

氏名(本籍)	霜野真幸(大阪府)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第2360号		
学位授与年月日	平成20年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Molecular Mechanisms Underlying Disease Resistance of Plants - Plant-Activator-Induced Resistance against Fungal Diseases and PTGS-Based Resistance against Viral Diseases - (植物の病害抵抗性機構に関する分子生物学的研究－抵抗性誘導剤による糸状菌抵抗性とPTGSによるウイルス抵抗性－)		
主査	筑波大学教授	農学博士	松本 宏
副査	筑波大学教授(連携大学院)	理学博士	高辻 博志
副査	筑波大学教授	理学博士	藤村 達人
副査	筑波大学教授	農学博士	柿 真

論文の内容の要旨

植物は様々な病害に対して防御する機構を備えている。本研究は、抵抗性誘導剤による糸状菌抵抗性および転写後ジーンサイレンシング(post-transcriptional gene silencing, PTGS)によるウイルス抵抗性の二つの異なる防御機構に着目し、それらの分子機構の解析を行ったものである。

プロベナゾール(PBZ)およびbenzothiadiazole(BTH)などの抵抗性誘導剤は、植物活性化剤(plant activator)とも呼ばれ、植物自身の防御応答シグナル伝達に作用して病害抵抗性を誘導する。本研究では、抵抗性誘導剤によるイネの病害抵抗性誘導の分子機構解明に向け、抵抗性誘導剤によってイネに発現誘導される遺伝子をマイクロアレイ等によって解析し、その作用に中心的な役割を果たすWRKY型転写因子WRKY45を見出した。PBZによりイネに誘導される病害抵抗性の分子機構を解析するには、1265のイネ遺伝子に対応するcDNAマイクロアレイを用いてPBZ応答性遺伝子を探索した。その結果、10種の遺伝子がPBZ処理により3倍以上の発現量の変化を示し、その中には既知の防御応答関与遺伝子が含まれていた。また、PBZにより発現誘導される7遺伝子のうち、3遺伝子はいもち病菌感染にも発現応答することがわかった。BTHもPBZと同様SAシグナル伝達経路に作用するが、その作用点はSAの下流と考えられている。BTH処理したイネをマイクロアレイ解析した結果、4種のWRKY型転写因子を含む多数の遺伝子がBTHに発現応答することが見出された。BTH誘導性WRKY型転写因子の1つWRKY45をRNAiで抑制した(WRKY45-kd)イネでは、BTH誘導性いもち病抵抗性が失われていた。このことから、本転写因子がBTHの作用に必須であることが示された。また、WRKY45過剰発現体(WRKY45-ox)ではいもち病抵抗性が顕著に向上していた。イネにおいて、WRKY45とNPR1のイネ・ホモログ(OsNPR1)との上位性解析を行った結果、WRKY45はOsNPR1の経路とは別のシグナル伝達経路に属していることが明らかになった。また、WRKY45-kdイネおよびOsNPR1-kdイネを用いた解析から、WRKY45とOsNPR1それぞれの下流には異なる遺伝子が制御されていることがわかった。これらの結果はSAの下流でシグナル伝達経路がWRKY45の経路とOsNPR1の経

路に分岐していることをさらに裏付けている。また、これらの結果によりイネの SA シグナル伝達経路はシロイヌナズナのものとは大きく異なることが明らかになった。転写因子の過剰発現には一般に致死性や生育阻害が付随するが、*WRKY45-ox* イネは特定の条件では比較的正常に生育した。しかしながら、生育条件によってはより強い生育阻害が認められ、遺伝子発現 *WRKY45* 下流の *PR* 遺伝子の発現と生育阻害との間に強い相関が見られた。これらから、*WRKY* 過剰発現は BTH 処理と同様のプライミング状態 (*PR* 遺伝子が発現していない状態) を誘導すること、また、生育環境によってはプライミング状態が維持されず、恒常的な抵抗性反応のために生育阻害に至ると推測された。

PTGS はウイルスに対する植物の防御機構と深く関わっている。本研究では PTGS の程度とウイルス抵抗性の強度の相関について解析するため、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子の PTGS を異なる程度に示す形質転換タバコ (*Nicotiana benthamiana*) 系統を作製した。これらの *GFP*-PTGS 系統は、*GFP* の発現に関して種々のパターン (type I, II, III) を示した。ノーザンブロット解析による *GFP* 遺伝子の mRNA 蓄積量は *GFP* 活性の強度とほぼ比例しており、異なる強度の PTGS を示す個体が得られたことが確認された。ジャガイモ X ウイルス (*PVX*) のゲノムに *GFP* 遺伝子が挿入された組換え *PVX* (*PVX*・*GFP*) を、上記 *GFP*-PTGS タバコに接種し、ウイルス増殖によるスポット状の *GFP* 活性を計数してウイルス抵抗性を評価した結果、PTGS の強さとウイルス抵抗性が正に相関していることが明らかになった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、抵抗性誘導剤による糸状菌抵抗性および転写後ジーンサイレンシング (PTGS) によるウイルス抵抗性の二つの異なる防御機構の分子機構の解析を行ったものである。この中で、抵抗性誘導剤 BTH によってプライミングされるイネの防御応答シグナル伝達 (サリチル酸経路) において中心的な役割を果たす転写因子 *WRKY45* の発見は特に重要で、当分野の研究の発展に大きく貢献すると考えられる。サリチル酸経路は双子葉のモデル植物シロイヌナズナ等で先行していたが、わが国の主要作物で単子葉植物のモデルでもあるイネを材料として研究することにより、シロイヌナズナ等には存在しない新規の転写因子 *WRKY45* を見出した。また本転写因子を足がかりにイネのサリチル酸経路がサリチル酸の下流で 2 経路に分岐していることを見出し、より高度に制御された防御応答シグナル伝達機構の存在が示唆された。さらに *WRKY45* 下流遺伝子の発現の生育環境依存性の結果は、抵抗性誘導剤の作用の特徴であるプライミング効果の分子基盤解明の糸口を与える知見となった。これらの研究成果は、イネにおける防御応答シグナル伝達機構の理解の上で重要であるとともに、イネ科作物の実用レベルでの耐病性分子育種研究への発展が期待される。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。