

論文内容の要旨

申請者氏名 Nguyen Phuong Thao

植物の自然免疫反応は、エリシターなどの病原菌に特有な分子パターンを認識して誘導される PAMPs 誘導抵抗性と、R タンパク質による病原菌の分泌タンパク質の認識によって誘導される R タンパク質依存抵抗性に分けられる。耐病性因子として知られている RAR1 は、HSP90 と相互作用して R タンパク質の安定性を制御するとともに、PAMPs 誘導抵抗性にも関与している。イネ低分子量 G タンパク質 OsRac1 もまた PAMPs 誘導抵抗性と R タンパク質依存抵抗性において中心的な役割を果たしていることが知られていたが、RAR1 や HSP90 との関係については不明であった。

本研究では、OsRac1 が形成する複合体について生化学的な解析を行ない、複合体の構成因子の同定とその機能解析を行った。OsRac1 を過剰発現させたイネ培養細胞を用いて免疫沈降法による解析を行ったところ、OsRac1 複合体に RAR1、HSP90、HSP70 が含まれることが明らかとなった。OsRac1 信号伝達系における RAR1 の機能を解析するために、活性型(CA)-OsRac1 を発現する細胞に RAR1 RNAi 遺伝子を導入した培養細胞を作成した。CA-OsRac1 培養細胞では、エリシター処理により防御遺伝子の発現や活性酸素生成が強く誘導されるが、RAR1 の発現抑制により、それらの誘導が抑制されることが示された。また、RAR1 RNAi と同じ効果が、HSP90 の阻害剤である GDA(geldanamycin)を処理した場合にも検出された。このことから、RAR1 と HSP90 は OsRac1 と複合体を形成し、耐病性の情報伝達に関与していることが示された。さらに、GDA 処理により、OsRac1 と RAR1 の複合体形成が阻害されることが明らかとなり、HSP90 の機能は OsRac1 複合体形成において必須であることが示された。

OsRac1 の相互作用因子として同定された Sti1 は、HSP90 と HSP70 とともにシャペロンとして機能していることが報告されている。免疫沈降実験により、Sti1 は OsRac1 や HSP90 と複合体を形成し、その複合体形成は RAR1 と同様に GDA によって阻害されることがわかった。さらに、耐病性誘導における Sti1 の機能を明らかにするために、Sti1 発現抑制体と Sti1 過剰発現体を作成し、防御遺伝子の発現を解析したところ、Sti1 の発現レベルは防御遺伝子の発現レベルと完全に相関しており、Sti1 は抵抗性誘導の正の制御因子であることが示された。

本研究により、OsRac1 は RAR1、HSP90、Sti1、HSP70 と複合体を形成し、病原体認識から抵抗性誘導における信号伝達系を制御していることが明らかとなった。さらに、この複合体形成は OsRac1 の機能発現に必須であることが示された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Nguyen Phuong Thao

本論文は、植物の耐病性誘導の鍵因子として働く低分子量 G タンパク質 **OsRac1** の生化学的解析により、**OsRac1** が **RAR1**、**HSP90**、**HSP70**、**Sti1** と複合体を形成していることを明らかにし、さらにこの複合体形成が **OsRac1** を介した抵抗性誘導に必須であることを発見した。

これまでの解析により、**OsRac1** が活性酸素シグナルの誘導、防御遺伝子の発現、リグニンの生成など様々な防御反応を制御する信号伝達因子として機能していることが示されてきたが、**OsRac1** が形成する複合体に関しては、全く不明であった。本研究では、免疫沈降解析によって、**OsRac1** が耐病性因子として知られていた **RAR1** や **HSP90**、**HSP70** と複合体を形成していることを発見した。また、**RAR1** の発現抑制体や **HSP90** の阻害剤を用いた実験により、**RAR1** や **HSP90** が **OsRac1** に依存した抵抗性誘導に関与していることを示すことに成功した。また、**HSP90** の阻害剤によって、**OsRac1** の複合体形成が阻害されることから、**HSP90** が **OsRac1** の複合体形成に重要であり、さらに **OsRac1**-**HSP90**-**RAR1** の複合体形成そのものが抵抗性誘導に必要不可欠であるという非常に重要な知見が得られた。

HSP90 と **HSP70** との相互作用によりシャペロンとして機能する **Sti1** が **OsRac1** の相互作用因子として同定されていたが、耐病性反応における **Sti1** の機能は全く不明であった。本論文において、**Sti1** 発現抑制体および **Sti1** 過剰発現体における防御遺伝子の発現解析により、**Sti1** が耐病性誘導のポジティブレギュレーターとして機能していることを見出しており、耐病性研究における新規な知見である。さらに、**Sti1** が **OsRac1** や **HSP90** と複合体を形成していることが示されたことから、植物の耐病性誘導を調節する **OsRac1**、**RAR1**、**Sti1**、**HSP90**、**HSP70** のタンパク質ネットワークの存在が示唆された。これまで、**RAR1** や **HSP90** が受容体を介した抵抗性誘導において重要な役割を果たしていることが明らかになっているが、その分子機構については解明されていなかった。本研究により、**RAR1** や **HSP90** が **OsRac1** 複合体の構成因子として抵抗性誘導に関わっていることが明らかとなり、病原菌認識から抵抗性発現に至る情報伝達機構の分子的基盤について重要な知見をもたらした研究であるといえる。

以上のように、本論文は耐病性誘導の分子スイッチとして働く **OsRac1** の複合体の生化学的・分子生物学的解析により新規な抵抗性誘導メカニズムを解明したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。