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_review.pdf, 審査の要旨



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨
Doctoral Dissertation Evaluation Summary

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　　氏　名　　丸山　洋介
Degree requested: Doctor of (Life Science)　　Name:　Maruyama Yosuke

審査担当者	主査 / Chief examiner	教　授	山口　淳二
Examiners	副査 / Associate examiner	教　授	田中　歩
	副査 / Associate examiner	准教授	藤田　知道

学 位 論 文 題 名
Title of Doctoral Dissertation

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）

博士学位論文審査等の結果について（報告）
Results of Evaluation of the Doctoral Dissertation (Report)

植物は様々な環境ストレスに適応するために多くの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。私の研究では，過剰発現体において恒常的に細胞死が誘導される *DEAR1* 形質転換体，遺伝子の機能不全で恒常的な細胞死が誘導される *nsl2* を解析することで，植物の細胞死を調節する機構を解明しようと試みた。

1. シロイヌナズナの転写因子 DEAR が制御する ERF9 が調節する病害抵抗性の解析

植物が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って生体内で, 病原菌の拡散を抑制する機構を植物は備えている。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(DREB and EAR motif protein 1)過剰発現体は病原菌の *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 による解析では ERF が抑制されていることが報告されていた。

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 を抑制してその下流の PDF1.2 を抑制していることを見いだした。DEAR1 と ERF9 の相互作用は in vitro の系で，EMSA を用いて DERA1 と ERF9 のプロモーター領域の *cis* 配列との結合を示した。また in vivo の系では DEAR1-GFP を強発現する形質転換体を用いて，ChIP を行い，相互作用を示した。ERF9 の PDF1.2 の制御については，同様に in vitro の系では EMSA とレポターアッセイを用いて示し，in vivo の系では，変異体の病原菌に対する抵抗性と，mRNA の発現解析を用いて ERF9 が抑制因子として働く可能性を示した。

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 PDF1.2 の発現を抑制することを明らかにした。

２．シロイヌナズナの NSL2 が誘導する細胞死のメカニズムの解明

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。これまでに，シロイヌナズナに４つ存在するホモログの内，nsl2 と *nsl1* 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，細胞死が誘導される機構については明らかにはされていなかった。近年では，*nsl2* 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* の過剰発現体を作成し，表現型を解析した。過剰発現体は変異体と同様の細胞死を恒常的に起こす表現型を示した。また *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をレポーターである GUS の上流に NSL2 のプロモーター領域付加した形質転換体を用いて示した。NSL2 の C 末端に GFP を付加したコンストラクトを用いた一過的発現系を用いて NSL2 の局在を解析した。GFP のシグナルから NSL2 は細胞質と細胞膜に局在することが示唆され，この結果は，既に報告されている,動物 やバクテリアの MACPF ドメインを有するタンパク質と同様の結果である。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，mRNA の発現と同様に，NSL2 の蓄積も細胞死の誘導に深くかかわっていと考えられ，*NSL2* の減少に伴う細胞死は老化時に誘導される細胞死だと考えられる。

上記の研究通して 1)では 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が明らかになり,既知の経路とは異なった新たな病害抵抗性経路が存在することが明らかになった。2)で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植物細胞内の局在が明らかになったことと，これまで、NSL2 の分解によって細胞死が誘導されると考えられていたが､蓄積によっても細胞死が誘導されることを明らかにした。

これを要するに，著者は，植物遺伝子 ERF9 と NSL2 の病害抵抗性に関する新規機能を明らかとした。これは，植物の病害抵抗性に関する新知見を得たものであり，今後の植物免疫学ならびに植物科学研究に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は，北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。