

氏名(本籍)	みつ はら いち ろう 光原 一郎(茨城県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博乙第1792号
学位授与年月日	平成14年2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2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 Self-Defence Mechanisms Using Tobacco Mosaic Virus-Infected Tobacco Leaves (タバコモザイクウイルス感染タバコ葉における自己防御機構の解析)
主査	筑波大学教授 農学博士 田仲可昌
副査	筑波大学教授 理学博士 鎌田博
副査	筑波大学教授 理学博士 沼田治
副査	筑波大学助教授 理学博士 漆原秀子

### 論文の内容の要旨

植物は、その適応戦略上動物とは異なった自己防御機構を持っていると考えられている。植物の病害抵抗性機構の中で、植物に特徴的な反応である「過敏細胞死」のメカニズムについて、分子生物学的な解析を試みた。この過敏細胞死は、特定の病原体と宿主植物の「抵抗性遺伝子」との相互作用の結果として起こる植物の防御反応であり、感染を受けた細胞が積極的に死を選ぶことによって、病原体を道連れにして局所的に封じ込める一種のプログラム細胞死であると考えられている。本研究では、この植物の過敏細胞死の実行機構を分子レベルで理解するために、タバコモザイクウイルス(TMV)と、TMVに対する特異的抵抗性遺伝子であるN遺伝子を持つサムソンNNタバコを用い、過敏細胞死の過程を分子生物学的に解析した。

現在の分子生物学において、目的遺伝子を過剰発現あるいは発現抑制する事によって、その遺伝子の機能を特定する事は既に一般的な方法といえる。しかし、本研究の開始時においては、植物では十分な発現量を示す発現ベクターが開発されていなかった。そこで、各種のプロモーターやエンハンサー等を組み合わせることによって、高発現ベクターを構築することを試みた。作製した発現ベクターは、従来高発現ベクターとして用いられていたカリフラワーウイルス35Sプロモーターを持つものと比べて、タバコで20倍、イネにおいては70倍という非常に高い発現活性を示し、外来遺伝子の高発現に有用であることが示された。また、このベクターは、相同性依存型遺伝子不活性化による内在性遺伝子の発現抑制にも有用であることも明らかになった。この現象を利用して、エチレン合成酵素遺伝子の発現量を増減させることにより、エチレンが過敏細胞死に必須のシグナル物質であることを明らかにすることが出来た。

植物における細胞死の決定・実行の分子機構については、未だ明らかにされていないが、動物のプログラム細胞死(アポトーシス)においては*bcl-xL*、*ced-9*、*P35*と言った細胞死抑制遺伝子や、カスパーゼの様な細胞死を実行するタンパク質分解酵素の存在が知られている。*Bcl-xL*、*Ced-9*と言った細胞死抑制タンパク質は、ミトコンドリアの膜電位を維持することにより細胞死の決定を阻害すると考えられており、*P35*タンパク質はカスパーゼを直接阻害することにより細胞死の実行を阻害すると考えられている。このような細胞死決定・実行のメカニズムが植物にも存在するかどうかを調べるために、これら動物の細胞死抑制遺伝子を本研究で開発した高発現ベクターに連結してタバコに導入したところ、形質転換植物では紫外線照射や活性酸素発生型の除草剤処理などによるストレス性の細胞死に耐性を示すことが明らかになった。さらに、形質転換植物では、TMV感染に伴う過敏細胞

死と、その結果として起こる病害応答性遺伝子の発現も抑制されていた。また、*bcl-xL* 導入植物細胞では、塩ストレスによるミトコンドリア膜電位の消失が抑制されていた。興味深いことに、野生型植物では過敏感細胞死に伴うカスパーゼ様活性の一過的な上昇が認められたが、形質転換植物ではこの上昇が一部阻害されていることも明らかになった。これらの結果は、動物と同様の細胞死決定・実行機構が植物にも存在している可能性を示唆している。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

植物のプログラム細胞死の機構については、いまだ不明な点が多く残されている。この研究で初めて、動物の細胞死抑制遺伝子が植物の細胞死を抑制する事が初めて明らかにされた。また、この細胞死抑制遺伝子産物は、植物の細胞内でも動物細胞内と同様にミトコンドリアの膜電位を維持する働きがあり、細胞死実行型のタンパク質分解酵素と考えられるカスパーゼ様活性の上昇を阻害している事が明らかにされた。このことは、植物と動物の細胞死決定・実行機構に共通する点があることを示しており、非常に画期的である。

また、この研究で開発された発現ベクターは、既に国内外の多数の研究室に分譲されて、種々の植物で高発現ベクターとして活用されている。したがって、植物分子生物学全般にたいする貢献も高い研究になっている。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。