

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 桐渕 協子

植物は、病原菌感染、害虫による食害などの生物的ストレスや乾燥、高浸透圧、低温、高温、紫外線等の非生物的ストレスから防御する植物独自の抵抗性機構を有している。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 (JA) が関与していることがわかってきた。イネ培養細胞においても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防御応答の一つとして抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシンの生産が誘導されるが、この系において、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。しかしながら、JA のシグナル伝達系については、殆ど未解明の状態である。そこで、本研究では JA のシグナル伝達経路解明研究の一環として、イネ培養細胞から JA 応答性遺伝子を単離し、その機能解析を行うことを目的とした。

第 1 章においては、序論として、植物における JA 研究の現状、特にストレス応答と JA との関連について概説した後、本研究の目的を述べた。

第 2 章においては、JA で 2 時間処理した培養細胞由来の cDNA ライブラリーからディファレンシャルスクリーニングにより、JA 応答性遺伝子 *RRJ1* と *RRJ2* の cDNA を単離した。塩基配列解析の結果、*RRJ1* はシスタチオンをシステインへ変換するシスタチオン  $\gamma$ -リアーゼをコードしていることが分かった。システインは、タンパク質の立体構造の決定に関わるアミノ酸残基の一つであり、その多くは、直接間接にストレス軽減に働くグルタチオン合成に用いられる。また、*RRJ1* は、イネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* に感染したイネ植物体においても発現していた。一方、*RRJ2* は、ピルビン酸デカルボキシラーゼをコードしており、ストレス条件下におけるエネルギー代謝に関与しているものと考えられる。

第 3 章では、JA 処理 30 分のイネ培養細胞由来の cDNA ライブラリーからディファレンシャルスクリーニングを行い、早期 JA 応答性遺伝子 *RERJ1* の cDNA を単離した。*RERJ1* の推定アミノ酸配列は、癌遺伝子産物である Myc などを代表とする一群の転写因子に見出される塩基性領域ヘリックス-ループ-ヘリックス (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、大部分は機能未知である。*RERJ1* は現在機能が同定されている植物の bHLH タンパク質とは分子系統樹上離れた clade に分類され、*RERJ1* は、新規の機能を持つ転写因子である可能性が考えられた。また、*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 に応答して発現することが示された。また、傷害、乾燥などのストレス条件下における *RERJ1* の発現と内生

JA レベルとの関連を調べることにより、*RERJ1* のストレス応答性は JA 生合成を介していることが強く示唆された。

第 4 章では、*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。センス過剰発現体においては生長抑制が見られた。ノーザン解析の結果、センス *RERJ1* 遺伝子の発現が強いほど強い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が考えられた。このことは、正常型イネ芽ばえでは JA 濃度依存的に伸長抑制が観察されるのに対して、アンチセンス体イネ芽ばえにおいては、JA による伸長生長の抑制が見られなかったことから支持された。さらに、野生型では JA によりネクローシスが誘導されるが、アンチセンス体ではネクロー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。また、*RERJ1* 過剰発現体由来のカルスを用いて、マイクロアレイ解析を行ったところ、up-regulate された遺伝子の中には病害抵抗性をはじめとするストレス応答やシグナル伝達に関与すると考えられる遺伝子の割合が多かった。さらに、乾燥ストレス応答配列 DRE に特異的に結合するタンパク質も up-regulate されていた。このことは *RERJ1* が乾燥ストレス応答性であることを支持するものと考えられる。

以上本論文は、イネ培養細胞から JA 応答性遺伝子 *RRJ1*、*RRJ2*、*RERJ1* の cDNA を単離し、それらがそれぞれイネのストレス応答において重要な役割を果たしている可能性を示したものであり、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。