

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科 分子生物学専攻 植物分子遺伝学講座 島本 功 教授		
氏名	高橋 章	提出	平成 13年 5月 2日
題目	イネ細胞死変異体を用いた耐病性信号伝達機構の解析		
<p>&lt;要旨&gt;</p> <p>植物は病原体に感染された細胞を自発的に死に至らしめることによって、病原体の増殖を防ぐことができる。この細胞死は植物の抵抗性遺伝子が病原体を認識することにより誘導される。近年、様々な植物種から多数の抵抗性遺伝子が単離され、病原体の認識機構の解明が進められているが、それに引き続く細胞死信号伝達の分子機構はほとんど明らかにされていない。そこで、当研究ではイネ細胞死変異体を用いて、耐病性信号伝達機構を遺伝的に解明するとともに、過敏感細胞死の誘導機構について分子レベルでの解明を目的とする。</p> <p><u>抵抗性細胞死変異体の選抜と解析</u></p> <p>我々は、イネ品種金南風に化学処理により変異を誘発した変異系統のうち約100系統の細胞死変異体について、病原性いもち病菌に対する抵抗性反応を調べた。その結果、8系統において抵抗性が誘導されていることを見出した。これらの変異体のうち3系統についてより詳細な解析を行い、<i>cdr</i> (cell death and resistance) 変異体と名付けた。<i>cdr</i>変異体では、病原体による感染が起きていない状態で、カロースの蓄積、ファイトアレキシンの恒常的な合成、防御関連遺伝子の発現などの、一連の抵抗性反応に付随する反応が誘導されていた。すなわち<i>cdr</i>変異体では、細胞死の誘導により抵抗性信号伝達経路が恒常的に活性化されていると考えられ、抵抗性信号伝達経路上の変異体であることが推測された。</p> <p><u><i>cdr</i>変異の耐病性信号伝達経路における機能</u></p> <p>過敏感細胞死の誘導には、細胞膜上での一過的な活性酸素種の生成が必要である。そこで、<i>cdr</i>変異体の培養細胞系を作成し、突然変異の活性酸素種生成に対する影響について検討した。イネでは脱リン酸化酵素の阻害剤であるカリクリンA (CA) により細胞膜上に存在するNADPH オキシダーゼに依存した活性酸素種生成が誘導されることが報告されている。そこで、<i>cdr</i>変異体の培養細胞にCA処理を行ったところ、3系統のうち<i>cdr 1</i>、<i>cdr 2</i>変異体では活性酸素種の生成が野生型に比べ有意に増加した。このことから、CDR1, CDR2遺伝子はNADPH オキシダーゼによる活性酸素種の生成を制御するリン酸化反応に関与していることが示唆された。</p>			

### リン酸化タンパク質の同定

CAによるリン酸化の促進およびNADPH オキシダーゼの活性化は、エリシターに対する反応と非常に類似しており、このときリン酸化されるタンパク質は抵抗性信号伝達に深く関与していることが推測される。そこで、二次元電気泳動法を用いて、カリクリンA処理により、リン酸化されるタンパク質を解析したところ、*cdr1*、*cdr2*変異体で野生型に比べ強くリン酸化を受ける4種のタンパク質が同定された。これらのリン酸化タンパク質は*cdr*変異体の抵抗性の獲得および細胞死の誘導に関与していることが示唆された。これらのタンパク質をゲルから回収し、ペプチドシーケンスを行ったところ、一つは、酵母からホ乳類、植物まで広く保存されたプロヒビチン(PHB)遺伝子に高い相同性を示した。

### イネPHB遺伝子のクローニングと解析

データベース検索によりスポットの一つがPHB遺伝子であることが予測されたため、イネのcDNAライブラリーからイネPHB遺伝子を単離した。イネPHB遺伝子は推定284アミノ酸をコードしており、分子量約31 kD、等電点6.65のタンパク質であることが推測された。これまで報告されている他の生物種のPHBとアミノ酸配列を比較してところ、植物だけでなく酵母、ヒト、マウスに至るまで全長にわたり非常に高く保存されていた。また、PHB遺伝子の発現量は葉および培養細胞において野生型と*cdr*変異体で有意な差は見られず、培養細胞ではCA処理によるPHB mRNAの発現誘導は見られなかった。さらに、PHBタンパク質に対する特異的抗体を作製し、タンパク質レベルでの解析を行った結果、野生型および*cdr*変異体でのタンパク質量に有意な差は見られなかった。二次元電気泳動を行い、ウェスタン解析を行った結果、CA処理により誘導されるリン酸化のスポットの位置と抗PHB抗体シグナルの位置は完全に一致していた。また、免疫沈降法、ネイティブ PAGE法によりPHBは二量体を形成していることも示唆された。

### PHBの局在解析

GFPタンパク質をPHBのC末側につないだコンストラクトを作成し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した結果、イネのPHBタンパク質はミトコンドリアに局在していることが示された。また、N末側にGFPをつないだコンストラクトでは、ミトコンドリアへの局在は阻害された。このことから、PHBのミトコンドリアへの移行にはPHBのN末側配列が重要な働きをしていることが示唆された。

### PHB遺伝子の機能解析

PHB遺伝子の機能を解析するため、イネで恒常的にPHBを過剰発現させた形質転換体、および発現抑制体を作製した。得られた過剰発現体では顕著な表現型は見られなかった。また、エリシターに対する反応を調べた結果、過剰発現体、発現抑制体ともに活性酸素生成には差は見られなかった。現在これら形質転換体について、より詳細な解析を行っている。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 高橋 章

植物は病原体に感染された細胞を自発的に死に至らしめることによって、病原体の増殖を防ぐことができる。この細胞死は過敏細胞死と呼ばれ、植物の抵抗性反応において主要な役割を果たしている。しかし、現在までこの細胞死の誘導機構や、耐病性信号伝達機構についてはほとんど明らかにされていない。そこで、本研究ではイネ細胞死変異体を用いて、耐病性信号伝達機構を遺伝的に解明するとともに、過敏細胞死の誘導機構を解明することを目的としている。第一章では、93系統の細胞死変異体から病原性いもち病菌に対して、抵抗性を獲得した変異系統を8系統選抜し、これらの変異体のうち3系統について、異なる遺伝子座の変異であることを確かめ、*cdr* (cell death and resistance) 変異体と名付けた。*cdr* 変異体では、細胞死の誘導にともない、一連の抵抗性反応に附随する反応が誘導されており、*cdr* 変異体は抵抗性信号伝達経路に変異を生じていることが推測された。過敏細胞死の誘導にはタンパク質のリン酸化反応を介した、NADPHオキシダーゼによる活性酸素種の生成が関与していることが示唆されている。そこで、*cdr* 変異体における変異がNADPHオキシダーゼの活性化機構に関与するか解析した結果、*cdr1*、*cdr2* 変異体では、NADPHオキシダーゼの活性化を制御するリン酸化活性が、野生型に比べ強くなっていることが示された。すなわち、**CDR1**、**CDR2** 遺伝子はNADPHオキシダーゼの活性化を制御するリン酸化活性を抑制していることが示唆された。そこで第二章では、このリン酸化反応に注目し、二次元電気泳動法を用いたプロテオミクス的手法により、*cdr* 変異体で見られる細胞死および抵抗性の誘導に関与する新規な因子の同定を試みた。その結果、*cdr1*、*cdr2* 変異体において、野生型と比較して強くリン酸化を受けるタンパク質が4つ同定された。これらのタンパク質を解析したところ、一つは動物や酵母において細胞死の制御に関与するプロヒビチン(**PHB**) 遺伝子に高い相同性が認められた。イネから単離した**PHB** 遺伝子は、量的な制御ではなくリン酸化による制御を受けていることが示され、さらにミトコンドリアに局在していることが示された。**PHB** 遺伝子の植物における機能を解析するため、イネで恒常的に**PHB** を過剰発現させた形質転換体を作製し解析を行った。過剰発現体の1系統では、防御遺伝子の発現誘導が認められ、さらに白葉枯れ病菌の接種により、急速な細胞死の誘導が認められた。これらの結果から、植物において**PHB** はミトコンドリアに存在し、リン酸化を受けることにより活性化され、過敏細胞死および耐病性信号伝達経路を誘導していると考えられた。また、**PHB** を過剰発現させた培養細胞では、エリシター処理による過酸化水素の生成量が野生型に比べ有意に増加したことから、**PHB** が活性酸素種の生成にも関与していることが示唆された。

以上のように、本論文は植物の抵抗性反応および過敏細胞死の誘導機構の解析に重要な知見を加えるものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。