

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮本 皓司

本研究は、イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン (momilactone や phytocassane を主要とする) の生産制御機構を明らかにすることを目的として、それらの生合成に関与することが示唆されているエリシター応答性 bZIP 型転写因子 OsTGAP1 の機能解析を行ったものである。

本研究の背景と目的を述べた第 1 章に続き、第 2 章においては、エリシター処理した OsTGAP1 過剰発現株培養細胞におけるファイトアレキシンの定量分析やトランスクリプトーム解析を行い、OsTGAP1 が、それぞれクラスターを形成している momilactone 生合成酵素遺伝子や phytocassane 生合成酵素遺伝子、及びそれらの上流の生合成段階である methylerythritol phosphate (MEP) 経路遺伝子の転写制御にも関与していることを示した。このことから、OsTGAP1 がイネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン生合成全体を制御するマスター転写因子として機能することが明らかになった。また、OsTGAP1 過剰発現株培養細胞においては、エリシター処理によりファイトアレキシン生産が劇的に増大することも示した。

第 3 章においては抗 OsTGAP1 抗体を用いて ChIP-seq 解析を行い、イネゲノム中における OsTGAP1 の結合領域の網羅的同定を行った。ChIP-seq 解析およびその後の ChIP-PCR の結果から、MEP 経路遺伝子については、その初発酵素遺伝子である *OsDXS3* のみがある上流域に OsTGAP1 結合サイトを有することが示された。さらに、momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターにおいては、*OsKSL4*, *OsCPS4*, *CYP99A2* の上流域に OsTGAP1 の結合が見出されたものの、*CYP99A3*, *OsMAS* の上流域には OsTGAP1 の結合サイトは認められなかった。また、クラスター領域の外側において、OsTGAP1 の強い結合が認められた。Phytocassane 生合成酵素遺伝子クラスターにおいても、それぞれの生合成酵素遺伝子の上流域に OsTGAP1 の結合は見出されず、遺伝子間領域やクラスター領域の外側において OsTGAP1 の結合が見出された。これらのことから、OsTGAP1 はジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の上流域それぞれに結合して転写制御を行っているのではなく、クラスターレベルの制御機構が存在することが示唆された。また、第 2 章で行ったトランスクリプトーム解析の結果を考えあわせることにより、OsTGAP1 標的候補遺伝子の同定も行った。

第 4 章においては、OsTGAP1 と相互作用するタンパク質の探索を行い、その結果、10 種の候補遺伝子を得た。本論文では、これらのうち、ヒストン修飾に関与すると考えられる ENT-domain containing protein をコードする遺伝子 *TIF1* に注目した。まず、TIF1 と OsTGAP1 との相互作用を pull-down assay により確認した。さらに、各種ヒストン抗体を用いた ChIP-PCR を行うことにより、少なくとも *OsKSL4*, *OsCPS4* の翻訳開始点付近の領域においてもヒストン H3 の K9/14 のアセチル化およびヒストン H3 の K4 のトリメチル化が誘導されることが明らかになった。*CYP99A2*, *CYP99A3*, *OsMAS* については、翻訳開始点付近の領域においてヒストン H3 の K4 のトリメチル化が誘導された。一方、*OsDXS3* についても、転写開始点付近の領域において、エリシター処理によるヒストン H3 の K4 のトリメチル化の誘導が認められ

た。これらのことから、*OsKSL4*, *OsCPS4*の転写制御にヒストン H3 の K9/14 のアセチル化およびヒストン H3 の K4 のトリメチル化が、*CYP99A2*, *CYP99A3*, *OsMAS*, *OsDXS3*の転写制御にヒストン H3 の K4 のトリメチル化が関与していることが示唆された。そして、以上の知見から、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子クラスターの転写制御機構として、*OsTGAP1* および *TIF1* が遺伝子クラスター領域に結合し、ヒストン修飾が変化し、その結果クロマチン構造が緩み、クラスター内の遺伝子の転写が誘導されるという仮説を提唱した。

以上、本研究は、*OsTGAP1* がイネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン生合成を制御するマスター転写因子として機能することを示すとともに、*OsTGAP1* が有する、クラスタースケールでの特異なファイトアレキシン生合成遺伝子転写活性化機構の解明に貢献する重要な知見を提供するもので、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。