

氏名	高橋 宏隆
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3210号
学位授与の日付	平成18年 3月24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	植物細胞の最外層に存在するアピレースの構造と役割
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

本研究は、植物の病原菌応答の機構を解明するための基礎研究として、細胞最外層に存在するアピレース(NTPase)の外界認識とシグナル分子に対する応答を解析したものである。エリシター処理5時間のササゲ黄化胚軸より作製した cDNA ライブラリーから、二つのアピレース遺伝子 *VsNTPase1*、*VsNTPase2* をクローニングした。*VsNTPase1* は、1) 系統解析より、エンドウ PsAPY1 や根粒菌との共生関係に関与するマメ科植物のアピレースと同じグループに属していたこと、2) *VsNTPase1* は傷処理や褐紋病菌シグナルに応答して発現レベルが変動すること、3) *VsNTPase1* の推定上の N 末端シグナル配列を融合した GFP は、細胞表層への分布が認められたことから、*VsNTPase1* は細胞表層において外界ストレスに応答する可能性が示唆された。

昆虫細胞で発現させた組換え *VsNTPase1* は、ササゲ細胞壁から調製した NTPase 活性と類似した生化学的な特徴を有していた。さらに組換え *VsNTPase1* はエンドウの病原菌、褐紋病菌のエリシターやサプレッサーに対し、ササゲ細胞壁 NTPase と同様の応答性を示した。これらのことから細胞表層においてアピレースは、褐紋病菌シグナルを直接認識し、宿主特異的に応答していることが強く示唆された。さらに組換え *VsNTPase1* はいくつかの Microbe-Associated Molecular Patterns(MAMPs)や多糖類エリシター、内生シグナルや金属イオンにも応答性を示した。近年、アピレースはその反応産物であるリン酸を介して活性酸素種生成を制御していることが明らかにされつつあり、アピレースは細胞表層において外界ストレスを認識し、応答する環境センサーとしての役割を担っていることが強く示唆された。感染の成否との関連では、エンドウ褐紋病菌は、宿主植物のアピレースを阻害するサプレッサーを生産することで、宿主の異物認識や防御応答の一部を遅延または阻害することで、感染に成功するものと考察した。

## 論文審査結果の要旨

本研究は、植物の病原菌認識と応答の機構を解明するための基礎研究として、細胞最外層に存在するアピレース(NTPase)の構造と機能を解析したものである。申請者は、まず、エリシター処理のササゲ黄化胚軸から cDNA ライブラリーを作成し、新規な二つのアピレース遺伝子 *VsNTPase1*、*VsNTPase2* をクローニングした。系統解析より、*VsNTPase1* はエンドウ *PsAPY1* や根粒菌との共生関係に関与するマメ科植物のアピレースと同じグループに属すること、また RT-PCR 解析から、傷害や褐紋病菌シグナルに応答して発現レベルが変化することを明らかにした。次に、これらアピレースの N 末端シグナル配列を融合した GFP の一過的発現を試み、*VsNTPase1* は細胞表層に、また *VsNTPase2* はミトコンドリアに分布することを明らかにした。このように、ササゲ細胞壁で働くアピラーゼは *VsNTPase1* であるという発見に基づき、昆虫細胞で発現させた組換え *VsNTPase1* タンパク質を用いて、以下の知見を得た。1) *VsNTPase1* タンパク質は、植物の細胞壁 NTPase (アピレース) と類似した触媒活性を有すること、2) 組換え *VsNTPase1* は褐紋病菌エリシター、サプレッサーに対して、ササゲ細胞壁 NTPase と同様の応答性を示すこと、3) さらに組換え *VsNTPase1* が Microbe-Associated Molecular Patterns や内生シグナル、また金属イオンにも応答することを見いだした。近年、アピレースはその反応産物であるリン酸を介して活性酸素種生成を制御していることが明らかにされつつあり、これらを総合して、アピレースが細胞表層において外界ストレスの認識と応答装置、すなわち環境センサーとして機能していると考察している。これらの成果は、著書 1 編で公表され、学術誌に 2 報の掲載が決定しており、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。