

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 辻 寛之

イネは冠水状態にさらされると、多数の遺伝子の発現を変化させることによって様々な適応反応を誘導する。しかし、この遺伝子発現の変化がどのような機構によって調節されているのかについては不明な部分が多かった。本研究では、冠水条件下におけるイネの遺伝子発現調節について明らかにするために、アルデヒド脱水素酵素の冠水解除時の活性化、カルシウムイオンによるシグナル伝達、ヌクレオソームヒストンのアセチル化に着目して解析した。

本論文は 5 章から構成されている。第 1 章では、現在問題となっている冠水による作物の被害を概説するとともに、冠水・低酸素に対する植物の適応と遺伝子発現調節についてこれまで報告された知見をまとめている。

第 2 章では、冠水中および冠水解除時におけるイネミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) 遺伝子の発現調節について検討した。植物は冠水中だけでなく冠水状態から解除されたあとも大きなダメージを受ける。このダメージの原因は、一つは冠水解除時に急激に生じる活性酸素であり、もう一つは冠水中に蓄積したエタノールが酸化されて生じるアセトアルデヒドである。植物においてミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) はアセトアルデヒドを無毒化できる酵素のひとつであることが知られているので、本研究ではイネ *ALDH2* 遺伝子の構造を明らかにし、その発現調節や冠水解除時の生理的役割について調査した。イネ *ALDH2* 遺伝子には *ALDH2a*, *ALDH2b* の 2 つが存在しており、両者の発現を詳細に解析した結果、*ALDH2a* の mRNA は冠水中急激に増加するにも関わらず *ALDH2a* タンパク質はそれほど増加しないことが分かった。そして冠水を解除した直後、*ALDH2a* の mRNA が減少していくにも関わらず *ALDH2a* タンパク質が一過的に増加することが明らかになった。これはイネが冠水中に *ALDH2a* の mRNA を増加させてプールしておき、冠水解除後これを急激に翻訳することで *ALDH2a* タンパク質を増加させていることを示唆している。このことを反映して、イネは冠水解除時に ALDH 活性が増加し、アセトアルデヒド量が減少していることが分かった。冠水に弱い作物であるオオムギやタバコでは、冠水中に *ALDH2a* の mRNA が増加するという性質は見られない。したがって、*ALDH2a* の mRNA が冠水中に増加するという性質は、イネが進化の過程で冠水に適応するために獲得したものである可能性が考えられた。

第 3 章では、冠水条件下のイネにおけるカルシウムイオンを介した遺伝子発現調節について解析した。トウモロコシ、シロイヌナズナでは、低酸素により細胞質カルシウムイオン濃度が上昇し、これが *ADH1* mRNA の冠水誘導性に必要であることが知られている。そこで *ALDH2a* mRNA の冠水誘導性にカルシウムイオンが関与しているかどうかを解析した。その結果、すべての植物に共通な *ADH1*, *PDC1* mRNA の冠水誘導性はカルシウムイ

オンを介したシグナル伝達経路で調節されていたのに対して、イネに特有の *ALDH2a* mRNA の冠水誘導性はカルシウムイオンを介さない経路で調節されていることが分かった。

これらの冠水で活性化する代謝経路の遺伝子と比較するため、冠水状態で機能が低下する酸素呼吸に関わる遺伝子の発現も同時に解析した。主要な ATP 合成を行うシトクロム呼吸系の遺伝子群の発現はカルシウムイオンに依存しない経路で調節されていたのに対し、ストレス応答に関わるオルタナティブ呼吸系遺伝子の発現はカルシウムイオンに依存した経路で調節されていることが明らかになった。

第 4 章では冠水条件下のイネにおけるヌクレオソームヒストンの修飾による遺伝子発現調節を解析した。イネを冠水処理し、*ADH1* および *PDC1* それぞれの領域におけるヌクレオソームヒストンのアセチル化状態をクロマチン免疫沈降法によって解析した。その結果、冠水処理によって *ADH1*, *PDC1* の mRNA が増加する際、これらの遺伝子を含む領域のヌクレオソームヒストンが高アセチル化されていることが分かった。

ヒストンのアセチル化状態は、アセチル化を促進するヒストンアセチル基転移酵素(HAT)と脱アセチル化を行うヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の活性のバランスによって決定されており、例えば HDAC 阻害剤はヒストンのアセチル化を促進することが知られている。イネに HDAC 阻害剤を処理したところ、好気状態であるにも関わらず *ADH1*, *PDC1* の mRNA が増加することが明らかとなった。したがって、好気状態における *ADH1*, *PDC1* の発現は TSA 感受性の HDAC によって抑制されている可能性が示唆された。この可能性を検証するために、イネ *HDAC* 遺伝子の構造を決定しその発現の冠水応答性を調べた。イネゲノム中には少なくとも 19 個の *HDAC* 遺伝子が存在しており、これらすべてについて冠水中の発現を解析したところ、3 遺伝子を除いてすべて冠水処理によって抑制されることが明らかとなった。

これらの結果から、好気状態では、TSA 感受性の HDAC が HAT 活性を上回って *ADH1* 周辺のヌクレオソームヒストンを脱アセチル化し、*ADH1* の発現が抑制されていると考えられる。冠水状態では、HAT 活性が HDAC 活性を上回って *ADH1* 周辺のヌクレオソームヒストンがアセチル化され、*ADH1* の発現が活性化したというモデルが考えられた。

第 5 章では、本研究で明らかとなった多段階による発現調節（転写段階の調節、翻訳段階の調節、カルシウムイオンによる調節、クロマチン構造変換による調節）を検証し、冠水条件下におけるイネ遺伝子発現調節の全体像について総合的に論じている。

以上本研究では、冠水状態および冠水解除時のイネにおいて、シグナル伝達、転写、翻訳といった様々な段階で遺伝子の発現調節がなされている事を明らかにした。また、冠水時における遺伝子発現の大規模な変化が、ヒストンのアセチル化あるいは脱アセチル化といったより高次の転写調節によってなされている可能性を示唆した。これらの知見は、植物の冠水・低酸素応答システムについての基礎的知見を与えるとともに、冠水害耐性作物を作出する基礎となるものであり、学術上また応用上極めて価値あるものである。したがって、審査委員一同は本論文が博士（農学）に値するものと認めた。