

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	金 容 賢
論文題目	Elucidation of the plant immune system by using the elicitor peptide PIP-1 as a chemical probe (エリシターペプチドPIP-1を化学プローブとした植物免疫機構の解明)		
(論文内容の要旨)			
<p>植物は、細菌や糸状菌など様々な病原体による感染から身を守るための独自の防御機構を有している。この応答は病原体由来の化学物質 (エリシター) を認識することで誘導される。エリシターには様々なものがあり、脂質、多糖、タンパク質、ペプチドなどが知られている。中でもペプチド性エリシターは合成が容易なこともあり、活性発現に必要な化学構造の詳細を明らかにできるだけでなく、植物の防御応答誘導機構解明のためのプローブとしても有用である。</p> <p>PIP-1 (配列 : YGIH⁶TH-NH₂) は合成ランダムペプチドライブラリより見出されたエリシターであり、タバコ細胞に対して様々な防御応答を誘導する。興味深いことに、PIP-1によって誘導される防御応答の種類は、処理濃度によって異なっており、代表的な応答である過酸化水素の発生は低濃度の処理で誘導されるのに対して、ファイトアレキシンと呼ばれる抗菌性化合物の蓄積には高濃度処理が要求される。本論文ではPIP-1による刺激時間がタバコ細胞のPIP-1に対する反応の違いに影響すると考え、以下のような検討をおこなった。</p> <p>まず第1章では、タバコ細胞によるPIP-1の分解様式を明らかにした。培養細胞にPIP-1を添加すると、ペプチドC末端のアミド結合の速やかな加水分解がおこり、3時間以内でほとんど検出されなくなった。この結果をもとにPIP-1のC末端ヒスチジン残基をアスパラギン酸あるいは<i>N</i>-メチルアラニンに置換した[Asp⁶]PIP-1あるいはMePIP-1を設計、調製したところ、いずれも良好な分解耐性を示し、タバコ細胞培養系に添加後24時間においても十分な量が残存するようになった。</p> <p>第2章ではこの分解耐性ペプチドのうちMePIP-1の作用を詳細に調べている。MePIP-1はPIP-1とは異なり、低濃度処理においてもファイトアレキシン (カプシジオール) の生成を誘導した。MePIP-1を処理してから一定時間経過後ごとに細胞を洗浄してMePIP-1を除去し、処理時間とカプシジオール生成の関係を調べたところ、カプシジオールの生成にはエリシターによる3~6時間程度の持続的な刺激が必要であることが明らかとなった。さらにカプシジオール誘導に関わる細胞内シグナル伝達因子の候補としてMAPキナーゼに着目し、MePIP-1処理による活性化を調べた結果、MePIP-1はPIP-1に比べて、より長時間MAPキナーゼ (SIPK) を活性化し、これがカプシジオールの生成につながることを示された。</p> <p>このようにエリシターによる刺激時間が植物の防御応答誘導にとっての変動要因となることが明らかになったものの、洗浄によるエリシター除去は、細胞に物理的なストレスを与え、エリシターの作用を正確に検出できていない可能性が考えられた。そこで第3章では、よりストレスの少ない方法で刺激時間を制御する方法を確立するために、任意の時間に光照射によって不活性化できるPIP-1誘導体を合成することとした。UV光 (365 nm) 照射によってアミド結合が切断されるアミノ酸を分解耐性類縁</p>			

体 [Asp⁶]PIP-1のスレオニン残基の位置に導入したPcPIP-1は、エリシター活性を保持しており、光照射により分解すると活性を消失した。PcPIP-1を細胞に投与してから一定時間経過後にUV照射し不活性化したところ、処理開始後1時間ではカプシジオールの生成は見られなかったのに対して、6時間あるいは9時間では、UV非照射と同程度のカプシジオールの生成が誘導され、防御応答誘導とエリシター刺激時間との関係をより明確に示した。さらに、カプシジオールの生成にはMAPキナーゼの長時間の活性化が重要であり、それによっではじめてカプシジオール生合成酵素（HMGR）の活性上昇がおこることを示した。

第4章では、PIP-1処理により誘導されるもう一つのタバコ二次代謝成分アセトシリンゴンについて、エリシター刺激時間の影響を調べた。アセトシリンゴンはカプシジオールとは異なり低濃度のPIP-1処理によっても生成誘導され、またMePIP-1を処理して1時間後に除去しても生成することから、短時間のエリシター刺激で生成誘導が活性化されることがわかった。アセトシリンゴンの生成に関与するシグナル因子について調べたところ、カプシジオール生成誘導とは異なるNADPHオキシダーゼ活性の上昇が重要な因子であることが示され、それぞれの誘導機構に応じて活性化に必要な刺激時間に差があるという結論に至っている。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

植物は病原体からの攻撃を病原体に由来する化学物質により認識し、身を守るための種々の抵抗反応を誘導する。エリシターと呼ばれるこの化学物質は植物の防御反応誘導メカニズムを解明し、病害抵抗性を強化する手段を開発するための研究材料として有用である。本論文は、合成ペプチドライブラリーのランダムスクリーニングによってエリシター活性が見いだされたPIP-1が、タバコ培養細胞において処理濃度に依存して異なる防御応答を引き起こす現象に着目し、その原因の解明に取り組んだ。その成果に関して評価できる点は次のとおりである。

1. エリシターの化学的な安定性が植物防御応答誘導に影響を与えることを明らかにし、その分解様式に基づく合理的な化学修飾方法を設計して、生物活性を保持した分解耐性エリシターを合成した。
2. 分解耐性をもつエリシターは細胞内シグナル伝達因子であるMAPキナーゼを長時間活性化させ、その持続的な活性化がファイトアレキシン（カプシジオール）の生成にとって重要であることをはじめて示した。
3. 分解耐性エリシターの構造を修飾することによりUV照射によって分解するエリシターを合成し、エリシター刺激時間による植物防御応答の変動を正確に調べる手法を開発した。さらに光分解性エリシターを用いた刺激時間の制御により、エリシターの持続的作用が細胞内シグナル伝達因子の持続的活性化を経て何らかの転写後修飾機能を調節し、それがファイトアレキシン生合成酵素の活性化に関与している可能性を示した。
4. カプシジオールと同様、フェノール性二次代謝成分アセトシリンゴンもエリシター処理によって生成が誘導されるが、その誘導はカプシジオール生成とは異なり、エリシターの短時間刺激によるNADPHオキシダーゼの速やかな活性化反応を介したものであることを示した。

以上のように、本論文はペプチド性エリシターPIP-1の植物培養細胞系における挙動の分析とそれに基づいた研究用プローブの開発により、植物の防御システムにおける病原体認識から防御態勢確立に至るプロセスについての新しい知見を提供したものであり、植物生化学、植物病理学および植物機能制御剤の分子設計をめざす創薬化学の進展に寄与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27年2月13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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)