

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大鎌 直子

硫黄は高等植物の必須元素のひとつであり、近年、硫酸の吸収や代謝の経路で機能する酵素をコードする遺伝子のほとんどが単離された。システイン、*O*-アセチルセリン (OAS; システインの前駆体)、グルタチオン(GSH)といった代謝産物が、硫黄栄養により植物体の濃度が変化することで遺伝子発現が制御 (mRNA 量) されることから、硫黄栄養のシグナルと考えられている。このような硫黄応答遺伝子のモデルとして、ダイズの $\beta$ -コングリシニン $\beta$ サブユニット遺伝子が用いられてきた。 $\beta$ サブユニット遺伝子はシロイヌナズナ植物体でも硫黄に応答し、その応答は転写レベルであり、OAS や GSH によって制御されることが知られている。さらにこれまでに、 $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーターの硫黄栄養応答領域 ( $\beta_{SR}$ ; 235bp) が調べられ、この領域を構成的に発現するカリフラワーモザイクウイルス(CaMV) 35SRNA プロモーターに挿入することにより、本葉を含めた種子以外の組織でも硫黄応答が観察できる。

第1章では上述のキメラプロモーターに green fluorescent protein (GFP) 遺伝子をつないだシロイヌナズナ形質転換体(NO<sub>B</sub> 株)を作成した。GFP 蛍光の変化は、OAS 濃度の増加及び、硫酸や GSH 濃度の減少と相関していた。またメチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナの変異株 *mtol-1* と NO<sub>B</sub> 株を交雑し、*mtol*NO<sub>B</sub> 株を作製した。*mtol* 変異に伴うメチオニンの増加より、種子では GFP の発現が抑制されるが本葉では抑えられなかった。さらに CaMV 35SRNA プロモーターの下流に $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター全長をつないだコンストラクトを持つ形質転換シロイヌナズナでは、 $\beta$ サブユニットプロモーター全長の活性は本葉でも、種子でも *mtol* 変異により抑制された。これらの結果により、 $\beta_{SR}$  は種子でのメチオニン応答には十分であるが、葉では $\beta_{SR}$  以外のプロモーター領域にメチオニン応答配列があることが明らかになった。

第2章では硫黄栄養応答遺伝子の発現に及ぼす植物ホルモンの影響を調べた。培地にサイトカイニン、アブシジン酸、オーキシン、エチレン前駆体、ジベレリン、ジャスモン酸を添加すると、サイトカイニンを添加した場合のみ、NO<sub>B</sub> 株における GFP の蛍光強度が増加した。また硫黄代謝系の硫黄栄養応答性遺伝子である *adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR) 1* と *sulfate transporter (Sultr) 2;2* の mRNA 量もサイトカイニン添加によって増加した。しかしながら、培地へのサイトカイニンの添加により、植物体の OAS 濃度は変化せず、糖濃度が増加した。また培地への糖の添加により、NO<sub>B</sub> 株の GFP の蛍光強度が増加した。これらの結果は、添加サイトカイニンは、硫黄欠乏とは独立な経路で糖濃度の増加を通してこれら硫黄栄養応答性遺伝子の発現を正に制御していることを示唆した。

第3章ではNOB株の種子を ethyl methanesulfonate で変異源処理し、そのM2世代約4万株から、NOB株（以後野生型株と記す）と異なるGFP蛍光強度を示す株をスクリーニングした。25株の変異株の候補が得られた。これらのうち一遺伝子による変異と確認され、GFPの蛍光強度とmRNA量に相関のあった2株（*nbm1-1*, *nbm2-1*）について詳細に解析した。*nbm1-1* (*NOB mutant*) と *nbm2-1* は、硫黄十分条件でも欠乏条件でも野生型株よりGFP蛍光が強く、*Sultr2;2*, *APR1*, *serine acetyltransferase (SAT) 1* の mRNA 量も高かった。*nbm1-1* ではシステインとGSHの濃度は変化していないが、OASの濃度が増加した。これらから、*nbm1-1* では、OAS合成過程に何らかの変異があることが示唆された。ポジショナルクローニングにより *NBM1-1* は、染色体5番上腕の約69kbの範囲に存在していることが分かった。*nbm2-1* はOAS、システイン、GSH濃度が高かった。*nbm2-1* では、OASによる正の遺伝子発現原因制御が、グルタチオンによる負の制御に勝っていると考えられた。*NBM2-1* は染色体3番上腕の約182kbの範囲に存在していることが分かった。

以上本論文は、硫黄栄養による遺伝子発現の制御を可視化した形質転換体を作製し、硫黄欠乏とメチオニンによる $\beta_{SR}$ の発現制御が組織により異なることとサイトカニンが硫黄応答性遺伝子を正に制御することを発見し、形質転換体の種子を変異原処理し硫黄応答性の異なる新規変異株を単離したもので、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。