

氏 名	佐 藤 慎 一
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 85 号
学位授与の日付	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 題 目	STUDIES ON THE DEFENSE RELATED PROTEINS AGAINST PATHOGENIC INVADERS —植物の生体防御関連蛋白質の機能に関する研究—
審 査 委 員	(主査) 教 授 原 三 郎 教 授 梶 原 莞 爾 教 授 山 中 寛 城 助教授 亀井加恵子 助教授 杉 村 順 夫

論文内容の要旨

植物病原細菌は植物に感染する際、強固な細胞壁を壊し細胞内に侵入・増殖する。一方、植物は病原細胞などによる攻撃を防ぐために、様々な防御蛋白質を生産する。これらの植物が生産する生体防御蛋白質に着目し、それらの構造および機能解析を総合的に行った。

第1章. 病原菌は宿主への進入に際して、まず植物の重要な防御物質の一つであるペクチンを分解する。感染初期の病原細菌と宿主植物のせめぎ合いを理解するため、イネ葉鞘褐変細胞病菌 *Pseudomonas marginalis* MAFF 03-01173が生産するペクチン分解酵素を精製し、ペクチンリアーゼとペクテートリアーゼの2種類を発見した。両者の発現および活性にはカルシウムイオンが大きく影響し、感染初期には主としてペクテートリアーゼが宿主を攻撃することが明らかにした。

第2章. 植物に細菌性の強力なキチナーゼ遺伝子を導入して病害耐性植物を作製することを目的として、細菌の生産するキチナーゼと植物の生産するキチナーゼの構造的相関を明らかにするため、*Altermonas* sp. Strain O-7の生産するキチナーゼのS-S結合の位置を決定し、植物キチナーゼとは構造相関を持たないことを明らかにした。

第3章. ニガウリ種子より得たゲノムDNAを元に、植物生体防御タンパク質であるプロテアーゼインヒビターMCTI-II遺伝子をクローニングした。MCTI-II cDNAをバキュロウイルス発現ベクターに組み込み、リコンビナントウイルスを作製し、カイコを用いてリコンビナントMCTI-IIの大量発現系を確立した。得られたリコンビナントMCTI-IIは天然型と同じ活性を示した。

第4章. 植物種子中に存在する一群の脂質結合蛋白質の一つのであるnon-specific lipid transfer protein (Ltp) は抗菌活性を示すが、生体内におけるレセプター物質が確認されていないなど、生体内でのLtpの機能は十分明らかにされていない。Ltpを大量に得るため、イネ子葉より調製したゲノムDNAを元に、大腸菌発現系、バキュロウイルス発現系および酵母発現系を用いて発現を試み、大腸菌発現系および酵母発現系で好成績を得た。

第5章. MCTI-IIの阻害反応部位ループをファージディスプレイ法を用いることにより、ランダムに改変したファージのライブラリーを作製した。イネLtpをリガンドとしたアフィニティークラムを用いて、ファージライブラリーからLtpに特異的に結合するリコンビナントMCTI-IIファージを選別した。その塩基配列から、Ltpに特異的結合するアミノ酸配列を明らかにした。これにより、MCTI-IIの阻害反応部位ループを様々な改変することにより、抗体と同様の特異的認識能を持たせることができることを明らかにした。

した。

上記内容の一部は下記の論文で公表されている。

1. Pectinolytic Enzymes from Pseudomonas marginalis MAFF 03-01173
Kaeko Kamei, Yasushi Inoue, Manabu Shiga, Shin-ichi Sato, Ryo Takano, Kazuyuki Hirayae, Tadaaki Hibi, and Saburo Hara
Phytochemistry, 45(7), 1359-1363, 1997
2. Identification of the Positions of Disulfide Bonds of Chitinase from a Marine Bacterium, Alteromonas sp. Strain O-7
Kaeko Kamei, Shin-ichi Sato, Ryo Takano, Hiroshi Tsujibo, Hideyuki Orikoshi, Chiaki Imada, Yoshiro Okami, Yoshihiko Inamori, and Saburo Hara
Biosci. Biotech. Biochem., 59(10), 1981-1982, 1995
3. Cloning and Expression of Momordica charantica Trypsin Inhibitor II Gene in Silkworm by using a Baculovirus Vector
Shin-ichi Sato, Kaeko Kamei, Mai Taniguchi, Hideki Sato, Ryo Takano, Hajime Mori, Masatoshi Ichida, and Saburo Hara
Biosci. Biotech. Biochem., 64(2), 393-398, 2000

論文審査の結果の要旨

植物病原細菌の感染は、植物の強固な細胞壁を壊し細胞内に侵入・増殖することから始まる。植物はこれらの攻撃を防ぐために、構造や機能の異なる様々な防御蛋白質を生産する。人工増加と食料問題の今後を考えると、病害に対する抵抗性作物を育種することが必須であると考えられる。申請者は植物病原菌が宿主に感染する際に必要である酵素群と植物の防御タンパク質との両側より生体防御機構を探索し、イネ葉鞘褐変細菌病菌 *Pseudomonas marginalis* MAFF 03-01173 が生産するペクチン分解酵素の生産および活性発現にカルシウムイオンが大きく影響し、感染初期には主としてペクテトリアーゼが宿主を攻撃することを明らかにする一方、植物の微生物に対する生体防御において重要な役割を果たすキチナーゼについて細菌由来および植物由来の同酵素の構造相関を解明した。また、植物の防御タンパク質であるニガウリ由来のスカッシュファミリー・トリプシンインヒビターや米由来のnon-specific lipid transfer proteinの遺伝情報およびタンパク機能についての知見を深めた。

本論文において、申請者は各種精製技術および遺伝子操作技術を巧みに利用し、病原菌と宿主の関係および植物の生存戦略の理解に新たな知見を与えるなど、意義のある内容であると判断された。