



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on Arabidopsis ERF9 and NSL2 involved in stress responses [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	丸山, 洋介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11167号
Issue Date	2013-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54659
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yosuke_Maruyama_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏名 丸山 洋介

学位論文題名

Studies on Arabidopsis ERF9 and NSL2 involved in stress responses.

(環境ストレスに関与するシロイヌナズナ ERF9 と NSL2 の研究)

植物は様々な環境変動に対応するために多くのストレス適応機構を兼ね備えている。その中でも細胞死は、発生や成長、病原菌に対する抵抗性や老化現象に深く結びついている。私は、病原体応答に関与する *ERF9* 遺伝子の上流及び下流の制御機構について、また細胞死誘導を制御する *NSL2* 遺伝子の機能解析を行い、植物の環境ストレス応答機構の解明を試みた。

1. シロイヌナズナ転写因子 ERF9 が調節する病害抵抗性の解析

植物は、バクテリアやウイルスから身を守るために過敏感細胞死(HR)を誘導する。HR が感染部位付近で誘導されることにより、植物は、病原菌の拡大を抑制する機構を備えている。HR は、病原菌の感染以外にも、発生、傷害、老化、高温、抗菌性のタンパク質の蓄積など、様々な現象に関与している。シロイヌナズナの *DEAR1* 過剰発現体は、病原菌 *b. cinerea* に対して抵抗性を有している。*DEAR1* 過剰発現体を用いた microarray による解析から、転写因子 *ERF9* の発現抑制が報告されていた。

本研究では、*DEAR1* が *ERF9* のプロモーター領域に結合することで *ERF9* の発現を抑制し、その下流の *PDF1.2* を制御していることを証明した。*DEAR1* と *ERF9* の相互作用については、EMSA を用いた in vitro 実験系を用いて、また、*DEAR1-GFP* を強発現する形質転換体を用いて ChIP を行い、その相互作用について in vivo 実験系を用いて証明した。*ERF9* による *PDF1.2* の転写抑制制御については、同様に EMSA とレポーターアッセイを持いた vitro 実験系により、また、変異体の病原菌に体する抵抗性と mRNA の発現解析による in vivo 実験系により証明した。

これらの結果から、病原体感染時には *DEAR1* は *ERF9* の発現を抑制し、抑制型の転写因子である *ERF9* が減少することにより、抗菌活性を示す *PDF1.2* の発現を増加させ、これにより病害抵抗性が上昇することを明らかにした。

2. シロイヌナズナ NSL2 が制御する細胞死誘導機構の解明

シロイヌナズナの *nsL2* 変異体は恒常的に細胞死を引き起こす表現型を示す。原因遺伝子 *NSL2* は、MACPF ドメインを含むタンパク質をコードしている。動物では MACPF タンパク質

は自然免疫に関与することが知られているが、植物での機能は不明のままであった。これまでに、MSL2 ホモログの中で、*NSL1* と *NSL2* 変異体のみが細胞死の表現型を示すことが報告されている。しかしながら、その細胞死誘導機構の詳細については明らかにされていない。近年、*ns12* 変異体では、葉緑体の分解に関わる酵素の減少によって、葉緑体の分解物の中間産物である pheophorbide a が蓄積して細胞死が誘導されることが明らかにされた。

本研究では、*NSL2* 遺伝子の過剰発現体を作成し、表現型を解析した。この過剰発現体では、遺伝子欠損変異体と同様の恒常的な細胞死が観察された。また、*NSL2* 遺伝子プロモーター - *GUS* 形質転換体を用いて、*NSL2* の発現が活性酸素によって誘導されることと、病原菌の感染によって誘導されること示した。*NSL2-GFP* 融合遺伝子を用いた解析から、*NSL2* は細胞質と細胞膜に局在することが示唆された。これは動物の MACPF タンパク質の細胞内局在性と一致する。従来、*ns12* 変異体の解析から、病原体感染時の細胞死を伴う抵抗性は *NSL2* の分解によって誘導されていると考えられていたが、*NSL2* の蓄積も細胞死の誘導に関与する可能性が示された。

上記の研究を通して 1) においては、DEAR1 と ERF9 直接的相互作用によって病害応答経路を調節していることを明らかにし、既知の経路とは異なる新たな病害抵抗性経路の存在を証明した。2) においては、植物ではほとんど解析されていない MACPF ドメインを含むタンパク質の細胞内局在性と細胞死誘導の新たな経路の存在を明らかにした。