

氏名	笠井 智成
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第3439号
学位授与の日付	平成19年 3月23日
学位授与の要件	自然科学研究科エネルギー転換科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	エンドウ細胞壁における病原菌シグナル認識・応答機構の解析 ー病原菌シグナルに応答するアポプラスト Cu/Zn-SOD についてー
論文審査委員	教授 白石 友紀 教授 一瀬 勇規 助教授 豊田 和弘

学位論文内容の要旨

通常、植物病原糸状菌の多くは植物表層に付着した後、細胞壁を貫通して侵入することから、宿主/非宿主の初期の認識や応答には細胞壁が重要な役割を果たしていると考えられる。最近になって、エンドウ細胞壁画分にはジアミンオキシデース、パーオキシデース(POX)などの酸化還元酵素が存在し、NTPaseと同様に病原菌シグナルを認識し、応答することが判明した。このように、細胞壁には酸化還元酵素が存在していることが明らかになってきたが、これらが防御応答やシグナル伝達に関与するか否かについては十分解明されていない現状であった。

そこで細胞外のCu/Zn型Superoxide dismutase(Cu/Zn-SOD)に注目してその構造と機能の解析を進めた。まず、エンドウcDNAライブラリーからの全長のCu/Zn-SOD cDNAを単離した。次にエンドウ幼苗を用いてノーザン解析を行った。Cu/Zn-SOD遺伝子発現は傷によっても誘導され、エリシター処理でさらに発現が促進される一方、サプレッサー処理では抑制されることを明らかにした。ウエスタン解析の結果、Cu/Zn-SODの蓄積は遺伝子発現をよく反映し、エリシター処理で増加することも明らかとなった。さらに、エンドウ細胞壁から抽出したタンパク質画分のSOD活性は、エリシター処理で水対照区に比べ1.2倍に増加し、サプレッサーでは阻害された。PsCu/Zn-SOD1を大腸菌で発現させた組換えタンパク質の活性は、褐紋病菌エリシターやサプレッサーで直接制御を受けること、すなわち、本SODが直接病原菌シグナルを認識して応答することを明らかにできた。

これらの結果、エンドウ細胞外Cu/Zn-SODは感染初期の防御応答において1) 活性酸素の消去を行うが、2) 生成されるH₂O₂が迅速な細胞壁の強化に関与し、さらに3) H₂O₂の生成を介して防御応答へのシグナル伝達が促進されると推察した。実際に、エンドウ葉に1 mMのH₂O₂を滴下処理すると、POX21 mRNAの発現量が増加し、処理後6時間には病原菌に対する抵抗化が起こることが判明した。一方、エンドウ褐紋病菌の非宿主であるササゲにおいては、SODの転写量および酵素活性は褐紋病菌サプレッサーで阻害されなかった。すなわち、エンドウとササゲ、それぞれのSODは褐紋病菌サプレッサーに対して宿主特異的な応答をしていることが明らかとなった。

以上の知見より、細胞壁酸化還元酵素が防御応答のスイッチとして働く一方で、病原菌はこれらの酵素の活性を抑制することにより、宿主の初期シグナルを遮断して防御応答を遅延させ、感染を成立するとの考えに至った。

論文審査結果の要旨

本研究は、植物の病原菌に対する認識と応答の機構を解明するための基礎研究として、植物特有の小器官であり細胞最外層に存在する細胞壁(アポプラスト液)中のCu/Zn-SODの構造と機能を解析したものである。これまでは、植物細胞においても動物細胞と同様に、病原菌認識は細胞膜で行われると信じられてきた。笠井氏は、エンドウの黄化胚軸細胞壁やアポプラスト液中に構成的にSODが存在し、この活性がエンドウ病原菌のエリシターやサプレッサーに制御されることを明らかにした。分子量、内部アミノ酸配列、活性の阻害剤特性並びにcDNAの解析等から、本SODがCu/Zn型であることを突止め、cDNAをクローニングし、これを*PsCu/Zn-SOD1*と呼んだ。ノザン解析から、本遺伝子は、構成的に発現しているが、傷害により発現が上昇し、エンドウ褐紋病菌エリシターでさらに上昇すること、一方、サプレッサーの共存下には、発現が顕著に抑制されることを明らかにした。次に、*PsCu/Zn-SOD1*を大腸菌で発現させた組換えタンパク質を精製回収し、以下の知見を得た。1) *PsCu/ZnSOD* タンパク質は、SOD活性を有し、特に多量体を形成することによって、活性が上昇すること、2) 組換え *PsCu/ZnSOD* タンパク質は、多量体の形成に影響を受けることなく、褐紋病菌エリシター、サプレッサーに対して、生体から調製したCu/ZnSODと全く同様な応答性を示すことを明らかにした。すなわち、本酵素は、細胞の最外層にあって、病原菌などの外界ストレスを直接認識し、これに応答する分子であることを突止めた。以上の結果から、本酵素は、植物細胞による異物認識の結果生成する活性酸素の消去と同時に、過酸化水素への転換を通して、防御応答への情報伝達系を作動させる引き金となる分子であると考察した。すなわち、細胞外Cu/ZnSODは、植物の一つの環境センサーとして機能していることを突止めた。これらの成果は、学術雑誌に2報掲載され、国内の学会や国際会議においても発表され、基礎研究のみならず応用研究としても高く評価できる。以上を踏まえ、博士(農学)の学位に値すると判定した。