

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 25 年度博士課程進学  
氏 名 小川 哲史  
指導教員名 野尻 秀昭

### 論文題目

イネのフラボノイド型ファイトアレキシンの生産制御機構の解明

植物は病原菌の感染を受けると、ジャスモン酸 (JA) などの二次シグナル物質を介したシグナル伝達を誘導し、最終的に抗菌性化合物であるファイトアレキシンの生産など様々な抵抗性反応を誘導する。イネにおいては 16 種類のジテルペン型化合物および 1 種類のフラボノイド型化合物がファイトアレキシンとして同定されているが、そのうちフラボノイド型のサクラネチンは抗菌活性の高さやイネいもち病菌感染時の蓄積量の多さから主要なファイトアレキシンの一つとされている。サクラネチン生産はその誘導に JA を要求する防御応答であり、主要なジテルペン型ファイトアレキシンの生産が JA 要求性、非要求性いずれのシグナルでも誘導されることと対照的である。本研究では、JA 要求性防御応答のモデルケースと考えられるサクラネチンの生産誘導に着目した。

サクラネチン合成の最終ステップでは、前駆体であるナリンゲニンが naringenin 7-O-methyltransferase (NOMT) によってサクラネチンに変換される。当研究室の先行研究において NOMT をコードする遺伝子 *OsNOMT* が同定された。その後の研究において、*OsNOMT* の発現が抑制されるとイネ葉身における JA 誘

導的なサクラネチン蓄積量が顕著に減少することから、*OsNOMT* がサクラネチン生産における必須遺伝子であることが示された。また、*OsNOMT* の発現もサクラネチン生合成と同様に JA 要求性をもって誘導されることが示されていたが、*OsNOMT* 発現機構の詳細については未解明であった。そこで本研究では、JA 要求性を示すサクラネチン生産の制御機構の解明を目的とし、特に *OsNOMT* の発現制御機構の詳細な解析を行うこととした。

### ジャスモン酸 (JA) 要求性をもつサクラネチン生合成を制御する転写因子の機能解析<sup>1)</sup>

ファイトアレキシンの生産を含む植物の防御応答は、種々の転写因子によって厳密に制御されている。イネにおいて、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産およびそれらの生合成遺伝子の発現を制御する転写因子は研究が進んでいる一方、サクラネチン生産や *OsNOMT* 発現に関与する転写因子はほぼ知られていなかった。先述の通りサクラネチン生産や *OsNOMT* 発現は JA 要求性であることから、その制御に関わる転写因子の発現も JA 要求性の誘導を示すと予想し、JA 生合成変異株を用いたトランスクリプトーム解析により JA 要求性の発現誘導を示す転写因子の選抜を行った。その結果、JA シグナルを正に制御する bHLH 型転写因子 *OsMYC2*、*OsMYC2* と相同性の高い *OsMYC2*-like protein 1 (*OsMYL1*)、およびフラボノイド生合成遺伝子の発現を誘導することが報告されている MYB 型転写因子などが選抜された。これらの転写因子について、*OsNOMT* の転写開始点上流域に対する影響を調べたところ、*OsMYC2* が *OsNOMT* のプロモーター活性を顕著に上昇させた。そこで、*OsMYC2* による *OsNOMT* のプロモーター領域の活性化に必要なシス配列を調べるために、*OsNOMT* 転写開始点上流域においてデリーションアッセイによりプロモーター領域の絞り込みを行ったが、*OsMYC2* により活性化される領域の同定には至らなかった。次に *OsMYC2* の発現抑制株の解析を進めたところ、JA 誘導的な *OsNOMT* 発現およびサクラネチン蓄積、さらに前駆体であるナリングニンの蓄積が抑制された。また、*OsMYC2* 過剰発現株の解析を進めたところ、JA 誘導的なサクラネチン蓄積量は一部の系統で増加傾向を示すものの、*OsNOMT* の JA 誘導性発現に対する影響は認められなかった。以上の結果から、*OsNOMT* の発現およびサクラネチンの生産は *OsMYC2* の制御下で起こっていることが示された。

*OsMYC2* などの bHLH 型転写因子は、MYB 型転写因子や bHLH 型転写因子と相互作用して機能変化するという報告があるため、上述のトランスクリプトームで選抜した *OsMYC2* 以外の転写因子をエフェクターとし、*OsMYC2* と共導入して *OsNOMT* のプロモーター活性に対する影響を解析した。その結果、*OsMYC2* による *OsNOMT* のプロモーター活性の上昇が *OsMYL1* により相乗的に亢進されることが示された。また、JA により誘導はされないものの *OsMYL1* と相同性の高い *OsMYL2* について同様の解析をした結果、*OsMYL1* と同様に *OsNOMT* のプロモーター活性の上昇が認められた。さらに *OsMYC2*、*OsMYL1*、*OsMYL2* についてタンパク質間相互作用を解析したところ、*OsMYC2* が *OsMYL1* および *OsMYL2* と物理的に相互作用することが示された。この相互作用による *OsMYC2* の転写機能の変化に着目して解析を行ったところ、*OsMYC2* が有する転写活性化能が *OsMYL1* および *OsMYL2* との相互作用により増強されることが明らかになった。

以上より、OsMYC2はOsMYL1およびOsMYL2と相互作用することで活性化し、OsNOMTの発現をJA誘導的に上昇させることで、サクラネチンの生産を促進していることが示唆された。本研究では、OsMYL1とOsMYL2は同様の機能を示したが、これらにはJAによる発現誘導の有無において明確な差が存在する。また、OsMYC2の発現抑制株を用いたRNA-Seq解析の結果より、OsMYL1の発現がOsMYC2依存的に誘導されることも示された。したがって、植物体内においてOsMYC2-OsMYL1複合体とOsMYC2-OsMYL2複合体を状況により使い分けていることが考えられ、OsNOMTの発現制御機構の解明においてこの使い分けを解析することが必要であると考えられる。

### サクラネチン合成酵素遺伝子を直接制御する転写因子の同定と機能解析

OsNOMTのプロモーターに結合し、発現を直接制御する転写因子を同定するため、yeast one-hybrid screeningによる探索を試みた。先述の通り、OsNOMTの転写活性化に重要な領域を絞り込むことができなかったため、標的配列には最大限広い範囲であるOsNOMT転写開始点上流1 kbの領域を用いた。ライブラリーとして、イネ転写因子をコードするcDNAのみが含まれるライブラリーを用いた。Screeningの結果、OsNOMTのプロモーターに結合し発現を制御する候補として8個の転写因子を得た。その中には、既に解析済みのOsMYC2をはじめ、NACファミリーに属し鉄欠乏応答に関与するIron deficiency-responsive cis-acting element binding factor (IDEF)であるOsIDEF2などが含まれていた。OsMYC2以外の7個の転写因子について、OsNOMTの転写開始点上流域に対する影響を調べたところ、OsIDEF2がOsNOMTのプロモーター活性を上昇させたが、OsMYC2のような顕著な影響は見られなかった。また、他の転写因子はOsNOMTのプロモーター活性に影響しなかった。ここで、OsMYL1やOsMYL2のように、単独では影響がみられないものの他の因子と相互作用することにより影響が見られるものがあるのではないかと予想し、OsMYC2と共導入してOsNOMTのプロモーター活性に対する影響を解析した。その結果、OsMYC2とOsIDEF2を共導入すると、それぞれ単独で導入した場合よりも強くOsNOMTのプロモーター活性を上昇させたため、OsMYC2とOsIDEF2が相乗的にOsNOMTの発現を上昇させていることが示された。OsMYC2などのbHLH型転写因子については、OsIDEF2などのNAC型転写因子と相互作用する例は報告がないため、OsMYL1やOsMYL2と異なり、OsIDEF2はタンパク質間相互作用以外の形でOsMYC2と協調的に作用し、OsNOMTのプロモーター活性を亢進している可能性も考えられる。今後、OsMYC2とOsIDEF2のタンパク質間相互作用を解析し、上記の仮説を検証していくことが急務である。

またOsIDEF2については、過剰発現株およびChimeric repressor silencing technology (CRES-T法)により機能が抑制される株の解析を試みたが、用いたいずれの株においても過剰発現が確認されなかった。今後、OsIDEF2の過剰発現および機能抑制が行われている株の再作出、選抜を行い、OsIDEF2がOsNOMT制御に果たす役割を詳細に解明することが必要であると考えられる。

## 総括と展望

本研究では、サクラネチンの生合成遺伝子 *OsNOMT* の発現制御機構の解明を目的として研究を行い、*OsMYC2* が *OsMYL1* および *OsMYL2* と相互作用しながら JA 要求性の *OsNOMT* 発現を誘導していることを示した。また、*OsNOMT* プロモーターに結合し発現を直接制御する転写因子として *OsIDEF2* を選抜し、*OsIDEF2* が *OsMYC2* と協調的に *OsNOMT* プロモーターを活性化していることを示した。すなわち、このような転写因子の機能によって、サクラネチンの生産誘導が制御されていることを示唆した。今後は、*OsNOMT* 転写開始点上流域に存在する *OsIDEF2* や *OsMYC2* の結合領域を同定し、タンパク質の DNA 結合能の解析、また当該領域にタンパク質が結合できなくなった場合の *OsNOMT* プロモーター活性に及ぶ影響の解析が必要であると考えられる。*OsMYC2* の場合、デリーションアッセイの結果から *OsMYC2* が直接プロモーター領域に結合することなく *OsNOMT* の転写を制御していることが考えられる。DNA への直接的な結合なしに遺伝子制御を行う転写因子について、*OsMYC2* と同じく MYC タンパク質に分類される Myc 転写因子がヒストン修飾によるエピジェネティック制御を介して遺伝子の発現制御を行っていることが報告されている。したがって、*OsMYC2* および *OsMYL1*、*OsMYL2* との複合体もエピジェネティックな遺伝子制御を行っている可能性が考えられるため、ヒストン修飾解析やクロマチンの構造解析などエピジェネティクス解析を行う必要があると考えられる。

*OsMYC2* の発現抑制株および過剰発現株を用いた解析より、サクラネチンの生合成経路のうちナリンゲニンよりも上流に位置する経路は、*OsNOMT* の発現制御よりも強く *OsMYC2* に依存することが示唆された。さらに、*OsMYC2* の発現抑制株を用いた RNA-Seq 解析の結果、少なくともナリンゲニン生合成経路の下流で機能する酵素の遺伝子発現は *OsMYC2* 依存的に JA シグナルで誘導されることが示され、*OsMYC2* がナリンゲニン生産を正に制御していることが示唆された。今後ナリンゲニン生合成経路の上流に位置する生合成遺伝子の発現などに関する情報を得ることで、*OsNOMT* 発現を含めた JA シグナル誘導的なサクラネチン生産制御機構の詳細が明らかになると考えられる。

本研究で得られた知見をもとに、今後サクラネチンを多量蓄積し強い病害抵抗性を示すイネやその他の作物を作出すること、またサクラネチン生産以外の JA 要求性防御応答の分子メカニズムの解明がなされることが期待される。

## 参考文献

- 1) [Ogawa S, Miyamoto K, Nemoto K, Sawasaki T, Yamane H, Nojiri H, and Okada K.](#) *OsMYC2*, an essential factor for JA-inductive sakuranetin production in rice, interacts with MYC2-like proteins that enhance its transactivation ability. *Sci. Rep.* In press.