

論文内容の要旨

申請者氏名 植田浩一

タバコモザイクウイルス(TMV)に対するタバコの抵抗性は、抵抗性遺伝子産物(R)である N 因子に依存している。これまでに TMV の非病原性遺伝子産物(Avr)である複製酵素のヘリカーゼドメイン(p50)が N 因子を持つタバコに HR を起こすことが分かっている。“gene-for-gene”説によれば、R が Avr を直接的、間接的に認識することで防御応答の情報を伝達するとされている。しかし、N 因子が p50 をどのようにして認識しているのかは未だに分かっていない。また、N 因子から HR に至までの情報伝達機構の詳細も明らかにされていない。

本研究はこれら 2 点を明らかにしようとするものである。第一の課題は認識機構の解明。相互作用を酵母 two-hybrid 法を用いて解析した。その結果、N 因子と p50 が直接相互作用する事が示された。N 因子は TIR/NBS/LRR と 3 個のドメインを持つ。そのどこが相互作用に必要なかを調べた結果、NBS/LRR が相互作用に必要なであった。さらに、NBS にある ATP 結合ドメイン(P-loop)の 222 番目のリジンをアルギニンに置換することで、ATP 結合、加水分解活性を欠失した変異タンパク質を用いて p50 との結合試験を行ったところ、完全に p50 との結合能力を失った。NBS の持つ ATP 加水分解活性は p50 の存在下では、約 1.5 倍に上昇した。続いて、N 因子内の各ドメインを用いて、分子内結合を酵母 two-hybrid 法、Pull-down 試験によって検討した。TIR/NBS は ATP に依存して LRR と分子内結合することが明らかになった。その分子内結合は p50 が結合する事で解除された。以上の結果から、次の新知見を得た。第一に、N 因子と p50 が直接結合することによって Avr が認識される事。第二に、その結合には N 因子が ATP と複合体を形成している事。第三に p50 との結合によって N 因子の ATP 加水分解が促進され、立体構造が変わる事。これらのことから、N 因子は ATP マシンであることが示唆された。p50 との相互作用に NBS/LRR が必要ならば、TIR が次の情報伝達因子と相互作用している可能性がある。そこで、TIR と相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid 法を用いて cDNA ライブラリーからスクリーニングを行なった。その結果、19 個のポジティブクローンを得た。蛋白質キナーゼ、RNA スプライシング因子などは有力な候補と考えられた。

第二の課題は N 因子によって起動される遺伝子群の解析。そのために、p50 をデキサメタゾン (DEX) 処理によって誘導できる形質転換培養細胞を作製し、HR を同調的に起こすモデル実験系を構築した。DEX 処理 12 時間後から過敏細胞死を起こし始め 24 時間後で 80% 近くの細胞が細胞死を起こすことが確認できた。この系を使って経時間的なマイクロアレイ解析を行なった。数百個も同定された遺伝子の発現状況の解析から HR の誘導に直接、必要な遺伝子と周辺細胞で二次感染を防ぐ一般的な抵抗性遺伝子とに分類できた。以上の結果から、病原抵抗性の分子機構の一端が明らかになり、今後の詳細な解析の端緒となるものと思われた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 植田浩一

病原菌による作物の収穫に対する被害は大きく、植物の病害に対する抵抗性の研究は盛んである。植物は、深刻な被害を与える病原菌に対して HR を起こす事で、感染を防ぐ機構を発達させた。これまでに、多くの宿主植物と感染する病原菌から R と Avr が単離された。しかし、R による Avr の認識や、R の周りで働く因子の知見は少ない。そこで本研究は、タバコのタバコモザイクウイルス感染による HR の初期の情報伝達機構を明らかにするために、以下の実験を行なった。(1) タバコ N 因子による Avr である p50 の認識機構の解析。(2) N 因子と相互作用する情報伝達因子の探索。(3) HR を誘導する実験系の構築、およびこれを用いた N 因子下流特異的な遺伝子の探索。

これらの実験の結果から、以下の知見を得た。(1) N 因子が p50 を直接、認識しており、その相互作用には、N 因子への ATP の結合が必要なこと。また、p50 との相互作用により ATP の加水分解を促進し、N 因子の高次構造が変化。その結果、下流への情報が伝達されること。(2) その機構を探るため、N 因子と直接、結合する蛋白質をスクリーニングした。タンパク質キナーゼの 1 つである NtSnRK1、スプライシング因子である NtSC35、膜脂質と相互作用する CLB1 を単離し、その生理機能を推定した。(3) p50 発現を DEX によって誘導し、HR を同調的に起こさせる系を確立。HR 初期に応答する遺伝子を多数単離し、N 因子下流特異的な遺伝子と、一般的な抵抗性に関わる遺伝子とに分類した。これらの事から、TMV の認識機構や、HR の遺伝子レベル、タンパク質レベルでの情報伝達経路の網羅的な解析への足がかりができた。特に、N 因子による病原体認識には、ATP マシンが携わっていることを明快に示したことは初めての知見であり、今後の情報伝達機構解明の基礎となる。

以上のように、本論文は植物・病原体相互作用の分子機構の一端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。