

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小林 高範

鉄は高等植物にとって生育に必須な元素であるが、土壌中では鉄の大部分は不溶態として存在するため、植物に吸収されにくい。高等植物の鉄獲得機構に関与する主要な遺伝子は次々と単離されてきたが、これらの遺伝子の機能については未知の部分が多く残されている。さらに、鉄欠乏によるこれらの遺伝子発現の制御機構についてはほとんど解明されていない。本論文では、オオムギ根から単離された鉄欠乏誘導性遺伝子 *IDS2* および *IDS3* に関してプロモーター解析を中心とした研究を行うことにより、植物の鉄栄養制御の分子機構の解明と、鉄欠乏耐性植物の創製への新たな足掛かりを構築した。

第1章は序論であり、第2章では形質転換イネを用いたオオムギ *IDS3* 遺伝子産物の機能証明を試みている。*IDS3* 遺伝子はムギネ酸類の 2' 位の水酸化反応を触媒する酵素をコードすると推察されていた。これを実証するため、2' -デオキシムギネ酸を合成するがムギネ酸を合成しないイネに *IDS3* 遺伝子を導入した。*IDS3* を恒常的に発現する形質転換イネを作出し、R<sub>1</sub> 世代での解析を行った。この形質転換イネは調べた3系統すべてが 2' -デオキシムギネ酸に加えてムギネ酸を分泌した。これに対して、非形質転換イネは 2' -デオキシムギネ酸のみを分泌した。これにより、*IDS3* タンパク質が 2' -デオキシムギネ酸の 2' 位を水酸化する「ムギネ酸合成酵素」であることが *in vivo* で証明された。

第3章では、形質転換植物を用いてオオムギ *IDS3* 遺伝子およびオオムギ *IDS2* 遺伝子のプロモーター領域を解析し、鉄欠乏誘導性・根特異的発現を付与するシスエレメントを同定している。*IDS3* 遺伝子および *IDS2* 遺伝子のプロモーター領域を、レポーター遺伝子である  $\beta$ -グルクロニダーゼに連結し、タバコまたはシロイヌナズナに導入して鉄欠乏応答性を検討した。*IDS3* プロモーターおよび *IDS2* プロモーターは、異種植物であるタバコまたはシロイヌナズナにおいても鉄欠乏条件下で根特異的に発現を誘導した。さらに *IDS2* プロモーター

ターの欠失解析により、翻訳開始点を+1として数えたとき-272から-91までの配列(-272/-91)がタバコの根における鉄欠乏誘導性発現のために必要かつ十分であることを明らかにした。この配列(-272/-91)内の欠失解析およびリンカースキャン解析により、*IDS2* プロモーターに鉄欠乏誘導性を付与する新規の2つのシスエレメント、すなわち-153/-136領域のIDE1 (Iron deficiency responsive element 1) および-262/-236領域のIDE2を明らかにした。IDE1とIDE2は協同的に発現を誘導した。主要な発現部位は根の内鞘細胞、内皮細胞および皮層細胞であり、IDE1とIDE2による発現は鉄欠乏誘導性であると同時に根特異的であった。IDE2はIDE1と相同性を持っていた。また、検索の結果、IDE1と相同性のある配列がオオムギ、イネ、シロイヌナズナの多くの鉄欠乏誘導性遺伝子のプロモーター領域にも存在することが明らかになった。このことから、鉄欠乏誘導性のシスエレメントが多くの遺伝子や植物種において保存されている可能性が示された。

第4章では、タバコにおける*IDS2*プロモーターの微量元素欠乏応答性を解析し、微量元素の複合欠乏による鉄欠乏の緩和効果を発見している。鉄と同時に他の微量元素を欠乏させた植物体では、*IDS2*プロモーターによる発現誘導の度合いが鉄のみを欠乏させた場合よりも低下していた。さらにこれらの植物体では、生育阻害、クロロシス、他の元素の蓄積等の鉄欠乏症状が緩和されていた。植物体内の鉄濃度は、鉄のみを欠乏させた植物体の場合と同程度であった。鉄欠乏状態の植物体内における鉄の利用性が、他の微量元素の存在状態に密接に関係していることが推察された。

以上、本論文は鉄欠乏誘導性遺伝子*IDS2*および*IDS3*の機能と発現制御機構についての研究を行い、高等植物において初めて「鉄欠乏誘導性・根特異的発現」を付与する新規のシスエレメントIDE1、IDE2を同定したものであり、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して認めた。