

論文の内容の要旨

論文題目 イネにおけるジャスモン酸応答性遺伝子の機能解析

氏 名 桐 潤 協 子

植物は動物のように動き、移動することが出来ない。そのため、低温、高温、乾燥、強い紫外線などの環境ストレスに対する植物独自の抵抗性を持っていると考えられている。また、非常に多くの病原菌の感染から防御する動物の免疫反応のような、しかし植物独自の抵抗性機構をも有している。近年、分子生物学の発展によりこれら防御応答の分子レベルにおいての研究がなされているが、依然として未解明な部分が多い。これらのことを明らかにするためには、植物が病原菌の感染シグナルをどのようなメカニズムで核内に伝えるか、そしてそのシグナルがどのような遺伝子の発現を誘導するのか、そしてその遺伝子産物がどのように機能することによって防御応答に繋がるのかを理解する必要がある。最近、これら防御応答に植物ホルモンの一種であるジャスモン酸 (jasmonic acid; JA) が関与していることがわかってきた。JA は他の植物ホルモンとクロストークして働き、病害抵抗性のみならず、様々な機能を有することがわかってきている。

我々のグループはイネ培養細胞を用いて、JA のシグナル伝達機構に関する研究を行ってきた。イネ培養細胞においては病原菌感染シグナルの一つであるキチンエリシター処理により抗菌性二次代謝産物 (ファイトアレキシン) 生産が誘導されるが、このシグナル伝達系において、JA がシグナル物質として重要な機能を果たしていることが明らかにされた。

本研究は JA のシグナル伝達経路解明の一環として行われたもので、イネ培養細胞において、JA によって mRNA レベルが増加する遺伝子をクローニングし、その機能解析を行うことを目的とするものである。

第2章においては、JA 処理2時間のイネ培養細胞 cDNA ライブラリーを作製し、ディファレンシャルスクリーニングにより、JA 処理で mRNA レベルが増加する遺

伝子の cDNA クローニング及び機能解析を行った。その結果、二種の JA 応答性遺伝子 *RRJ1* と *RRJ2* の cDNA クローニングすることに成功した。*RRJ1* は、337 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていると推測された。推定アミノ酸配列はイネのシスタチオン γ -リアーゼ完全に一致した。シスタチオン γ -リアーゼはシスタチオンからシステインに変換する酵素であり、得られたシステインの多くは抗酸化剤として働く、グルタチオンへと変換され、防御応答に関わる遺伝子発現を制御していると考えられる。*RRJ1* の cDNA のフラグメントは、イネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* に感染させたイネ葉からの EST クローンとして登録されており、培養細胞だけでなく、イネ植物体においても発現しているものと考えられる。これらのことから、植物の病害応答の一つとして含流アミノ酸の生合成代謝が誘導され、それには、JA が関与している事が示唆された。*RRJ2* は 605 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていると推測され、イネのピルビン酸デカルボキシラーゼ配列とほぼ一致した。ピルビン酸デカルボキシラーゼは嫌気条件下でアルコールデヒドロゲナーゼとともに機能し生物のエネルギー獲得に関与している。最近の研究で、ピルビン酸デカルボキシラーゼは嫌气的条件下以外でも、植物体で ABA 処理、マンニトール処理や傷害ストレスに対しても発現することが分かっている。さらに、植物が病原菌感染後や障害に対し、多くのエネルギーを防御応答に向けることが考えられ、*RRJ2* はその場合のエネルギー獲得のために働く酵素であると考えられる。

第3章ではより早いJA応答性を示す遺伝子を探索するため、JA処理30分のイネ培養細胞から作製したcDNAライブラリーを用いて、ディファレンシャルスクリーニングを行い、*RERJ1*と命名した一種のJA応答性遺伝子のcDNAを単離した。*RERJ1*は310アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、その推定アミノ酸配列と相同性の高いものは見つからなかったが、MybDやガン遺伝子産物であるMycなどを代表とする一群の転写因子に見出されるDNA結合モチーフである塩基性領域ヘリックスループヘリックス (basic helix-loop-helix; bHLH) モチーフを有していた。bHLH転写因子はゲノム解析が終了したシロイナズナやイネにおいて、それぞれゲノム中に100個以上存在し、スーパーファミリーを形成しているが、生物学的機能解析が明らかになったものはごく一部で、大部分は機能未知のままである。*RERJ1*は現在機能が研究されている植物のbHLHタンパク質とは系統樹上はなれており、*RERJ1*は、今までに無い新規の機能を持つ転写因子である可能性が考えられた。*RERJ1*は培養細胞でJA応答性を示すだけでなく、イネ植物体においてもJAに反応して発現が見られた。JAは様々な生物学的、非生物学的環境ストレスに対する防御応答に関与している植物ホルモンであることが示唆されていることから、*RERJ1*もストレス応答に関与している可能性が考えられた。植物体における*RERJ1*遺伝子の様々な環境ストレスに対する応答性を解析したところ、傷害、乾燥などのストレスに対して、*RERJ1*が応答性を示した。*RERJ1*のストレス応答がJAを介しているか否かを*RERJ1*発現前後での内生JAレベルの定量したところ、*RERJ1*の発現時には内生JAの増加が認められ、*RERJ1*の発現にはJAが関与していることが強く示唆された。

第4章では、さらに *RERJ1* の生物学的機能を解析するため、センス、アンチセ

ンス *RERJ1* mRNA の過剰発現イネを作製し、それらの表現型の解析を行った。また、*RERJ1* 過剰発現株を用いて、マイクロアレイ解析を行い、*RERJ1* の制御下にある遺伝子の探索を試みた。センス体において生長抑制が見られ、ノーザン解析の結果、センス *RERJ1* 遺伝子の発現が強いほど生長抑制が見られたことから、*RERJ1* が伸長生長の制御に関与している可能性を示唆していると考えられた。このことは第二葉鞘伸長抑制検定を行うと、野生型では JA 濃度依存的に第二葉鞘の伸長抑制が観察されるのに対して、アンチセンス体において、JA による伸長生長の抑制は見られなかったことから支持される。さらに、野生型では JA によりネクロシスが誘導されるが、アンチセンス体ではネクロシスがみられないことから、*RERJ1* は病害抵抗性にも関与している可能性が示唆された。*RERJ1* 過剰発現株由来のカルスを用いて、マイクロアレイ解析を行った結果、up-regulate された遺伝子の中には転写因子が含まれており、*RERJ1* が早期に発現することも踏まえて、シグナル伝達系の比較的上流で働いていることが示唆された。さらに、乾燥ストレス時の転写因子 DRE と結合するタンパク質も up-regulate されたことは *RERJ1* が乾燥ストレスに対して発現することの証拠にもなると考えられた。

以上、JA に対して早期に応答する *RERJ1* 遺伝子は、イネの伸長生長や病害抵抗性に関与し、様々な環境ストレスに対する応答性を示した。さらに、*RERJ1* の発現には JA が関与していることが示された。これらのことは、マイクロアレイ解析の結果からも示唆された。今後、*RERJ1* の標的遺伝子を同定し、*RERJ1* を中心としたシグナル伝達のネットワークを解明して行くことが必要と考えられる。