

学 位 論 文 題 名

Studies on Primary Structure and Binding Site of Microbial Elicitors
for the Induction of Defense Responses in Soybean Plant

(ダイズ植物に防御反応を誘導する病原微生物由来エリシターの一次構造
および結合部位に関する研究)

学位論文内容の要旨

【第一章】ダイズ組織内の β -1,3-エンドグルカナーゼの作用による糸状菌細胞壁からのエリシターの遊離モデルの提唱

(研究の背景)

ファイトアレキシンは植物が合成する抗菌的な低分子化合物であり、その合成・蓄積は病原体に対する防御システムの一つである。ファイトアレキシン合成は病原体が植物へ侵入する際に誘導されるが、その誘導は病原体由来のユニークなシグナル分子(エリシター)を植物が認識する結果起こると考えられている。以前私の研究室では、ダイズ疫病菌(*Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*)の細胞壁中には、ダイズのファイトアレキシン合成を強く誘導するエリシターが存在することを証明した。さらに、このエリシターが多糖であり、ダイズ組織内の β -1,3-エンドグルカナーゼ(β EGと略)の働きにより不溶性の疫病菌細胞壁から遊離されることを明らかにした。しかし、この遊離エリシター(REと略)がいかなる構造を持ち、宿主の β EGの作用でどのように遊離されるかは未だ不明であった。そこで、本研究ではREの一次構造の解析を行ない、その構造から推測される遊離のメカニズムの提唱を行なった。

(研究方法と成果)

まず、REの分子量をゲル濾過クロマトグラフィーにて分析した結果、およそ数百から5万以上に互ったため、便宜上それらを4分画(RE-I、RE-II、RE-III、RE-IVは、それぞれ平均分子量が40,000, 15,000, 4,000, <500)に分類した。そのうち、RE-I~IIIだけに高いエリシター活性が見られた。次に、各RE分画を構成する単糖の種類を調べるため、REの加水分解物をガスクロマトグラフィーにて分析した。その結果、4分画ともほぼ完全にグルコースから構成されることが判明した。よって次に、RE中でのグルコースの結合様式を調べるため、 ^1H および ^{13}C -NMR分析を行なった。その結果、エリシター活性を持つRE-I~IIIでは β -1,3結合および β -1,6結合の両方が検出されたのに対し、RE-IVでは β -1,3結合のみが検出された。また、RE-I~IIIに再度 β EG処理を行なっても分解は見られず、またエリシター活性にも影響はなかった。一方、RE-I~IIIを今度は β -1,3-エキソグルカナーゼで処理したところ、各RE分画は低分子化され、エリシター活性も消失していた。以上の結果からRE-I~IIIの主要鎖は β -1,6結合であり、 β EGにより分解されない1ないし2残基の β -1,3結合の側鎖の存在が示唆された。さらに、その側鎖がエリシター活性に重要であることも示された。この基本構造からREの遊離メカニズムを推測すると次のように説明できる。疫病菌細胞壁には様々な長さの β -1,6結合の多糖(グルカン)が存在し、細胞壁

本体とは多様な長さの β -1,3結合でつながれている。よって、疫病菌がダイズ植物体へ進入する際、ダイズ組織内の β EGによってその β -1,3結合が切断され、以上に述べた特徴を持つREが遊離すると考えられる。

【第二章】*Pseudomonas syringae* の非病原性遺伝子 $avrD$ 由来の特異的エリシター（シリングライド）に対するレセプター様タンパク質のダイズ可溶性画分における存在

（研究の背景）

植物と病原体との間にみられる相互作用のうち、遺伝子対遺伝子相互作用(gene-for-gene interaction) (GFGと略)は高い特異性を有することで有名な現象である。すなわちGFGとは、ある優性の1遺伝子（抵抗性遺伝子）を持つ植物が、それと対応する優性の1遺伝子（非病原性遺伝子）を持つ病原体の侵入に対してのみ特異的に抵抗反応を発現する現象である。GFGの事例は現在数多く確認されているが、この遺伝子依存的現象に関する分子生物学的メカニズムはまだほとんど解明されていない。

分子生物学的研究が比較的進んでいるGFGの例に、ダイズの抵抗性遺伝子 $Rpg4$ と病原細菌*Pseudomonas syringae* (PSと略)の非病原性遺伝子 $avrD$ との系がある。この系で既に解明されていることは、まず $avrD$ を持つPSがダイズに侵入した際、 $avrD$ の働きでシリングライド(Syrと略)と呼ばれるシグナル分子（エリシター）を合成する。この際ダイズが $Rpg4$ を有していると、ダイズの被侵入部位ではSyrに依存した抵抗反応が誘導される。つまり、 $Rpg4$ を持つダイズはSyrを特異的に認識し速やかに抵抗反応を起こすことで、 $avrD$ を持つPSの侵入を防いでいる。私はこの系のメカニズムをさらに解明するため、想定されるシリングライドレセプターの単離解析を目標に研究を行なっている。その第一段階として、そのようなレセプターがダイズ組織内に実在するか否かの検討を、ダイズ細胞成分と放射線標識したSyrとの結合実験により行なった。

（研究方法と成果）

方法として、 $Rpg4$ を持つダイズの緑葉から細胞成分を抽出し、 ^{14}C で標識したSyrとの特異的結合を測定した。その結果、Syrに対する特異的結合サイトは予想していた膜画分には検出されず、細胞可溶性画分に存在することが明らかとなった。この可溶性画分の結合サイトはプロテアーゼに感受性であることから、一般的なレセプター同様タンパク質を成分とすることが示唆された。またSyrとの特異的結合のスキッチャード解析により、解離定数(K_d)は340 nMで、結合サイトの数はダイズ可溶性タンパク質1 mg 当たり65 pmol存在する計算となった。さらに、Syrの構造類似体を用いた実験では、この結合サイトはエリシター活性を有する類似体とは強く結合するがエリシター活性を持たない類似体とは結合しないという機能的相関が示され、このサイトがシリングライドレセプターであることを強く支持する結果となった。なお、Syrのような特異的エリシターに対するレセプターの研究は、まだほとんど報告例のない先進的分野である。「エリシター・レセプターモデル」は現在世界的な支持を受けているGFGのメカニズムの仮説である。すなわち植物の抵抗性遺伝子がレセプターをコードし、病原体の非病原性遺伝子由来の特異的エリシターがそのレセプターで認識されるという筋書きである。しかしながら本研究においてさらに検討を加えた結果、Syrに対する結合サイトは抵抗性遺伝子 $Rpg4$ を持たないダイズにも同様に存在することが判明した。つまり、 $Rpg4$ 産物はレセプターではなく、より下流のシグナル伝達系に関与し抵抗性発現のオン・オフを決定しているものと推察される。このことは、従来より支持されてきたエリシター・レセプターモデルに一石を投じる重要な発見であると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 永 典 之
副 査 教 授 米 田 好 文
副 査 助 教 授 山 岡 直 人

学 位 論 文 題 名

Studies on Primary Structure and Binding Site of Microbial Elicitors for the Induction of Defense Responses in Soybean Plant

(ダイズ植物に防御反応を誘導する病原微生物由来エリシターの一次構造
および結合部位に関する研究)

自然界において、植物は大多数の病原体に対して抵抗反応を示し、それら病原体の侵入から身を守っている。この抵抗反応は必ずしも単一のものではなく、宿物の種類および侵入する病原体の種類によって異なる多様なものであると思われる。しかしながら、植物の抵抗反応は、宿主の活発な代謝を経て感染後に誘導されることが多く、植物・病原体の系において広く認められる共通の性質であると考えられている。この現象を説明する一つの例として、以前著者の研究室では、ダイズとダイズ疫病菌の系において、植物の抵抗反応は疫病菌細胞壁に結合した多糖エリシター (REと略) により誘起されること、さらにこのエリシター分子は、感染に際し、植物のある特定の因子により結合が切断され遊離することが必須であり、さらにこのエリシターを遊離する植物因子は、 β -1,3-endoglucanase (EG と略) であることが明らかとなっていた。しかしこのREの一次構造や菌糸細胞壁における存在様式については不明である点が多く、著者はそれを明らかにすべく、以下の点について検討を加えた。まず高いエリシター活性が認められるREを構成する単糖の種類をガスクロマトグラフィーにて分析し、それらのほとんどはグルコースのみから構成されることを明らかにした。次にNMR分析により、そのグルコースの結合様式を調べ、高いエリシター活性が認められるREは、 β -1,3および β -1,6のみの結合からなっていることを明らかにした。このREはEGによる再処理でもエリシター活性を失わず、またexoglucanase 処理によりその活性を失うことから、REの主要鎖は β -1,6結合であり、EGにより分解されない1ないし2残基の β -1,3結合の側鎖が存在すること、そしてその側鎖がエリシター活性に重要であることを示した。

次に著者は、遺伝子対遺伝子相互作用 (Gene-for-Gene Interaction) (GFGと略) すなわち、ある抵抗性遺伝子を持つ植物がそれと対応する非病原性遺伝子を持つ病原体に対し特異的に抵抗性を示す現象、の分子生物学的メカニズムについて検討を加えた。比較的研究の進んだGFGの例に、ダイズの抵抗性遺伝子 *Rpg4* と病原細菌 *Pseudomonas syringae* (PSと略) の非病

原性遺伝子 *avrD* との系がある。この系では、*avrD* を持つPSが合成するエリシター・シリノゴライド(Syrと略)がシグナルとなり、*Rpg4*を持つダイズにのみ特異的に抵抗性を誘導する。著者はこの系のさらなる解明のため、想定されるシリノゴライドレセプターの存在確認およびその性質分析を、放射線標識したSyrを用いた結合実験により行なった。まず*Rpg4*を持つダイズ本葉から細胞成分を抽出し、 ^{14}C 標識したSyrとの特異的結合を測定し、Syrの結合サイトが膜画分ではなく細胞可溶性画分にあることを明らかにした。さらに、このサイトは数種のSyr類似体のうちエリシター活性を有するものとのみ強く結合することから、シリノゴライドレセプターであることを示した。さらに著者はSyrの結合サイトが抵抗性遺伝子 *Rpg4* を欠くダイズにも同様に存在することを明らかにし、*Rpg4*産物がレセプターではなく、抵抗性発現に関するさらに下流のシグナル伝達系に関与していると推察した。このような特異的エリシターの研究は、G F G系の解明に必要不可欠でありながら従来ほとんどなされていなかった分野である。さらに著者の提唱するモデルは、エリシター・レセプターモデルという画一的仮説に頼ってきたGFGの研究界に一石を投じる重要な発見と思われる。

以上著者の研究は、植物と病原体とのまさに接点を成す物理的現象に関して新たな知見を得たものであり、生物間情報伝達の機構解明に向けて少なからず貢献するところである。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格のあるものと認める。