



Title	イネにおけるトレハロース誘導抵抗性に関する分子生物学的研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	手塚, 大介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13587号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73975
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Tezuka_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（農学）

氏名 手塚 大介

学 位 論 文 題 名

イネにおけるトレハロース誘導抵抗性に関する分子生物学的研究

トレハロースは微生物や昆虫など広範囲の生物群に見出される二糖であり、貯蔵糖やストレス保護物質として機能する。高等植物においてもトレハロースが内生糖として存在するが、その蓄積量は極微量であり、植物中での生理機能については不明な点が多い。イネでは、根部へのトレハロース処理により、根部での防御関連遺伝子の発現と、地上部でのイネいもち病抵抗性が誘導される。トレハロースによって全身に抵抗性が誘導されるこの現象は、Trehalose-induced systemic resistance (TSR)と称される。TSR は、トレハロースが植物においてシグナル物質として機能する可能性を示している。そのため TSR を理解することで、植物におけるトレハロースの生理機能について新たな知見が得られると期待される。本研究では TSR の解明を目的として、シグナル伝達における植物ホルモンの関与を分子生物学的に解析した。TSR のシグナル伝達的一端を明らかにし、TSR の分子機構を推定した。

1. TSR における植物ホルモンシグナルの解析

TSR における植物ホルモンの関与を調べるため、トレハロース処理後のホルモン内生量を定量した。トレハロース処理された根部では、病害関連の植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA)，JA-イソロイシン (JA-Ile) およびサリチル酸 (SA) の内生量が速やかに増加した。次にこれらの蓄積が TSR を制御するかを検討した。JA 生合成変異株 (*hebiba*) および SA 分解酵素過剰発現株 (*NahG*) を用いて、ホルモン欠損状態での TSR を解析した。TSR において早期に誘導される転写因子遺伝子 10 種の発現を観察したところ、トレハロースによる発現誘導が *hebiba* でのみ消失する遺伝子 3 種、*NahG* でのみ消失する遺伝子 3 種、*hebiba* と *NahG* のいずれでも消失する遺伝子 3 種、*hebiba* と *NahG* のいずれでも観察される遺伝子 1 種に分類された。従って TSR における根部での遺伝子発現誘導は、JA シグナルと SA シグナルの両者に制御されることが示された。また *hebiba* と *NahG* を用いて、TSR における地上部での病害抵抗性を観察したところ、イネいもち病に対する抵抗性獲得は *NahG* においてのみ損なわれた。この結果から、TSR における地上部での病害抵抗性は主に SA シグナルにより制御されることが示され、JA シグナルの寄与は小さいことが示唆された。

2. トレハロース蓄積量改変株における防御応答の解析

トレハロースが TSR を引き起こす様式として、細胞内に取り込まれてから TSR を誘起する可能性と、細胞の外側から TSR を誘起する可能性の二つが予想された。前者の可能性を検証するため、トレハロース高蓄積株を用いて、TSR 様の現象が観察されるかを調べた。トレハロース分解酵素をコードする *OsTRE1* の変異株を CRISPR/Cas9 を用いて作出した。*OsTRE1* 変異株では、トレハロース分解活性の低下と、根部および地上部でのトレハロース高蓄積が観察された。*OsTRE1* 変異株の根部では、TSR 様の遺伝子発現誘導は明確には観察されなかった。この結果より、トレハロースの高蓄積は TSR 様の防御応答を誘導しないことが示唆され

た。トレハロースは細胞の外側から TSR を誘起すると考えられた。

3. トレハロース誘導性転写因子 OsERF83 の機能解析

SA シグナルが TSR における地上部での病害抵抗性を制御することが示された。一方で JA シグナルが根部でどのような役割を持つかは不明である。そこで TSR における JA シグナルについて、より詳細な解析を行った。トレハロース処理により誘導される転写因子遺伝子のうち、*hebiba* においてトレハロース誘導性が消失する *OsERF83* に着目し、その機能解析を行った。細胞内局在解析、転写活性化能の評価、および DNA 結合能の評価から、*OsERF83* が GCC ボックスを認識する正の転写調節因子として機能することが明らかとなった。また *OsERF83* の過剰発現株を作出し、遺伝子発現解析から *OsERF83* に制御される下流遺伝子を決定したところ、トレハロース処理により誘導される抗菌タンパク質遺伝子が複数含まれていた。従ってトレハロース処理された根部では、JA シグナルが *OsERF83* を介して抗菌タンパク質の発現制御を行う可能性が強く示唆された。

4. トレハロースに誘導されるファイトアレキシン生合成遺伝子の解析

TSR における JA シグナルの役割をさらに検討した。トレハロースを処理された根部では、ファイトアレキシン (PA) 生合成遺伝子の発現が誘導される。そこで PA 生合成遺伝子の発現誘導に JA シグナルが関与していると予想し、*hebiba* を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、PA 生合成遺伝子 *OsKSL4* および *OsKSL7* のトレハロースによる発現誘導は *hebiba* において消失した。従って根部での PA 生合成遺伝子の発現は JA シグナルに制御されることが示された。また解析の過程で、JA シグナルに依存するトレハロース誘導性遺伝子として、*OsKSL2* を見出した。*OsKSL2* は全長 cDNA が得られないことから、偽遺伝子であると考えられていたが、本研究により全長 cDNA が初めて単離された。*OsKSL2* は *ent*-CDP を基質に *ent*-beyerene を生成する機能型のタンパク質をコードしていた。*ent*-beyerene とその誘導体は抗菌活性を持つことが報告されており、TSR における JA シグナルは、根部における *beyerene* 型 PA の生産も制御している可能性が考えられた。

本研究から、TSR の分子機構が推定された。すなわち、根部に処理されたトレハロースは細胞膜上の受容体などにより認識され、細胞内にシグナルを伝達する。このシグナルは、根部での JA 類と SA の蓄積を誘導することで、それぞれのホルモンシグナルに変換され防御応答を制御する。JA シグナルは根部局所的な防御応答に関わり、PA 生合成遺伝子の発現誘導や、*OsERF83* を介した抗菌タンパク質遺伝子の発現誘導を制御する。一方 SA シグナルは、根部での遺伝子発現誘導に寄与するだけでなく、地上部でのイネいもち病抵抗性を制御することで、TSR の全身誘導性の病害抵抗性に関わる。