

## 博士論文を要約したもの

博士論文題目 細胞の水輸送制御を介した植物の防御応答機構の解明

氏 名 平瀬 大志

(要約)

要旨：

水は膨圧の維持や光合成など植物が生命を維持するために必須であり、植物の環境適応は水の輸送制御メカニズムに大きく依存している。例えば、降雨などによる多湿（植物が適切に水の輸送制御ができない）環境では、植物病害が深刻化することが知られている。細胞の内外へ水を輸送するタンパク質として、動植物で保存された水チャネル（アクアポリン）がある。近年、アクアポリンの活性制御が、孔辺細胞の水の輸送制御を介して膨圧調節を行うことで気孔の閉鎖応答に寄与することが明らかとなってきた。しかしながら、病原菌の感染や病害の深刻化・拡大と植物の水輸送制御との関係性について分子レベルの知見は極めて乏しく、アクアポリンの活性制御が防御応答に関与するかは不明であった。そこで本研究では、シロイヌナズナにおいてトマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*)に対する水の輸送制御を介した植物の防御応答について調査した。

植物の細胞膜に存在するパターン認識受容体（PRR）は、病原菌の出現や感染を感知し、増殖を抑える上で中心的な役割を果たす。内生の免疫制御ペプチド Pep を認識する受容体 PEPR の新規相互作用因子を探索したところ、細胞膜局在型アクアポリン（PIP）の分子種を複数検出した。また、細菌の鞭毛成分（flg22）を認識する FLS2 についても、PEPR と同様に PIP と相互作用することを突き止めた。よって、PRR-PIP の相互作用を介した水制御メカニズムが病原細菌に対する防御応答として寄与することが考えられた。

シロイヌナズナのロゼット葉で高発現している PIP 3 分子種に着目し、病原細菌抵抗性に PIP が重要であるかどうか検証した。*Pst* は、感染時に増殖の場である葉の細胞間隙に水を蓄積して（Water soaking）、自身の増殖を促進する。そこで *Pst* の誘導する Water soaking や増殖への影響を、上述した PIP 3 分子種の欠損変異体において調査した。野生型植物（WT）と *pip* 三重欠損変異体との間で、*Pst* 野生株に対しては増殖や Water soaking の程度に差異が認められなかった。しかしながら、弱毒株であるエフェクター分泌装置を欠損した *Pst*  $\Delta$ hrcC を接種した場合、WT では Water soaking が誘導されない一方で、*pip* 三重変異体では Water soaking が誘導された。この結果から、*Pst* が water soaking を誘導する際にはエフェクターが必要であること、並びにエフェクターを介して PIP を不活化させることが示唆された。さらに、特定の PIP 1 分子種の欠損のみで *Pst*  $\Delta$ hrcC が water soaking を誘導できるようになる一方で他の PIP 分子種の単独欠損では誘導されなかったことから、特に当 PIP 分子種が *Pst* による Water soaking の抑制に寄与することが示唆された。加えて、当 PIP 分子種の欠損

変異体植物では *Pst* Δ*hrc* の増殖も顕著に増加したことから、当 PIP 分子種が病原細菌抵抗性に重要であることが明らかとなった。

これまでに、PIP2;1 については 121 番目の Ser (S121) が免疫活性化時にリン酸化され、気孔閉鎖については病原細菌の侵入前抵抗性に重要な働きをすることが報告されている。そこで、侵入後抵抗性に寄与する当 PIP 分子種についても PIP2;1 と同様に気孔閉鎖応答に寄与するかどうか調査した。その結果、当 PIP 分子種の欠損変異植物は、*flg22* 誘導性の気孔閉鎖応答、および *Pst* に対する侵入前抵抗性（葉表面に接種して計測）が WT と同等であることが判明した。よって、当 PIP 分子種は、気孔閉鎖応答を介した侵入前抵抗性には必要ではないと考えられた。また、シロイヌナズナは、病原細菌に対する侵入前抵抗性および侵入後抵抗性において、それぞれ異なる単独 PIP 分子種に主に依存していることが示され、防御応答の様式に応じて異なる PIP 分子種を活用していると推定された。

PRR-PIP の相互作用の意義について調査するため、当 PIP 分子種のリン酸化が PRR の活性化に伴い誘導されるか検証した。PRR 活性化時のリン酸化プロテオームデータを照合した結果、当 PIP 分子種における PRR 誘導性のリン酸化を受ける部位が判明した。そこで、同定されたリン酸化部位が水輸送活性に与える影響について、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた異所発現系において解析した。その結果、上記リン酸化部位へリン酸化阻害置換を導入すると水輸送活性が著しく低下することがわかった。

植物内での当部位のリン酸化の生理的意義について詳細に検証するため、リン酸化阻害体もしくは疑似リン酸化体を発現する形質転換植物体（当 PIP 分子種の欠損背景）を作出し、*Pst* Δ*hrcC* 接種葉における Water soaking および細菌増殖の測定を行った。その結果、野生型 PIP もしくは疑似リン酸化体の導入により、Water soaking および細菌増殖に対する抵抗性は WT と同等レベルに回復した一方で、リン酸化阻害体の導入では上述の PIP 分子種欠損の表現型が相補されなかった。以上の結果から、当該部位のリン酸化が Water soaking の抑制および細菌抵抗性に寄与することが示唆された。

PRR-PIP 経路を介した細菌抵抗性メカニズムに重要なリン酸化制御機構を明らかにするため、当 PIP 分子種の上記部位をリン酸化するキナーゼの探索を行った。上述したリン酸化プロテオーム解析では、当部位のリン酸化は *flg22* 処理後 30 分以内に顕著に増加する。まず、PRR 複合体中に存在するキナーゼが当リン酸化を触媒する可能性を検証した。PRR 複合体を構成する PEPR, BAK1, BIK1 を用いて In vitro リン酸化アッセイを行った結果、BAK1 が当 PIP 部位のリン酸化活性を有することが示された。

本研究により、以下の結論が得られた。① PIP による水輸送制御は、PRR を介した病原細菌に対する侵入前抵抗性及び侵入後抵抗性に重要であり、それぞれ特定の PIP 分子種に大きく依存する、② PRR の活性化に伴う当 PIP 分子種の上記部位のリン酸化は Water soaking の抑制に寄与する、③ BAK1 が当部位をリン酸化するキナーゼの一候補である。