

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 滝澤 真理

真核生物においてユビキチン系によるタンパク質分解系は、単なるタンパク質の寿命の制御という意味にとどまらず、多くの生物体において発生制御、ホルモン応答、ストレス耐性などの生物学的な機能と結びつくことが明らかとなっている。植物においても最近、オーキシン応答や微生物に対する抵抗性をしめす上で、ユビキチン系の因子の関与が主に遺伝学的解析から明らかとされてきた。しかし、その詳細は未だ不明な点が多い。

植物には多くの病原体があり、ウイルスも植物に対して大きな脅威となっている。論文提出者は、タバコモザイクウイルス (TMV) がタバコに感染した際に、ユビキチン系のうち、ユビキチン活性化酵素 (E1) の蓄積が増大することを偶然発見し、そこから解析が始まった。抗 E1 抗体をもちいたウェスタン解析から、TMV や近縁のウイルスを感染させた後に E1 タンパク質の蓄積が増大すること、別種のキュウリモザイクウイルスの感染ではそれが見られないことが確認された。ジャスモン酸、サリチル酸、エチレンといったストレスホルモンの処理によっても蓄積が増大した。こうした事実から、植物はウイルスなどの病原体の感染やストレスを受けた際に、一連の防御反応のひとつとしてユビキチン系因子の蓄積を変動させるものと予想した。ユビキチン系には多くの因子が関与しており、こうしたストレス応答と因子の発現との相関の全貌を明らかとするには、その宿主のゲノム情報が不可欠と考え、以後の解析はシロイヌナズナで行うことにした。

シロイヌナズナと TMV の組み合わせにおいても、E1 の蓄積の増大が確認された。ゲノム情報を生かして、2つある E1 遺伝子の区別を試みた。その結果、ふたつの E1 遺伝子のうち、UBA2 mRNA のほうのみが増大していることから、一方の遺伝子のみ転写が増大したことが予想された。重複したようにみえる E1 遺伝子も、その転写レベルは種々の状況、ストレス応答などに関連して、特異的に個々の発現が調節されていることが想像された。

こうした知見をもとに、続いてユビキチン結合酵素 (E2) の発現調節の可能性を検討した。研究開始時に報告のあった *UBC1~20* 遺伝子について、ウイルス感染など種々のストレス応答時の蓄積量を半定量的 RT-PCR 法にて解析した。その結果、面白いことにウイルス感染に伴って蓄積の増大が見られたのが *UBC1* と *UBC14* (それぞれ約 3 倍, 約 9 倍)、減少したのが *UBC8* (約 0.2 倍) であった。これまで E2 分子についてその転写が植物のストレス応答に関与するという知見はなく、こうした発現レベルでの変動についても新しい知見である。また

異なるキュウリモザイクウイルスを感染させたとき、*UBC1* と *UBC8* の変動はより大きなものであった。それに対し、*UBC14* の変動は見られず、この遺伝子は TMV 特異的に変動することが明らかとなった。また病原体として細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* が感染した際には、*UBC1*, *UBC14* の変化はみられず、*UBC8* の蓄積はむしろ増加した。

こうしたユビキチン系因子の蓄積変化、転写制御が、生物学的機能となんらかの関係があるものと考え、ここで変動が見出された3つの E2 遺伝子のうち、特に *UBC1* と *UBC14* について、種々のストレス応答との関係を検討することにした。それぞれの機能破壊株シロイヌナズナを手に入れ、その変異体が種々のストレスにどのような反応をするかを、以後調べた。

UBC1 についてその mRNA の蓄積を既知のホルモン非感受性突然変異体において解析した。するとジャスモン酸低感受性変異体 *jar1-1* において、その蓄積が増加していた。このことはジャスモン酸によってこの発現が抑制されている可能性が示された。つぎに *UBC1* 遺伝子の T-DNA 挿入変異体 (*ubc1-1*) を手に入れ、感染マーカー遺伝子を中心とした 571 遺伝子によるカスタムアレイ解析をおこなひ、*ubc1-1* と *jar1-1* のプロファイルが非常に類似していることを見いだした。その表現型を検討した。野生型と比較して葉の大きさが一回り大きいこと、老化現象あるいは花芽形成が早いこと、エチレン前駆体 ACC 処理を加えたところいわゆる triple response とは異なるが、胚軸の膨張促進が見られ、エチレン経路との関係がうかがえた。このようにこの *UBC1* 遺伝子産物は、ジャスモン酸、エチレンといったストレスホルモンによるシグナル伝達経路のなかに位置する可能性が強く示唆された。*ubc1-1* 変異体に TMV を感染させたところ、野生型と比較してウイルス蓄積量には違いはないが、病徴が激しく現れた。ウイルス蓄積量は同じであるにもかかわらず病原性が異なるという興味深い表現型となった。

UBC14 については TMV 感染に特異的な挙動に注目した。実際に *UBC14* 特異的なペプチド抗体を作成し、感染にともなって mRNA のみならず、そこからの翻訳産物の蓄積が大きく増加していることが確かめられた。*UBC14* 遺伝子の T-DNA 挿入変異体 (*ubc14-1*) を手に入れ、TMV, CMV を感染させたところ、病徴は野生型植物と同様あまり現れないが、内部でのウイルス蓄積が増大することが明らかとなった。現れる病徴には差がないが、内部でのウイルス蓄積に差が見られるといった、*ubc1-1* のときと好対照な表現型であった。この遺伝子が TMV の感染に特異的に応答することに興味をもち、*UBC14* を bait にした酵母 2 ハイブリッド系による、相互作用する候補分子の探索を行った。感染組織由来の cDNA をライブラリーとして用いて行った。その結果、ユビキチンや TMV の移行タンパク質 (movement protein; MP) や、糖代謝に関連した複数の遺伝子が候補として単離

された。MP が単離されたことは、このウイルスの感染に特異的な応答を示す一つの説明を与え、かつウイルス感染に対して負の制御を描けている可能性を強く示唆するものである。

以上の結果は、植物においてユビキチン系に関与するE1, E2遺伝子の発現が、ウイルス感染などストレス環境下における応答の一環として、制御されていることを明らかとした。ストレス応答の分野のみならず植物生理学、ウイルス学、植物病理学の進展への貢献が期待されるものである。

したがって、本審査委員会は論文提出者が博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。