論　文　内　容　要　旨

氏　　名	江越　脩祐	提出年	平成27 年
学位論文の 題　　目	植物病原菌感染因子コロナチンの COI1-JAZ 非依存的作用に関するケミカルバイオロジー		

論　文　目　次

序論
第 1 章　「コロナファシルアミノ酸縮合体（CFA-AAs）の構造活性相関研究」
第 2 章　「新規受容体探索へ向けた植物孔辺細胞内コロナチン作用部位解明研究」
結語

論　文　内　容　要　旨

[序論]

植物病原菌 *Pseudomonas syringae* が生産する植物毒素であるコロナチン（**1**）は，活性型ジャスモン酸であるジャスモン酸イソロイシンのミミックとして働き，植物生体内で COI1-JAZ シグナル伝達経路を介して食害防御応答を誘導する[1]．一方で **1** は，植物の気孔を開口させる作用をもつ[2]．植物は，病原菌感染時に気孔を閉鎖することで感染経路を遮断する stomatal defense と呼ばれる感染防御応答を示す．一方，病原菌はこれに対抗して **1** を分泌し，COI1-JAZ シグナル伝達経路を介して NAC 転写因子を活性化させ，アブシシン酸（ABA）による気孔閉口を阻害し感染経路を確保すると考えられている[3]．著者は，閉じた気孔を再開口させる **1** の作用が COI1-JAZ シグナル伝達経路に非依存的であり，未知のメカニズムに基づく現象であることを明らかにした．

[1，**コロナファシルアミノ酸縮合体（CFA-AAs）の構造活性相関研究**]

著者は，**1** の気孔再開口作用と COI1-JAZ 共受容体形成との直接的な相関関係を明らかにするため，7 種のコロナファシルアミノ酸縮合体（CFA-AAs）を合成して構造活性相関研究を行った．気孔開口活性試験の結果，全ての CFA-AAs が閉じた気孔を再開口誘導し，アミノ酸側鎖の大きさが気孔再開口活性に大きな影響を与えないことが明らかになった．続いて，COI1-JAZ1 共受容体に対するドッキングシミュレーション並びに，植物個体における COI1-JAZ シグナル伝達経路の下流で働く遺伝子の発現量に及ぼす影響について検討を行った．その結果，アミノ酸側鎖が比較的大きい CFA-L-Tyr および CFA-L-Gln が，COI1-JAZ 共受容体形成を誘導しないにも関わらず，気孔開口誘導作用を引き起こすことを明らかにした．これらの結果より， **1** の気孔再開口誘導作用は COI1-JAZ 共受容体が関与するシグナル伝達経路に依存しない未知の機構に基づく現象であることが強く示唆された．

[2，**新規受容体探索へ向けた植物孔辺細胞内コロナチン作用部位解明研究**]

第 1 章の結果から，コロナチン（**1**）の気孔再開口誘導作用は COI1-JAZ 共受容体非依存的であることが強く示唆された．本章ではコロナチン立体異性体を合成し，より詳細な化学的検証および遺伝学的検証を行った．シロイヌナズナ野生株（Col-0），*coi1* 変異体株などの各種変異株を用いた気孔再開口活性試験，共受容体親和性，植物個体での遺伝子発現量に及ぼす影響について検討を行った結果，閉じた気孔を再開口させる **1** の作用は， COI1-JAZ 共受容体非依存的なメカニズムにより制御されていることを明らかにした．続いて，**1** の孔辺細胞内作用部位を明らかにするために，生細胞ラマンイメージング実験[4]を行い，細胞内局在性について検討を行った．以上の結果から著者は， **1** による気孔防御（Stomatal defense）の打破が，「COI1-JAZ 共受容体を介して，ABA による気孔閉口を阻害する気孔閉口阻害作用」と「細胞内小器官が関与する未知のメカニズムによって，閉じた気孔を再開口させる気孔再開口誘導作用」という 2 つの作用機構に基づくものであることを明らかにした．

[結語]

本学位論文で著者は，コロナチン（**1**）による気孔再開口作用は，COI1-JAZ シグナル伝達経路に非依存的メカニズムが寄与する生物応答現象であること明らかにした．

[参考文献]

1. Sheard, L. B.; Tan, X.; Mao, H.; Withers, J.; Nissan, G. B.; Hinds, T. R.; Kobayashi, Y.; Hsu, F. F.; Sharon, M.; Browse, J.; He, S. .; Rizo, J.; Howe, G. A.; Zheng, N. *Nature* **2010**, *468*, 400–405.
2. Mino, Y.; Matsushita, Y.; Sakai, R. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **1987,** *53*, 53–55.
3. Zheng, X. Y.; Spivey, N. W.; Zeng, W.; Liu, P. P.; Fu, Z. Q.; Klessig, D. F.; He, S. Y.; Dong, X. *Cell Host Microbe* **2012**, *11*, 587–596.
4. Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Okada, M.; Ando, J.; Palonpon, A.; Fujita, K.; Kawata, S.; Sodeoka, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011,** *133*, 6102–6105.

論文審査の結果の要旨

江越脩祐の論文は，植物毒素コロナチンが植物病原菌の感染因子として気孔孔辺細胞に作用する際の新規機構を提案する内容である．

第 1 章において，植物が食害応答時に生合成する JA-AAs を基に設計した，7 種のコロナファシルアミノ酸縮合体（CFA-AAs）を合成した．また，合成した CFA-AAs を用いた気孔開口活性試験（1.4 節），COI1-JAZ 複合体とのドッキングシミュレーション（1.5 節），植物個体における遺伝子発現量に与える影響（1.6 節）より，アミノ酸側鎖が大きい CFA-L-Tyr，および，CFA-L-Gln が COI1-JAZ 複合体形成を誘導しないにも関わらず，気孔開口誘導作用を引き起こしていることを明らかにした．これらの結果は，コロナチンの気孔開口作用が COI1-JAZ シグナル伝達経路に依存せず，未知の機構に基づく現象であることを強く示唆した．

著者は，第 2 章において，Y2H による COI1-JAZ 複合体型受容体との物理的親和性（2.2 節），遺伝子発現量に与える影響（2.2 節），変異体植物を用いた気孔再開口誘導試験（2.3 節），Diyne-Tagged コロナチンを用いた *arc6-1* 変異体孔辺細胞 *in vivo* ラマンイメージング実験（2.7 節）より，コロナチンによる気孔防御（Stomatal defense）の打破が，「COI1-JAZ 複合体および NAC TFs を介して，ABA による気孔閉口を阻害する気孔閉口阻害作用」と「小胞体（ER）が関与する未知のメカニズムによって，気孔を再開口させる気孔再開口誘導作用」という 2 つの作用機構に基づくものであることを明らかにした．

植物ホルモンである 7-*iso*-ジャスモン酸イソロイシンは，COI1-JAZ シグナル伝達経路を介して病害虫に対する食害防御応答を誘導し，植物毒素であるコロナチンは，COI1-JAZ シグナル伝達系を介して SA 生合成の阻害や ABA の気孔閉口作用を阻害して，気孔を再開口させて病原菌の感染経路を確保する．この「病害虫に対する防御応答」と「病原菌感染の促進」は同じ COI1-JAZ 複合体を介した生物応答である．即ち，植物は病害虫に対する防御応答と病原菌の感染の促進を COI1-JAZ シグナル伝達経路を介して同時に活性化しており，病害虫と病原菌を同時に防御することは原理的に不可能と考えられていた．

本論文の結果は，コロナチンが閉じた気孔を再開口させる作用は，COI1-JAZ シグナル伝達経路に非依存的であり，小胞体（ER）が関与する未知のメカニズムに基づく生物応答現象であることを示すものであり，著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している．したがって，江越脩祐提出の博士論文は，博士（理学）の学位論文として合格と認める．