

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 傍 嶋 宏 行

ジャスモン酸 (JA) は、植物の病害抵抗性を制御する、重要な植物ホルモンの一つであるが、その作用発現機構はほとんど未解明の状態である。本研究は、JA の作用発現機構解明研究の一環として行ったもので、イネ培養細胞由来の JA 応答性遺伝子 *OsOPR1* の生物学的機能および発現制御機構の解析を行うことを目的としている。第 1 章は序論であり、JA が関与する植物の病害抵抗性発現機構と本論文の研究目的について概説している。

第 2 章では JA 処理後 2 時間のイネ培養細胞由来の cDNA ライブラリーからディフアレンシャルスクリーニングにより単離された JA 応答性遺伝子の一つである *OsOPR1* の機能解析を行っている。*OsOPR1* cDNA の塩基配列解析の結果、*OsOPR1* は酵母の Old Yellow Enzyme ホモログをコードしていると考えられ、シロイヌナズナ由来の 12-oxophytodienoic acid (OPDA) reductase 1 (*AtOPR1*) と高い相同性を示すことがわかった。OPDA reductase (OPR) は JA 生合成酵素の一つである。そこで、*OsOPR1* の ORF 全長を histidine-tagged protein として大腸菌で大量発現させ機能解析を行い、*OsOPR1* が OPR 活性を有することを確認した。ところで、シロイヌナズナには 3 種類の OPR が存在することが知られている。そのうち *AtOPR1*、*AtOPR2* は天然型の (+)-*cis*-OPDA より非天然型の (-)-*cis*-OPDA を基質として好むが、*AtOPR3* は天然型、非天然型 *cis*-OPDA を同等に効率よく還元し JA 生合成に必要な機能を果たしていることが分かっている。そこで、*OsOPR1* の基質特異性を調べた結果、基質として非天然型の (-)-*cis*-OPDA を基質として好み、天然型の (+)-*cis*-OPDA に対しては酵素濃度が高い場合のみ微弱な還元活性を示すに過ぎなかった。こうして、*OsOPR1* は *AtOPR1*、*AtOPR2* タイプの OPR であることが明らかになった。イネにおいて *AtOPR3* タイプの OPR が存在するかどうかを最近公開されたイネゲノムデータベースを用いて検索した結果、*OsOPR1* のほかに 11 種類の相同性遺伝子の存在が示唆され、塩基配列解析の結果から、それらのうち *OsOPR8* と仮称された遺伝子が *AtOPR3* タイプの特徴を有することが判明した。以上の結果から、*OsOPR1* の機能については、JA 生合成に関与している可能性は残されているものの、天然型の (+)-*cis*-OPDA 以外に本来の基質が存在し、ストレス応答に関連した、未知の生物学的機能を果たしている可能性が高いと考えられる。

第 3 章では *OsOPR1* の転写誘導機構の解明を目的としてプロモーター解析を行っ

ている。*OsOPR1* の翻訳開始点上流 1 kbp についてホタルルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子としたレポータージーンアッセイを行った結果、-0.88 kbp から-0.86 kbp 間の 20 bp に JA 応答性のシスエレメントが存在することが示された。この 20 bp の領域には basic region/leucine zipper (bZIP) モチーフをもつ転写因子 TGA ファミリーの結合配列と考えられる TGACG モチーフ(TGACG1 と仮称)が含まれていた。また、もう1つの TGACG モチーフ(TGACG2 と仮称)が 1 kbp から 0.9 kbp 間にも見つかった。これら 2 つのモチーフにトランスバージョン変異を導入し、レポーター活性が変化するかどうかを調べた結果、TGACG1 の単独変異および TGACG1、2 の二重変異で JA 応答性を失い、TGACG2 の単独変異では JA 応答性がやや低下する程度であることが示された。以上より TGACG1 は *OsOPR1* の JA 応答性の転写活性化に必須であり、TGACG2 は TGACG1 ほどではないものの *OsOPR1* の JA 応答性に関与していることが示された。

以上、本論文は、単子葉植物であるイネから OPR 遺伝子を初めて単離し、その機能および発現制御機構を解析してイネのストレス応答機構を考える上で重要な知見を提供したものであり、学術上、応用上貢献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。