

ふりがな イシカ トシキ
氏名 石川 寿樹
学位 博士 (農学)
学位記番号 新大院博 (農) 第 86 号
学位授与の日付 平成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Comprehensive investigation of roles of nitrilase and amidase involving in auxin biosynthesis and plant hormone crosstalk in clubroot development caused by *Plasmodiophora brassicae* in turnip, *Brassica rapa* L.

(*Plasmodiophora brassicae* 感染によるカブ *Brassica rapa* L. の根こぶ病発症における植物ホルモン相互応答及びオーキシン生合成に関与するニトリラーゼとアミダーゼの役割の包括的解明)

論文審査委員 主査 教授 堀 秀隆
副査 教授 三ツ井 敏明
副査 教授 和田 清俊
副査 准教授 岡崎 桂一

博士論文の要旨

Plasmodiophora brassicae はアブラナ科植物の根に感染し根こぶを形成する。本病を防除するためには、根こぶ形成の分子機構を明らかにすることが必要である。本研究では、カブ *Brassica rapa* L. の根こぶ形成におけるオーキシン生合成を調査した。

インドールアセトニトリル (IAN) をインドール酢酸 (IAA) に変換するニトリラーゼの 3 種類の cDNA (BrNIT-T1, BrNIT-T2, BrNIT-T4) を、カブから RT-PCR によりクローニングした。組換えタンパク質を用いた酵素学的解析の結果、BrNIT-T1 と BrNIT-T2 は IAN を IAA に変換する活性を、BrNIT-T4 はシアノアラニン (AlaCN) を分解する活性を示した。後者はエチレン合成の際副産物として生じるシアン代謝経路の最終段階に位置する反応である。

根こぶ病感染組織における IAA 合成とニトリラーゼの発現を定量的に解析した。感染組織における活性型遊離 IAA は根こぶ肥大の初期成長段階と終期成熟段階において増加した。前者では BrNIT-T1 が、後者では BrNIT-T2 発現量が、感染組織でそれぞれ特異的に増加していた。一方 BrNIT-T4 は肥大初期には発現が大きく減少し、後期には回復して非感染健全組織と同程度の発現量となった。

根こぶ病菌の感染、成長とカブニトリラーゼとの関係を詳細に調査するため、in situ hybridization を行い、根こぶ病感染組織における BrNIT-T1 と BrNIT-T2 の発現部位を組織学的に解析した。従来の RNA プロブでは BrNIT-T1 と BrNIT-T2 の特異的検出は不可能であったが、オリゴプロブ中に locked nucleic acid (LNA) を導入することで、特異的な検出が可能になった。この特異的プロブによる in situ hybridization の結果、肥大進行中の感染組織では、BrNIT-T1 は成長中の若い病原菌変形体が存在する細胞で、BrNIT-T2 は病原菌に進入されていない細胞で、それぞれ特異的に発現していることが示された。また感染後期に、病原菌が成熟し休眠胞子を形成すると BrNIT-T1 の発現は検出されなくなるのに対し、BrNIT-T2 は非感染細胞だけでなく、休眠胞子を含む感染細胞でも強く発現していた。

IAA のモノクローナル抗体を用い免疫染色し、感染組織における free IAA の局在は、感染の初期には BrNIT-T1 の、後期には BrNIT-T2 の発現部位と同一であることを示した。根こぶ病感染組織におけるエチレン合成量を推定するため、エチレン前駆体アミノシクロプロパンカルボン酸 (ACC) 含量と ACC をエチレンに変換する ACC オキシダーゼ (ACO) 酵素活性を測定したところ、感染初期には ACC 含量、

ACO 活性共にほとんど変化が無く、後期には共に増加し、根こぶ組織の成熟もしくは腐熟にエチレンが関与することが示唆された。

植物ホルモンや関連代謝産物を処理したカブ幼根におけるニトリラーゼの発現を定量解析したところ、BrNIT-T1 はサイトカイニン処理で、BrNIT-T2 はジャスモン酸処理で、それぞれ特異的に発現が増加した。これらの植物ホルモンは根こぶ病の初期と後期にそれぞれ含量が増加することが報告されており、それぞれの時期にみられたニトリラーゼの発現と IAA 含量の増加に関与することが示唆された。

これらの結果を総合し、カブの根こぶ組織における植物ホルモンクロストークと IAA 合成を介したニトリラーゼアイソフォームの特異的関与を示す事が出来た。

さらに、他の IAA 合成酵素であるアミダーゼについても、根こぶ組織における酵素活性を測定し、また cDNA をクローニングしその発現量を定量した。酵素活性解析の結果、カブ組織には温度安定性の異なる複数のアミダーゼが存在することが示唆されたが、本研究ではそれらを同定することはできなかった。しかしクローニングしたアミダーゼ (BrAMI) は酵素活性を有しており、また感染初期から中期にかけて発現量が大きく増加することが示された。また in situ hybridization により、アミダーゼは BrNIT-T1 と共局在することが示された。植物のニトリラーゼは、ニトリル基質からカルボン酸を生じるニトリラーゼ活性と同時に、アミドを生産するニトリルヒドラターゼ活性を持つが、BrNIT-T1 は IAN から IAM を生産する活性が他の相同ニトリラーゼと比べて非常に高かったため、カブアミダーゼは BrNIT-T1 と同時に発現することで、IAN からの IAA 合成効率を高める補助的な機能を有すると思われる。

これらの結果は、世界的に著名な植物病理学雑誌に筆頭著者として発表した(T.Ishikawa et al., 2007, Molec. Plant Pathol. 8 (5), 623-637)。またこれに先立つ、根こぶ病感染カブ培養根を用いた研究で、抵抗性反応を解析し、中堅の植物病理国際誌に第2著者として発表した。これも参考論文である。(H.Takahashi, T.Ishikawa 他7名, 2006年, J. Plant Pathology. 154, 1-7.) in situ hybridization およびアミダーゼに関する研究はそれぞれ筆頭著者として投稿するところである。

審査結果の要旨

平成20年2月19日(火)に専攻の博士論文公開発表会を行いその後審査委員会を開催し、各委員の本論文に対する意見交換を行い、多くの点で新しい知見を根こぶ病の生化学分子生物学に導入したことは十分に博士論文に値する点で一致した。特に

1. 3つのニトリラーゼをクローニングし基質特異性を決めた点。
2. LNAプローブを使用し、特異性を格段に高めインサイチューハイブリダイゼーションを成功させ、感染組織と非感染組織でのニトリラーゼの局在を示した点。
3. IAAモノクローナル抗体を用い IAA の局在を示し、更にニトリラーゼ1, 2との時間的な共局在性を示し、その役割に明確な示唆を示した点。
4. アミダーゼをクローニングし反応産物特異性から、アミダーゼがニトリラーゼ1と共存することの意味を示唆した、

諸点は、特筆すべき研究成果であり、これらの新発見は *Plasmodiophora brassicae* のアブラナ科植物への感染機構を明らかにし、本質的な根こぶ病耐性品種を作出する基本的データとなるものであると認め、本論文が博士(農学)の学位論文に十分であることが全審査委員によって認定された。