冬小麦におけるアブシジン酸誘導性 病原菌関連タンパク質の機能解析

学位論文内容の要旨

越冬性植物は、秋から冬にかけての低温馴化過程において凍結耐性（耐凍性）などの寒冷環境適応機能を高めることが知られている。この耐凍性の獲得には、植物ホルモンであるアブシジン酸（ABA）濃度の上昇が伴う。また、ABA処理した植物は常温でも耐凍性が誘導されることから、ABAが耐凍性の獲得に重要な役割をはたすものと考えられている。これまでに環境ストレスに関連する様々なABA誘導性遺伝子が解析されているが、その翻訳産物の多くが細胞内に局在するものであった。

植物のアポプラストは、組織の凍結時における氷晶成長の開始部位であることや病原菌の感染を最初に受ける部位であることからわかるように、環境ストレスに対する防御応答を最初に行う場とみなされている。そこで、ABA処理によって耐凍性が上昇する冬小麦培養細胞のABA誘導性分泌タンパク質が、低温馴化においてアポプラストに誘導されるタンパク質に相当すると仮定し、これらのタンパク質が寒冷環境適応機構にどのような役割を果たしているかを解明することを目的として研究を進めた。

冬小麦培養細胞（*Triticum aestivum* L. cv. Chihokukomugi）を常温でABA処理すると、低温馴化した実生と同様に耐凍性が上昇する（Koike et al. 1997）。これに並行して、培地中に分泌される細胞外タンパク質の蓄積量が増加し、そのタンパク質組成も変動することが判明した。そこで、ABA誘導性分泌タンパク質群（WASタンパク質：Wheat ABA-induced Secretory proteins）のなかで顕著に誘導されていた25kDタンパク質WAS-2およびWAS-3について、アミノ酸配列の分析およびcDNAクローニングをおこなった。

WAS-2 cDNAは、N末端アミノ酸配列をもとに作成したPCRプローブを用いて、ABA処理した冬小麦培養細胞由来のcDNAライブラリーから単離した。その結果、WAS-2は、小麦を病原菌抵抗性を誘導する薬剤で処理した時に誘導されるWCI-5遺伝子の翻訳産物やタバコの病原菌関連タンパク質NtPRp27と相同性を持っていた。また、培養細胞におけるWAS-2の転写産物ならびに翻訳産物とともに、ABAや β -グルカン、キトサン、病原菌の細胞壁画分で処理することによって誘導された。また、小麦実生においてWAS-2は低温馴化によって誘導され、アポプラストに蓄積することが明らかになった。これらの結果から、WAS-2は、ABAや低温誘導性であると共に病原菌抵抗性に関与することが示唆された。また、推定されるアミノ酸配列をもとにPSI-BLASTによるモチーフ

検索をおこなった結果、WAS-2には動物や微生物で同定されているアミノペプチダーゼMのZn結合領域が存在することが明らかになった。

一方、WAS-3タンパク質は、N末端アミノ酸配列の解析の結果、オオムギのprotein R、エンバクのpermatin、冬ライ麦のタウマチン様不凍タンパク質と高い相同性を持っており、タウマチン様タンパク質 (TLP) に属するものと考えられた。TLPは病原菌関連タンパク質 (PR proteins) の中の一群を成す抗菌性タンパク質として知られているものの、その詳しい作用機作については不明な点が残されているため、WAS-3の機能解析を試みた。ABA処理した冬小麦培養細胞のcDNAライブラリーから、オオムギの抗protein R抗体を用いてイムノスクリーニングを行い、WAS-3をコードする三種類のcDNAクローンを得た。これらのcDNAの塩基配列から予想される一次構造にはTLPモチーフが含まれており、推定される分子量や等電点は、三種類とも約21kDでpI 7.46と同一であった。培養細胞を用いたノザン解析の結果、WAS-3の転写産物は、ABAの他、 β -グルカンやキトサン、病原菌の細胞壁成分などのエリシター処理によって誘導されることが明らかになった。また、オオムギ抗protein R抗体を用いたイムノプロット解析の結果でも、培養細胞において、WAS-3は、ABAやエリシター処理で誘導されることがわかった。また冬小麦実生では、WAS-3は低温馴化ならびにABA処理によってアポプラストに誘導された。次に、WAS-3の活性を明らかにするために、三種類のWAS-3 cDNAsのなかの一つであるWAS-3a cDNAを用いて、石川農業短期大学農業資源研究所の島田多喜子博士の協力のもと、春小麦 (*T. aestivum* L. cv. Haruyutaka) 由来のHY-1細胞にパーティクルガンによって遺伝子を導入し、WAS-3aの産生を試みた。これにより、組み換えWAS-3aタンパク質 (rWAS-3a) を分泌する形質転換体tgHY-1を創出できたため、この培地中から高度に精製したrWAS-3a画分を用いて不凍活性と抗菌活性について検証した。不凍活性の検定は低温顕微鏡を用いておこなったが、rWAS-3aによる氷晶成長の阻害活性は検出されなかった。また、異なる分類群に属する六種類の植物病原菌を用いてrWAS-3の菌糸の成長阻害活性の検定を行ったところ、rWAS-3aは糸状菌 (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria brassicicola*, *Microdochium nivale*) に対して抗菌活性を示したが、鞭毛菌*Pythium irregulare*、担子菌*Typhula* spp.、子のう菌*Sclerotinia borealis*に対しては抗菌活性を示さなかった。これらの病原菌は異なる細胞壁成分を持つことから、菌から調製した細胞壁成分とrWAS-3aの親和性を調べたところ、rWAS-3aに最も感受性であった*F. oxysporum*の細胞壁成分に最もよく結合した。さらに、*F. oxysporum*の細胞壁の主成分が β -1,3-グルカンであることから、グルコースが β -1,3-結合したポリマーであるカードランを用いて結合活性を調べたところ、rWAS-3aとの親和性が認められた。この結果は、WAS-3aの抗菌作用に糸状菌の細胞壁との結合が関与することを示唆している。また、*M. nivale*は低温下においてrWAS-3aに感受性であったことから、WAS-3aは、常温下での糸状菌による感染防御機構に関与するのみならず、越冬中における雪腐れ病菌抵抗性にも関与することが示唆された。

以上の結果から、冬小麦のWAS-2およびWAS-3はABA誘導性病原菌関連タンパク質であり、低温馴化過程でアポプラストに蓄積することによって越冬期間中の病原菌抵抗性に関与することが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 歩

副 査 教 授 藤 川 清 三 (大学院農学研究科)

副 査 教 授 山 本 興 太 朗

学 位 論 文 題 名

冬小麦におけるアブシジン酸誘導性

病原菌関連タンパク質の機能解析

越冬性草本植物は、冬季に凍結や乾燥などの様々な寒冷環境ストレスを受けるが、特に多雪地帯に於いては雪腐れ病菌の感染を受けやすくなる。病原菌の感染や凍結ストレスは、まず初めに、細胞壁などのアポプラストに於いて防御応答が行われることから、非常に重要な場所であることが考えられるが、アポプラストに局在する物質が寒冷環境ストレス耐性にどのような役割を果たしているかという点についてはあまりよく知られていない。植物の寒冷環境ストレス耐性は、低温馴化過程に獲得されると考えられている。低温馴化過程では、内在性のアブシジン酸 (ABA) 含量が増加するため、低温馴化に伴う細胞の形態的、生理的变化には、ABAが関与している可能性が示唆されている。これまでに、寒冷環境ストレスに関与するABA誘導性遺伝子が多数単離されているが、その翻訳産物の多くが細胞内に局在するものであった。そこで、申請者は、ABA処理によって耐凍性が上昇する冬小麦培養細胞 (*Triticum aestivum* L. cv. Chihokukomugi) を用い、細胞外に分泌されるABA誘導性タンパク質の解析を通して、アポプラストタンパク質が寒冷環境適応機構にどのような役割を果たしているかを解明することを目的として研究を行った。

ABA処理した冬小麦培養細胞では、未処理の細胞に比べて分泌タンパク質の蓄積量が増加し、そのタンパク質組成も変動することが判明した。そこで、ABA誘導性分泌タンパク質群 (WASタンパク質: Wheat ABA-induced Secretory proteins) のなかで顕著に誘導されていた25kDタンパク質WAS-2およびWAS-3について、アミノ酸配列の解析およびcDNAクローニングを行った。ABA処理した冬小麦培養細胞のcDNAライブラリーから単離したWAS-2 cDNAは、小麦を病原菌抵抗性を誘導する薬剤で処理した時に誘導されるWCI-5遺伝子と相同性を持っていた。また、培養細胞におけるWAS-2の転写産物ならびに翻訳産物はともに、ABAの他、エリシターである β -グルカン、キトサン、病原菌の細胞壁画分で処理することによって誘導された。また、小麦実生ではWAS-2は低温馴化によって誘導され、アポプラストに蓄積することが明らかになった。これらの結果が

ら、WAS-2は、ABAや低温誘導性であると共に病原菌抵抗性に関与することが示唆された。また、推定されるアミノ酸配列をもとにPSI-BLASTによるモチーフ検索をおこなった結果、WAS-2には動物や微生物で同定されているアミノペプチダーゼMのZn結合領域が存在することが明らかになった。

一方、WAS-3タンパク質は、N末端アミノ酸配列の解析の結果、オオムギのprotein R、エンバクのpermatin、冬ライ麦の25 kD不凍タンパク質と高い相同性を持っており、タウマチン様タンパク質 (TLP) に属するものと考えられた。TLPは病原菌関連タンパク質 (PR proteins) の中の一群を成す抗菌性タンパク質として知られているものの、抗菌活性における詳しい作用機作については不明な点が残されている。そのため、ABA処理した冬小麦培養細胞のcDNAライブラリーから、WAS-3をコードする三種類のcDNAクローンを得た。これらのcDNAの塩基配列から予想される一次構造にはTLPモチーフが含まれており、推定される分子量と等電点はいずれも21kDならびにpI 7.46であり、三種類とも同一であった。培養細胞を用いたノザン解析の結果、WAS-3の転写産物は、ABAの他、 β -グルカン、キトサン、病原菌の細胞壁画分などのエリシター処理によって誘導されることが明らかになった。また、オオムギ抗protein R抗体を用いたイムノプロット解析の結果でも、WAS-3は、培養細胞において、ABAやエリシター処理で誘導されることがわかった。また冬小麦実生では、WAS-3は低温馴化ならびにABA処理によってアポプラストに誘導された。WAS-3の機能解析のために、三種類のWAS-3 cDNAsのなかの一つであるWAS-3a cDNAを、春小麦の高効率発現系に導入し、組み換えWAS-3aタンパク質 (rWAS-3a) の産生を試みた。これにより、rWAS-3aを分泌する形質転換体を創出できたため、この培地中から高度に精製したrWAS-3a画分を用いて不凍活性と抗菌活性について検証した。不凍活性の検定は低温顕微鏡を用いておこなったが、rWAS-3aによる氷晶成長阻害活性は検出されなかった。また、異なる分類群に属する六種類の植物病原菌を用いてrWAS-3の菌糸の成長阻害活性の検定を行ったところ、rWAS-3aは糸状菌 (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria brassicicola*, *Microdochium nivale*) に対して抗菌活性を示したが、鞭毛菌*Pythium irregulare*、担子菌*Typhula* spp.、子のう菌*Sclerotinia borealis*に対しては抗菌活性を示さなかった。これらの病原菌は異なる細胞壁成分を持つことから、菌から調製した細胞壁画分とrWAS-3aの親和性を調べたところ、rWAS-3aに最も感受性であった*F. oxysporum*の細胞壁画分に最もよく結合することがわかった。さらに、*F. oxysporum*の細胞壁の主成分が β -1,3-グルカンであることから、グルコースが β -1,3-結合したポリマーであるカードランを用いて結合活性を調べたところ、rWAS-3aとの親和性が認められた。この結果は、WAS-3aの抗菌作用に糸状菌の細胞壁との結合が関与することを示唆している。また、*M. nivale*は低温下においてrWAS-3aに感受性であったことから、WAS-3aは、常温下での糸状菌による感染防御機構に関与するのみならず、越冬中における雪腐れ病菌抵抗性にも関与することが示唆された。

以上の結果は、冬小麦のWAS-2およびWAS-3がABA誘導性の病原菌関連タンパク質であることを示すとともに、低温馴化過程でアポプラストに蓄積することによって越冬期間中の病原菌抵抗性に関与する可能性を示唆した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また、研究者として誠実かつ熱心であり、大学院過程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。