

氏 名 白 野 由 美 子
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学位記番号 論 農 博 第 2196 号
 学位授与の日付 平 成 10 年 7 月 23 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
 学位論文題目 A Novel Plant Defense Mechanism that Involves A Chloroplastic Lipoygenase
 in Rice Plants
 (イネ葉緑体型リポキシゲナーゼが関与する新規な病害抵抗性機構)

(主査)

論文調査委員 教授 古澤 巖 教授 泉井 桂 教授 津田盛也

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、植物病害抵抗性機構におけるリポキシゲナーゼの機能に関して、イネから同遺伝子のクローニングを行い、その遺伝子の発現解析、酵素の性質の解析、および同タンパク質の葉緑体への局在を示し、葉緑体型リポキシゲナーゼが関与する新規な植物病害抵抗性機構について検討した結果をまとめたものである。主な内容は、次のとおりである。

1. 非親和性いもち病菌を接種したイネ葉からリポキシゲナーゼ遺伝子をクローニングした。まず、精製したイネのリポキシゲナーゼL-3に対する抗体を用いて、イネの幼苗で発現しているリポキシゲナーゼL-2のcDNAの単離に成功した。このイネL-2と他のリポキシゲナーゼ間で保存されている領域から作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって、いもち病菌接種イネ葉で発現しているリポキシゲナーゼ (PiLOX) のcDNAの単離に成功した。PiLOX遺伝子は923アミノ酸からなる分子量102,714のタンパク質をコードしていた。また、アミノ酸配列のN末端に葉緑体への移行のためのペプチド配列が存在した。このような配列はそれまでに報告されていたリポキシゲナーゼには存在しないことから、PiLOX遺伝子を新しいタイプの植物リポキシゲナーゼ遺伝子に分類した。

2. PiLOX遺伝子は病害抵抗性反応時やエリシター処理によって発現が誘導されることを示すと同時に、他の多くの病害抵抗性反応に関与する遺伝子とは異なり、分化した組織に特異的なシグナル伝達機構を介して遺伝子発現することを明らかにした。PiLOX遺伝子は緑葉で非親和性いもち病菌の接種、エリシター処理、紫外線照射によって発現が誘導されたが、未分化な培養細胞ではこれらの処理によって全く発現が認められなかった。病原菌接種で誘導されるペルオキシダーゼ遺伝子もPiLOX遺伝子と同様な発現パターンを示したが、キチナーゼ遺伝子やフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子等の他の病害抵抗性に関与する遺伝子は、葉でも培養細胞でもエリシター処理によって発現が誘導された。これらの結果から、PiLOX遺伝子とペルオキシダーゼ遺伝子は、分化した組織に特異的に存在する病害抵抗性反応のシグナル伝達機構を介して発現していることを明らかにした。

3. cDNAから活性を有するPiLOXを大腸菌内で発現させることに成功し、同酵素の性質を明らかにした。最初にイネのリポキシゲナーゼL-2のcDNAを導入した大腸菌を用いて、リポキシゲナーゼタンパク質の大腸菌内での発現の条件を検討した結果、15℃の低温で大腸菌を培養することによって活性を有する同タンパク質の発現に成功した。この低温培養法を用いて大腸菌内で活性を有するPiLOXを発現させた。このPiLOXの酵素的性質を詳細に調べた結果、PiLOXはpH 5から6の酸性側で最も高い活性を示した。また、PiLOXはリポキシゲナーゼの基質であるリノール酸とリノレン酸のC13位に特異的に酸素を導入することを明らかにした。リノレン酸のC13位に酸素導入された過酸化リノレン酸は、植物の病害抵抗性反応のシグナル伝達物質と考えられているジャスモン酸の前駆体であることから、PiLOXが病害抵抗性反応時にジャスモン酸の生合成に関与している可能性が示された。

4. PiLOX遺伝子は核にコードされているが、その産物はトランジットペプチドの作用によって葉緑体ストロマに局在し、

PiLOXが葉緑体で機能していることを示した。PiLOXはそのアミノ酸配列から葉緑体に局在することが推定された。そこで、PiLOXのcDNAの転写、翻訳産物を、ハウレンソウから単離した無傷葉緑体に移行させる実験を行った結果、PiLOXが葉緑体内部に移行することを示した。さらに、PiLOXが内在する葉緑体を分画した結果、PiLOXは葉緑体のストロマに局在することを明らかにした。この結果は、PiLOXが葉緑体で機能していることを示している。

論文審査の結果の要旨

従来の研究により植物リポキシゲナーゼが病害抵抗性に関与していることが示唆されていたが、リポキシゲナーゼの機能に関する分子レベルでの詳細な研究は行われていなかった。本論文では、イネから病害抵抗性に関与するリポキシゲナーゼ遺伝子のクローニングに成功するとともに、その遺伝子の発現、酵素の性質を詳細に解析し、葉緑体型リポキシゲナーゼが関与する新規な植物病害抵抗性機構について検討したものである。評価すべき点は以下のとおりである。

1. 非親和性もち病菌を接種したイネ葉からリポキシゲナーゼ (PiLOX) 遺伝子をクローニングし、単子葉植物からは初めてリポキシゲナーゼ遺伝子のクローニングに成功している。さらに、PiLOXのアミノ酸配列のN末端に葉緑体への移行のためのペプチド配列が存在することを示し、PiLOX遺伝子を植物の新しいタイプのリポキシゲナーゼ遺伝子に分類した。

2. PiLOX遺伝子は病害抵抗性反応時やエリシター処理によって発現が誘導されることを示すとともに、他の多くの病害抵抗性反応に関与する遺伝子とは異なり、分化した組織に特異的なシグナル伝達機構を介して遺伝子発現することを明らかにした。PiLOX遺伝子は緑葉で非親和性もち病菌の接種、エリシター処理、紫外線照射によって発現が誘導されるが、未分化な培養細胞ではこれらの処理によって全く発現しないことを示した。これらの結果は、分化した組織に特異的な病害抵抗性反応のシグナル伝達機構が存在することを示す知見として興味深い。

3. 大腸菌内でPiLOXのcDNAから活性を有するPiLOXを発現させることに成功し、同酵素の性質を解析した。その結果、PiLOXはpH 5 から 6 の酸性側で最も活性が高く、基質であるリノール酸とリノレン酸のC13位に特異的に酸素を導入することを明らかにした。

4. PiLOX遺伝子は核にコードされているが、その翻訳産物はトランジットペプチドの作用によって葉緑体ストロマに局在し、PiLOXが葉緑体で機能していることを明らかにした。葉緑体が植物の病害抵抗性反応の場として機能していることを示す知見として興味深い。

以上のように、本論文は、植物病害抵抗性機構に関与するリポキシゲナーゼの研究を行い、葉緑体型リポキシゲナーゼが関与し、分化した組織に特異的な新規な植物の病害抵抗性機構を提唱したものであり、植物感染生理学並びに植物病理学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成10年5月27日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。