

氏名(本籍)	やま かわ ひろ もと 山 川 博 幹 (東 京 都)
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	博 甲 第 2773 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	生物科学研究科
学位論文題目	Tobacco Calmodulins Responsive to Tobacco Mosaic Virus-Induced Hypersensitive Reaction and Wounding (病傷害に応答するタバコカルモデュリンに関する研究)
主 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 白 岩 善 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 佐 藤 忍

論 文 の 内 容 の 要 旨

植物の病原体感染に対する自己防御機構のひとつに過敏感反応 (hypersensitive reaction; HR) がある。タバコはタバコモザイクウイルス (TMV) による感染を受けるが、抵抗性品種では、感染部位が細胞死を起こすことによって病原体をその部位に封じ込めることが知られている。このようなHRを引き起こしている植物においては、周辺の未感染部位に感染特異的 (pathogenesis-related; PR) タンパク質が誘導される。一方、植物に傷害を与えられると塩基性タイプのPRタンパク質が誘導される。PRタンパク質には抗菌活性を有するものがあり、傷口などからのさらなる病原体の感染に対して抵抗性を付与すると考えられている。これまでの研究から、PRタンパク質の発現誘導には、細胞内Ca²⁺レベルの上昇に依存した活性酸素および一酸化窒素 (NO) の発生が必要であることが示されているが、Ca²⁺レベルの上昇からPRタンパク質の誘導に至る機構の詳細については不明のままであった。動物細胞においては、Ca²⁺受容タンパク質のカルモデュリン (CaM) が活性酸素やNOを発生させる酵素を活性化することが知られている。実際、植物においても、接触や感染にともなって細胞内Ca²⁺レベルが上昇し、CaM遺伝子の転写産物が蓄積することが報告されている。本研究では、植物のCaMに着目し、病傷害応答におけるその機能を明らかにすることを目的とし、タバコを用いた生化学的、分子生物学的解析が行われている。

TMV感染あるいは傷害を受けたタバコより、cDNAライブラリースクリーニングあるいはRT-PCRにより、13種類のCaM遺伝子 (*NtCaM1* ~ *13*) が単離された。これらの遺伝子は4種類のCaMタンパク質をコードしており、それぞれ4つのCa²⁺結合モチーフ、EFハンドがよく保存されていた。推定アミノ酸配列によるアライメントおよび系統樹の作成により、これらのCaMタンパク質は3タイプに分けられ、*NtCaM1/2* (タイプI) はポテトPCMIと、*NtCaM3/4/5/6/7/8/11/12* および *NtCaM9/10* (タイプII) はシロイヌナズナ *ACaM2/3/5* と、*NtCaM13* (タイプIII) はダイズ *SCaM-4* とそれぞれ高い相同性を示した。単離したCaM遺伝子の各々は、TMV感染、傷害、防御関連シグナル物質であるサリチル酸やジャスモン酸に対して異なる転写制御を受けていた。さらに、各々のタンパク質に特異的な抗体を用いた解析により、TMV感染後には*NtCaM3* および *NtCaM13* タイプのタンパク質の蓄積が、傷害後には*NtCaM1* および *NtCaM3* タイプのタンパク質の蓄積が認められた。また、CaMタンパク質の蓄積量は転写後の制御を受けており、少なくとも傷害後においては、26Sプロテアソームによるタンパク質分解系によって制御されていることが本研究によって初めて示された。

次に、各タイプのCaMの下流側の情報伝達について以下の2つの手法による解析が行われた。

- (1) 代表的なCaM標的酵素について *in vitro* 系を用いて活性化能が調べられた。NtCaM3タンパク質は活性酸素の発生に関与するNAD⁺キナーゼおよびタンパク質脱リン酸化酵素のカルシニューリンを、NtCaM13はNOシンターゼをより強く活性化し、NtCaM1は両者の中間的な性質を示した。これらの結果から、NtCaM1タイプおよびNtCaM3タイプのCaMはNAD⁺キナーゼを活性化することによって活性酸素発生のための基質となるNADP⁺の供給を促進し、NtCaM13タイプのCaMはNOシンターゼを活性化することによってNOの発生を促すと考えられた。
- (2) *NtCaM1*, *NtCaM3*, *NtCaM13* 遺伝子の各々を過剰発現あるいは発現抑制する形質転換植物が作成された。このうち、*NtCaM13* 遺伝子を過剰発現する形質転換タバコでは、PR遺伝子の構成的な発現が認められ、また、*NtCaM1* 遺伝子を過剰発現あるいは発現抑制したタバコでは、傷害応答のシグナル物質であるジャスモン酸の合成を支配するMAPキナーゼをコードする *wipk* 遺伝子の発現がそれぞれ促進あるいは抑制されていた。これらの結果から、NtCaM1 および NtCaM13 の各々が *wipk* および PR 遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

本研究で得られた知見から、TMV感染後には、NtCaM3およびNtCaM13の各々がNAD⁺キナーゼとNOシンターゼの活性化を介した活性酸素とNOの発生およびそれに続いて起こるPR遺伝子の発現誘導に関与しており、傷害後には、NtCaM1およびNtCaM3がNAD⁺キナーゼの活性化を介した活性酸素の発生および *wipk* 遺伝子の発現誘導を介したジャスモン酸合成に関与しているとする新しいモデルを提唱している。植物において異なるタイプのCaMの各々の合成・蓄積が転写レベルおよびタンパク質レベルで独自に制御されており、病傷害応答に関与していることが本研究によって初めて明らかとなった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、多数のCaM遺伝子をタバコより単離するとともに、ウイルス感染と傷害という2つの環境ストレス条件下において、転写レベルおよびタンパク質レベルで各CaM分子種を別々に定量し、それぞれ異なる分子種が蓄積することを初めて明らかにしたものである。また、CaMの標的となる酵素の活性化および形質転換植物を用いた解析により、総合的にCaMの下流側の情報伝達機構を明らかにした点は特に高く評価される。CaMの植物体内の標的分子を明らかにすることが今後の課題として残されているものの、植物において知られている3タイプ全てのCaM分子種について、生理的、生化学的性質を明らかにした本研究は、植物の情報伝達機構研究の今後の発展に多大な貢献をするものと強く期待される。

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。