

イネ-いもち病病害応答におけるキシロオリゴ糖誘導抵抗性反応機構の解析

佐藤 佑哉 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

【導入】

植物は厳しい環境ストレスに対し、その場から避けることができないためそれらに対する優れた応答反応を身に付けてきたと考えられる。中でも病害応答に関する解析が行われてきたが、その多くは細胞内プログラムについての研究であり、細胞外、つまり細胞壁領域についての病害応答反応の知見は乏しいのが現状である。

細胞壁は発生過程に重要であると同時に、その一部であるヘミセルロースは病害応答にも関与している。イネなどの単子葉植物においてヘミセルロースは細胞壁の約60%を占める。ヘミセルロースを分解する酵素が過剰発現したイネ *OsARAF*FOX において、キシロオリゴ糖量の増加、病害抵抗性反応および関連遺伝子の発現誘導が起こることが示されている。

病原体侵入時に病害応答を開始する物質のことをエリターと呼び、PAMPs と DAMPs の2種類が存在している。PAMPs は病原体由来の物質で、DAMPs は植物由来の物質である。本研究室で、ヘミセルロース分解物であるキシロオリゴ糖が DAMPs の一つとして機能し、その受容体として Wall Associated Kinase: WAK21 が関与していると予想された。WAK は、細胞外に糖結合領域(受容領域)、細胞膜貫通領域、細胞内にキナーゼ領域を有する構造をもち、植物特有の監視センサーとして働いている。しかし、WAK21 に関しては、キナーゼ領域のみを有するタンパク質であると報告がある。しかし、ゲノム情報を確認したところ、糖結合領域(受容領域)、細胞膜貫通領域を含む非常に長い5'非翻訳領域が存在していたことから、キナーゼ領域以外の領域もキシロオリゴ糖により発現誘導されているのか、また実際にどのようなタンパク質が作成されているのかについて調査を行なった。

本研究では単子葉植物の植物細胞壁由来のオリゴ糖による病害応答メカニズムの解明を目的に、WAK がキシロオリゴ糖と結合してセンサーとしての役割を果たし細胞壁中における防御応答に寄与しているのか、また *OsWAK21* 欠損変異体の形態形成過程を調査する。

【材料と方法】

① *OsWAK21* の5'非翻訳領域の発現解析

キシロオリゴ糖を与えたイネ培養細胞より RNA を抽出し、5'非翻訳領域を含む領域にプライマーを設計し、発現解析を行った。

② *OsWAK21* の全長配列

報告されていたタンパク質部分の間の塩基配列にプライマーを設計し、間の配列を RT-PCR によって増幅した。その後、シーケンシングにより塩基配列を調べた。

③ *WAK21* 欠損変異体の形態形成観察

WT 及び *OsWAK21* 欠損変異体3系統を特定網室で生育させ、形態形成観察を行った。開花後の雌蕊をサンプリングした。また、背丈を約4週に渡り計測した。

④ キシロオリゴ糖と *OsWAK21* の結合性の実験

OsWAK21 の糖結合領域においてある部分のみのペプチドを作製し、ELISA 法により二つの物質が結合するか確認した。

【結果・考察】

① 発現解析の結果、糖結合領域(受容領域)、細胞膜貫通領域を含む非常に長い5'非翻訳領域もキナーゼ領域と同様に、キシロオリゴ糖により誘導を受け、発現していた。

② シーケンシングの結果、5'非翻訳領域とされていた領域には開始コドンであるメチオニンが存在し、糖結合領域、細胞膜貫通領域塩基配列の後、終始コドンが存在していた。また、データベース上で報告のあるキナーゼ領域でも開始コドンであるメチオニンが存在し、終始コドンが存在していた。つまり、*OsWAK21* は糖結合領域を含む領域がタンパク質として機能している可能性が最も高く、キナーゼ領域のみの二つ目のタンパク質も翻訳する可能性は低いことが示された。そのため、糖結合領域でキシロオリゴ糖を受容し、さらに他の *OsWAK* と協調して病害応答に関与していると予想された。

③ イネの背丈については WT と欠損変異体で差は見られなかった。雌蕊については変異体で黒く変色した穂が欠損変異体で多く見られた。その他においても WT と変異体で見たいにはっきりとした違いがみられなかった。

④ 詳細は卒業研究発表会にて報告する。現在までに、*OsWAK21* は他の *OsWAK* と協調して病害応答に関与することが示唆されていたが *OsWAK21* そのものが受容体ドメインとキナーゼドメイン両方を含む一つのタンパク質ではなく、キナーゼとして働くのでもなく、主にオリゴ糖の結合に関与している可能性が高いことがわかった。今後他の *OsWAK* との関連性を調査することで、キシロオリゴ糖が病害応答反応にどう機能するのか調査していく予定である。