

学位論文題名

植物ペルオキシダーゼの多様性と病傷害応答に関する研究

学位論文内容の要旨

ペルオキシダーゼは、過酸化水素を酸化剤とする酸化還元反応を触媒する酵素の総称で、動植物および微生物に広くその存在が知られている。本研究で対象としたclass III植物ペルオキシダーゼ（POX）は植物にのみ認められ、還元剤に対する基質特異性が低く、単一植物種に複数の分子種が存在するなどの特性を有している。一部の分子種では、傷害や病原体感染および酸化的ストレスにより発現が誘導されることも特徴である。ここではイネやタバコのPOXについて、多様性と病傷害応答の観点から研究を行い下記の成果を得た。

(1) POXの多様性に関して

近年のゲノムプログラムの進展に伴い、POXをコードする発現クローン（expressed sequence tag; EST）が多数得られ、イネでは42種、シロイヌナズナでは40種以上の異なったPOXをコードするESTが同定されている。しかしながら、同一植物に多くのPOX分子種が存在する理由は不明のままである。

イネゲノムプログラムにより単離された21種のイネPOXのESTについて、特異的なプローブを調製しRNAゲルブロット分析を行ったところ、個々の遺伝子は全て異なった発現パターンを示し、各イネPOX分子種がイネの生長やストレス応答において、それぞれ異なる多様な機能を担っていることが示唆された。いくつかの処理は、単独で複数のPOX遺伝子（細胞外型と液胞型の両方を含む）を誘導した。したがって、複数のPOX分子種が同じ生理的過程で、協調的あるいは独立に関与していることが示唆され、これが植物に多数のPOX分子種が存在する意義の一つであると考えられた。

(2) POXと病傷害応答に関して

POXの一部の分子種は傷害や病原体感染により誘導され、これらが植物の病傷害応答過程で重要な役割を担っていることは古くから指摘されてきた。病原体感染により誘導され

るPOXは、14種に分類される感染特異的（PR）タンパク質の一種とされている。タバコではPR-1からPR-5までの5種について、感染応答における機能およびその発現誘導に至るシグナル伝達に関する知見が豊富に蓄積している。しかしながら、POX（PR-9）についてはその誘導に至るシグナル伝達に関する研究例はきわめて少ない。同様に、傷害誘導性POXについてもほとんど知見が得られていないのが現状である。このような理由から、本研究では病傷害誘導性POXをコードするcDNAをタバコより単離し、それらに対応する遺伝子の発現特性を調べた。

タバコモザイクウイルス（TMV）感染タバコ葉を用いて構築したcDNAライブラリーより2種の新規POX cDNAsを単離した。一方（*tpoxN1*）は傷害誘導性で、他方（*tpoxC1*）はTMV感染による過敏感反応（hypersensitive reaction; HR）に伴って誘導されるものであった。

*tpoxN1*遺伝子は、切断傷害後30分という非常に短時間で転写産物の蓄積が確認され、7日後には下位葉に傷害を与えたタバコ植物の無処理上位葉にも転写産物が蓄積していた。*tpoxC1*遺伝子は、*N*遺伝子を有するタバコではTMV感染によるHRに伴い誘導され、*N*遺伝子を持たずHRを示さないタバコではTMV感染による応答は認められなかった。既知の病傷害応答関連シグナル物質であるサリチル酸（SA）、メチルジャスモン酸（MeJA）およびエチレン生成剤のエテフォンで処理したタバコ葉切片において、HR誘導性である酸性PR-1タンパク質遺伝子はSAにより、傷害誘導性である塩基性PR-1タンパク質およびプロティナーゼインヒビター-II遺伝子はMeJAおよびエテフォンにより誘導された。これとは対照的に、ここで得られた両POX遺伝子は、いずれのシグナル物質によっても誘導されなかった。したがって、*tpoxC1*および*tpoxN1*遺伝子は、HRおよび傷害応答系においてこれまでPRタンパク質遺伝子で明らかにされてきたものとは全く異なる新規なシグナル伝達系を介して誘導され、その誘導には未知のシグナル物質が関与していると示唆された。

高発現プロモーター下に*tpoxC1*cDNAを連結しタバコに導入したところ、*tpoxC1* mRNAレベルの高かった個体の細胞間隙浸出液に非形質転換体には認められないPOX分子種（等電点9.3以上、分子量約34 k）が認められた。このタンパク質をピログルタミルアミノペプチダーゼ処理した後N末端アミノ酸配列を解析したところ、*tpoxC1* cDNAから予想される成熟N末端アミノ酸配列（2番目以降）と5残基にわたり一致した。*tpoxC1*遺伝子を過剰発現する形質転換タバコと選抜マーカーのみが導入された対照形質転換タバコにTMVを接種し、形成される壊死斑の直径を比較したところ、*tpoxC1*を高レベルで発現する個体でのみ有意に壊死斑の直径が減少していた。以上の結果から、*tpoxC1*遺伝子は分子量

34k, 等電点9.3以上の細胞外分泌型POXをコードし, そのタンパク質はTMV感染の増殖を抑制する過程に関与することが示唆された.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 井 博 和
副 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 内 藤 哲
副 査 助 教 授 伊 藤 浩 之

学 位 論 文 題 名

植物ペルオキシダーゼの多様性と病傷害応答に関する研究

本論文は、図30、表8、引用文献158を含み、7章からなる総頁138の和文論文である。別に参考論文6編が添えられている。

ペルオキシダーゼは、過酸化水素を酸化剤とする酸化還元反応を触媒する酵素の総称で、動植物および微生物に広くその存在が知られている。本研究で対象としたclass III植物ペルオキシダーゼ(POX)は植物のみに認められ、還元剤に対する基質特異性が低く、単一植物種に複数の分子種が存在するなどの特性を有している。一部の分子種では、傷害や病原体感染および酸化的ストレスにより発現が誘導されることも特徴である。ここではイネやタバコのPOXについて、多様性と病傷害応答の観点から研究を行い下記に示すような結果を得た。

(1) POXの多様性に関して

近年のゲノムプログラムの進展にともない、イネやシロイヌナズナでは異なるPOX分子種をコードするcDNAが多数得られているが、単一植物に多くのPOX分子種が存在する理由は不明のままである。21種類のイネPOX分子種をコードする遺伝子それぞれについて特異的なプローブを調製しRNAゲルブロット分析を行ったところ、個々の遺伝子は全て異なった発現特性を示すことが明らかとなった。このことより、各POXがイネの生長過程やストレス応答において、それぞれ異なる多様な機能を担っていることが示唆された。傷害、紫外線照射、パラコート処理、エテフォン処理およびジャスモン酸処理による刺激に対する応答を調べたところ、単一の刺激により複数のPOX遺伝子が誘導され、それらには細胞外分泌型および液胞局在型と推定されるPOX

をコードする遺伝子を両方含む場合があることが明らかとなった。したがって、特定の生理過程に複数のPOX分子種が独立にもしくは協調的に関与していることが示唆され、そのことが単一植物に多数のPOX分子種の存在する意義のひとつであると判断された。

(2) POXと病傷害応答に関して

一部のPOX分子種は傷害や病原体感染により誘導され、これらが植物の病傷害応答過程で重要な役割を担っていることは古くから指摘されてきた。病原体感染により誘導されるPOXは、感染特異的（PR）タンパク質の一種とされている。ここでは、病原体感染あるいは傷害により誘導される新規POX cDNAs をタバコから2種類単離し、それぞれに対応する遺伝子の発現特性を調べた。その結果、一方 (*tpoxN1*) は傷害により迅速かつ全身的に誘導されたが、既知の傷害応答関連シグナル物質であるメチルジャスモン酸やその誘導体あるいはエチレン生成剤であるエテフォンでは誘導されなかった。また、もう一方のPOX遺伝子 (*tpoxC1*) はタバコモザイクウイルス (TMV) 感染による過敏感反応にともなって誘導されたが、サリチル酸、ジャスモン酸およびエテフォンなどでは誘導されなかった。以上の結果は、これらのPOX遺伝子はこれまでに明らかにされてきたシグナル伝達とは全く異なった新しい経路で誘導されること、またこれらの遺伝子の発現には未知のシグナル物質および新規な病傷害シグナル伝達系が関与している可能性を示唆した。

TMV感染による過敏感反応にともなって誘導される *tpoxC1* を過剰発現する形質転換タバコを作成し、細胞間隙浸出液に予想されるタンパク質が蓄積することを認め、これがシグナルペプチドを有する細胞外分泌型であることを明らかにした。さらに、得られた形質転換植物にTMVを接種し、形成される壊死斑の大きさを関連のない遺伝子を導入した対照植物と比較した結果、導入 *tpoxC1* 遺伝子の発現レベルが高いものは対照植物より壊死斑が小さいという傾向を示し、導入した病原体感染誘導性POX遺伝子産物がTMVの増殖の抑制に関わることを示唆した。

以上の結果は、植物に多くのペルオキシダーゼ分子種が存在することのひとつの理由を明らかにするとともに、幾つかのペルオキシダーゼはこれまでに知られているシグナル伝達とは異なる新規な経路で誘導されること、またこれらの遺伝子の発現には未知のシグナル物質が関与している可能性を提示するものであり、学術的に高く評価されるものである。

よって審査員一同は、平賀勲が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。