキシダティブバーストのような初期の防御応答を正に制御する因子として位置づけた。さらに、培養細胞や葉身を用いた解析によって、*BSR1* 過剰発現が MAMP 応答を亢進させることを明らかにした。これらの結果より、*BSR1-OX* イネにおいて、様々な MAMP 認識の下流で BSR1 が防御応答を過剰活性化することで複合病害抵抗性をもたらすというモデルを提唱するに至った。

論文審査の結果の要旨

植物側の抵抗性を強化するという観点から、植物の病害抵抗性に関わる遺伝子の単離やその分子機構の解明に向けた研究がなされてきた。*BSR1* (*Broad-Spectrum Resistance 1*) 過剰発現イネはイネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) などの病原細菌とイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) をはじめとする病原糸状菌に対して抵抗性を示す。一つの遺伝子が、系統学的にこれほど広い範囲の植物において多様な病原体に対して有効な複合病害抵抗性を与える例は極めて珍しく、病害防除への応用が期待されている。本研究では、植物の有する抵抗性機構において BSR1 がどのような機能を担っているのかを解明することを目的とした。

まず *BSR1* が receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK) サブファミリーVII に分類されるプロテインキナーゼをコードしていることに注目した。RLCK は、受容体様プロテインキナーゼ (Receptor-Like protein Kinase: RLK) と相同性の高いキナーゼドメインをもつ一方で、細胞外ドメインや膜貫通ドメインはもたない細胞質基質タンパク質のファミリーであり、病原体の認識に関わるものを含むことがシロイヌナズナ等で知られている。そこで、*BSR1* がイネの本来有する初期の防御応答の誘導に寄与するかどうかを調べた。*BSR1* ノックアウト系統から誘導したカルスからイネ懸濁培養細胞を調製し、キチン (糸状菌細胞壁構成多糖) やペプチドグリカン (細菌細胞壁成分)、リポ多糖 (LPS; グラム陰性細菌外膜成分) といった代表的な MAMP (microbe-associated molecular pattern) で処理したところ、野生型細胞ではオキシダティブバーストが誘導されて培養系の過酸化水素濃度が上昇したのと対照的に、*BSR1* ノックアウト懸濁培養細胞の培養系ではわずかにしか上昇しなかった。さらに、MAMP 認識後に発現が誘導される防御関連遺伝子の転写産物を定量したところ、*BSR1* ノックアウトがこれらの遺伝

子の発現上昇を抑制することが明らかになった。*BSR1* が MAMP 応答性の防御応答に寄与することから、*BSR1* 過剰発現時の複合病害抵抗性は MAMP 応答が野生型より強く活性化されることで生じるのではないかと仮定した。*BSR1-OX* 懸濁培養細胞は MAMP エリクター処理下で野生型と比較して約 2 倍の濃度の過酸化水素を産生した。これらの結果から、*BSR1* 過剰発現はイネの MAMP 応答を亢進させることが明らかになった。

イネいもち病菌のような植物病原体は、活性酸素種を分解する酵素によって宿主のオキシダティブーストを抑制することが知られている。*BSR1-OX* 系統と野生型系統の間でオキシダティブーストに差があるのかどうかを調べるために、リーフストリップとイネいもち病菌分生子を共培養した状態で過酸化水素濃度を定量する実験を行ったところ、OX 系統での濃度上昇が認められた。活性酸素種を分解することが病原性に必要であるという知見と合わせ、*BSR1* 過剰発現による複合抵抗性の原因は、病原体が分解しきれないほどに過剰産生された活性酸素種であることが示唆された。また、*BSR1* が HAMP (herbivore-associated molecular pattern) など他のストレス応答にも寄与する可能性を検討した結果、他のストレスについても *BSR1* の上流で認識されるものがあることを示唆する結果を得た。

本論文において、申請者は *BSR1* をオキシダティブーストのような初期の防御応答を正に制御する因子として位置づけた。さらに、培養細胞や葉身を用いた解析によって、*BSR1* 過剰発現が MAMP 応答を亢進させることを明らかにした。これらの結果より、*BSR1-OX* イネにおいて、様々な MAMP 認識の下流で *BSR1* が防御応答を過剰活性化することで複合病害抵抗性をもたらすというモデルを提唱するに至っており、博士 (理学) の学位論文として十分に価値あるものと認められる。