

氏名	加 藤 久 晴		
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 1246 号		
学位授与の日付	平成6年3月25日		
学位授与の要件	自然科学研究科生産開発科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文題目	エンドウの防御反応に関与する遺伝子の発現制御機構の解析		
論文審査委員	教授 白石 友紀	教授 井上 成信	教授 中筋 房夫
	教授 佐藤 公行	教授 篠田 純男	

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

植物の防御反応に関与する遺伝子は、病原菌のシグナル物質や環境ストレスに対する応答性を有していると共に、分化発生の過程においても発現制御されている。本研究では、エンドウの防御反応に関する遺伝子のうち、フェニルタラニンアンモニアリアーゼ (PAL) およびカルコン合成酵素 (CHS) をコードする遺伝子の発現制御の解析を試みた。エンドウのPAL, CHS遺伝子はエンドウ褐紋病菌の分泌するエリシターにより発現が誘導され、サプレッサーにより一時的に抑制されることがわかっている。まず、2種類のエンドウPAL遺伝子のエリシターに対する応答をプライマー伸長法により解析したところ、これらはいずれもエリシターにより誘導を受けることが示された。菌由来シグナルに対するこれら遺伝子の応答を詳細に調べるため、核run-onアッセイを行ったところ、PAL, CHS遺伝子は、いずれもエリシター処理後5分以内に転写が活性化され、その転写の活性化はサプレッサーによりすみやかに抑制された。菌由来シグナルによる発現制御に関する核内因子を解析するため、PAL遺伝子の5'上流制御流域のDNA断片を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、エリシター処理した胚軸より調整した核抽出物と特異的に結合するDNA断片が同定された。この核タンパクの結合は塩基配列特異的ではなく、DNAのAT-richな配列に結合することが示され、そして他のエンドウPAL, CHS遺伝子の5'上流制御流域にも作用することから、これら遺伝子の同調した発現制御にこの核タンパクが関与していることが考えられる。また、このタンパクを脱リン酸化すると結合能が消失することから、エリシターによる転写の活性化には核タンパクのリン酸化が関与している

ことが示唆された。このほかにも本核抽出物中においては複数の結合因子が見いだされ、これらは防御遺伝子が示す応答の多様性に関与するものと推察した。

論文審査の結果の要旨

植物と微生物の相互作用においては、植物の防御反応を誘導する物質であるエリシターとその誘導を抑えたり遅らせたりする物質であるサプレッサーなどの菌由来シグナル因子が、病原性・非病原性を決定する要因として非常な役割を果たしている。エンドウ褐紋病菌の胞子発芽液中には高分子分画にエリシターが、また低分子分画にサプレッサーが含まれ、サプレッサーはエリシターによって誘導される一連の防御反応を一時的に抑制する。最近、エリシターによる植物防御反応遺伝子の発現調節機構に関する研究が進んでいるが、そのほとんどはエリシターや紫外線、傷などのストレス因子による遺伝子発現の誘導機構、すなわちPositive regulationに関する研究であり、サプレッサーのような防御反応遺伝子発現の抑制機構 (Negative regulation) に関しては、研究が進んでいない。この研究は、二つのメンバーのフェニールアラニンアンモニア・リアーゼ遺伝子 (PSPAL1, PSPAL2) に焦点を絞って、エリシターによる誘導やサプレッサーによる抑制における遺伝子発現調節に必要なシス因子・トランス作用因子を明らかにしたものである。まず、サプレッサーによる宿主植物の防御反応抑制効果が防御反応に関与する遺伝子の発現レベルにも及んでいることを上述のPAL, CHS (カルコン合成酵素) 遺伝子を指標としたin vitro nuclear run-on assayによって証明した。さらに、エリシター処理、あるいはサプレッサー処理したエンドウ組織体より核タンパク質を抽出し、gel shift assay, competition assayを行い、エリシター誘導に必要なDNAシス因子と結合タンパク質の割だしを行ったところ、少なくとも二種類の核タンパク質の結合領域が確認され、いずれもATに富むシークエンスを確認していることが明らかとなった。以上のようにこの研究は植物の病原菌に対する防御反応応答に関与する遺伝子の発現調節機構を分子遺伝学的・分子生物学的に解明した点で、植物病理・植物分子生物学上高く評価され、学位論文に十分値すると判断した。なお、本研究内容はPlant Molecular Biology, Plant Cell Reports, 日本植物生理学会誌, 日本植物病理学会誌, 岡山大学農学部報に各一編, の論文としてすでに公表されており、他の二編が日本植物生理学会誌に投稿中である。