［別紙２］

論文審査の結果の要旨

申請者氏名　板井　玲子

イネ科植物は土壌中の鉄を吸収するために、三価鉄キレーターであるムギネ酸類を合成する。鉄欠乏条件下のイネ科植物の根ではムギネ酸類の合成活性が上昇し、その活性化は転写レベルから起こっている。鉄の吸収や移行に関与する多くのタンパク質は鉄欠乏によって発現誘導される。本研究は、イネ科作物で鉄欠乏により発現上昇する遺伝子の機能解明とその鉄欠乏誘導性遺伝子の発現制御機構の解明を目指して行われたもので、論文は５章からなる。

第１章の序文に続き、第２章では、鉄欠乏誘導性遺伝子の１つについて鉄欠乏における機能を同定した。鉄十分区と鉄欠乏区のオオムギの根のタンパク質を二次元電気泳動により分離すると、鉄欠乏区でのみ出現するスポットがいくつか見出された。そのうちのひとつ、C スポットタンパク質から部分アミノ酸配列を決定し、その部分配列を基にオオムギの cDNA ライブラリから遺伝子全長を単離した。C スポットタンパク質は、アデニンを AMP へ変換するアデニン・リボースリン酸基転移酵素（APRT）であった。その遺伝子発現は、鉄欠乏により根で強く誘導された。また、鉄欠乏のオオムギの根では、APRT の酵素活性が鉄十分区に比べて 6.8 倍に上昇していた。鉄欠乏根での APRT 活性の上昇は、他のイネ科作物（イネ、トウモロコシ、ライムギ）でも確認されたが、双子葉植物であるタバコでは確認されなかった。イネ科植物は鉄欠乏になると多量のムギネ酸類を根で合成し、その時、原料であるメチオニンはメチオニン回路から供給される。メチオニン回路からは必ずアデニンの放出が起こる。メチオニン回路の機能を維持するために、鉄欠乏のイネ科植物の根では、細胞質中のフリーのアデニンを回収する APRT 活性が上昇すると考えられた。

第３章では、鉄欠乏のごく初期における遺伝子応答を解析した。鉄欠乏が進行した植物体では数百の遺伝子が発現誘導されることがイネやオオムギで報告されてきたが、鉄欠乏初期での遺伝子発現の変動は未解明だった。そこで、鉄欠乏処理後 3，6，9，12，24，36 時間という鉄欠乏初期のイネの根を用いてマイクロアレイ解析を行った。鉄欠乏区とコントロール区での発現比が約２を越えた時点を発現上昇とすると、6 時点のいずれかで発現上昇した遺伝子は 1068 あった。これらの発現上昇パターンは非常に多様だった。つまり、鉄欠乏の初期といえども遺伝子の発現誘導にいたるシグナルには多くの経路があると考えられた。ムギネ酸類に関与する遺伝子群の発現上昇は、24 時間目と 36 時間目に起きた。ムギネ酸類生合成酵素遺伝子群に加え、ムギネ酸類分泌トランスポーターTOM1、三価鉄―ムギネ酸類複合体吸収トランスポーターOsYSL15 の遺伝子

は、6時点すべてで発現比の移り変わりがよく似ていた。さらに、メチオニン回路およびその周辺反応の酵素遺伝子群も、ムギネ酸類生合成酵素遺伝子と同じ発現パターンを示した。このような同調的な遺伝子発現は、発現を制御する転写因子やシス配列の組み合わせがよく似ているために起こると考えられた。

第4章では、鉄欠乏誘導性発現を制御する転写因子を単離した。高等植物で鉄欠乏誘導性の遺伝子発現を付与するシス因子として、鉄欠乏応答性シスエレメントIDE1とIDE2がオオムギの鉄欠乏誘導性遺伝子 IDS2 のプロモーター領域から同定されている。Yeast one-hybrid 法によりIDE2-IDE1 連続配列に結合するタンパク質をスクリーニングした。単離されたクローンは新規NAC 型タンパク質をコードしており、IDE-binding factor 2 (IDEF2) と名付けられた。ゲルシフト解析により、IDEF2 は 27 塩基ある IDE2 配列中の"CAAGTTT"への結合が確認された。IDEF2の遺伝子発現は鉄欠乏誘導を受けず、根でも葉でも恒常的であった。IDEF2は細胞内で核に局在し、酵母実験により転写活性も確認されたので、転写アクチベーターであると考えられた。IDEF2の遺伝子発現を抑制したRNAiイネでは、鉄欠乏誘導性遺伝子が多く抑制されており、特に、鉄(II)－ニコチアナミントランスポーター遺伝子であるOsYSL2の発現抑制が顕著であった。IDEF2の転写活性能を阻害したCRES-Tイネでも、OsYSL2の抑制が確認された。また、RNAiイネとCRES-Tイネでは体内の鉄濃度が変化していた。IDEF2は鉄欠乏に応答した遺伝子制御ネットワークの上位に位置する転写活性因子として、イネの鉄ホメオスタシスに重要であると考えられた。

第５章では、イネの鉄欠乏誘導性遺伝子の発現制御について得られた知見をまとめ、鉄欠乏耐性植物創製への今後の展望と総合的な総括を述べている。

以上、本研究はイネ科作物で鉄欠乏により発現上昇する遺伝子の機能解明と、鉄欠乏誘導性遺伝子の発現制御機構の解明を目指して行われた。その結果、鉄欠乏誘導性遺伝子の１つについて鉄欠乏における機能を同定し、鉄欠乏のごく初期における遺伝子応答を解析し、鉄欠乏誘導性発現を制御する転写因子を単離して、鉄欠乏誘導性遺伝子の発現制御の解明を進めたものであり、学術上、応用上、貢献することが少なくない。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があるものと認めた。