

氏 名 小笠原 希実

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1252 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 新奇小胞体由来オルガネラ"ER ボディ"の機能解析

論文審査委員 主 査 教授 大隅 良典
教授 西村 幹夫
教授 飯田 滋
教授 三村 徹郎（神戸大学）

小胞体由来の新奇オルガネラである ER ボディは、シロイヌナズナをはじめとするアブラナ科植物に存在する。ER ボディは、アブラナ科植物の幼植物体全身の表皮に恒常的に存在するが、成熟葉には存在しない。アブラナ科植物の幼植物体全身の表皮に恒常的に存在する ER ボディを恒常型 ER ボディと名付けた。恒常型 ER ボディを欠く突然変異体 *nail* 変異株の解析から、恒常型 ER ボディに含まれる主な構成成分は PYK10 と呼ばれる β グルコシダーゼであることがわかっている。一方で、恒常型 ER ボディが存在しない成熟葉に傷害を与えると、傷口の周りに ER ボディが誘導される。この傷害により誘導される ER ボディを誘導型 ER ボディと名付けた。

恒常型 ER ボディは、生体防御に関与する例が多く知られている β グルコシダーゼである PYK10 タンパク質を内部に蓄積することに加え、誘導型 ER ボディは傷害、食害、ジャスモン酸メチル処理によって誘導されることから、ER ボディの植物体内における機能は生体防御に関与すると考えられる。本研究では、傷害誘導と菌感染の二つを用いて、総合的な ER ボディの機能を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では傷害誘導を用いた誘導型 ER ボディの解析を行った。まず、ER ボディの数に着目し、誘導型 ER ボディが多く誘導される条件を検討した。その結果、小胞体を GFP で可視化した野生株 (GFP_h 植物体) の発芽 9 日目の子葉組織を用いると、傷害後 66 時間で ER ボディの数が増加することを見いだした。GFP_h 植物体の子葉の片方にのみ傷害を与えたところ、傷害を与えた子葉 (locally-wounded cotyledon) の ER ボディの数が 4 倍以上に増加するとともに、傷害を与えていない子葉 (systemically-wounded cotyledon) の ER ボディの数も 5 倍以上に増加した。GFP_h 植物体の子葉に傷害を与えた 66 時間後に定量 PCR を行った結果、恒常型 ER ボディの主な内容物である PYK10 の発現量は変わらず、そのホモログである BGLU18 の発現が誘導されることが判明した。これらの結果より、恒常型と誘導型 ER ボディの内容物は異なることが明らかとなり、それぞれの ER ボディが異なった機能を果たしていることが示唆された。

第 2 章では *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 (*avrRpm1*) 接種によって誘導されるシロイヌナズナの過敏感反応系および罹病性病原菌 *Pst* DC3000 (*vector*) を用いて、植物の防御機構と ER ボディ内容物 PYK10 タンパク質の関わりを検討した。本研究では、子葉の次に発生する 2 枚のロゼット葉を No. 1, 2 とし、以降の葉は発生の順に番号 (leaf number、以後 leaf No. とする) をつけ、それぞれの葉における防御応答を詳しく調べた。植物では本葉、特に No. 7 以降の葉での防御機構はよく調べられているが、それ以前の葉 (No. 1-6) の防御機構は調べられていない。leaf No. ごとに抵抗性が異なっているのではないかと考えた。

そこで本研究では、過敏感反応を起こさない *Pst* DC3000 (*vector*) および過敏感反応を起こす *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) 接種によって誘導されるシロイヌナズナの防御応答を調べ、ER ボディが存在する GFP_h 植物体と存在しない *nail* 変異株を比較することで、ER ボディおよび PYK10 と植物の生体防御機構の関連を明らかにすることを目的とした。ER ボディおよび PYK10 が蓄積しない *nail*、*pyk10* 変異体に *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) を接種した。接種後 3 日目の菌数を測定した結果、GFP_h 植物体と比較して *nail* 変異体では菌数が顕著に増加してい

た。*Pst*DC3000 (*avrRpmI*)は接種によって過敏感反応を引き起こすので、この生菌数の差と細胞死の関連を、細胞死の指標となるイオン漏洩伝導率の経時変化および感染 12 時間後のトリパンブルー染色を行い調べた。*Pst*DC3000 (*avrRpmI*)接種後の GFPh 植物体と *nail* 変異株では、すべての leaf No. においてイオン漏洩伝導率およびトリパンブルー染色に差がみられなかった。これらの結果より PYK10 は過敏感細胞死に直接関係ないことが明らかになった。

また、*Pst*DC3000 (*avrRpmI*)接種後の第 7 葉をもちいて、ER ボディの内容物である PYK10 の発現を定量 PCR を用いて調べたところ、未接種と比較して約 80 倍に発現が上昇していた。以上の結果から、PYK10 が細胞死に非依存的な抵抗性に関与していることが示唆された。

本研究では、傷害誘導および菌感染の手法を用いた解析より、ER ボディは植物の生体防御に深く関わっていることが示唆された。

論文の審査結果の要旨

小胞体由来の新奇オルガネラである ER ボディは、アブラナ科植物の幼植物体全身の表皮に恒常的に存在する（恒常型 ER ボディ）が、成熟葉には存在しない。一方で、成熟葉に傷害を与えると、傷口の周りに ER ボディが誘導される（誘導型 ER ボディ）。恒常型 ER ボディは、生体防御に関与する例が多く知られている β グルコシダーゼである PYK10 タンパク質を内部に蓄積することに加え、誘導型 ER ボディは傷害、食害、ジャスモン酸メチル処理によって誘導されることから、ER ボディの植物体内における機能は生体防御に関与する可能性が考えられる。本研究では、傷害誘導と菌感染の二つを用いて、総合的な ER ボディの機能を明らかにすることを目的としている。

第 1 章では傷害誘導を用いた誘導型 ER ボディの解析を行った。ER ボディの数に着目し、誘導型 ER ボディが多く誘導される条件を検討し、小胞体を GFP で可視化した野生株（GFP_h 植物体）の発芽 9 日目の子葉組織に傷害後 66 時間で ER ボディの数が明確に増加することを見いだした。GFP_h 植物体の子葉に傷害を与えた 66 時間後に定量 PCR を行った結果、恒常型 ER ボディの主内容物である *PYK10* の発現量は変わらず、そのホモログである *BGLU18* の発現量が誘導されていることが判明した。この結果より、恒常型と誘導型 ER ボディの内容物は異なることを明らかにし、それぞれの ER ボディが異なった機能を果たしていることが示唆された。

第 2 章では *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 (*avrRpm1*) 接種によって誘導されるシロイヌナズナの過敏感反応系を用いて、植物の防御機構と ER ボディ内容物 PYK10 タンパク質の関わりを検討した。*Pst* DC3000 (*avrRpm1*) 接種後 3 日目の菌数を測定した結果、GFP_h 植物体と比較して *nail* 変異体では菌数が顕著に増加していた。*Pst* DC3000 (*avrRpm1*) は接種によって過敏感反応を引き起こすので、この生菌数の差と細胞死の関連を、細胞死の指標となるイオン漏洩伝導率の経時変化および感染 12 時間後のトリパンプルー染色を行った。*Pst* DC3000 (*avrRpm1*) 接種後の GFP_h 植物体と *nail* 変異株では、イオン漏洩伝導率およびトリパンプルー染色では、差がみられなかった。これらの結果より PYK10 は過敏感細胞死に直接関係しないことが明らかになった。また、ER ボディの内容物である *PYK10* の発現を定量 PCR を用いて調べたところ、*Pst* DC3000 (*avrRpm1*) 接種によって未接種と比較して約 80 倍にその発現が上昇していた。以上の結果から、*PYK10* が本葉の菌感染時においては、誘導的に細胞死非依存的な抵抗性に関与していることが示された。

本研究は、傷害誘導および菌感染の手法を用いた解析より、ER ボディとその誘導が植物の生体防御に深く関わっていることを初めて示したものとして高く評価され、博士論文に値するものと審査員一致で判断された。本研究の成果の一部は既に国際専門誌に掲載されることが決定している。