

論文内容の要旨

植物は移動できないため、さまざまな環境ストレスに対して常に受け身であり、素早い対応をしなければならぬ。なかでも、昆虫や動物による食害や暴風雨などの物理的作用によって起きる傷害は大きなストレスであり、放置すれば病原菌感染や壊死の広がりにより個体の死にもつながる。このため、植物は傷害に対する防御機構を発達させてきた。傷害応答は、細胞・組織・器官の修復・再生、傷害のシグナル伝達、感染・食害に対する予防など、さまざまな遺伝子が関与する複雑な系である。特に、被害を確実に認識し、一刻も早くその情報を全身に伝達することが重要である。傷害シグナルはジャスモン酸合成を通じて、プロテアーゼインヒビター(PI)などの防御遺伝子の発現を誘導することがこれまでに明らかになっている。しかし、ジャスモン酸合成に至る伝達経路の初期過程で働くタンパク質や全身性シグナルなどはほとんど分かっていない。本研究では、全体としてこの傷害応答の初期過程で起きる現象を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

本研究の前半では、傷害応答の初期過程で発現が制御される遺伝子の単離を試みた。そのために、まず、蛍光ディフュージョンディスプレイ法による傷害応答遺伝子のスクリーニング・クローニング系を確立した。次に、合計64回の独立したPCRによる傷害応答遺伝子の探索により、8種類の傷害応答遺伝子のcDNA断片を得た。このうちクローンA7に対応する転写産物は傷処理により数分以内に蓄積し始め、30分後に極大となる一過的な蓄積パターンを示した。クローンA8、C14、C20に対応する転写産物は傷処理後3時間から12時間の間に蓄積し始めた。これらはいずれも防御関連の遺伝子をコードしていた。PI遺伝子は傷処理後24時間から発現した。これらの傷害応答遺伝子は分・時間・日レベルでの段階的な制御を受けていることがノザン解析によって明らかになった。

このスクリーニングによって、クローンA7以外にも分レベルで傷害に応答する複数の遺伝子の存在が確認されたことから、本研究の後半ではこれらの遺伝子の単離を行った。その結果、すでに単離したクローンA7以外に、クローンC10、C15、6-1を得た。クローンA7とC10は、5'-RACE法によって全長cDNAを得た。A7遺伝子産物は513アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、C末端側にロイシンジッパードメインを持っていた。驚くべきことに、全アミノ酸のうち70%以上が、リジン(K)、グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)から構成されていた。このことから、この遺伝子を*ked*と名付けた。相同性を示す遺伝子は報告されておらず、そのアミノ酸組成より、デヒドリン様の機能を持つのではないかと推定した。6-1は、リン酸処理で誘導されるタバコの*phi-1*と同一であることが分かった。

C10遺伝子産物は356アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、ロイシンジッパードメインとジンクフィンガードメインをもつことから、この遺伝子を *wizz* (wound-induced leu-zipper zinc-finger)と名付けた。アミノ酸配列の相同性検索の結果より、オートムギのABF2やバセリのWRKY3などのよく保存された領域を持つ蛋白質群に属することが示された。そのアミノ酸配列中にはWRKYを含む約60残基が保存されており、この部分がC2-H2型のジンクフィンガードメインとなり転写因子として働くことが推定されている。従ってWIZZも転写因子であると考えられた。GFPとの融合タンパク質をタマネギの表皮細胞で一過的に発現させると、融合タンパク質は核に局在した。ゲルシフトアッセイによって、WIZZはほとんどのWRKYファミリーが結合するDNA配列のTTGAC(C/T)を認識し結合した。この結合はキレート剤の添加によって阻害された。一過的発現実験によって、WIZZはタバコBY-2細胞内では転写活性化能を示さなかった。しかし、この認識配列は多くの防御関連遺伝子の転写制御に関わっていることから、WIZZは傷害応答遺伝子の転写を制御していることが示唆された。

*ked*と*wizz*の転写産物は健全な葉ではみられず、傷害により数分以内に蓄積し始めることから、転写レベルでの制御が示唆される。そこで、両遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子をつなげたプラスミドを作製し、タバコの葉で一過的に発現させた。約0.7kbの*ked*プロモーターを導入した場合、レポーター活性が全く認められなかったことより、約0.7kbの領域では転写に

必要な部分を欠いていることが示唆された。一方、約1.5kbのwizzプロモーターを導入した場合、導入後3時間から6時間にかけてレポーター活性は一過的に上昇した。次に、約1.5kbから約0.2kbまで5'末端側からwizzプロモーターの長さを変えた場合、導入後5時間目のレポーター活性は、プロモーターが短くなるにつれ低下した。このことから、プロモーター上に分散するエレメントが協調的に働いていることが示唆された。

*ked*と*wizz*の転写にかかわるシグナル伝達経路を明らかにするために、タバコ葉の傷害時にさまざまな阻害剤や作動薬で前処理し、その影響を調べた。また、*phi-1*と*wipk*の転写も同時に調べ、非常に早く一過的に発現する遺伝子群がすべて同様の制御を受けているのかどうかを調べた。*ked*と*wizz*の転写産物は、多くの傷害応答遺伝子の発現を誘導するメチルジャスモン酸、リノレン酸、アブシジン酸で処理しても蓄積しなかった。*ked*と*wizz*の傷害による転写産物の蓄積は、シクロヘキシミド前処理では打ち消されなかったことから、新規の蛋白質の合成を必要としないと考えられた。さらに、シクロヘキシミド処理のみで、これら4種類の遺伝子すべての発現が誘導された。傷害による*wizz*転写産物の蓄積は、スタウロスポリン前処理では打ち消され、オカダ酸前処理で持続した。オカダ酸前処理による持続効果は*wipk*の場合にもみられ、蛋白質のリン酸化・脱リン酸化の関与が示唆された。これら4種類の遺伝子の傷害およびシクロヘキシミドによる転写産物の蓄積は、ジフェニレンヨードニウムクロリド前処理では打ち消されなかったことから、NADPHオキシダーゼによる活性酸素種の産出とは関係ないと考えられた。キレーター、チャネルブロッカー、イオノフォア処理の実験から、カルシウムの流入による発現の誘導も認められなかった。細胞膜に局在するH⁺-ATPaseの阻害剤であるエリトロシンB前処理と活性化因子であるフシコクシン前処理は、傷害による転写産物の蓄積を阻害しなかったが、その処理自体で転写産物の蓄積を誘導し、細胞内のpHの変化が関与していることが示唆された。さらに、プロピオン酸処理による細胞内の酸性化によって4種類の遺伝子すべての発現が一過的に誘導された。

これらの結果より、傷害応答の初期過程では、細胞内の酸性化や蛋白質のリン酸化・脱リン酸化による制御が*ked*や*wizz*などの早く一過的に応答する遺伝子群の発現に重要な役割を果たすことが明らかになった。そして、WIZZは転写因子として下流の防御関連遺伝子の発現を誘導し、KEDは細胞内環境の維持・改善にかかわると示唆された。本研究により、いまだ同定されていない傷害応答の全身性シグナルの同定に向けて大きな足がかりができ、新たな展開が期待できる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 原 光二郎

植物に対する環境ストレスのうち、傷害は最も大きなストレスの一つであり、放置すれば病原菌感染や壊死の広がりにより個体の死にもつながる。このため、植物は傷害に対する防御機構を高度に発達させてきた。傷害反応は傷害の認知、情報の伝達、生理応答の三つの素過程に分けられる。この中で、傷害の認知とその情報伝達については未知の部分が多く、分子レベルでの研究も遅れていた。

本研究では、傷害応答の初期過程で発現が制御される遺伝子の単離から始め、それらの性格づけを行うことによって、傷害応答の全体像を明らかにすることを目指した。そのために、蛍光ディファレンシャルディスプレイ法による傷害応答遺伝子のスクリーニング/クローニング系を確立し、11種類の傷害応答遺伝子のcDNA断片を得た。このうち4クローンは傷害後、10分以内にmRNAの蓄積が始まる、超初期応答遺伝子であることが明らかになった。

A7遺伝子産物は513アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、C末端側にロイシンジッパードメインを持つ。全アミノ酸のうち70%以上が、リジン(K)、グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)から構成されていた。このことから、この遺伝子を**KED**と名付けた。相同性を示す遺伝子は報告されておらず、そのアミノ酸組成より、デヒドリン様の機能を持つのではないかと推定した。6-1は、リン酸処理で誘導されるタバコの**PHI-1**と同一であることが分かった。ともにホメオスタシスの維持に係わることが示唆された。

C10遺伝子産物は356アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、ロイシンジッパードメインとジンクフィンガードメインをもつことから、この遺伝子を**WIZZ** (**wound-induced leu-zipper zinc-finger**)と名付けた。アミノ酸配列の相同性検索の結果より、オートムギの**ABF2**やパセリの**WRKY3**などのよく保存された領域を持つ**WRKY**蛋白質群に属することが示された。GFPとの融合タンパク質をタマネギの表皮細胞で一過的に発現させると、融合タンパク質は核に局在した。ゲルシフトアッセイによって、**WIZZ**はほとんどの**WRKY**ファミリーが結合するDNA配列の**TTGAC(C/T)**を認識し結合した。しかし、タバコBY-2細胞内では転写活性化能を示さなかった。とは言え、この認識配列は多くの防御関連遺伝子の転写制御に関わることから、**WIZZ**は傷害応答遺伝子の転写を制御していることが示唆された。

タバコ葉の傷害時にさまざまな阻害剤や作動薬で前処理し、超初期応答遺伝子の転写にかかわる因子を探索した。**WIZZ**および**KED**のmRNAは、多くの傷害応答遺伝子の発現を誘導するメチルジャスモン酸、リノレン酸、アブシジン酸によっては蓄積しなかった。キレーター、チャンネルブロッカー、イオノフォア処理の実験から、カルシウムの流入による発現の誘導も認められなかった。しかし、傷害による**WIZZ** mRNAの蓄積は、スタウロスポリン前処理では打ち消され、オカダ酸前処理で持続した。このことは蛋白質のリン酸化・脱リン酸化が関与することを示唆する。さらに、細胞膜に局在するH⁺-ATPaseの阻害剤であるエリトロシンBと活性化因子であるフシコクシンによってmRNAの蓄積が誘導された。プロピオン酸処理による細胞内の酸性化によって4種類の遺伝子すべての発現が誘導された。したがって、細胞内のpHの変化がこれらの遺伝子発現のトリガーになることが示唆された。これらの結果により、傷害応答の初期過程では、細胞内の酸性化、蛋白質のリン酸化・脱リン酸化が初期応答遺伝子の発現を制御することが示された。さらに、**WIZZ**は転写因子として下流の防御関連遺伝子の発現誘導、**KED**と**PHI-1**は細胞内環境の維持・改善にかかわることも明らかにされた。

以上のように、本論文は、植物の傷害応答の機構解明のために新しい、重要な知見を加えるものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。したがって、審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。