

| | | | |
|---------------|--|----|-------------|
| 所属 (主指導教官) | バイオサイエンス研究科植物細胞工学 (佐野 浩) | | |
| 氏名 | 依田 寛 | 提出 | 平成14年 7月 5日 |
| 題目 | Molecular mechanism of hypersensitive response in tobacco plants: Contribution of polyamines to hypersensitive cell death and properties of a novel WRKY-type transcription factor | | |

[Introduction]

Among diverse environmental stresses that endanger plant life, pathogen attack may be one of the most critical ones. Plants are sessile organisms and lack a circulating, somatically adaptive immune system to protect themselves against pathogens. Instead, they are considered to have evolved other defense mechanisms against pathogens. Being attacked by pathogens, some plant which have the resistance (*R*) gene against pathogens can restrict them to a small region near the site of infection, where thereafter collapses and gives rise to a necrotic lesion. This localization of pathogens is referred to as a hypersensitive response (HR).

The *R* gene of tobacco plants is referred as *N* gene, and confers resistance to tobacco mosaic virus (TMV). However the resistance is temperature-sensitive, thus, exhibiting HR below 26°C, but not above 26°C. The activity of *N* gene can be controlled by the temperature shift (30°C → 20°C), where onset of HR is synchronized. Using this system, we compared the mRNA populations in TMV-infected tobacco leaves before and after the temperature shift by fluorescence differential display. Of the 20 clones initially identified, 6 cDNA were confirmed to be differentially expressed in response to TMV infection. They were designated as *HRR* (hypersensitive response related) with serial numbers. Among 6 genes, we focused on *HRR3* and *HRR4* for further experiments because of their early and temporal response to TMV. *HRR3* belonged to a WRKY-type transcription factor and *HRR4* was identical to ornithine decarboxylase of *Nicotiana tabacum*.

HRR3 (258 a.a.) contained a single WRKY domain, a Cys₂His₂ zinc-finger motif and a leucine-zipper motif in the N terminal. *HRR3* showed high similarity to another tobacco WRKY protein,

WIZZ (wound-induced leucine zipper zinc-finger), and consequently HRR3 was designated as TIZZ (TMV-induced leucine zipper zinc-finger). TIZZ was found to localize to the nucleus and to bind to the W-box (TTGAC) element that is recognized by other WRKY protein. However TIZZ did not have a transactivation activity by itself. The expression of *TIZZ* was independent on salicylic acid, indicating the presence of salicylic acid –independent signal pathways for HR, in which a novel type of WRKY protein(s) may play a critical role for the activation of defense.

HRR4 (433 a.a.) was identical to ornithine decarboxylase (ODC), which is one of the enzymes involved in polyamine biosynthesis. Further analysis revealed that not only *ODC* but also other genes encoding enzymes for polyamine biosynthesis (e.g. spermidine synthase) were inducible in response to TMV infection. TMV-infected leaves treated with inhibitors (DFMO and MGBG) for polyamine biosynthesis showed the reduced HR rate. When tobacco cultured cells (BY2 cells) were treated with cryptogein, an elicitor for HR, genes for polyamine biosynthesis were also induced in a similar manner with intact leaf and hypersensitive cell death was obvious. However, cell death was inhibited by DFMO, confirming ODC to be a key enzyme governing its occurrence. Polyamines were also found to accumulate in apoplast of both TMV-infected leaves and BY2 cells treated with cryptogein. In contrast, polyamine oxidase activity was consistently detected in apoplast regardless TMV infection, suggesting the ready of polyamine degradation. High level of H_2O_2 was detected in BY2 cells after elicitation. Both polyamine accumulation and H_2O_2 generation in BY2 cells were almost completely suppressed by DFMO. These results strongly suggest that one of the biochemical events underlying HR is production of polyamines, the enzymatic degradation of which generates H_2O_2 , resulting in hypersensitive cell death.

Screening genes responsive to TMV infection identified two genes, that may play critical roles in HR. Further analyses of these gene products as well as the remaining genes identified will shed more lights on the plant defense mechanism against pathogens.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 依田 寛

申請者はタバコモザイクウイルス (TMV) に抵抗性であるタバコ品種を用い、植物の病原体に対する抵抗性反応である、過敏反応の分子機構の研究を行なった。実験的には、TMV 感染による過敏反応時に発現量が変化する遺伝子を蛍光ディフアレシナルディスプレイ法により単離した。単離した遺伝子のなかで、TMV 感染で転写量が増加する新規 WRKY 型転写因子とオルニチン脱炭酸酵素について、さらに詳しく機能を解析した。

新規 WRKY 型転写因子は、258 アミノ酸からなり、WRKY ドメインを1個持つ。さらに、N 末端側にはロイジンジッパーが存在する。この遺伝子を、*TIZZ* (TMV-induced leucine zipper zinc-finger) と命名した。*TIZZ* は核に局在し、TGAC をコア配列に持つ W-box と呼ばれるシス配列に結合した。*TIZZ* 単独では転写活性化能がなく、また、これまでに TMV 感染で単離されていた WRKY 因子とは異なり、サリチル酸によって発現は誘導されなかった。これらの結果より、*TIZZ* はサリチル酸非依存的に転写、翻訳され、防御関連遺伝子のプロモーター上に存在する W-box に結合し、転写の調整を行うことが示唆された。サリチル酸が関与しない防御系の存在を立証するものであり、これまで知られていなかった過敏反応の側面を明らかにした。

オルニチン脱炭酸酵素はポリアミン合成酵素の1つであり、そのほかの合成酵素とともに TMV 感染により発現が誘導された。さらに、TMV 感染葉のアポプラストにおいて、ポリアミンの蓄積が観察された。この結果を受け、ポリアミン合成を薬剤 (DFMO) によって阻害したところ、過敏細胞死が抑制された。ポリアミンと過敏細胞死との間に相関があることを示すものである。そこで、細胞死の検定が容易な培養細胞—エリシターの系に実験系を構築し、詳しい解析を続けた。この系でも、過敏細胞死は DFMO により抑制されることが明らかになった。アポプラストにおけるポリアミンの蓄積も観察され、さらにそれは DFMO により抑制されることが分かった。ポリアミンが酸化的分解を受けると、 H_2O_2 が発生することは動物細胞で知られている。そのため、 H_2O_2 発生量を調べたところ、明らかに DFMO により抑制された。これらの結果より、合成されたポリアミンがアポプラストに蓄積し、酸化的分解を受け、 H_2O_2 が発生し、過敏細胞死を誘導することが示唆された。これまで、推定はされていたものの、実験的に示されたことはなく、本研究によって始めて、実証された。今後の過敏反応の解明、ひいては、より抵抗性の作物作出において役立つことと思われる。

以上のように、本論文は植物と病原体の相互作用を明らかにしたもので、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。