

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高崎 寛則

第一章では、背景と目的について述べた。環境ストレスは作物の生産性を制限する大きな要因の一つである。環境ストレス耐性作物の開発は、環境ストレスが問題となっている作物生産地域の農業に大きな利益をもたらすと考えられる。NAC型転写因子は植物特異的な転写因子であり、環境ストレス応答ではシロイヌナズナの乾燥応答性遺伝子の一つとして単離された *Respond to Dehydration 26 (RD26)* がコードするタンパク質が知られている。また、*RD26* は乾燥ストレス初期応答性遺伝子 *early responsive to dehydration stress 1 (ERD1)* の発現を制御する因子としても同定されている。*RD26* と相同性の高い環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子であるイネの *OsNAC6* や *SNAC1* を用いることで乾燥耐性イネを作出できることが明らかになっている。

本研究においては、新規のイネ環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子の作用機構を明らかにすること、さらにイネに乾燥耐性を付与することを目的として、イネ環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子遺伝子 *OsNAC5* について、その詳細な発現解析とタンパク質の機能解析を行った。一方、環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子の機能を詳細に解析するために、シロイヌナズナの *RD26* ファミリーに属する遺伝子群の T-DNA 挿入多重変異体の作製とその表現型解析を行った。

第三章はイネの環境ストレス誘導性 *OsNAC5* の発現解析とタンパク質の機能解析について述べた。イネにおいて環境ストレスで誘導される遺伝子を解析したところ、*SNAC1* や *OsNAC6* に加えて *OsNAC5* がストレス誘導性であることが明らかになった。転写活性化能の解析により、*OsNAC5* の C 末端に転写活性化領域が見出された。*OsNAC5*、*OsNAC6*、*SNAC1* の組換えタンパク質を用いて DNA 結合活性を解析したところ、NACRS を持つオリゴ DNA に結合したことから、これら 3 つの転写因子が直接 DNA (NACRS) に結合することが示唆された。また、*OsNAC5* の NAC ドメインを用いたプルダウンアッセイの解析により、*OsNAC5* と *OsNAC5*、*OsNAC6* あるいは *SNAC1* の NAC ドメインは相互作用することが示唆された。

第四章では環境ストレス誘導性 *OsNAC5* 過剰発現イネの解析について述べた。*OsNAC5* の植物体中での機能を明らかにするために *OsNAC5* をトウモロコシのユビキチンプロモーターによって過剰発現する遺伝子組換えイネを作出し、その生育ならびに環境ストレス耐性を評価した。*OsNAC6* 過剰発現イネは生育が遅延することが示されていることから、*OsNAC5* 過剰発現イネと *OsNAC6* 過剰発現イネの生育を比較したところ、*OsNAC6* 過剰発現イネは生育に遅延が見られたが、*OsNAC5* の過剰発現イネには生育の遅延が見られず、ベクターコントロールのイネと同様の

生育を示した。*OsNAC5*の過剰発現イネを用いて塩ストレス耐性試験、あるいは乾燥耐性試験を行った結果、*OsNAC5*の過剰発現イネはベクターコントロールと比較して高い生存率を示した。マイクロアレイによって遺伝子の発現を解析した結果、*OsLEA3*を含む数種の乾燥誘導性遺伝子が *OsNAC5* 過剰発現イネにおいて発現が増加していることが明らかになった。

第五章はシロイヌナズナの環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子の機能解析について述べた。環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子の機能を明らかにするために、変異体を用いて表現型を解析した。シロイヌナズナの環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子をコードする *RD26*を含むファミリー遺伝子の T-DNA 挿入変異体の多重変異体を作製した。*ANAC019*, *ANAC055*, *RD26*, *ATAF1*, *ATAF2*の五重変異体においても顕著な乾燥耐性の変化は見られなかった。しかし、ABAによる葉の老化に関して顕著に差が観察され、ABAによって誘導される葉の老化が、五重変異体において抑制されることを見出した。変異体においては ABA によるクロロフィルの減少が抑制され、老化のマーカー遺伝子である *SEN4*あるいは *ERD1*の発現も抑制されていた。

第六章は総括について述べた。今後は、*OsNAC5*過剰発現植物が、圃場レベルでの干ばつや塩害といった不良環境に耐えるか検証することが求められる。また、今後さらなる機能解析によって環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子による環境ストレス耐性獲得の制御機構や老化の詳細な制御機構が解明されることが期待される。

本論文は、シロイヌナズナやイネを材料として、乾燥ストレス下や ABA 処理時に誘導される植物の NAC 型転写因子に関して詳細な機能解析を行い、ストレス下における耐性の獲得や ABA 存在下における葉の老化におけるこれらの転写因子の役割を明らかにしたものである。また、これらの NAC 型転写因子の一つである *OsNAC5*を高発現することで、イネに高い乾燥耐性を付与することも明らかにしたことから、環境ストレス耐性作物の分子育種法の開発にも貢献するものと期待される。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。