

氏名(本籍)	香西雄介(香川県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第6107号
学位授与年月日	平成24年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Improvement of Disease Resistance in Rice by Engineering MAMP-Triggered Immunity and Antifungal Activity (病原菌に対する防御応答及び細胞壁分解能の亢進による耐病性イネの開発)
主査	筑波大学教授 農学博士 南 栄 一
副査	筑波大学教授 理学博士 佐藤 忍
副査	筑波大学教授 理学博士 鎌田 博
副査	筑波大学講師 博士(理学) 岩井 宏 暁

論文の内容の要旨

植物は、病原菌に由来する特徴的な分子パターン (Microbe-Associated Molecular Patterns: MAMPs) をパターン認識受容体 (Pattern Recognition Receptor: PRR) を介して認識し、防御応答を活性化する。このような抵抗性は基礎的抵抗性と呼ばれ、多種の病原菌に対して発揮されることから農業上有用な形質であり、これを増強することで幅広い病害に対して抵抗性を増強することが可能となると考えられる。本研究では、イネに広範囲の病原菌に対する強力な抵抗性を付与する目的で、MAMPs シグナルの生産、受容・認識を介した植物と病原糸状菌の相互作用を改変することで耐病性の増強を試みた。本研究では、①病原菌細胞壁多糖の分解能の強化、② MAMPs 応答能力の強化、これら2つのアプローチによって耐病性イネの作出を試みた。

①病原菌細胞壁多糖の分解能の強化

キトサンは *N*-グルコサミンが β -1,4 結合した多糖で、一部の糸状菌の細胞壁成分である。キトサナーゼは、キトサンを特異的に加水分解する酵素で、多種の微生物から単離されているが、高等植物からは見つからない。イネいもち病菌や炭疽病菌等の一部の植物病原菌は、宿主感染時に主要な細胞壁多糖であるキチンを脱アセチル化してキトサンに変換することが示唆されており、これは宿主の溶菌酵素による分解を回避する植物病原菌の感染戦略の一つであると考えられる。本研究では、キトサナーゼのイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) に対する抗菌活性を調べるとともに、耐病性の向上を目的としてキトサナーゼ活性を付与したイネを作製し、そのいもち病抵抗性を調査した。

Bacillus circulans MH-K1 株由来のキトサナーゼ (Chol) を用いて、いもち病菌に対する *in vitro* 抗菌活性を調べたところ、Chol はいもち病菌の付着器形成を強く阻害した。次に、Chol の成熟タンパク質の N 末にイネのキチナーゼ Cht2 由来の細胞外分泌シグナルを付加した Chol および成熟タンパク質のみを恒常的に発現する二種類の Chol 発現イネ (+SS、-SS) を作製した。これらのイネ由来のカルスでは Chol を発現する培養細胞のキトサナーゼ活性は -SS、+SS いずれの細胞からも検出された。+SS 組換えイネ細胞では Chol タンパク質は細胞外面分 (アポプラスト) にも検出されたのに対し、-SS イネ細胞ではアポプラスト画分における蓄積量は極めて低いものであった。+SS イネではいもち病菌を接種した葉鞘において過酸化水素蓄積の

充進および菌糸進展に対する抵抗性が認められ、さらに葉身への滴下接種検定においては有意な病斑拡大阻止が観察された。以上の結果から、感染時のいもち病菌の細胞壁には酵素がアクセス可能な表層にキトサンが存在していること、また、Chol を細胞外に十分量分泌させたイネでは、Chol によっていもち病菌のキトサンが分解され、その生育が阻害されるとともに、いもち病菌由来のエリシター生成が高まり、イネの防御応答がより活性化するために、いもち病抵抗性が向上することが強く示唆された。

② MAMPs 応答能力の強化

キチンとそのオリゴ糖は、エリシターとして植物の防御応答を誘導するが、宿主病原菌の侵入を完全に抑制するほど強い抵抗性は誘導しない。しかしながらキチンは植物病原糸状菌に広範に分布する MAMPs と考えられることから、キチンあるいはそのオリゴ糖を介した抵抗性シグナル伝達はそれを改変してより強い抵抗性につなげることができれば農業上も有用であると考えられる。実際、本研究の前段階の成果として、キチンオリゴ糖受容体 CEBiP と受容体型キナーゼ (RLK) である XA21 (イネ白葉枯病抵抗性タンパク質) の細胞内領域を融合させた人工受容体 CRXA を発現する組換えイネでは、キチンオリゴ糖応答性といもち病抵抗性が向上することを明らかにした (Kishimoto, Kouzai et al. 2010)。本研究では、人工受容体によるキチンオリゴ糖応答性の強化が、XA21 とは異なる RLK でも可能かどうか調べる目的で、CEBiP と Pid2 (RLK 型いもち病真性抵抗性タンパク質ホモログ) を膜貫通ドメイン (TM) 領域で融合させた人工受容体 CRPi をデザインした。

Pi-d2 は TM の 1 アミノ酸が異なるアイソフォーム (dPid2 と nPid2) が存在し、抵抗性の発現に影響を与える。そこで、TM が CEBiP 由来の CRPi1、dPid2 由来の CRPi2、nPid2 由来の CRPi3、これら 3 種の CRPi 遺伝子を構築しイネで恒常的に発現させた。まず、培養細胞で CRPi タンパク質の発現を解析したところ、CRPi2 はタンパク質の蓄積が認められなかった。CRPi1 または 3 を発現する培養細胞では、キチンオリゴ糖処理による過酸化水素の生成が充進した。CRPi3 細胞では、細胞死の誘導も充進した。CRPi1 または 3 を発現するイネ葉鞘と葉身におけるいもち病抵抗性を検定したところ、CRPi3 イネで抵抗性の向上が認められたが、CRPi1 では向上しなかった。また、CRPi3 の細胞内キナーゼ領域を欠失させた CRPi3DK を発現するイネでは、キチンオリゴ糖に対する応答といもち病抵抗性の充進はみられなかった。以上の結果から、CEBiP を XA21 とは異なる RLK 型抵抗性タンパク質の細胞内領域と融合させた場合でも、キチンオリゴ糖シグナルの強化を通じたイネいもち病抵抗性の付与が可能であることが示された。

審査の結果の要旨

植物が持つ基礎的抵抗性は広範囲の病原体に有効であり、結果として一つの植物に感染できる病原体の種類は極めて限定される。これは病原体が宿主の基礎的抵抗性を抑制するメカニズムを持っていることを意味しており、それを解明することで新たな抵抗性を植物に付与することが可能となるが、このような菌の感染戦略についてはほとんど知見が得られていないのが実情である。また、基礎的抵抗性を高める手法については抗菌スペクトラムが広いために極めて有効な作物保護戦略となりうると予想されていたが、基礎的抵抗性発動の引き金の実態が不明であったために手がつけられてこなかった。本論文においてはイネとイネいもち病菌の相互作用の解析においていもち病菌細胞壁のキトサンの分解酵素遺伝子を導入することによりイネに抵抗性を付与できること、広く病原糸状菌細胞壁の成分となっているキチンのオリゴ糖エリシターの受容体をキメラ化することによってそのシグナルをより増強できることを明らかにした。前者はこれまで生理学的意義が不明であったキトサンが感染戦略としての機能を持つことを強く示唆するものとして、後者はキチンオリゴ糖エリシターシグナル増強の新しい手法を提供するとともに、植物細胞膜に多く見出される受容体型キナーゼにおいては細胞内および細胞外ドメインのスイッチングによりシグナル伝達機能を人為的に改変で

きることを証明した点において、それぞれ高く評価されるものである。

平成 24 年 1 月 16 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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。