

学位論文審査の結果の要旨

氏名	伊藤 慎
審査委員	主査 木場 章範 副査 曳地 康史 副査 山岡 直人 副査 秋光 和也 副査 西口 正通

論文名

Tabtoxinine- β -lactamによる細胞死誘導機構の解明

審査結果の要旨

タバコ野火病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) は宿主植物である *Nicotiana benthamiana* の葉に非選択的毒素である Tabtoxinine- β -lactam (T β L) を分泌し壊死病斑を形成する。T β L は植物のグルタミン合成酵素に作用し細胞内に過剰なアンモニアを蓄積させ細胞死を誘導するが、その細胞死誘導機構は不明であった。そこで、本研究では T β L による細胞死誘導機構の解明を目的とし、T β L 処理が PCD を誘導することを明らかにするとともに、ウイルス誘導型遺伝子サイレンシング法を用いた逆遺伝学的な解析により、*N. benthamiana* において T β L 誘導細胞死に関与する植物因子の探索を行った。その結果、T β L による細胞死を制御する2種の植物因子を見出した。

1. *N. benthamiana* に T β L を処理し、植物における典型的なプログラム細胞死 (PCD) である Hypersensitive Response (HR) のマーカー遺伝子 (Hin1) の発現解析を行った結果、顕著な Hin1 の発現上昇が認められた。したがって、T β L は PCD を誘導することが示唆された。

PCD に関連深い分子シャペロン HSP70 と HSP90 とそのコシャペロン SGT1 と RAR1 の TBL 誘導細胞死への関与を明らかにするため、ウイルス誘導型遺伝子サイレンシング法により *HSP70*、*HSP90*、*SGT1* および *RAR1* の発現抑制を行った *N. benthamiana* をそれぞれ作出し、T β L 処理を行った。その結果、*HSP70* サイレンシング植物においてのみ細胞死誘導、壊死斑形成の顕著な抑制が認められた。また、T β L と同様にグルタミン合成酵素の阻害を阻害する L-メチオニンスルホキシイミン (MSX) による細胞死も、*HSP70* サイレンシングによって抑制された。以上の結果から、T β L 誘導細胞死に *HSP70* が関与することを示した。

T β L 誘導細胞死における Hsp70 の役割の解明を目的に、T β L と MSX それぞれの処理後の *HSP70* サイレンシング植物におけるアンモニア濃度を測定した。その結果、T β L と MSX いずれの処理によっても *HSP70* サイレンシング植物でのアンモニアの蓄積量の低下は認められず、むしろ対照植物と比較して有意に増大していた。以上の結果より、*HSP70* は T β L と MSX の細胞死誘導経路のうち、アンモニアの下流において重要な機能を果たすことが示した。

さらに、タバコ野火病の発病に対する *HSP70* サイレンシングの影響を明らかにするため、*HSP70* サイレンシング植物に Pta を葉肉注入接種した。その結果、対照植物では接種10日後に接種葉全体に壊死

斑が及ぶのに対し、HSP70 サイレンシング植物では接種 20 日後まで病斑の形成は認められなかった。以上の結果より、タバコ野火病の発病においても HSP70 は重要な役割を果たすことが示した。

2. TβL 誘導細胞死へのアデニル酸シクラーゼ (AC) の関与を明らかにするため、*N. benthamiana* の AC の単離を行った試みたところ、*N. tabacum*、*Arabidopsis thaliana*、*Zea mays* および *Oryza sativa* 由来の AC とそれぞれ 96%、53%、57% および 54% の相同性を示す遺伝子 (NbAC) を得た。系統解析、および *in vitro* における酵素活性の測定結果より、NbAC は植物において新奇のタイプの AC であることを明らかにした。

TβL・MSX 誘導細胞死における NbAC の役割を解析するため、NbAC サイレンシング植物を作製し、TβL を処理した結果、対照植物と比較して NbAC サイレンシング植物では細胞死誘導、壊死斑の形成、および Hin1 の発現上昇が顕著に抑制された。以上の結果より、TβL 誘導細胞死に NbAC が関与することが示した。

TβL 誘導細胞死における NbAC の役割の解明を目的に、TβL と MSX それぞれの処理後の NbAC サイレンシング植物におけるアンモニア濃度を測定した。その結果、TβL と MSX いずれの処理によっても NbAC サイレンシング植物でのアンモニアの蓄積量の低下は認められなかった。以上の結果より、NbAC は TβL と MSX の細胞死誘導経路のアンモニアの下流において重要な機能を果たすことが示唆された。

さらに、タバコ野火病の発病に対する NbAC の関与を明らかにするため、NbAC サイレンシング植物に Pta を葉肉注入接種した。その結果、対照植物では接種 10 日後に接種葉全体に壊死斑が及ぶのに対し、NbAC サイレンシング植物では病徴の進展が顕著に抑制された。以上の結果より、タバコ野火病の発病に NbAC が関与することを示唆した。

以上の結果から、今まで未知であった Tabtoxinine-β-lactam による細胞死・壊死斑誘導経路、および *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* による野火病の発病機構に関する新たな知見を見出した。本成果は、植物病の発病メカニズムの解明や植物病の防除に大きく寄与するものと期待される。

学位論文の公開審査会は平成 26 年 2 月 1 日に愛媛大学農学部で開催され、論文発表と質疑応答が行われた。続いて開催された学位論文審査会において慎重に審査を行った結果、審査委員全員一致して博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判定した。