



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                       |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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 [全文の要約]                                                                                                                                 |
| Author(s)           | 手塚, 大介                                                                                                                                                                |
| Description         | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。<br><a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a> |
| 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             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/74020">https://hdl.handle.net/2115/74020</a>                                                                                     |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                       |
| File Information    | Daisuke_Tezuka_summary.pdf                                                                                                                                            |



# 博士論文の要約

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

### 第1章 序論

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 の分子機構を明らかにすることを目的に、TSR のシグナル伝達機構と、TSR の誘起様式について解析を行った。

### 第2章 TSR における植物ホルモンシグナルの解析

植物は病原菌の感染や傷害などの外的刺激を受けると、全身へシグナルを伝達し、非刺激部位における病害抵抗性を誘導する。このような全身誘導型の病害抵抗性は植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) やサリチル酸 (SA) に制御される。TSR は根部へのトレハロース処理が、根部での防御応答と地上部での病害抵抗性を誘導する現象である。そのため TSR のシグナル伝達も、植物ホルモンに制御される可能性が考えられる。本章では TSR のシグナル伝達に植物ホルモンが関与するかを解析した。

はじめにトレハロース処理時のホルモン内生量を定量した。水耕栽培した幼苗の根部にトレハロースを処理し、根部と地上部における JA 類と SA の内生量を観察した。その結果、根部においては JA、JA イソロイシン、および SA の内生量が、トレハロース処理後すみやかに増加した。また地上部では、これらの内生量に変化は観察されなかった。次に、これらのホルモンシグナルが TSR を制御するかを検討した。JA 生合成変異株 (*hebiba*) および SA

水酸化酵素過剰発現株 (*NahG*) を用いて、ホルモン欠損状態での TSR を解析した。水耕栽培した *hebiba* および *NahG* の根部にトレハロースを処理し、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 における根部での防御応答は、JA シグナルと SA シグナルの両者に制御されることが示唆された。また *hebiba* と *NahG* を用いて、TSR で獲得される地上部での病害抵抗性を観察した。土耕栽培した *hebiba* および *NahG* の根部にトレハロースを処理し、地上部を用いたイネいもち病抵抗性試験を実施した結果、*hebiba* ではトレハロース処理により病害抵抗性が誘導されたのに対し、*NahG* では抵抗性が誘導されなかった。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た。

### 第 3 章 トレハロース蓄積量改変株における防御応答の解析

TSR はトレハロース特異的に引き起こされる現象であるが、トレハロースがどのようにして TSR を誘起するかは不明である。TSR の誘起様式としては、トレハロースが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る。このうち前者の可能性を検証するためには、細胞内のトレハロース蓄積量を増加させた株を用いて、防御関連遺伝子の発現や、イネいもち病抵抗性の解析を行うことが有効である。本章では、ゲノム編集によりトレハロース高蓄積株を作出し、当該株において 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。得られた変異株を水耕栽培し、根部粗タンパク質を用いて *in vitro* でのトレハラーゼ活性を測定した。その結果 *OsTRE1* 変異株のトレハラーゼ活性は、野生型株と比べて低下していた。トレハラーゼ活性の低下による糖蓄積量の変化を調べるため、水耕栽培した幼苗の根部および地上部を用いて、糖蓄積量を定量した。*OsTRE1* 変異株のトレハロース蓄積量は、根部および地上部のいずれにおいても、野生型株と比べて増加していた。従って *OsTRE1* 変異株はトレハロース高蓄積株であることが示された。次に *OsTRE1* 変異株において TSR 様の現象が観察されるかを調べた。水耕栽培した変異株の根部を用いて、TSR において誘導される防御関連遺伝子の発現を観察した。その結果、これら遺伝子の発現について、野生型株との間に明確な差は観察されなかった。従って、トレハロース高蓄積は TSR 様の現象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。

## 第 4 章 トレハロース誘導性転写因子 OsERF83 の機能解析

SA シグナルは TSR における地上部での病害抵抗性を制御する．一方で JA シグナルは根部での局所的な防御応答に関わると考えられる．本章では，トレハロース処理により JA シグナル依存的に誘導される転写因子遺伝子 *OsERF83* の機能解析を行い，TSR における JA シグナルの役割を詳細に検討した．

はじめに *OsERF83* のタンパク質機能について解析した．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 ボックスに結合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．次に *OsERF83* が制御する下流遺伝子を検討するため，*OsERF83* 過剰発現イネ (*OsERF83ox*) を作出した．マイクロアレイおよびリアルタイム PCR を用いた発現解析の結果から，*OsERF83ox* では多数の防御関連遺伝子の発現が上昇していた．またこれら遺伝子のうち，複数の抗菌タンパク質遺伝子はトレハロース処理によっても誘導される遺伝子であった．従って TSR においては，JA シグナルが *OsERF83* を介して，抗菌タンパク質遺伝子の発現制御を行う可能性が考えられた．

## 第 5 章 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

化学的抵抗性は植物が持つ防御応答の一つであり，抗菌性の二次代謝産物を蓄積させる事により，病原菌の感染を防ぐメカニズムである．ファイトアレキシン (PA) は化学的抵抗性に関与する化合物であり，病原菌の感染や UV 照射，塩化銅などのエリシター処理を受けて動的に生産される低分子抗菌化合物の総称である．トレハロースを処理された根部では，PA 生合成に関わる *KSL* 遺伝子と偽遺伝子と考えられる *OsKSL2* の発現が誘導される．本章では，この PA 生合成遺伝子の発現誘導が JA シグナルに制御されるかを検討するとともに，*OsKSL2* が PA 生合成に関わる機能型のジテルペン環化酵素であると予想し，全長 cDNA の取得と酵素活性の解析を行った．

トレハロース処理による *KSL* 遺伝子の発現誘導が，JA シグナルに制御されるかを検討した．水耕栽培した *hebiba* の根部にトレハロースを処理し，根部における *KSL* 遺伝子の発現を観察した．その結果 *OsKSL2*，*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，トレハロースによる *OsKSL2*，*OsKSL4*，および *OsKSL7* の発現誘導は JA シグナルに制御されることが示された．次に *OsKSL2* の全長 cDNA の取得を試みた．MeJA 処理 1 時間の根部から RNA を抽出し，5'-および 3'-RACE により *OsKSL2* の cDNA 末端を決定した．決定された配列をもとに全長 cDNA の増幅を試みた結果，2,460 bp の ORF を含む全長 cDNA を単離した．*OsKSL2* の機能を解析するため，組換えタンパク質を用いて *in vitro* における酵素活性試験を行った．A 型ジテルペン環化酵素の

基質である *ent*-CDP および *syn*-CDP を組換え OsKSL2 と反応させ、反応液を GC-MS により解析した。その結果、*ent*-CDP を基質とした場合に、反応液中に *ent*-kaurene および 17-noukaure-15ene 13-methyl (beyerene) のピークが観察された。以上の結果から、OsKSL2 は *in vitro* において、*ent*-CDP を基質として *ent*-kaurene と *ent*-beyerene を生成する酵素であることが示された。

## 第6章 総括

本研究の結果から、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認識されることで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 生合成や、OsERF83 を介した抗菌タンパク質の生産を制御する。一方 SA シグナルは、根部での防御応答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 の全身誘導型の病害抵抗生に関わる。