

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 松倉 智子

本論文は第 1 章で、研究の背景および目的について述べた。DREB は植物の温度、乾燥、高塩濃度などのストレス応答性の転写因子であり、下流遺伝子のプロモーター領域に存在する DRE/CRT 配列に特異的に結合することでそれらの発現を制御し、植物のストレス耐性獲得に寄与する。シロイヌナズナにおいては *DREB2A* が乾燥・高温ストレス耐性獲得に関与することが報告されている。近年の環境悪化等を理由としてストレス耐性作物の開発は大きな課題となっており、そのために作物のストレス耐性獲得機構の解明が重要であると考えられる。そこで本研究では重要な作物であり単子葉植物のモデル植物でもあるイネにおいて *DREB2* 型の遺伝子群を網羅的に解析した。

第 2 章ではイネの *DREB2* 型遺伝子の同定および比較解析の結果を示した。イネゲノム配列のデータベース上でシロイヌナズナの *DREB2* と配列の相同性の高い遺伝子を探索した。分子系統解析の結果、*OsDREB2A/B/C/E*, *OsABI4* の 5 遺伝子を *OsDREB2* 遺伝子と定義した。ストレス条件下における各 *OsDREB2* の mRNA 蓄積量の変化を定量 RT-PCR 法によって調べたところ、*OsDREB2A* および *OsDREB2B* はストレス条件下における mRNA 蓄積量が多くなっていた。他の *OsDREB2* は非ストレス条件下での mRNA 蓄積量が少なく、顕著なストレス応答性も示さなかった。

次に、イネ由来のプロトプラストを用いた一過的発現系で細胞内局在と転写活性化能を調べた。その結果、*OsDREB2E* 以外は核に特異的に局在していることが示唆された。また転写活性化能は、酵母 GAL4 タンパク質の DNA 結合領域と結合配列を利用する系を用いた実験において *OsDREB2B* が他の *OsDREB2* と比較して特に高い転写活性化能を示した。以上の結果から、イネにおけるストレスに応答した遺伝子発現制御に *OsDREB2B* が重要な役割を担っていると考えられた。

第 3 章では *OsDREB2B* に着目し、そのスプライシング制御と植物体での機能についての解析結果を示した。*OsDREB2B* は 2 種類の転写産物を持ち、*OsDREB2B2* が、転写因子としての活性を持つタンパク質をコードしていた。*OsDREB2B1* は、フレームシフトにより転写因子をコードできないと考えられた。*OsDREB2B1* の mRNA は、非ストレス条件下での蓄積量が *OsDREB2B2* と比較して多いが、ストレス応答性はあまり高くなかった。通常条件下では *OsDREB2B1* を主に産生することで植物の生育にはほぼ影響を与えずに転写システムを活性化させておき、ストレス時にはスプライシングで *OsDREB2B2* を多く産生することでイネがより早くストレスに対処できるのではないかと考えられた。

一過的発現系の実験から、OsDREB2B2 が DRE 配列に依存した下流遺伝子の発現を活性化できること、全長配列で高い転写活性化能を持つことが示された。そこで *OsDREB2B2* を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナを作出したところ、これらの植物はシロイヌナズナの活性型 DREB2A を過剰発現させた植物と同様に生育の遅れなどの性質を示し、DREB2A 標的遺伝子の発現量が非ストレス条件下でも増加していた。また、対照区の植物体と比較して高い乾燥・高温耐性を示した。*OsDREB2B2* をストレス誘導性プロモーターの制御下で発現させた形質転換シロイヌナズナは対照区の植物体と比較して生育に差はなかったが、乾燥ストレス耐性は向上していた。

以上の結果より、OsDREB2B2 がシロイヌナズナ中において活性型 DREB2A と同様の機能を持ちうることを示された。しかし、*OsDREB2B2* の形質転換イネは形質転換シロイヌナズナのような顕著な形態変化を示さず、これまでのところ明確なストレス耐性の変化も見られていない。そのため、イネにおいては OsDREB2B2 が十分に活性を持つための特異的制御機構が存在する可能性が示唆された。

第 4 章では総合考察と今後の展望について述べた。本研究によって、イネの *DREB2* 型遺伝子群の全体像が明らかとなり、*OsDREB2B* がイネのストレス耐性獲得にとって重要な遺伝子であることが示唆された。今後 *OsDREB2B* を介したイネのストレス耐性獲得機構を明らかにすることで、環境ストレス耐性を持つ作物の分子育種に利用できると考えられる。

以上、本論文はイネの乾燥耐性の獲得機構で重要な機能を持つ *DREB2* 型転写因子の機能を明らかにするとともに、環境ストレス耐性を持つ作物の分子育種へ利用できることを示唆したもので、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。