

生 物 理 工 学 研 究 科

平成 26 年度

(課程修了による)

谷 垣 悠 介

学位論文審査結果の報告書

氏 名 谷垣 悠介

生 年 月 日 (昭和)・平成 60 年 7 月 17 日

本 籍 (国籍) 兵庫県

学位の種類 博 士 (工 学)

学位記番号 生 第 38 号

学位授与の条件 学位規程第 5 条該当
(博士の学位)

論 文 題 目 ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)

の病害応答モデル植物としての可能性

審 査 委 員

(主 査) 秋田 求



(副主査) 加藤 恒雄



(副主査) 阿野 貴司



(副 査)



(副 査)



論文内容の要旨

植物の防御反応には、病害応答遺伝子の発現、病害応答性ホルモンの生成、全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance, SAR) の発達がある。病害応答性ホルモンには、サリチル酸 (SA)、アブシジン酸 (ABA)、ジャスモン酸 (JA)、エチレンなどがあり、各々病害の引き起こすシグナルの伝達に関係している。特に SA と ABA は病害応答において重要な役割を担っている。SA は細胞死を誘導し、病原菌の封じ込めを行い、ABA は、SA シグナルを阻害し無駄な細胞死を抑制する。これら種々のホルモンが関係する様々なシグナルにより、lipoxygenase (LOX)、phenylalanine ammonia lyase (PAL)、chalcone synthase (CHS) などの発現が調節され耐病性を高めていることが知られている。種子植物の病害応答は、上記の病害応答性ホルモンの相互作用 (いわゆるクロストーク) により複雑に制御されており、その制御経路等には未解明な部分が多く存在する。また、防御活性を促進するものとして NADPH oxidase や Peroxidase (Prx) が知られている。これらは活性酸素種 (ROS) の生成に関係し、生成された ROS は、植物細胞内を移行し早期の病害シグナル物質として機能する。上記の様々な応答は、種特異的に感染を認識する抵抗性遺伝子 (Resistance gene : R 遺伝子) を介することで迅速に行われる。また、病原体由来のエリシターを認識させると、R 遺伝子を介した応答と同様の反応が引き起こされる。R 遺伝子の構造とその推定されている機能メカニズムも複雑であり、未解明な部分が多い。種子植物の主要な R 遺伝子は、主に 4 つのクラスに分けることができるとされている。なかでも代表的な R 遺伝子は、細胞質内在型 TIR-NBS-LRR (TIR-NL) 型と細胞膜上に存在する KLR 型である。TIR-NL 型は、suppressor of G2 allele of *skp1* (SGT1) タンパク質により制御されていると考えられている。KLR 型は、細胞外に受容器として機能する LRR ドメイン、その下流に膜貫通ドメイン (TM)、細胞質内に Ser/Thr kinase ドメインをもつ。この KLR 型 R 遺伝子については、*Oryza sativa* Xanthomonas resistance 21 (OsXa21) などで研究が進んでいる。さらに OsXa21 では、病原体認識後に細胞質内に存在する Xa21 binding protein 3 (OsXB3) と相互作用し、リン酸化を介したシグナル伝達を行うことも解明されている。実際の病害応答は、これらが様々な関係しあうことで実現している。本研究の目標は、この複雑な植物病害応答機構を解明するためのモデルをヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) で構築することである。

ヒメツリガネゴケは、単純な構造をしているものの種子植物と多くの共通点を持ち、かつ、分子生物学的解析に適していることが知られている。ヒメツリガネゴケはモデル植物として関心を集めてきたが、一方、コケにおける病害応答に関する情報は限られている。しかし、ヒメツリガネゴケに病原性のカビを感染させると SA の生合成がなされ、LOX、PAL、CHS 等の病害抵抗性遺伝子ホモログが発現することが報告されている。また、エリシターとしてキトサンを処理したときにヒメツリガネゴケでは、ROS 生成源であるペルオキシダーゼを速やかに培地中に放出することがわかっている。R 遺伝子については、Akita and Valkonen (2002) により TIR-NL 型 NBS の保存配列をもつ PpC24 (PpKNL1) が報告されている。この遺伝子は NBS の N 末端側に kinase をもつ R 遺伝子ホモログ (以降 KNL) であり、2012 年に Xue らもヒメツリガネゴケゲノム上に複数存在することを報告している。しかし、ヒメツリガネゴケに認められた応答が病害応答で重要な役割を担う R 遺伝子を介したものなのか、また、生産された SA は病害応答に寄与するものなのかどうか、SA など各々の病害応答性ホルモン類間に相互関係がみられるかどうかについて観察された例はない。R 遺伝子についても、JGI や COSMOSS といったデータベースにおける記載は不十分と言わざるをえない。種子植物で NL 型に続き大きなグループを形成するとされる KLR 型 R 遺伝子については報告がない。このような状況をうけて、本研究では、(1) エリシター応答に関する研究 (2) ホルモン応答と細胞死との関係の解析 (3) ヒメツリガネゴケにおける R 遺伝子ホモログの探索を行い、病害応答植物のモデルとしてのヒメツリガネゴケの可能性を示した。

(1) では、 $\text{CuCl}_2(\text{II})$ に対するヒメツリガネゴケの応答を確認した。 $\text{CuCl}_2(\text{II})$ 処理することで、キトサン処理時と同様に細胞死が誘導された。また、PAL、CHS の発現が誘導され、LOX 遺伝子の発現は誘導されなかった。 $\text{CuCl}_2(\text{II})$ を処理したところ同様に ROS の生成を確認した。この ROS 生成量は、WT よりも Prx34 をノックアウトした株 (ΔPrx34) でより高かった。 $\text{CuCl}_2(\text{II})$ 処理したとき、キトサン処理時とは異なり Prx は放出されなかった。PAL の発現が誘導されていること、細胞死が誘導され、LOX の発現が誘導されていないことから、 $\text{CuCl}_2(\text{II})$ 処理時には ABA を介した細胞死抑制機構が働いていないと考えられた。 ΔPrx34 株における ROS の生成は、ヒメツリガネゴケについてこれまで確かめられていた Prx 以外に ROS の生成源があることを示唆していると考えられる。

(2) では植物ホルモン SA と ABA を前処理したヒメツリガネゴケにおける、キトサンエリシターにより誘導される細胞死の変化を確認した。キトサン処理時の細胞死は ABA 前処理により抑制された。この ABA による細胞死の抑制は、SA を高濃度で処理することで解除され細胞死が誘導された。ABA による細胞死の抑制、SA によるその抑制の解除は、種子植物で報告されている SA、ABA 間の相互関係と同じものがコケに存在することを示唆している。また、セン類であるエゾスナゴケ (*Racomitrium japonicum*) でも同様の応答を確認した。このことから、本研究で観察された SA と ABA に対する応答は、セン類に共通する応答である可能性が考えられた。

(3) ではヒメツリガネゴケゲノムから R 遺伝子ホモログの探索を行った。シロイヌナズナの TIR-NL と相同性をもつ 4 個の TIR-NL 型を見出したが、これらのうち 3 個の PpTIR-NL の C 末端には、tetratricopeptide repeats か zinc finger ドメインが存在した。ヒメツリガネゴケゲノムから 603 個の kinase 様、475 個の NBS 様と 8594 個の LRR 様配列を PpC24 (PpKNL1) を用いたホモロジー検索により見出した。それらの情報を基に、17 個の KNL 型 R 遺伝子ホモログ (PpKNLs) を見出した。系統解析の結果 PpKNL の NBS は TIR タイプではあるものの、種子植物の TIR-NL の NBS と異なるグループに属すると考えられた。また、ヒメツリガネゴケから SGT1 のホモログも見出された。しかし、PpKNL のうち PpKNL1、PpKNL6 について解析した結果、PpSGT1 との相互作用は Y2H 解析からは確認されなかった。次にイネ OsXa21、シロイヌナズナ FLS2 との類似性から KLR 型 R 遺伝子ホモログを探索した。結果、11 個の KLR 型 R 遺伝子ホモログ (PpKLRs) を見出した。これら 11 個の PpKLRs を系統解析した結果、PpKNL36、PpKLR39、PpKLR40、PpKLR43 の 4 つがイネ OsXa21 と同じクラスターを形成した。これらはいずれも TM ドメインを有していたが、OsXa21 と異なって膜近傍ドメインをもたず、また、うち 3 つは OsXa21 と異なって RD kinase と予想された。さらに OsXa21 と相互作用することが知られている XB3 のホモログ (PpXB3s) をヒメツリガネゴケゲノムから 14 個見出した。これら XB3 ホモログのうち 2 つについて Y2H 解析した結果、PpKNL36、PpKLR39、PpKLR40、PpKLR43 すべてがこれらの PpXB3 ホモログと相互作用することを確認した。このことからヒメツリガネゴケには、イネにおける OsXa21 を介したシグナル伝達機構と類似した機構が存在する可能性があると考えられた。

これらの結果から、ヒメツリガネゴケの病害応答モデル植物としての可能性を議論した。

論文審査結果の要旨

本研究は、モデル植物として注目されているヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を使って植物の病害応答機構を研究するための実験系を構築することを目的に行われた。ヒメツリガネゴケはモデル植物として優れた特長をもち、特に、遺伝子ノックアウト解析を容易に実施できるという注目すべき性質がある。そのため、ゲノム情報もよく整備されている。

植物は周囲に存在する病原菌から絶えず自身を防御しなければならない。この防御システムは2つに分けて考えられている。すなわち、抗菌性物質の蓄積等による受動的防御システムと病原菌種特異的に感染を認識する抵抗性遺伝子 (Resistance gene: R 遺伝子) を介する能動的防御システムである。実際の防御はこれらが相互に関係しあい、さらに他の組織・近傍に存在しない場合も含めて一からの影響も受け、きわめて精巧かつ複雑なシステムによって行われている。言うまでもなく植物の病害防除法の開発は非常に重要であり、防御メカニズムの研究は極めて活発に行われてきた。しかし、その複雑さのゆえに解明が待たれている問題は多い。著者の所属するグループは早くからヒメツリガネゴケのモデル植物としての有用性に着目し、ヒメツリガネゴケゲノムに R 遺伝子様の遺伝子が存在する可能性を他に先駆けて指摘してきた。本研究はそれを発展させるとともに、新たな研究の糸口を示唆する意義あるものとなっている。

本研究は、大きく3つの内容に分けられる。すなわち、(1) エリシター応答に関する研究、(2) エリシター応答時のホルモン応答と細胞死との関係の解析、(3) R 遺伝子ホモログの探索、である。

(1) では、エリシターとして重金属 $\text{CuCl}_2(\text{II})$ に対する応答を確認している。ヒメツリガネゴケも種子植物と同様に $\text{CuCl}_2(\text{II})$ 処理によって細胞死が誘導される。キトサンエリシター処理時にも同様に細胞死がみられるが、キトサン処理の場合は培地中に特定のペルオキシダーゼが放出されるのに対しペルオキシダーゼ放出は見られなかったという。さらに興味深いことに、このペルオキシダーゼ (Prx34) をノックアウトした株ではより高い活性酸素種 (ROS) 生成が検出された。Prx34 ノックアウト株ではキトサンによる ROS 生成は見られないことがすでに知られており、このことは、キトサンと $\text{CuCl}_2(\text{II})$ とではその誘導する反応が異なっていることを示唆している。ROS 生成源としては NADPH Oxidase が代表的であるが、ヒメツリガネゴケの NADPH Oxidase 活性とその調節に関する情報は非常に乏しい。ヒメツリガネゴケの NADPH Oxidase はキトサン処理時には働かないのに対し $\text{CuCl}_2(\text{II})$ 処理時には働き、かつ、 $\text{CuCl}_2(\text{II})$ により誘導された ROS は、おそらく Prx34 等に消去されるためあまり強いシグナルとして検出されないと考察することができる。これらは、すべてヒメツリガネゴケについては新規に報告された現象である。本研究は、ヒメツリガネゴケがエリシター応答に関わる情報伝達と ROS 生成の調節機構に関する有用な実験系となる可能性を示唆している。

(2) では、病害応答時における植物ホルモンの作用に関する現象を観察している。種子植物ではエリシター処理時のホルモン条件が細胞死に影響することが知られている。このときに関係する植物ホルモンは、代表的にはサリチル酸 (SA) とアブシシン酸 (ABA)、ジャスモン酸である。これらのホルモンは相互に影響しあい、最終的に細胞死を誘導する、あるいは、抗菌性物質を合成する、といった結果をもたらすと考えられている。このホルモン間の相互作用 (いわゆるクロストーク) は、近年特に活発に解析がすすめられている問題のひとつであるが、本研究では、これをヒメツリガネゴケによって解析する可能性について検討した。研究では、SA と ABA を前処理したヒメツリガネゴケに対してキトサンエリシターを処理した際に誘導される細胞死の変化を観察している。キトサンにより誘導される細胞死は ABA 前処理により抑制されたが、SA を高濃度で処理することで抑制解除されると考えられた。これは種子植物で知られている現象とよく類似している。緑化に使用されるエゾスナゴケ (*Racomitrium japonicum*) でも同様の反応が観察され、蘚類一般に見られる傾向ではないかとしている点も興味深く、かつ有用な情報と考えられる。

(3) はさらに2つの内容に分けられる。最初に、ヒメツリガネゴケのゲノム情報を利用して R 遺伝子様の遺伝子を探索している。著者らのグループでは早くから TIR-NBS-LRR タイプ (TNL 型) の R 遺伝子にみられる NBS ドメイン様の配列がヒメツリガネゴケに存在すること、この NBS の N 末端側には TIR ドメインではなく Kinase ドメインが存在する (KNL 型) ことを報告してきた。その後、広範囲にゲノムから NBS 配列を探索した結果、ヒメツリガネゴケには KNL 型の配列が多数存在するという報告が他のグループからなされた。これを確かめるために、各ドメイン (TIR、NBS、LRR、Kinase) を個別に探索し、さらにその位置関係を調べた。ヒメツリガネゴケの遺伝子モデルは JGI データベースなどに整備されているが、そこに提案されているモデルではこのようなドメイン間を詳細に比較することが行われておらず、R 遺伝子様と表記されている例は限られている。探索の結果、ヒメツリガネゴケには TNL 型の遺伝子が 4 個、KNL 型の遺伝子が 17 個推定された。系統解析の結果、ヒメツリガネゴケの KNL 型遺伝子の NBS ドメインが種子植物の TNL 型遺伝子の NBS ドメインとは異なるグループに属することが示唆された。このような詳細な比較はこれまでに行われたことがなく、これは、KNL 型の遺伝子 (種子植物の R 遺伝子としてはコムギに存在) がヒメツリガネゴケで独自に変化してきたことを示唆するものであろう。なお、シロイヌナズナとイネでは KNL 型遺伝子は知られておらず、一方、TNL 型はシロイヌナズナに 200 個以上存在する。NBS ドメインを有する R 遺伝子 (NL 型と総称) は種子植物で最も大きなグループを形成すると言われているものの、そのメカニズムについては詳細な解明が必要とされている。いくつかのモデルが提案されているが、SGT1 等の複数のタンパク質と複合体を形成してシグナル伝達に関わるというものが有力である。探索の結果、SGT1 のホモログがヒメツリガネゴケでも見出された。しかし、本研究では KNL から分離した LRR との直接的な相互作用を確認することはできなかったという。他のタンパク質の関与など今後の検討が待たれるであろう。つづいて、Kinase-LRR 型 (KLR 型) の R 遺伝子の探索結果が報告されている。KLR 型遺伝子産物は細胞外に LRR の、細胞内に kinase の各ドメインをもつレセプターである。植物ではイネの Xa21 やシロイヌナズナの FLS2 に代表され、比較的解析が進んでいる (イネでは 150 個、シロイヌナズナでは 26 個存在すると考えられている)。しかし、コケにおける KLR 型遺伝子の存在について解析された報告は知る限り存在しない。解析の結果、Xa21 をコードする遺伝子のホモログ (PpKLR) がヒメツリガネゴケに少なくとも 11 個存在すると予想された。それらを系統解析した結果、Xa21 と同じクレードに存在する遺伝子が 4 個あることがわかった。この 4 個はいずれも発現しており、かつ膜貫通型であると予測された。また、イネ Xa21 は XB3 と呼ばれるタンパク質と相互作用しシグナル伝達にかかわると考えられているが、ヒメツリガネゴケにも XB3 のホモログ (PpXB3) を複数見出すことができた。ヒメツリガネゴケの PpKLR と PpXB3 との相互作用性を Y2H 解析した結果、用いられた 4 個の PpKLR と 2 個の PpXB3 はいずれも相互作用しうることが確かめられた。このことは、Xa21 タイプの膜局在性 kinase とその相互作用するタンパク質がヒメツリガネゴケに存在することを示している。このことは本研究において初めて明らかにされた。

コケが病害を受ける現象は知られているが、コケに感染する微生物に関する情報は体系だっていない。特定の病原菌と病徴の発達との関係が知られていないことは課題として残るが、本研究の結果はいずれも、ヒメツリガネゴケを植物の病害応答機構の解明に使用する可能性を強く示唆するものである。特にイネ Xa21 のホモログがその相互作用しうるタンパク質とともに見出されたことは、Xa21 に関して提案されている病害応答機構モデルがヒメツリガネにも適用される可能性を示すものと考えられる。

以上のように、本論文は、植物の病害応答機構の解明にヒメツリガネゴケを利用する可能性を明らかにしたと同時に、研究をさらに深化させるうえで有益かつ興味深い知見をもたらしたものであり、博士 (工学) 論文として価値あるものと認める。