

論文内容の要旨

申請者氏名 中 島 綾 子

低分子量 G タンパク質は活性型 (GTP 型), 不活性型 (GDP 型) の 2 つの構造をとることで, 動植物共通してさまざまなシグナル伝達の分子スイッチとして機能している。植物には Rho ファミリーに相当する Rac/Rop ファミリーが存在する。これまでに Rac/Rop ファミリーは, 花粉管の伸長, 細胞分化及びストレス応答等で機能していることが報告されており, イネでは 7 遺伝子, シロイヌナズナでは 11 遺伝子から成っている。

植物の自然免疫応答における Rac/Rop ファミリーの働きは, イネ, オオムギを用いて研究されている。我々の研究室では, これまでにイネの OsRac1 が抵抗性遺伝子を介するいもち病や白葉枯病に対する抵抗性反応や, アセチルキトオリゴ糖やスフィンゴ脂質エリシターによって誘導される自然免疫応答に機能していることを明らかにしている。

本研究では, イネの自然免疫応答に関わる OsRac1 を中心とした複合体の構成成分を明らかにするため, プロテーム解析の手法を用いた。OsRac1 アフィニティークロマトグラフィーと質量分析の結果から OsRac1 と相互作用するタンパク質として 5 つの NB-LRR 型タンパク質, stress-inducible protein 1 (STI1) 及び RACK1 (Receptor for Activated C-Kinase 1) を同定した。NB-LRR 型タンパク質は抵抗性遺伝子産物の主要なクラスでシロイヌナズナには約 150, イネには約 600 存在する。STI1 は, 哺乳類では Hop として知られており HSP90 や HSP70 のコシャペロンとして機能し, 3 つの tetratricopeptide repeat (TPR) domains をもっている。RACK1 は動物では多くのシグナル伝達でさまざまなタンパク質と相互作用することがわかっている。RACK1 の構造はトリプトファン, アスパラギン酸が約 40 アミノ酸配列ごとに現れ (WD リピートドメイン), β シート配列を 7 回持っている。その構造解析の結果からスキャフォールド (足場) タンパク質であると考えられている。

私は RACK1 がイネの自然免疫応答にどのように関わっているのかを明らかにするため機能解析を行った。イネには *RACK1A*, *RACK1B* の 2 つの遺伝子が存在し, 質量分析によって同定されたタンパク質は RACK1A であった。RACK1 は 7 つの WD40 リピートドメイン (WD1~7) を有し, 活性型 OsRac1 は RACK1A の WD1 及び WD2 ドメインを介して直接相互作用することがわかった。また, イネの培養細胞を用いた共免疫沈降によって恒常的活性型 OsRac1 複合体に RACK1A が存在することを明らかにした。OsRac1 は遺伝子発現及び転写後制御の両方において *RACK1A* を正に制御していることがわかった。また, *RACK1A* の遺伝子発現はエリシター, アブシジン酸, ジャスモン酸及びオーキシンによっても誘導され, *RACK1A* は植物免疫応答だけでなく, 植物ホルモンに対する応答においても機能していると考えられた。*RACK1A* の過剰発現体および発現抑制体を用いた解析から, *RACK1A* は活性酸素種の生成及びイネいもち病菌に対する抵抗性に機能していることがわかった。実際, RACK1A は Rboh の N 末端領域に結合することから, RACK1A は直接的な相互作用により Rboh の活性を制御していると考えられる。さらに, RACK1A は OsRac1 複合体の構成因子として同定された植物免疫応答の分子シャペロンである RAR1 や SGT1 と相互作用することが示された。本研究の結果から RACK1A は, OsRac1 複合体中で防御応答の主要なタンパク質と相互作用し, イネの自然免疫応答に関わっていることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 中 島 綾 子

本研究は、プロテーム解析の手法を用いて低分子量 G タンパク質 OsRac1 と相互作用するタンパク質を同定することに成功した。質量分析の結果、合計 21 個のタンパク質を同定し、その中には耐病性に関与すると考えられる 5 つの NB-LRR 型タンパク質, stress-inducible protein 1 (STI1) 及び RACK1 (Receptor for Activated C-Kinase 1) が含まれていた。

RACK1 がイネの自然免疫応答にどのように関わっているのかを明らかにするため機能解析を行った。酵母 two-hybrid 法によって、RACK1A の WD1 及び WD2 ドメインを介して活性型 OsRac1 と直接相互作用することがわかった。また、イネの培養細胞を用いた共免疫沈降によって恒常的活性型 OsRac1 複合体中に RACK1A が存在することを明らかにした。RACK1A の過剰発現体および発現抑制体を用いた解析から、RACK1A は活性酸素種の生成及びイネいもち病菌に対する抵抗性に機能していることがわかった。さらに、RACK1A は OsRac1 複合体の構成因子として同定された植物免疫応答の分子シャペロンである RAR1 や SGT1 と相互作用することが示された。

本研究では、アフィニティークロマトグラフィー及び質量分析によって OsRac1 と相互作用する新規な因子 RACK1A を同定した。また、RACK1A は OsRac1 複合体中で防御応答の主要なタンパク質と相互作用し、イネの自然免疫応答に関わっていることを明らかにした。

以上のように、本論文はプロテオーム解析の手法を用いてイネの自然免疫応答に関わる新規な因子を同定したもので、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。