

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 15 年度博士課程入学

氏名 岡田 敦

指導教員 山根 久和

論文題目 イネのファイトアレキシン生合成酵素遺伝子 *OsKS4* の発現を制御する転写因子の探索と解析

一般に植物は、病原体に感染すると、病原体の細胞表層由来の成分などがエリシターとなり、細胞膜上の受容体と結合し、病原体の感染を認識する。そして、これが引き金となって、NADPH酸化酵素系の活性化による、 $\cdot O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 などの活性酸素種(ROS)の発生がおこるとともに、pathogenesis-related (PR) タンパク質と総称される抗菌性タンパク質の発現やファイトアレキシンと総称される抗菌性二次代謝産物の生産などの様々な抵抗性反応が誘導される。しかしながら、エリシターの受容から個々の抵抗性反応に至るまでのシグナル伝達機構の詳細は殆ど未解明の状態である。

イネにおいては、15種類の化合物がファイトアレキシンとして同定されているが、それらのうち、フラボノイドのサクラネチンを除く14種類はジテルペン型で、それらは基本炭素骨格により、モミラクトンA、B、ファイトカサンA-E、オリザレキシンA-F、オリザレキシンSの4つのグループに分類され、共通の前駆体であるgeranylgeranyl diphosphate (GGDP)から2段階の環化反応により生成するジテルペン炭化水素を経て生合成される。これらの環化反応を触媒する合計6種のジテルペン環化酵素遺伝子については、山形大学、当研究室を中心とする共同研究により、全て単離・機能解析が行われている。当研究室では、イネの液体培養細胞がいもち病菌の細胞表層由来の物質であるキチンエリシター(*N*-アセチルキオリゴ糖)を処理することによりモミラクトン類、ファイトカサン類等のジテルペン型ファイトアレキシンを生産することに着目し、この系を用いてファイトアレキシンの生合成制御機構の解明研究を行っている。本研究は、その一環として行うもの

で、イネの主要ファイトアレキシンであるモミラクトン類の生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子 *OsKS4* の発現制御機構を解明することを目的とする。

I モミラクトン類の生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子 *OsKS4* のプロモーター解析

イネの主要ファイトアレキシンであるモミラクトン類の生産に関与するジテルペン環化酵素遺伝子 *OsKS4* は、培養細胞にキチンエリシターを処理することにより一過的に発現が誘導される。この *OsKS4* のエリシター誘導的発現の制御領域の探索を行うため、*OsKS4* 上流域をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に連結させたレポータープラスミドを構築し、レポーター・ジーンアッセイを行った。その結果、*OsKS4* 上流-1,224~-991bp の領域にキチンエリシター応答性のシスエレメントが存在することが示唆された。この領域について、モチーフ検索を行ったところ、bZIP 型転写因子の認識配列である TGACG-モチーフが 2 つ、それ以外にも WRKY 型転写因子の認識配列である W-ボックスの TGAC コア配列が 2 つ存在していた。そこでこれらのエレメントに変異を導入したコンストラクトを作製し、レポーター・ジーンアッセイに供したところ、*OsKS4* 上流-1,145~-1,140bp の領域に存在する TGACG-モチーフに変異を導入した場合にキチンエリシター応答性の消失が認められた (Fig.1)。以上の結果は、*OsKS4* のキチンエリシター応答性の発現には bZIP 型転写因子が関与することを強く示唆している。

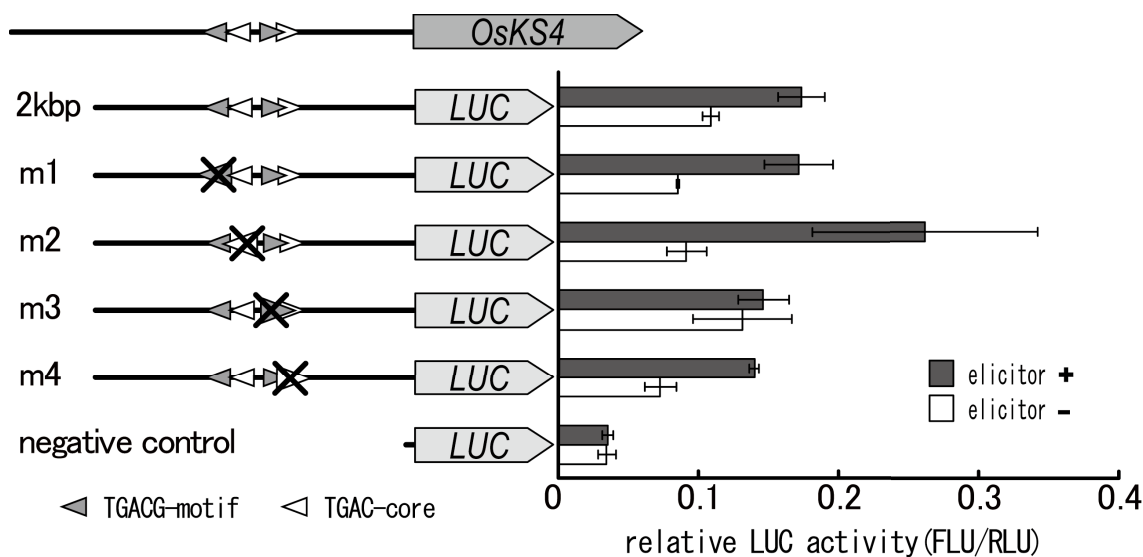


Fig. 1 *OsKS4* 上流域におけるキチンエリシター応答性領域の解析

II. マイクロアレイ解析および QRT-PCR を用いた *OsKS4* の発現を制御する転写因子の探索

一般に植物における防御応答のうち、二次代謝物質の合成は他の防御応答に比べその誘導が遅いことが知られている。実際ファイトアレキシン生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子の発現もキチンエリシター処理後 6 時間から 8 時間を最大とする誘導を示すことから、キチンエリシター処理後長いタイムスパンでトランスクリプトーム解析を行うことでキチンエリシターによ

って誘導されてくる膨大な数の遺伝子の中から効率よくファイトアレキシン生合成遺伝子の発現制御に関わる転写因子を探索するための有用な知見が得られる可能性が考えられる。

そこで、キチンエリシター処理した培養細胞由来の RNA を用いたトランスクリプトーム解析により、*OsKS4* の発現制御に関わる転写因子の探索を行うことにした。

使用した RNA はエリシター処理後 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 時間のイネ培養細胞から精製したものを、マイクロアレイスライドはイネ 22k オリゴアレイを用いた。得られた結果を解析したところ、5 種の bZIP 型転写因子の発現がキチンエリシター処理により一過的に上昇している可能性が示された。これらの遺伝子のうち、TGACG-モチーフに結合することが示唆されている typeD bZIP 型転写因子遺伝子は 4 種存在したが、qRT-PCR によりキチンエリシター応答性を調べたところ、2 種の bZIP 型転写因子遺伝子 (*OsTGA1*, *OsZIP21*) がいずれもエリシター処理後 4 時間を最大とする一過的なキチンエリシター誘導的発現を示した。

III. *OsTGA1*, *OsZIP21* 変異体を用いた解析

マイクロアレイ解析、及び qRT-PCR により *OsKS4* の発現制御に関わる転写因子遺伝子の候補として得られた二種の bZIP 型転写因子遺伝子 (*OsTGA1*, *OsZIP21*) には、その遺伝子領域 (イントロン) にイネ内在性レトロトランスポゾン *Tos17* の挿入が確認された株が存在していた。そこでこれらの *Tos17* 挿入変異株の種子を RGRC より入手し、ホモ接合体の培養細胞を分離した。得られた挿入変異株における各転写因子遺伝子の発現を RT-PCR を用いて調べたところ、*Ostga1* 変異体については *OsTGA1* の発現が全く認められず、*Oszip21* 変異体については *Oszip21* の発現抑制が観察された。これらの変異株における *OsKS4* の発現を qRT-PCR により、また、モミラクトン類の生産を LC-MS/MS により調べたところ、*Ostga1* 変異体において、*OsKS4* の発現及びモミラクトン類生産が顕著に抑制されていた (Fig.2 A,B)。このことより *OsTGA1* が *OsKS4* の発現を直接、もしくは間接的に制御していることが強く示唆された。

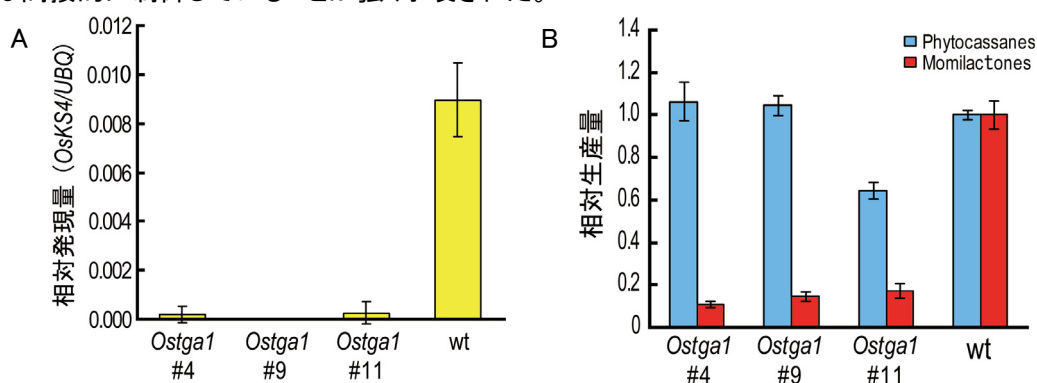


Fig.2 キチンエリシター処理した *Ostga1* 変異株における *OsKS4* の発現量 (qRT-PCR 解析) (A) とファイトアレキシン生産量 (B)

IV. OsTGA1 の特性解析

OsTGA1 を Green Fluorescent Protein (GFP) 融合タンパクとして発現させるコンストラクトをタマネギ表皮細胞にパーティクルガンによって導入したところ、主に核において蛍光が観察され、OsTGA1 が核局在性を示すことが明らかになった。また、酵母 GAL4 DNA-binding domain と OsTGA1 の融合タンパク質遺伝子を保持するエフェクタープラスミドと GAL4 シス配列下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を保持するレポータープラスミドを用いたレポーター・ジーンアッセイにより、OsTGA1 は植物体内でアクチベーターとして機能している可能性が高いことが示された。

さらに、OsTGA1 が *OsKS4* 遺伝子の発現を直接制御する転写因子として機能する可能性を検討する目的でゲルシフトアッセイを行った。N 末グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として発現させるために大腸菌発現用ベクター pDEST15 に *OsTGA1* ORF を挿入したプラスミドを構築した。宿主として Rossetta-gami (DE3) 株を用い、Overnight Express TB medium によって 30°C、no induction、16 時間の条件で培養を行った。菌体から得た可溶性画分から glutathione-sephadex を用いてアフィニティー精製を行った。得られた精製 GST-OsTGA1、及び probe として *OsKS4* 上流-1,224~-991bp の領域を用いたゲルシフトアッセイの結果、GST-OsTGA1 と probe との特異的結合が認められた。以上の結果は OsTGA1 が *OsKS4* の発現を直接制御する転写因子として機能することを強く示唆するものである。

V. *Ostga1* 変異体を用いたマイクロアレイ解析

OsTGA1 による *OsKS4* を含むキチンエリシター応答性遺伝子の発現に対する影響を網羅的に解析する目的で、キチンエリシター処理した *Ostga1* 変異株を用い、マイクロアレイ解析を行った。

WT と *Ostga1* 変異株のキチンエリシター処理後 6 時間における発現を比較したところ、WT においてキチンエリシター処理後 6 時間で発現が誘導される 1690 遺伝子のうち、228 遺伝子の発現が 1/2 以下に抑制されていた。興味深いことにこれらの遺伝子にはジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子、PR タンパク質遺伝子など多数の防御関連遺伝子が含まれていた。以上の事実は、OsTGA1 がファイトアレキシン生産を含む様々なイネの防御応答の制御において中心的な役割を担う重要な転写因子の一つであることを強く示唆している。今後、OsTGA1 を中心とする遺伝子ネットワークを解明することによりイネの防御応答の制御機構の一端が解明されるものと期待される。