

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻

平成 18 年度博士課程 進学

氏 名 大西孝幸

指導教員名 堤 伸浩

論文題目 イネ転写因子 OsNAC6 は生物学的および非生物学的ストレスを統合する

人口増加に伴うさらなる食糧需要の増大は、作物の供給量を上回り、深刻な食糧危機をもたらしている。今後は、作物栽培に向かない土地での作物生産が解決策の1つとして唱えられている。また、地球規模での環境汚染が深刻化している。環境汚染は、作物の収量に甚大な被害を与えている。環境劣化に対する植物の反応を理解し、汚染が作物に与える影響への認識を深め、その被害を抑制させるための対応策を探ることも必要である。植物のストレス応答を探求することは、農業生産の域を超え、広く医学・公衆衛生学などにも益するところが多い。植物が備えているストレス耐性機構に関する理解を深めること、そして、ストレス耐性植物の作出することを目的に本研究を行った。本研究では、モデル作物であるイネを用いて、ストレス応答性転写因子 OsNAC6 に着目し、イネのストレス応答の分子機構の解明を目指した。

OsNAC6 を含む NAC 遺伝子ファミリーは、*NAM*・*ATAF*・*CUC* 遺伝子に保存されている NAC ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインを N 末側にもつ植物特異的な転

写因子をコードする遺伝子ファミリーとして知られている。NAC 遺伝子は、植物特異的な転写因子でありながら、多数の遺伝子から構成される遺伝子ファミリーである。これまでに、NAC タンパク質として、シロイヌナズナで 105 種類、イネで 75 種類が報告されている。NAC タンパク質の特徴として、N 末端の領域は NAC ドメインを含みアミノ酸配列が保存されているのに対して、C 末端の領域のアミノ酸配列が多様化していることがある。NAC 遺伝子の担う機能は、多岐に及ぶものであることが知られている。

植物の受けるストレスは、大きく 2 種類に分類することができる。1 つは、非生物的ストレスで、環境ストレスと呼ばれる塩・乾燥・低温・高温などのストレスがこれに含まれる。もう 1 つは、生物的ストレスで、害虫・細菌・ウイルス・傷害などによるストレスが含まれる。植物のストレスシグナル伝達機構に関する研究結果から次のようなモデルが支持されている。ストレスセンサーと呼ばれる受容体が、シグナル伝達経路の発端に位置し、ストレスによる刺激を感知する機能を担っている。センサーによってストレス刺激が認識された後、その信号はリン脂質や Reactive Oxygen Species (ROS)・植物ホルモンのような低分子化合物といったシグナル伝達物質に形を変えて植物体全身に送られる。これらの物質を感知した各細胞内で MAPK や SnRK に代表されるリン酸化経路が活性化され、転写因子、その下流の遺伝子と順に伝達されることで、生物の自己防御システムや生存戦略が機能する。乾燥ストレスや塩ストレスなどの非生物的ストレス条件下では、植物体内で植物ホルモン ABA が蓄積し、ABA がシグナル伝達物質として植物の非生物的ストレス応答反応に重要な機能を担っている。また、生物的ストレスに対する植物のストレス応答としては、植物体内で植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) が合成され、シグナル伝達物質として機能することが知られている。

1. イネ転写因子 *OsNAC6* のストレス応答性

当研究室の菅原の実験結果から、*OsNAC6* が非生物的ストレス応答性を示すことがすでに明らかになっていた。本章では、*OsNAC6* と相同性の高い遺伝子が生物的ストレスに応答性を示すことから、*OsNAC6* の生物的ストレスに対する発現解析を行った。その結果、*OsNAC6* が生物的ストレスおよび非生物的ストレスに応答することが明らかとなった。また、タンパク質レベルでも同様のストレス応答性を示すことを確認した。*OsNAC6* のように ABA と JA という異種のストレスシグナル伝達物質に共通して応答性を示すような転写因子は、シロイヌナズナで *AtMYC2*・*AtMYB2*・*AtBOS1* の報告例があるのみで、イネでは初めての報告となった。シロ

イヌナズナの3つの遺伝子は、ABA 依存的ストレスシグナル伝達経路と JA 依存的ストレスシグナル伝達経路のクロストークに参与していることから *OsNAC6* もこれらのクロストークに参与している可能性があると考えた。

2. イネのストレス応答における *OsNAC6* の機能解析

OsNAC6 が生物的ストレスおよび非生物的ストレスに応答を示すことから、*OsNAC6* が両方のストレス応答に参与していることが示唆された。本章では、*OsNAC6* がさまざまなストレス応答経路においてどのような機能を担っているのかを明らかにする目的で、*OsNAC6* の発現量を変化させた形質転換イネを作成し、その解析を試みた。その結果、*OsNAC6* を過剰発現させることで、耐塩性が向上し、発現抑制によって耐塩性が低下した。このことから *OsNAC6* が塩ストレス耐性に対して重要な役割を担っていることが示唆された。また、マイクロアレイ解析によって、*OsNAC6* の発現量を増加させることによって生物的ストレス応答性遺伝子および非生物的ストレス応答性遺伝子の転写が活性化されていることが示唆された。これまでのシロイヌナズナの ATAF サブファミリー遺伝子の ATAF1, ATAF2 の研究結果と比較して、*OsNAC6* は、これらの遺伝子のもつ機能とは異なった機能を担っていることが明らかとなった。イネやシロイヌナズナでは、ABA 依存的ストレスシグナル伝達経路と JA 依存的ストレスシグナル伝達経路という2つの経路は、拮抗的に機能していることが報告されている。しかしながら、本研究結果は、転写因子 *OsNAC6* を介してこれらの経路が協調的に機能していることを示唆している。このことは、植物ストレス応答において初めての報告である。

3. *OsNAC6* プロモーターの解析

本章では、*OsNAC6* のプロモーター領域による器官ごと、およびストレス種ごとの遺伝子発現を解析する目的で、*OsNAC6* の発現を制御しているプロモーター領域と考えられる転写開始点より上流 940 (bp) の配列に注目して研究を行った。より詳細にプロモーター領域の機能を探るために、*OsNAC6* のプロモーター領域を5' 端より欠損させた長さの異なるプロモーター配列に *GUS* (β -グルクロニダーゼ) レポーター遺伝子を繋いだコンストラクトを作製した。これらを導入した形質転換イネの解析から、*OsNAC6* の傷害処理に対する応答は、傷口の周辺に限定された局所的なものであり、傷害処理に対する応答において主要な役割を果たしているシス領域が、*OsNAC6* プロモーターの -120 ~ 0 (bp) の領域に含まれていることが示唆された。さらに、*OsNAC6* の ABA 処理に対する応答において主要な役割を果たしているシス領域が、-940 ~ -210 (bp) の領域に含まれており、JA 処

理に対する応答において主要な役割を果たしているシス領域が、-210 ~ -120 (bp) の領域に含まれていることが示唆された。このことは、同じコンストラクトを導入したイネ培養細胞 (OC-cell) における実験結果からも確認できた。これらの結果は、傷害処理・ABA 処理・JA 処理によるストレスシグナルがそれぞれ異なった形式で OsNAC6 プロモーターに伝えられていることを意味し、それぞれのストレスシグナルが OsNAC6 に伝わるまでは独立していることを示唆している。各種ストレスシグナルを受信した OsNAC6 プロモーターは一様に OsNAC6 の転写を活性化することがわかっているため、独立していたストレスシグナル伝達経路が OsNAC6 の発現の活性化という形で統合されたと言える。

本研究を遂行する過程で *OsNAC6* を過剰発現させた形質転換イネにおいて耐乾性・耐塩性・耐病性が向上することが別のグループによって報告された。この結果は、OsNAC6 が生物学的および非生物学的ストレスに耐性を付与する経路で機能していることを示唆しており、本研究の結果と矛盾しない。本研究結果から、OsNAC6 の下流のストレスシグナル経路は、生物学的および非生物学的ストレスの両方に応答し、いずれの耐性にも寄与している可能性がある。このような経路の存在が明らかになればストレス耐性作物の作出に非常に有意義である。

植物は、自然界においてさまざまな種類の環境ストレスを複合的に受けているため、ストレス耐性機能の開発においても特定のストレスに限った耐性を改良しても大きな効果を期待できない場合も多い。非生物学的ストレスと生物学的ストレスの両方に耐性をもつ作物が作出できれば、作物栽培に不適な地域を緑地化することで環境問題が改善し、かつ、作付面積の拡大と収量増加を見込める。