HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The study of salicylic acid-mediated defense responses by a tobacco calmodulin-like protein [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	田, 恩眞
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12879号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67373
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Eun_Jin_Jeon_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

博士の専攻分野の名称　博士（農学）　氏　名　Eun Jin Jeon

審査担当者　主査　教授　増田　税
副査　教授　伴戸久徳
副査　講師　中原健二

学位論文題名

The study of salicylic acid-mediated defense responses by a tobacco calmodulin-like protein

（タバコカルモジュリン様タンパク質により誘導されるサリチル酸を介した防御応答に関する研究）

本論文は英文 106 頁, 図 30, 表 3, 2 章からなり, 参考論文 1 編が付されている. カルモジュリン(CaM)およびカルモジュリン様タンパク質(CML)は, 他のカルシウム(Ca^{2+})結合タンパク質とともに植物では比較的に大きな遺伝子ファミリーを形成している. 細胞質における Ca^{2+}濃度の上昇は環境ストレスに曝された植物に必然的に伴う初期応答であり, それをシグナルとして下流に伝達するこれらの Ca^{2+}結合タンパク質は植物のストレス応答において重要な役割を果たす Ca^{2+}センサーである. CaM や CML タンパク質には Ca^{2+}が結合する EF ハンド領域以外, 明らかな機能領域はなく, 内生の多様なシグナル因子に結合して, それらの構造や活性を変えることでシグナルを伝達していると考えられる. しかしながら, 本研究で解析されたタバコの CML の一つ rgs-CaM は, ウイルスが感染細胞で発現する外生の RNA サイレンシング抑制タンパク質(RSS)に結合し, オートファジーによる分解に誘導することが以前の研究で報告された. RNA サイレンシングは植物の主要なウイルス防御機構の一つであり, それを阻害する RSS はウイルスの感染増殖に貢献する病原性決定因子として重要である. したがって, このウイルス RSS を分解に導く rgs-CaM の働きは, 植物がウイルスの RSS に対抗するために身につけた防御機構ではないかと思われる. 本研究では, さらに rgs-CaM が植物のウイルス防御に深く関与するサリチル酸シグナルを誘導する免疫受容体として働くことを明らかにした.

1. rgs-CaM を過剰発現した時にタバコ植物体で誘導される防御反応とサリチル酸シグナルの解析

カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター制御下で rgs-CaM を過剰発現する形質転換タバコの中の 2 系統で, 葉のえそや形態異常, 植物体の矮化が観察された. これらの表現型は, 過敏感反応様の細胞死やサリチル酸シグナルの誘導を伴う防御反応が恒常的に活性化された植物変異体に似ていた. そこで, これら rgs-CaM を過剰発現する 2 系統の形質転換タバコで実際に, サリチル酸シグナルが誘導されているのかを調べたところ, サリチル酸シグナルの指標となる病原性関連タンパク質 1a (*PR1a*)のメッセンジャーRNA(mRNA)のレベルがこれら形質転換タバコ

の葉で高くなっていることが確認された．rgs-CaM の過剰発現でサリチル酸シグナルが誘導されることを別のやり方で確かめることにした．rgs-CaM 遺伝子を組み込んだジャガイモ X ウイルスベクターを野生タバコに接種して，感染細胞で rgs-CaM を人為的に過剰発現したところ，接種葉で細胞死が観察され *PR1a* の mRNA のレベルも非感染の擬似接種葉に比べて有意に上昇した．rgs-CaM 遺伝子を持たないウイルスベクターを接種した場合には，接種葉の細胞死も *PR1a* の mRNA レベルの上昇も観察されなかった．これらの結果から，過剰発現した rgs-CaM はサリチル酸シグナルや細胞死を含む防御反応を誘導すると結論した．

2. rgs-CaM がウイルス感染を感知してサリチル酸シグナルを誘導する免疫受容体であることの証明

キュウリモザイクウイルス(CMV)を野生タバコに接種すると接種葉で *PR1a* の発現が強く誘導されるが，rgs-CaM の発現を抑制したタバコに接種した場合には *PR1a* は有意に誘導されなかった．これは，内生の rgs-CaM が CMV 感染に応じて接種葉で誘導されるサリチル酸シグナルに関わっている可能性を示している．接種葉の初期 CMV 感染細胞では，ウイルスの機械接種に伴う傷による Ca^{2+}流入と rgs-CaM と結合する CMV の RSS である 2b が発現する．そこで，rgs-CaM が Ca^{2+}と 2b に同時に結合して感知した時にサリチル酸シグナルが誘導されるのではないかと仮説を立てた．2b に加えて rgs-CaM と結合するポティウイルスの RSS である HC-Pro をウイルス感染なしに恒常的に発現する形質転換タバコを用いた実験でこの仮説を検証した．ウイルス RSS 発現形質転換タバコの葉における *PR1a* のレベルは野生タバコと変わりない．しかしながら，傷を付けたりカルシウムイオノフォア A23187 を葉に注入することで細胞内へのCa^{2+}流入を誘発すると 24 時間後には，RSS 発現形質転換タバコ葉で *PR1a* の発現が誘導された．野生タバコの葉で Ca^{2+}流入を誘発しても *PR1a* は誘導されなかった．そして，RSS 発現形質転換タバコの rgs-CaM の発現を RNA サイレンシングにより抑制すると Ca^{2+}流入による *PR1a* の誘導は弱まったことから，仮説通り rgs-CaM がウイルス感染のしるしとして，ウイルス RSS と Ca^{2+}を同時に感知してサリチル酸シグナルを誘導すると結論した．これまでに，病原体を感知する免疫受容体として CaM や CML が働く例はなく，本研究で，新規タンパク質が免疫受容体として働くことを証明したことになる．

以上，本研究では rgs-CaM の過剰発現，rgs-CaM とウイルスタンパク質及び Ca^{2+}との結合がサリチル酸シグナルに与える影響について解析することで rgs-CaM の免疫受容体としての新たな機能を明らかにすることができた．この成果は，ウイルス感染に対する植物の誘導免疫機構の解明に大きく寄与するものである．

よって審査員一同は，Eun Jin Jeon が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた．