

## 論文の内容の要旨

### Analysis of ubiquitin pathway components responding to stress in plants 植物のストレス応答に関与するユビキチン系因子の解析

滝澤真理

**序** ユビキチン系は種々のタンパク質の寿命などを制御することで生体内での様々な高次機能の制御や環境ストレスに応答した恒常性に関与する(図1)。動物細胞ではユビキチン系がウイルスに対する防御反応の中で役割を果たすことが知られている。植物の病害応答においてもユビキチン系が役割をもつことが示唆されてきた。植物病原体であるタバコモザイクウイルス(TMV)の移行タンパク質(movement protein; MP)の分解にユビキチン系が関与することも示されている。しかしその詳細については未知な点が多い。

そこでウイルス感染などのストレス応答に関わる新たなユビキチン系因子を特定することによってユビキチン系の活性を制御しているシグナル伝達系を明らかにしたいと考えた。それによりユビキチン系の植物の防御応答に対する調節機能を解明することを目的とした。

#### ウイルス感染時におけるタバコのE1

まずユビキチン系の第一段階に関与するタバコのユビキチン活性化酵素(E1)とウイルス感染との関係を解析した。タバコ(*Nicotiana benthamiana*)にトマトモザイクウイルス(ToMV)、TMV、そしてTMVとは異なる属のウイルスであるキュウリモザイクウイルス(CMV)を感染させた。すると非感染葉に比べてTMV、ToMV感染葉はE1タンパク質の蓄積が増加していたが、CMV感染葉では変化は見られなかった。また傷害や病害応答に関わる植物ホルモンであるジャスモン酸、サリチル酸、エチレン処理により、E1タンパク質の蓄積が上昇した。このことより植物のウイルス応答、ストレス応答に標的タンパク質とは直接結合しないユビキチン系因子であるE1の発現制御も関与することが示唆された。

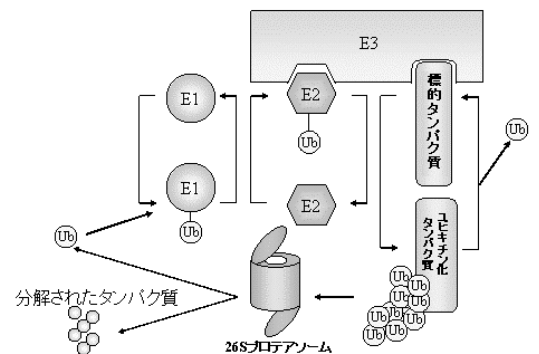


図1 ユビキチン系  
ユビキチンは活性化酵素(E1)、結合酵素(E2)、リガーゼ(E3)を経て標的タンパク質に共有結合する。

## シロイヌナズナにおけるユビキチン系

次にゲノム情報が豊富なシロイヌナズナに舞台を移してさらに解析をすすめた。遺伝子情報を利用し、転写レベルでの調節を明らかにすることを試みた。

シロイヌナズナは2つのE1遺伝子、約45のE2、E2like遺伝子、約1200のE3遺伝子が知られている(表1)。まずシロイヌナズナにおける2つのE1(*UBA1*, *UBA2*)に着目して解析をおこなった。その結果TMV感染葉の*UBA2* mRNAの蓄積の増加が検出された。シロイヌナズナのE1での機能分担は知られていないが、このことは2つのE1遺伝子の転写が個々に調節されていること、シロイヌナズナにおいて他のユビキチン系の因子もウイルス感染時に転写レベルで制御される可能性を示唆した。そこで次にTMV感染時に蓄積が変動するシロイヌナズナのE2遺伝子の探索をおこなった。

### TMV感染時に蓄積が変化するE2の特定

TMV感染5日後に蓄積が変化するE2mRNAを探索した。各遺伝子特異的なプライマーを用いてE2活性が知られているシロイヌナズナの*UBC1*から*UBC20*までRT-PCRにより解析をおこなった。その結果蓄積が増加する*UBC1*、*UBC14*及び蓄積が減少する*UBC8*を特定した(表2)。このことはノーザン解析によっても確かめられた。

E1(UBA) (Ubiquitin Activating enzyme)	2
E2 and E2 like(UBC) (Ubiquitin Conjugating enzyme)	~ 45
E3 (Ubiquitin Ligase)	~1200

表1 シロイヌナズナにおけるユビキチン系因子の遺伝子の数

<i>UBC1</i>	3倍
<i>UBC8</i>	0.2倍
<i>UBC14</i>	9倍

表2 TMV感染によるmRNAの蓄積の変化(非感染を1とした場合)

### TMV以外のストレスによる*UBC1*、*UBC8*、*UBC14* mRNAの変動

*UBC1*、*UBC8*、*UBC14*mRNAがTMV以外のストレスに対してどのように応答するか確かめた。

#### -TMV以外のウイルス

まずTMVと近縁のU1、分類上大きく異なるCMVを感染させたときの蓄積の変化を調べた。その結果、3つのE2ともU1 に対してはTMVほど大きな蓄積の変化が見られなかった。*UBC1*、*UBC8*はCMV感染に対してTMV感染よりも大きな蓄積の変化を示した。一方*UBC14*の蓄積の変化はTMV特異的であった。

#### -シュードモナス

病原細菌シュードモナス(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)を感染させて24時間後の遺伝子の発現の変化を調べた。その結果*UBC8*のみ変化があり、TMV感染時とは逆に増加することが分かった。

#### -傷害処理

傷害処理を与えたところ、*UBC8*mRNA の蓄積が減少し、*UBC14*mRNA は蓄積が増加した。

これらのことにより*UBC1*、*UBC8*、*UBC14*が他のストレスに関与することも示唆された。

以上の結果を表3にまとめた

	TMV	U1	CMV	傷害	シュードモナス
<i>UBC1</i>	↑↑	↑	↑↑↑	変化なし	変化なし
<i>UBC8</i>	↓↓	↓	↓↓↓	↓	↑
<i>UBC14</i>	↑↑↑↑	変化なし	変化なし	↑	変化なし

表3 ストレスに対する*UBC1*、*UBC8*、*UBC14*mRNAの蓄積変化増加を↑、減少を↓のそれぞれの数で表す

### UBC1変異体における解析

UBC1のT-DNA挿入変異体*ubc1-1*を用いてさらなる詳細な解析を行った。*ubc1-1*において葉の細胞の増加、老化や花芽形成の促進などが観察された。*ubc1-1*にTMVを感染させたところ、感染葉や上葉などにおいて病徴が激化したが(図2、3)、TMVのRNAの蓄積に変化が見られなかった。また、*ubc1-1*にCMVを感染させたところ、病徴が激化し、CMVのRNAの蓄積が増加した。

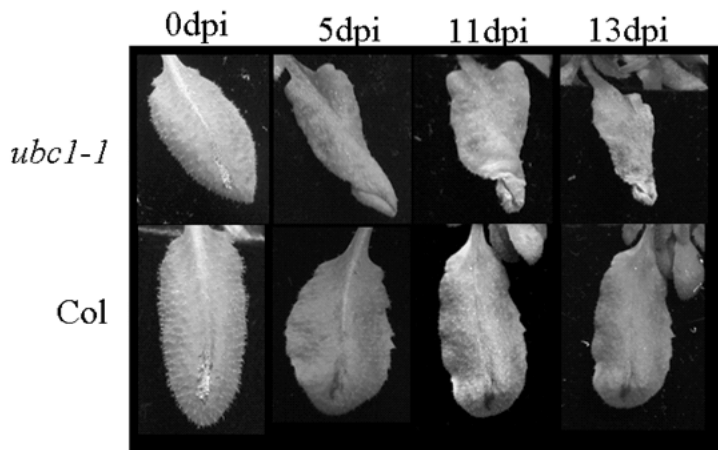


図2 TMV感染葉における壊死

図3 TMV感染後2週間



### UBC1と植物ホルモンとの関係

野生型にジャスモン酸を処理したところ、UBC1mRNAの発現が抑えられることが分かった。UBC1はジャスモン酸の変異体である*jar1-1*で多く発現していた。またSmall Scale Micro Arrayを行ったところ、*ubc1-1*と*jar1-1*の遺伝子発現パターンが似ていた。これらの結果はUBC1がJAR1に関わるジャスモン酸経路に関わることを示唆している。*ubc1-1*にエチレンの前駆体であるACCを処理したところ、胚軸や根の長さは野生型と変わらなかったが、胚軸の膨張の促進が見られた。このことはUBC1はエチレン経路に関わることを示唆している。しかし野生型においてACC処理によりUBC1mRNAの発現に変化はなかった。

これらのことはUBC1がジャスモン酸およびエチレンの経路のクロストークを考える上で重要な因子であることを示唆している。

### UBC14と相互作用するタンパク質の探索

UBC14と相互作用するタンパク質を探索するためにyeast two hybrid法を行った。UBC14をbaitとし、TMVを感染させて5日後の感染葉由来cDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、fructose biosphosphate aldose, oxygen evolving enhancer protein, NAD binding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TMV MPが得られた。UBC14はTMV MPとは相互作用したが、TMV-U1のMPとはしなかった。このことからUBC14はTMV MP特異的に相互作用することが示唆された。TMV MPがユビキチン化されることが知られているが、その詳しいメカニズムについては知られていない。本研究で示唆されたUBC14とTMV MPの相互作用はウイルスタンパク質のユビキチン化や植物の病害応答を解明する有力な手がかりとなることが期待される。

### UBC14変異体における解析

UBC14のT-DNA挿入変異体*ubc14-1*を用いてさらなる詳細な解析を行った。*ubc14-1*において特にフェノタイプは観察されなかった。*ubc14-1*にTMVを感染させたところ、TMVの蓄積に増加がみられた。またCMVを感染させてもCMVの蓄積の増加がみられた。UBC14の遺伝子のノックアウトがウイルスの蓄積を増加させることからUBC14はウイルス感染に対する防御応答に関わっていることが示唆された。

以上本研究においてウイルス感染などストレス応答に関係するユビキチン系因子としてE1、E2を特定し、それらのストレス応答への寄与について示すことができた。