

氏名(本籍)	高井亮太(茨城県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2817号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	エリシター応答性イネ遺伝子 <i>EL5</i> の解析
主査	筑波大学教授 理学博士 長谷川 宏 司
副査	筑波大学教授 農学博士 久 島 繁
副査	筑波大学教授 農学博士 白 井 健 二
副査	筑波大学教授 農学博士 岩 堀 修 一
副査	農業生物資源研究所 農学博士 南 栄 一

論文の内容の要旨

イネ懸濁培養細胞はキチンの加水分解物であるN-アセチルキトオリゴ糖をエリシターとして認識し、一過的な膜電位変化、イオンフラックス、活性酸素生成のような秒または分単位で観察される初期反応、ファイトアレキシン生成のような遅い反応からなる抵抗性反応を展開する。これらは病原菌の感染を受けた植物が展開する反応と質的に同一のものであり、培養細胞が植物体に比べて生理学的、生化学的により均一な集団であると考えられること、抵抗性の誘因がエリシターという化学物質であるため、それを投与することで反応自体の人為的コントロールがより容易であること等を勘案すると、本実験系は抵抗性反応の解析のモデル系として大きな利点を有している。このような抵抗性反応の過程では遺伝子発現のダイナミックな変化が起こっており、反応の調節に深く関わっていると考えられるが、発現が変化する遺伝子のほとんどについてその生理的意義が明らかになっていないのが現状である。そのような背景のもとに本研究は、サブトラクション法によって単離された新規エリシター応答性遺伝子 *EL5* についてその構造的特徴、発現特性を明らかにした。更に動物や酵母でごく最近明らかになってきた知見を採用しつつその翻訳産物の機能を明らかにすることを目指した。まず、cDNAライブラリーのスクリーニングによってアミノ酸コード領域を完全にカバーするcDNAの単離に成功し、その塩基配列を解読した。その結果、本遺伝子はアミノ酸配列のほぼ中心部にRingフィンガーの変形であるRing-H2フィンガーモチーフを有していること、またそれ以外の領域の相同性を詳細に検討した結果、アラビドプシスで同定されている機能未知の遺伝子群、*ATL*ファミリーに特徴的な構造を有することを明らかにした。これは単子葉植物で初めて単離・同定された*ATL*ファミリー遺伝子であり、このファミリーが進化の過程で保存されていることが示された。また*ATL*ファミリーはRing-H2フィンガータンパク質の中でも植物に固有のものであることから、本遺伝子の産物は植物に固有の機能を担っていることが示唆された。イネ培養細胞における本遺伝子の発現に至るシグナル伝達経路を、すでに単離されたエリシター応答性遺伝子 (*EL2*, *EL3*, *PAL*, キチナーゼ, グルカナーゼ) のそれと比較検討した。遺伝子発現に先立って起こるイオンフラックスの結果、プロトンの流入による細胞質酸性化現象が起きること、及びタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤であるカリクリンAが単独で活性酸素生成を誘導することが知られていたため、細胞質酸性化を誘導するプロピオン酸、及びカリクリンAを細胞に処理しこれらの遺伝子発現を解析したところ、*EL2*, *EL3*, *PAL*はプロピオン酸及びカリクリンAを細胞に処理しこれらの遺伝子発現を解析

したところ、*EL2*, *EL3*, *PAL*はプロピオン酸及びカリクリンA処理によって誘導され、キチナーゼ、グルカナーゼはそのいずれにも応答しなかった。興味あることに本遺伝子はプロピオン酸には応答しないがカリクリンAに反応するという、この両グループのいずれにも属さない特徴を有することを明らかにした。動物や酵母細胞での最新の研究結果によりそれまで生化学的な機能が不明であったRingフィンガータンパク質のいくつかについて、細胞内タンパク質の主要な分解系であるユビキチン・プロテアソーム系の酵素、ユビキチンリガーゼ (E3) であることが報告され始めた。そこで本研究では試験管内でユビキチン・プロテアソーム系を再構成し、それを用いて本遺伝子産物のE3活性について検討した。大腸菌マルトース結合タンパク質 (MBP) を人為的なユビキチン化基質として解析したところ、本遺伝子産物は本再構成系のコンポーネントであるE1 (ユビキチン活性化酵素), E2 (ユビキチン結合酵素), ユビキチン, ATPのすべてに依存してMBPをユビキチン化する活性, すなわちE3活性を有することを証明した。この活性にはRing-H2フィンガーモチーフが必須であった。更に本遺伝子産物と共役してMBPをユビキチン化するE2のcDNA (*OsUBC5a*, *OsUBC5b*) をイネより単離し, うち*OsUBC5b*はN-アセチルキトオリゴ糖応答性であることを示した。これらは高等植物におけるE2, E3の生化学的相互作用の証明及びエリシター応答におけるタンパク質分解機構の活性化を示した最初の例である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

植物の病害は農業上重要な問題であり, その克服に向けて遺伝子組み換え等の最新技術を用いた努力がなされてきている。病害抵抗性が多数の遺伝子の複雑な相互作用の結果であることが次第に明らかになりつつあり, そのネットワークの中でタンパク質の分解を通じた機能調節が大きな役割を有することは予想されていたが, 実際にその分子機構にまで踏み込んだ研究はなされてこなかった。

本研究では, イネのエリシター応答性遺伝子の一つ, *EL5*の構造的特徴を解析し, それまで主としてアラビドプシスにおいて知られていた*ATL*ファミリーが単子葉植物, イネにも存在することを初めて明らかにした。また本遺伝子の発現調節に関わる細胞内シグナル伝達機構の解析から, 他の応答性遺伝子とは異なるユニークな発現調節を受けていることを明らかにし, シグナル伝達の分子機構の複雑性を示唆する結果を得た。更に, 構造上の特徴を手掛かりにその機能解析にまで研究を進展させ, 現在の生命科学のホットスポットの一つである細胞内タンパク質分解系に関する最新の知見を機敏かつ的確に援用した。それによって本遺伝子産物の生化学的機能を明らかにしたのみならず, それと協調して働くカウンターパート (*OsUBC5a*, *OsUBC5b*) の解析にまで研究を展開し, 高等植物において世界で初めてエリシター応答反応におけるタンパク質分解機構の活性化を示すとともに, それに関わる因子の単離に成功したことは高く評価できる。

本研究によって得られた知見は, 病害抵抗性増強剤の開発や抵抗性作物自体の育種といった農業への応用展開を実現可能にした点においてその役割は極めて大きいと判断する。

よって, 著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。