

審査の結果の要旨

林 光紀

本論文は5章からなり、第1章はYK1過剰発現イネにおけるストレス耐性の解析、第2章はYK1タンパク質の機能解析、第3章はYK1過剰発現イネにおけるNAD代謝の解析、第4章は*Hml*変異体を用いたトウモロコシの解析、第5章はDFR欠損イネの解析について述べられている。

トウモロコシ *Hml* 遺伝子はNADPH依存性HC-toxin還元酵素(HCTR)をコードし、トウモロコシに特異的に感染する病原菌(北方斑点病菌)の生産するHC-toxinを還元し無毒化する。論文提出者は、イネ *Hml* 様遺伝子(*YK1*)の高発現イネを用いてYK1の生化学的機能を明らかにすることを目的に以下の研究を行った。

第1章ではYK1過剰発現イネのストレス耐性の解析について述べている。YK1高発現体に過酸化水素、塩、スクロース飢餓の各処理を行いストレス応答の解析を行った結果、形質転換体で耐性を示した。さらに、イネに感染する病原菌への抵抗性を解析した結果、褐条病菌の病斑拡大を抑制することが明らかとなった。これらの結果からYK1がストレス耐性機構に關与する可能性を示した。

第2章ではYK1タンパク質の機能解析について述べている。YK1がHCTR活性を有するかを解析した結果、YK1過剰発現体で有意な活性上昇が検出された。更に、YK1がリグニン合成系で働くシンナモイル-CoA還元酵素(CCR)、及びアントシアニン合成系で働くジヒドロフラボノール還元酵素(DFR)と相同性を持つことを見出した。CCR活性とリグニン量に変化がなかったため、リグニン合成系への關与はないものと考えられたが、DFR活性、及びデルフィニジン量、アントシアニン量については形質転換体で有意な増加が検出された。また、GST-YK1融合タンパク質を利用してDFR活性の検出を行った結果、実際にYK1タンパク質がDFR活性を有していることを明らかにした。YK1がHCTR活性のみならずDFR活性も有していたことからYK1がアントシアニン合成系に關与することを明らかにした。

第3章では形質転換体におけるNAD(P)合成系の解析について述べている。YK1がNAD(P)H依存性の酵素であることから、ニコチンアミド補酵素に注目し定量を行った。その結果、形質転換体でニコチンアミド補酵素量が有意に増加していた。さらにNAD(P)合成系に關わる酵素活性を測定した結果、NAD synthetase と NAD kinase 活性が形質転換体で上昇していた。ノーザ

ン解析の結果、両酵素の mRNA の蓄積量に差は見られなかったことから、転写後の何らかの調節機構により酵素活性が上昇したものと考えられた。ここまでの結果から、DFR としての機能を有する YK1 の増加によりアントシアニン合成系、及び NAD(P)(H)合成系の活性化が起こり、これが協調することでストレス耐性を獲得したと示唆した。

第 4 章では *Hm1* 変異体の解析について述べている。YK1 が HCTR と DFR 活性を有していたことから、トウモロコシ変異体(*Hm1hm2* と *hm1hm2*)を用いて、DFR 活性、及びアントシアニン量の測定を行ったところ、*Hm1* 変異体(*hm1hm2*)で共に減少していた。更に、過酸化水素処理を行いストレス耐性を調べた結果、*Hm1* 変異体はストレスに感受性を示した。また、ニコチンアミド補酵素量も *Hm1* 変異体で減少していた。これらの結果から *Hm1* も YK1 同様 DFR としての機能を有する可能性を示した。

第 5 章では *DFR* 遺伝子欠損イネの解析について述べている。本研究において、イネゲノム中には *DFR* 様遺伝子が 8 つ存在することを見出し、ノーザン解析によりこのうち 5 つが実際に発現していることを明らかにした。これらのイネ *DFR* 遺伝子の 1 つが欠損したイネを用いてアントシアニン合成系の変化、及びストレス耐性に対する解析を行った結果、*DFR* 遺伝子欠損イネでは DFR 活性の減少、及びシアニジン量の減少が検出された。また、過酸化水素処理に対する耐性を調べた結果、*DFR* 遺伝子欠損イネではストレスに感受性を示した。これらの結果より *DFR* が過酸化水素ストレスに対する防御機構に関与することを示した。

本研究は、イネ *Hm1* 様遺伝子が HCTR 及び DFR 活性の複数の機能を有する酵素であり、ストレス耐性機構に重要な役割を果たしていることを示した。これは植物のストレス応答の機構を解明する上で重要かつ新しい知見である。植物におけるストレス耐性機構に関わると考えられる酵素の機能を明らかにしたという点において、この研究は高く評価でき、博士(理学)の学位を授与できると認められた。

なお、本論文の第 1 章の一部は田村勝徳氏、第 3 章の一部は高橋秀行氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。