

論文の内容の要旨

氏名：樋口 直樹

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：トマト植物体におけるストレス応答タンパク質 NP24 の機能解明

序論

植物は病原体の感染や周囲の生育環境による様々なストレスに対し、植物ホルモンをシグナル伝達物質とし特有の防御機構を発現している。この際、病原体の感染拡大の抑制に備え全身獲得抵抗性（Systemic Acquired Resistance: SAR）を誘導する。これは人為的にも誘導が可能なため実際に農業において病害予防の一環として利用されている。

SAR の発現により、抗菌性タンパク質として感染特異的タンパク質（Pathogenesis Related Protein: PR-タンパク質）が生産される。これまでに単子葉・双子葉を問わず様々な植物種で同定されており、自身のアミノ酸配列や酵素活性、免疫学的相同性等より PR-1 から PR-17 に分類され、傷害や乾燥等の環境変動によっても発現することが見出されている。その中でもタバコ植物体より検出されたオスモチンはタウマチン様タンパク質として PR-5 に帰属し、植物体に塩・乾燥ストレス耐性を付与する。一方で植物病原菌計 18 属の菌糸や胞子の生育を効果的に阻害することが報告されている。いくつかのタウマチン様タンパク質は真菌細胞壁の構成成分である β -1,3 グルカンの加水分解性、もしくは結合性を示すものの抗菌性への関与については明らかではない。近年ではオスモチンが酵母細胞膜に存在する PHO36 タンパク質に結合することが見出され、それにより酵母細胞内の Ras2/Protein kinase A (PKA) のリン酸化経路を介して活性酸素種（ROS）の消去能の低下を引き起こし、アポトーシスを誘導することが明らかにされた。PHO36 は Progestin and AdipoQ receptor superfamily に属し、その保存性は高く、幅広い生物種において相同性の高いタンパク質が同定されている。しかし未だ他のタウマチン様タンパク質によるアポトーシスの誘導については確認されていない。酵母と高等真核生物では細胞内プロセスが高く保存されていることから、酵母アポトーシスモデルは抗菌剤の開発や生理学的メカニズムの同定からも重要性が伺える。

トマトは 2010 年時点で年間 1.5 億 t（国際連合食糧農業機構, FAO）生産される主要作物であると同時に、果実形成や成熟過程に関する研究のモデル生物として扱われている。これまでにトマトにおいても塩ストレス誘導性タンパク質・タウマチン様タンパク質として根の cDNA ライブラリーより NP24 がクローニングされており、果実部における成熟の進行に伴うタンパク質の発現が明らかにされている。一般的に果実の成熟が進行するにつれ果実の軟化や果色の変動とともに、植物細胞壁の安定性低下に起因して病原体に対する感受性が高まる。しかし、これまでに NP24 の機能性については未解明な部分が多く明確ではない。さらに、シークエンス解析より NP24 では PHO36 との結合が予測される領域において、オスモチンと一部アミノ酸配列が置換していることが明らかになり、一層興味を持たれるところである。本研究ではタウマチン様タンパク質、NP24 の機能解明のため酵母に対する PHO36 を介したアポトーシスの誘導能、及び果実成熟過程における NP24 発現制御の解明を行った。

1 NP24 の発現系の構築及び PHO36 を介する酵母スフェロプラストの生育阻害の検討

NP24 機能解明のためリコンビナントタンパク質の発現系の構築を試みた。市販品種であるトマト桃太郎の cDNA を鋳型にシグナルペプチドを除く NP24 全長遺伝子を、制限酵素認識配列を付加したプライマーを用いて PCR により増幅後、pET-41a(+) vector に挿入し発現ベクターを構築した。これを大腸菌 Origami2 (DE3) に遺伝子導入後、IPTG によるタンパク質の誘導発現を行った。回収した菌体より可溶性タンパク質を抽出後、アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、リコンビナント NP24 (rNP24) を取得した。タウマチン様タンパク質の異種発現は封入体を形成することがこれまで

の研究の隘路となっていることから、本研究では GST-tag 融合タンパクとして用いた。また、NP24 の PHO36 への作用性を直接的に検討するため、酵素処理により細胞壁を一部除いた酵母スフェロプラストを供試した。

Saccharomyces cerevisiae BY4741 スフェロプラストに対する rNP24 の感受性を検討したところ、PHO36 欠損株では増殖の違いがみられなかったものの、BY4741 野生株では増殖速度に遅延がみられた。これにより rNP24 が PHO36 を介し生育阻害を誘発することが明らかになった。

2 リコンビナント NP24 の *Saccharomyces cerevisiae* に対するアポトーシスの誘導

NP24 が PHO36 を介し酵母スフェロプラストの生育を阻害したことが明らかになり、その誘因がアポトーシスである可能性について検討した。酵母におけるアポトーシスはこれまでに、ミトコンドリアにおける ROS の生産の増加やタンパク質分解酵素であるカスパーゼの活性化などのメカニズムにより、核の断片化等の現象を誘発することが明らかにされている。そこで、細胞内において予想される ROS の消去能の低下に伴う蓄積増加について、蛍光プローブである DCF DA を用いた蛍光観察により検討した。rNP24 の存在下、2 時間で野生株においては、PHO36 欠損株よりも顕著な蛍光シグナルが観察された。また、全細胞数に対して約 50% の ROS 蓄積陽性細胞がみられた。このことより rNP24 が酵母細胞内において ROS の蓄積を増加させていることがわかった。

アポトーシス初期過程にみられる特徴的な活性化カスパーゼを阻害剤である SR VAD FMK を菌体内に取り込ませ検出した。野生株においては、rNP24 の存在下、4 時間で PHO36 欠損株よりも強い蛍光シグナルが観察された。また、全細胞数に対して約 10% の活性化カスパーゼ陽性細胞がみられ、生育阻害のメカニズムにおいてカスパーゼが関与していることが示唆された。

核染色試薬 Hoechst 33342 を用いて核を染色し、形状の観察を行った。PHO36 欠損株では単一の核がみられたものの、rNP24 存在下の野生株では不均一に断片化した核をもつ菌体が観察され、アポトーシス性の特徴がみられた。

rNP24 は PHO36 を介して酵母細胞内に ROS の蓄積を誘発し、カスパーゼを活性化するメカニズムを示し、また兆候として核の断片化が観察されたことから、生育阻害がアポトーシス性細胞死に起因することが明らかとなった。その際に、オスモチンの作用と同様に NP24 も Ras2/PKA のリン酸化経路を活性化させていることが考えられる。

3 NP24 上流域配列における成熟関連転写因子 RIPENING INHIBITOR の発現制御の解明

結実したトマト果実は肥大成長した後、エチレン生合成が急激に増加し成熟が加速されることから、エチレン生産量の増加が果実成熟における主要な因子として考えられる。エチレン生合成より早期の制御、また非エチレンによる制御には MADS ボックス転写因子に属する RIPENING INHIBITOR (RIN) が関与している。RIN は結合認識配列である CArG ボックス配列へ特異的に結合し、成熟過程に必要な遺伝子の転写を活性化する。

NP24 においてはシーケンズ解析より、上流域 2 kbp に CArG ボックス配列が存在し、とりわけ NP24 開始メチオニンより -230 bp において強い結合を示すことがクロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation assay : ChIP) により示唆された。この点において詳細な検討を行うため、同様に ChIP を用いて成熟ステージでの RIN 結合の挙動の解明を行った。トマトの成熟段階を果実の肥大成長が終わった頃の緑熟期 (Green)、赤色が果実表面に見え始める催色期 (Breaker)、全体に薄く赤色が広がる桃熟期 (Pink)、赤色が全体に広がる完熟期 (Mature) の 4 段階に分け、その中でも RIN の発現が高い Pink と、発現の低い Green を比較検討した。ホルムアルデヒドにより Green、Pink それぞれの果肉組織内における DNA とタンパク質を架橋後、調製した核懸濁液よりクロマチンを抽出した。その後、超音波破碎による DNA の断片化を行った後、RIN 抗体で免疫沈降したものを RIN-IP DNA とし、免疫沈降しなかったものをコントロールであるインプット DNA とした。RIN 抗体により特異的に濃縮した DNA 配列の相対的存在量の測定のため、CArG ボックスを含む上流域配列特異的プライマーを設計し、

リアルタイム PCR による定量解析を行った。RIN の CArG ボックス配列への結合評価はインプット DNA に対する RIN-IP DNA の RIN 抗体特異的濃縮、すなわち上流域配列の存在量の比較で行った。

RIN の結合能の低い-1840 bp では Green、Pink において存在量に有意差はみられず、成熟過程の進行に伴う RIN 結合の可能性は示唆されなかった。しかし、-230 bp で Pink において高い存在量がみられ、Green に対して約 3 倍、NP24 上流域配列の RIN 抗体による濃縮が明らかになった。このことから、-230 bp の CArG ボックス配列において、RIN による NP24 発現の促進がなされていることが強く示唆された。

総括

本研究結果より、トマト植物体が有するタウマチン様タンパク質 NP24 は酵母に対し、カスパーゼに依存するアポトーシス性細胞死を誘発し、それにより生育を阻害することが明らかになった。この作用は膜タンパク質 PHO36 の存在に起因しており、オスモチンと同様に細胞内における Ras2/PKA のリン酸化経路を促進していることが示唆される。PHO36 様タンパク質は病原菌においても保存されており、本知見は抗菌剤等の開発において重要なメカニズムの一つとなることが考えられる。また、果実の成熟過程において NP24 の発現制御は成熟関連転写因子 RIN によりコントロールされることが明らかとなった。以前の研究より、NP24 はエチレン応答性転写因子によってコントロールを受けることが明確になっており、本研究より RIN 及びエチレンの双方により制御されることが考えられる。このような制御はポリガラクトクトナーゼやエチレン前駆体合成酵素にみられ、NP24 の発現は成熟過程における重要なファクターであることが示唆される。現段階では NP24 が病原菌に対し脆弱な果実組織において日和見感染を防ぐため発現することが可能性の一つとして考えられる。NP24 タンパク質による PHO36 様タンパク質への作用性、とりわけ植物病原菌へ効果の解明が課題として考えられるとともに、他種の植物における NP24 様タンパク質の機能の普遍性についても興味を持たれるところである。