

論文の内容の要旨

農学国際専攻
平成 18 年度博士課程 入学
氏 名 権 純一
指導教員名 山川 隆

論文題目 ベラドンナのサリチル酸メチル化酵素遺伝子
AbSAMTI の発現に関する研究

1. 序

植物は動物と違い、病原性因子に対し免疫反応として抗体を作ることができない。そこで自分を守るために防御メカニズムが備わっており、ウイルスや細菌、糸状菌などの病原菌に感染すると即座に感染部位で存在する非病原性因子により病原性因子を認識し、それに対応する過敏感細胞反応(hypersensitive response ; HR)による細胞死を起こして物理的に病原菌を封じ込める。そして、リグニン化による細胞壁の肥大やファイトアレキシンの合成、桂皮酸経路及びイソコリスミン酸経路(ICS)関連遺伝子群の発現に伴うサリチル酸(salicylic acid ; SA)の合成などの防御反応を開始する。蓄積した SA は侵入菌の細胞壁を分解してエリシター分子を遊離させるキチナーゼやグルカナーゼなど下流の病原性関連タンパク質(pathogenesis-related protein ; PR protein)遺伝子を誘導して局所的な病害抵抗性を示すことが知られている。

感染葉で誘導された SA は抵抗性応答シグナルとして篩管を通過して全身的に伝達され、感染組織から離れた未感染組織においても新たな病原性因子の攻撃に備えて、防御態勢を整える。それは植物が生き残るための重要な機構で全身獲得抵抗性(Systemic acquired resistance ; SAR)と呼ばれる。植物における重要な免疫応答であり、広い範囲の病原菌に対して植物体全体が再感染に対する抵抗性を獲得する。

そのメカニズムに関する研究は、1990 年にタバコ植物にタバコモザイクウイルスを感染させたところ内生 SA の濃度が上昇したことから SAR の内生シグナルであることが報告された。そ

の後、1997年 Shulaev らによりタバコモザイクウイルスを感染させたタバコの葉からメチルサリチル酸(サリチル酸のカルボキシル基がメチル化されたメチルエステル体；MeSA)が放出され、隣の個体に SAR をもたらす揮発性シグナルであることが報告された。SA はサリチル酸メチル化酵素(S-adenosyl-L-methionine：salicylic acid carboxyl methyltransferase；SAMT)によってメチル化されると考えており、生成された MeSA はシグナル物質として各組織から放出される。草食動物による摂食傷害応答シグナル及び香気成分として昆虫誘引シグナル、さらに病原菌に対する病害抵抗性誘導シグナルとして機能することが確認されている。その時から、SAMT が注目されるようになり、シロイヌナズナとイネで解析が進んでいる。また、植物種によっては SAMT の発現様式が異なり、シロイヌナズナ、イネ、タバコ、トマトは抵抗性誘導を伴い、葉などで発現誘導が確認されたが、それ以外の植物では花の匂いの成分合成酵素として発現が誘導されている。

最近では遺伝子組み換えタバコを用いた研究から、SAMT を欠損させた株を用いるとウイルスの感染部位から離れている部位に関して SAR のシグナルが伝達されないことが確認された。その結果から、MeSA が SAR の内生シグナルである可能性が示唆された。現在までの様々な研究から、SAMT 酵素が植物の病害抵抗性誘導に重要な役割を担っていることが示された。

これまでに、ナス科の薬用植物 *A. belladonna* の毛状根培養細胞において SA 処理により、SA のカルボキシル基をメチル化する酵素、*AbSAMT1* の発現が誘導され、MeSA を生成することを見出された。そこで、本研究では *AbSAMT1* の機能を解析することを目的として、*AbSAMT1* の SA に対するメチル基転移機能及びその生成物 MeSA と基質である SA の病害抵抗機能をふまえて、*A. belladonna* による *AbSAMT1* の発現解析を行った。

2. *A. belladonna*の植物体における様々なエリシター処理による*AbSAMT1*の発現解析

AbSAMT1 の発現誘導は *A. belladonna* の毛状根培養細胞に SA を投与することでその生成物である MeSA が確認され、その反応経路推定された。しかし、その応答反応を植物体でも再現するために、毛状根培養細胞で行った条件を元に植物体での反応を確かめた。植物において抵抗性を誘導することが知られている抵抗性誘導化合物を処理し、SA の蓄積を伴う抵抗性誘導化合物(BIT)と蓄積を誘導しない化合物(BTH、CMPA)、二つケースに分けて実験を行った。まず、SA の処理により植物の葉から *AbSAMT1* の発現が誘導され、その酵素により生合成される MeSA の濃度も増加した。また、内生 SA の蓄積を誘導する BIT 処理のみ、*AbSAMT1* の発現誘導が認められた。これらの結果から、*A. belladonna* の毛状根培養細胞での発現誘導が植物体でも再現できた。また、SAR 誘導化合物処理による応答反応に *AbSAMT1* の誘導が起きたことで、SA のシグナル伝達機構にある役割を担っていることが考えられる。

植物の抵抗性反応と共に誘導される遺伝子であることを確認するために、*A. belladonna* に HR を誘導し、抵抗性遺伝子により認識される非病原性菌と植物に病原性を示す親和性病原菌を感染させ、その応答反応を観察した。二つの菌に対して *AbSAMT* の発現が誘導され、その生成物も検出された。これは、植物において病原性菌を認識する主動遺伝子としての役割と、環境に左右されやすい微動遺伝子としての二つの応答反応に働くことが示唆された。

最近、同様な酵素群に関して、植物の病傷害応答反応に関連する誘導因子による発現誘導が報告されている。そこで、病傷害応答反応に関連する MeJA の処理を試みた。その結果、イネ、またはシロイヌナズナと同様な応答反応が検出された。しかし、報告例がまだ少ないことや、その機能について様々な報告が出されている現状から、推測が難しい。そこで、組換え植物を作製し、解析することで植物の中での機能を明確に知ることができると考えた。

2. *AbSAMT1* の過剰発現株と抑制株を用いた発現解析

SABAMT 群の酵素に関しても遺伝子組換え植物を利用した解析が進められてきた。現在、*NtSAMT1* と *OsBSMT1* に関しては組換え植物を用いた研究の結果が 2007 年に報告されている。また、その二つの植物種では SABAMT が花の匂い成分合成酵素ではなく、植物の抵抗性に関わっている酵素であることで知られている。しかし、他の植物では組換え植物を利用した例がなく、その事例がまだ十分ではない。そこで、同じく植物の抵抗性応答反応に関連性が示唆された *AbSAMT1* を用いて過剰発現と抑制株を試みた。

組換え植物での発現解析を RT-PCR を利用して行った。過剰発現株に導入した *AbSAMT1* と抑制株に導入した *Antisense-AbSAMT1* の発現を RT-PCR を行い、そのゲル写真を画像解析ソフトである ImageJ 1.41(Wayne Rasband ; National institutes of Health, USA)を用いて、比較解析を行った。そして、野生株に SA 1mM を処理した時の発現量と比較し、その量より多く発現し、生育状態が良いものを選抜した。発現量が野生株に SA 1mM を処理した時一番高かった 12 時間目の発現量 (30)を超えているラインを選抜した。その結果、過剰発現株は 14 ライン(3、4、7、12、13、14、15、22、23、24、25、26、27、28、30)、抑制株は 16 ライン(7、9、10、13、15、16、17、18、19、20、21、22、24、25、25'、27)を得た。これらの組換え植物に対して前述べた様々なエリシターを処理し、野生株との差異を観察し、*AbSAMT1* の機能を推測した。

遺伝子組換え植物は野生株と同様な条件で *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*(*Pst*) を感染させ、感染後、48 時間で感染葉を回収した。その後、RT-PCR により SAR により発現が予想される PR protein を観察した。

PR2(a) protein の発現は野生株でも弱かったことから、過剰発現株、または抑制株でも *Pst* の感染により発現が誘導されることが期待されなかった。他の二つ、PR2(b)、PR1(b) protein の発現は誘導されたことから、その二つの遺伝子をマーカー遺伝子として使用した。野生株では *Pst* の感染により、HR が誘導され *AbSAMT1* の発現も増加したことは確認された。また、PR2 protein の発現も同様に誘導された。しかし、過剰発現株ではその PR protein の発現が弱い株が確認され、その中でも SA により誘導が促進されることが知られている PR1 protein の発現が抑制された株が観察された(ライン 12、13、14、23、30)。その発現の差が約 50%低くなった。逆に抑制株ではその発現様式が少し異なり、野生株より、少し高くなっている株が見つかった(ライン 20、24、25)。

内生 SA の濃度を上昇させることが知られている抵抗性誘導化合物である BIT を処理し、SA 増加が遺伝子組換え植物ではどのような影響を与えるか、またはその増加した SA によりその下

流の遺伝子である PR protein の発現は誘導されるかなどを検討した。

過剰発現株は、*NahG*(salicylic acid hydroxylase)を導入した組換え植物と同様な作用があることが示唆されている。*NahG* は内生 SA をカテコールに変換し分解するが、過剰発現株では、内生 SA を MeSA に変換することが予測され、SA により誘導される SAR の反応が抑制される可能性が示唆された。逆に抑制株では、内生 SA の変換経路であるメチル化を防ぐことで、内生 SA の濃度の上昇が生じ、SAR のマーカー遺伝子の発現誘導が敏感に現れる可能性があると考えられた。今回の実験では、その結果を明確に確認することができなかったが、それと類似な反応は確認された。

3. タバコにおける *NtSMT* の発現解析

タバコは *A. belladonna* とは同じナス科であり、*NtSMT* と *AtSMT1* の遺伝子配列の相同性は高い。そこで、*NtSMT* の誘導に SA が因子として働くかどうかを検討するため、SA と BIT 処理を行った。その結果、*N. tabacum* cv. Xanthi は SA と BIT により *NtSMT* 発現が誘導され、揮発性 MeSA も検出された。また、SAR のマーカー遺伝子と共に発現が誘導されることも一つの特徴として確認された。しかし、*N. benthamiana* に関しては誘導が見られなかった。

これまでの結果から、*NtSMT* の発現誘導は抵抗性反応に深く関係する可能性が示唆された。

4. 総括

AbSMT 1 の発現誘導は他の植物で報告された事と同様なエリシターで発現誘導され、さらに SA と SA を蓄積することができる抵抗性誘導化合物により発現が誘導された。これは、植物の抵抗性の誘導に重要な役割を担っていることが示唆された。また、発現誘導が SAR だけではなく、病傷害応答反応に関わる因子に関しても同様な発現誘導を示した。これは一つだけの機能ではなく、複数の機能を担っている可能性を示唆する。また、組換え植物を用いた実験では、SA の役割を補助したり、逆に抑制したりすることが予測され、類似な応答反応は確認されたものの、抵抗性反応が一つだけが原因で起きることではないことと、主動遺伝子と微動遺伝子の応答反応などが複雑に関係することで、その詳細な解析が必要であった。

AbSMT1 の発現解析により、植物の抵抗性応答反応において、高濃度に蓄積される SA 濃度を減らす解毒作用と、病傷害応答反応を円滑に動かすための役割を担っていると考えられる。今後、その機能が他の植物においても観察されることを期待する。