

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成13年度博士課程進学

氏名 中条 哲也

指導教員名 山根 久和

論文題目 イネにおけるエリシター応答性 WRKY 型転写因子の機能解析

植物は動物のような免疫系を持たないが、糸状菌、細菌、ウイルスなどの病原体が感染すると、これを特異的な機構で認識し、様々な抵抗性反応を示すことで生存を図っている。病原体感染に対する植物の抵抗性応答の直接的な引き金となる特異的因子を一般にエリシターと呼び、病原体の感染を受けた植物では、病原体や植物の細胞表層由来の断片などがエリシターとなって活性酸素の発生、PR タンパク質と総称される抗菌性タンパク質やファイトアレキシンと呼ばれる低分子の抗菌性物質の生産など様々な抵抗性反応が誘導されることが知られている。

我々の研究グループは、イネ液体培養細胞におけるエリシター誘導のシグナル伝達経路の全貌の解明を目的として研究を進めてきた。その過程において、イネの **expression sequence tag (EST)** を用いたマイクロアレイ解析を行ったところ、エリシター応答性の **WRKY** 遺伝子が少なくとも2種類存在していることが明らかになった。**WRKY** 型転写因子は、エリシター応答性遺伝子のエリシター応答配列 (**W-box**) に特異的に結合する植物特有の転写因子として同定されたが、エリシター応答はもとより、サリチル酸応答を示す防御関連遺伝子の発現制御に重要な役割を果たす転写因子として、現在もっとも注目されている転写因子ファミリーの一つである。イネにおいて **WRKY** 型転写因子の生物学的な役割はほとんど報告されていない。イネ以外の植物において、これまで報告されている防御応答に関わる **WRKY** 型転写因子の多くがエリシターによって誘導されることから、これらのイネのエリシター応答性 **WRKY** 型転写因子もイネの防御応答に関わっている可能性が高いと考えられ、その生物学的機能に非常に興味を持たれる。

本研究では、イネのエリシター誘導のシグナル伝達経路の一端を明らかにすることを目

的として、これら2種のエリシター応答性 WRKY 型転写因子を単離し、機能解析を試みた。

1. エリシター応答性 WRKY 遺伝子 OsWRKY53・OsWRKY71 の単離

マイクロアレイ解析によって存在が示された2種のエリシター応答性 WRKY 遺伝子の cDNA を EST データベースの配列データ及び Rice GAAS の推測配列データに基づいて設計したプライマーと、キチンエリシター処理後1時間のイネ液体培養細胞から抽出した total RNA を用いて RT-PCR によってクローニングした。得られた cDNA の塩基配列をデータベースで解析した結果、それぞれ OsWRKY53、OsWRKY71 であることが確認された。また、アミノ酸配列を解析した結果、OsWRKY53 は Cys2His2 zinc finger motif タイプである WRKY ドメインを2個持つグループ I、OsWRKY71 は Cys2His2 zinc finger motif タイプである WRKY ドメインを1個持つグループ II に属していることが明らかになった。

ノーザン解析により、OsWRKY53、OsWRKY71 はイネ液体培養細胞において、イモチ病菌由来の2種類のエリシターであるキチンエリシター及びスフィンゴリピドエリシターによって処理後30分以内に発現が誘導され、1時間でピークに達し、以後漸減することが示された。さらに、OsWRKY53、OsWRKY71 はイネ植物体において、イモチ病菌接種によって接種後6時間以内に発現が誘導されることが示された。以上の結果から、これらの WRKY 型転写因子がイネのイモチ病菌に対する非特異的な抵抗性反応の初期段階に関与している可能性が示唆された。

また、ノーザン解析により、OsWRKY53、OsWRKY71 はイネ液体培養細胞において、ジャスモン酸によっても発現が誘導されることが明らかになった。我々の研究グループは、イネ液体培養細胞におけるエリシター誘導のファイトアレキシン生産において、エリシター刺激のシグナルトランスデューサーとしてジャスモン酸 (JA) が重要な役割を果たしていることを明らかにしていることから、イネの抵抗性反応における JA の役割を解明する上でも、これらの WRKY 型転写因子の機能に興味を持たれる。

2. OsWRKY53・OsWRKY71 の核局在性・W-box 結合能の確認

GFP と OsWRKY53 及び OsWRKY71 の融合タンパク質を CaMV35S プロモーターの制御のもと、タマネギ表皮細胞内で一過的に発現させたところ、核にのみ GFP の蛍光が観察されたことから、OsWRKY53、OsWRKY71 の核局在性が確認された。また、thioredoxin (Trx) と OsWRKY53 の融合タンパク質及び maltose-binding protein (MBP) と OsWRKY71 の融合タンパク質をタンデムに並んだ W-box を含むプローブに対するゲルシフトアッセイに供した結果、シフトバンドが観察された。Trx 及び MBP のみではシフトバンドが観察されなかったこと、及び W-box に変異を導入したプローブを用いた場合 Trx-OsWRKY53 または MBP-OsWRKY71 を加えてもシフトバンドが観察さ

れなかったことから、OsWRKY53、OsWRKY71 が特異的に W-box を認識して結合することが確認された。

3. OsWRKY53 の機能解析

OsWRKY53 の機能解析の一環として、マイクロアレイ解析を用いて OsWRKY53 の標的遺伝子をスクリーニングすることにした。アグロバクテリウムを用いた形質転換により OsWRKY53 過剰発現変異株（イネ培養細胞）を5ライン作製し、そのうち2ラインをマイクロアレイ解析に供した。対照区として、空のプラスミドで形質転換したイネ培養細胞を用いた。アジレント社のオリゴマイクロアレイを用いた結果、OsWRKY53 過剰発現変異株においてキチナーゼや PR-4 などの PR タンパク質遺伝子や、いくつかの WRKY 遺伝子などの抵抗性反応に関わると考えられる遺伝子の発現量が対照区と比べて2倍以上増加していることが明らかになった。また、OsWRKY53 過剰発現変異株5ライン全てにおいて、これらの遺伝子の発現が活性化されていることを定量的 RT-PCR により明らかにした。これは、マイクロアレイ解析によって得られた複数の遺伝子の発現が活性化しているという結果が、ライン特異的なものではなく、OsWRKY53 を過剰発現させたことによるものであることを示している。

次に、データベースを用いてこれらの遺伝子の5' 上流域の塩基配列を解析した結果、多くの遺伝子の5' 上流域に W-box が複数存在していた。また、現時点で少なくとも3種類の遺伝子（キチナーゼ、PR-4、WRKY）がキチンエリシターによって発現が誘導されることが明らかになった。以上の結果は、これら一連の遺伝子群が、キチンエリシターによって誘導された OsWRKY53 によって発現を正に制御されている可能性が極めて高いことを示している。現在、レポータージーンアッセイにより、これらの遺伝子のキチンエリシター応答性領域の同定を W-box を中心に試みるとともに、OsWRKY53 過剰発現変異株、OsWRKY53 発現抑制株（それぞれイネ植物体）を作製し、それらのイモチ病菌に対する抵抗性の変化を観察している。

4. OsWRKY71 の機能解析

OsWRKY71 の機能解析の一環として、マイクロアレイ解析を用いて OsWRKY71 の標的遺伝子をスクリーニングすることにした。アグロバクテリウムを用いた形質転換により OsWRKY71 過剰発現変異株（イネ培養細胞）を6ライン作製したが、OsWRKY71 の発現量にライン間で差が認められたため、発現量が多いほうから2つのラインをマイクロアレイ解析に供した。アジレント社のオリゴマイクロアレイを用いた結果、OsWRKY71 過剰発現変異株においてキチナーゼやヒートショックプロテインなどの抵抗性反応に関わると考えられる遺伝子の発現量が対照区と比べて2倍以上増加していることが明らかになった。

5. まとめ

本研究ではイネにおける2種のエリシター応答性 WRKY 遺伝子、OsWRKY53、OsWRKY71 を単離し、それぞれの遺伝子がイネ植物体においてイモチ病菌接種によっても発現が誘導されることを明らかにするとともに、核内局在性、W-box 特異的な結合能を確認した。さらに、OsWRKY53 過剰発現株及び OsWRKY71 過剰発現変異株を用いたマイクロアレイ解析の結果、イネの抵抗性反応に関わると考えられる様々な遺伝子の発現が活性化されていることが明らかになった。また、これらの遺伝子の多くがエリシター応答性であり、かつそれらの5' 上流域には、複数の W-box が存在しているものも多く見受けられた。以上のことは、イネの抵抗性反応に関わると考えられる遺伝子群が、OsWRKY53、OsWRKY71 もしくはそれらによって誘導される WRKY 型転写因子によって発現を制御されている可能性が高いということを示唆している。

近年、植物が有している抵抗性を高めることによって病害を防除する薬剤が注目されている。本研究で得られた知見は、イネの自己防御機構の解明につながるとともに、そのような薬剤開発のための科学基盤の構築に寄与するものと期待される。