

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 イメヌ ラジ

本研究は、トウモロコシの通気組織形成過程で特異的に発現する遺伝子の網羅的な解析を行うことで、通気組織形成の分子機構の一端を解明したものであり、次の3つの章から構成されている。

1. 湛水条件下および好気条件下におけるトウモロコシ幼植物体の成長および通気組織形成パターンの解析

トウモロコシ幼植物体の地上部と根の生育および通気組織形成パターンの解析を行うため、3日間好気条件下で生育させた幼植物体を、さらに湛水条件下または好気条件下で24時間生育させた。好気条件と比較して湛水条件では根の生育に明らかな遅延がみられた。一方、地上部の生育に違いは見られなかった。24時間の湛水処理の後に、根の様々な部位で通気組織形成パターンの解析を行った結果、基部から1.5-2 cmの部位で特に顕著な通気組織形成が観察されたことから、この部位を材料にして、遺伝子発現解析を行うことにした。

2. レーザーマイクロダイセクション法およびマイクロアレイ解析を用いた通気組織形成に関する遺伝子の同定

植物ホルモンのエチレンがトウモロコシの通気組織形成に関与することが知られている。そこで、3日間好気条件下で生育させたトウモロコシの幼植物体を1 ppmのエチレンで処理して、種子根における経時的な通気組織形成率の解析を行った。その結果、処理後6-12時間の間に通気組織形成が開始されることが明らかとなった。一方、好気条件下では24時間後まで通気組織形成は全く観察されなかった。湛水条件下では、処理後18-24時間の間に通気組織が形成されたが、エチレン受容阻害剤である1-methylcyclopropene (1-MCP; 1 ppm)で前処理した湛水条件下では24時間後まで通気組織は形成されなかった。これらの結果から、湛水処理による通気組織形成はエチレンを介して行われることが確認できた。

通気組織は根の皮層において形成されることから、好気条件と湛水条件、1-MCPの前処理後に湛水処理する条件と1-MCPの前処理をせずに湛水処理をする条件で12時間生育させた種子根の皮層を、レーザーマイクロダイセクション法によって単離して、マイクロアレイ解析を行った。その結果、42,034プローブのうち575遺伝子が2つの比較条件において共通して変動することが明らかとなった。それらのうち、239遺伝子は2条件で共通して発現上昇しており、336遺伝子は2条件で共通して発現減少していることが分かった。それらの遺伝子の中には、活性酸素種の発生・消去、細胞壁の弛緩・分解、Ca²⁺シグナリングに関与する遺伝子が含まれていた。

3. 半定量 RT-PCR 法によるマイクロアレイ解析結果の検証および組織特異的な遺伝子発現解析

第2章で行ったマイクロアレイ解析の結果から、発現上昇する遺伝子の中に、活性酸素種の発生に関与する NADPH oxidase 関連タンパク質 [Respiratory burst oxidase homolog (RBOH)] をコードする遺伝子が含まれていた。一方、発現減少した遺伝子の中には、活性酸素種の消去に関与する metallothionein (MT) をコードする遺伝子が含まれていた。さらに、これらの遺伝子の組織特異的な発現を解析するために湛水条件下または好気条件下で 12 時間生育させた種子根の皮層組織と中心柱をレーザーマイクロダイセクション法によって単離した。これらの組織を用いて、半定量 RT-PCR を行った結果、*RBOH* 遺伝子の発現は湛水条件下で誘導され、発現は中心柱と比較してわずかに皮層で高いことがわかった。一方、*MT* 遺伝子は好気条件下において両組織で構造的に発現しているのに対して、湛水条件下では皮層組織で特異的に発現が抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、通気組織形成過程においてはエチレンの下流のシグナルとして活性酸素種が重要な役割を担っていることが示唆された。そのことを確認するために、湛水条件下において NADPH oxidase の阻害剤である diphenyleneiodonium (DPI) 処理を行ったところ、通気組織形成が抑制された。

通気組織形成の最終的な段階では、細胞壁の弛緩・分解に関わる複数の酵素が関与することが知られている。本研究によって、発現上昇した遺伝子の中には、細胞壁の弛緩・分解に関与する xyloglucan endo-transglycosylase (XET)、cellulase (CEL)、polygalacturonase (PG) をコードするものが含まれていた。組織特異的な遺伝子発現解析の結果、*CEL* 遺伝子は湛水条件下において皮層組織で特異的に誘導されたが、*XET* 遺伝子は皮層組織と中心柱の両方で発現が誘導されることが明らかになった。また、 Ca^{2+} シグナリングに関わる calcineurin B-like (CBL)、calmodulin-like protein (CML) などの遺伝子が発現上昇していることが明らかになった。一方、cyclic nucleotide-gated ion channel (CNGC) をコードする遺伝子は湛水条件下において、皮層組織で特異的に抑制されていることが明らかとなった。

これらの結果より、本研究ではトウモロコシの種子根の通気組織形成過程において、活性酸素種の発生・消去、細胞壁の弛緩・分解、 Ca^{2+} シグナリングに関与する遺伝子などが、エチレンの制御下で皮層組織特異的に誘導または抑制されることを、世界に先駆けて発見することができた。これらの知見は、作物の耐湿性の付与に重要な通気組織の形成機構を解明するための基盤となることから、学術上価値が高いといえる。したがって、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があるものと認めた。