

氏名(国籍)	タリク マハムド (パキスタン)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第4335号		
学位授与年月日	平成19年3月23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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Analysis of Defense Related Proteins in Rice against the Bacterial Blight Pathogen using Proteomic Approach (白葉枯病菌に対するイネ防御関連タンパク質群のプロテオミクス解析)		
主査	筑波大学教授	農学博士	柿 寫 眞
副査	筑波大学教授	農学博士	江 面 浩
副査	筑波大学教授(連携大学院)	農学博士	石 井 英 夫
副査	筑波大学助教授	農学博士	山 岡 裕 一
副査	農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所チーム長	薬学博士	小 松 節 子

論文の内容の要旨

白葉枯病は、イネに大きな被害を及ぼすため稲作での重要な病害となっている。しかし、この病原菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)を防除するための有効な手段が少なく、その早急な開発が望まれている。しかし、本菌とイネとの相互作用、特にイネの抵抗性機構については不明な点が多く、その防除技術の開発にとって大きな支障となっている。最近、抵抗性機構の解明においては、種々の分子生物学的手法や生化学的手法が用いられているが、イネにおいてはゲノム塩基配列解読が終了し、その情報を利用しての重要形質に対する機能解明研究が活発に行われている。プロテオーム解析技術は、機能発現に関与する因子をタンパク質群として捕らえることができ、包括的解析技術の一つとして注目されている。本研究では、プロテオミクス解析技術を用いて、白葉枯病菌に対するイネの防御関連タンパク質群を解析することを目的とした。

最初に、イネ品種 Java14 の応答機構を解析するために、*X. oryzae* pv. *oryzae* の T7174 (race 1) と Xo7435 (race 4) を用いた。Java14 は T7174 に対して非親和性を、Xo7435 に対して親和性を示す。播種3週間後の Java14 に白葉枯病菌を接種すると、接種後6日目まで明らかに病徴の差異が認められることから、プロテオーム解析では病徴の現れる以前の応答機構を解析するために、接種後3日目のイネの細胞質と膜画分を遠心分離法にて分画した。分画後、タンパク質群を二次元電気泳動で分離し、20種類のタンパク質群の変動を確認して、気相プロテインシーケンサーや質量分析計を用いて構造を解析した。その結果、白葉枯病菌の感染により、エネルギー産生関連タンパク質、代謝関連タンパク質、そして防御関連タンパク質等が経時的に変動していることを明らかにした。次に、白葉枯病菌の感染による、これらタンパク質群の発現過程を明らかにするために、環境ストレスに関与する植物ホルモンのジャスモン酸を用いて、その下流に位置するタンパク質群との関連をプロテオーム解析技術で検討した。その結果、少なくとも thaumatin-like protein (PR5) と probenazole inducible protein (PBZ1) の2種類のたんぱく質が T7174 および Xo7435 の感染後にジャスモン酸を介して発現することを明らかにした。

さらに、PBZ1 と白葉枯病菌との関係を解析するために、播種3週間後の Java14 に、PBZ1 の誘導薬剤と

して報告されているプロベナゾールを3日間処理して、白葉枯病菌を接種し、タンパク質群の変動を解析した。プロベナゾール処理により、PBZ1が顕著に誘導されるとともに、PR5とPR10も誘導された。一方、Xo7435の接種前にプロベナゾール処理することにより病徴が抑制されることも確認し、プロベナゾール処理後のT7174あるいはXo7435感染により、PR5の発現量はPBZ1の発現量以上に亢進することが明らかになった。そこで、PR5が白葉枯病抵抗性発現における鍵タンパク質かどうかを明らかにするために、PR5遺伝子導入過剰発現形質転換イネを作出し、白葉枯病菌抵抗性を評価した。その結果、PR5遺伝子導入過剰発現形質転換イネは、白葉枯病菌に対して抵抗性を示した。

以上のことより、白葉枯病菌感染時にはエネルギー産生系、代謝系および防御系が作動することをプロテオーム解析により明らかにした。さらにジャスモン酸の誘導を介する抵抗性反応においても、PBZ1の発現と同時に最終的にPR5を誘導することが、白葉枯病抵抗性に関与していることが明らかとなった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

イネ白葉枯病は、*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* という病原細菌によって引き起こされるイネの重要病害の一つである。イネ白葉枯病はアジアにおいてイネに最も甚大な被害を与える病害として知られていたが、現在ではアジアのみならずアフリカ、北米、南米、オーストラリアなど世界の多くのイネ栽培地域で頻繁に発生が報告されている。日本では特に西南温暖地域において多発していたが、1965年をピークとして発生は減少してきた。しかしながら、1993年の異常気象に伴い再発し、全国的に多大な被害を与えた。本病に対して卓効を示す薬剤が少ないことや、現在の栽培品種のほとんどが日本に存在する本菌レースのすべてに感受性であることなどから警戒が必要となっている。さらに、中国、ベトナム、ミャンマーなどでは、本菌に感受性の高いハイブリッドライスの普及と共に大きな問題となっている。そのため、この病原菌に対する有効な防除手段の開発が早急に望まれている。しかし、本菌とイネとの相互作用、特にイネの病気に対する抵抗性機構については不明な点が多く、その防除技術の開発にとって大きな支障となっている。そのため、本研究では、機能発現に関与する因子をタンパク質群として捕らえることができるプロテオミクス解析技術を用いて、本病原菌に対するイネの防御関連タンパク質群を解析することを目的としている。その結果、抵抗性に関与する2つのタンパク質の存在を明らかにするとともに、これらのタンパク質が抵抗性の発現に大きな役割を果たしていることを証明している。

以上のように、本研究は、イネの抵抗性機構の一端をタンパク質レベルで明らかにしたことで、大変高く評価される。また、本研究は、病害防除のための基礎研究としても大変価値の高いものであると判断される。

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。