

## 審査の結果の要旨

氏名 吉田 悠里

ファイトアレキシンは、植物が病原体などの感染を受けると生産される抗菌性の二次代謝化合物であり、イネにおいては *momilactone* および *phytocassane* が主要なジテルペン型ファイトアレキシン (DP) として知られている。これらの生合成遺伝子はイネ染色体上においてそれぞれ遺伝子クラスターを形成し、いもち菌感染や重金属ストレスなどに応答して、一過的かつ同調的な発現誘導を示す。その際、抵抗性反応を司る植物ホルモンの一種であるジャスモン酸 (JA) が、シグナル伝達物質として機能することが示唆されていた。また、この DP 生合成遺伝子群の同調的な制御を担う転写因子として、キチンエリシター応答性 bZIP 型転写因子 *OsTGAP1* がイネ培養細胞から単離・同定されていた。しかし、植物体における *OsTGAP1* の生理機能や組織特異的あるいは誘導時特異的な制御の実態は未解明であった。本論文は、イネ植物体の JA 誘導性の DP 生産における *OsTGAP1* の機能を明らかにすることを目的として、特に *OsTGAP1* の発現が強い根に着目し、*OsTGAP1* とその相互作用因子による影響を、植物細胞内での転写レベル及び DNA 結合能の評価をもとに追究したものである。

本論文で行った研究の背景と目的を述べた第 1 章に続き、第 2 章では、まずイネ植物体において *OsTGAP1* が根で高い発現を維持し、根特異的に JA に依存した発現誘導を受けることを示した後、*ostgap1-tos17* 挿入変異体および *OsTGAP1* 過剰発現体の解析から、根における JA 誘導性の DP 生産量と関連生合成遺伝子 (*OsDXS3*、*OsKSL4*、*OsKSL7*) の発現が *OsTGAP1* に依存していることを明らかにしている。また、*OsDXS3* および *OsKSL4* プロモーターに対するレポーター遺伝子アッセイにより、*OsTGAP1* がイネの根での DP 生産において、*OsDXS3* および *OsKSL4* の転写を直接制御することで、特に *momilactone* の生産に強い影響力をもつことを示している。さらに、根における JA 処理有無の条件下での *OsTGAP1* の *OsKSL4* プロモーターに対する結合を、*OsTGAP1* 特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)-PCR アッセイによって解析し、*OsTGAP1* が JA 処理の有無に関わらず *OsKSL4* プロモーター領域に恒常的に結合していることを見いだしている。これらの結果と、野生型株において JA 処理により *OsKSL4* の発現が顕著に誘導されることを考え合わせることで、クラスター遺伝子の発現誘導には *OsTGAP1* の結合以外に *OsTGAP1* の翻訳後修飾や *OsTGAP1* と相互作用するタンパク質などの他の因子の関与が重要であるとの結論を得ている。

第3章では、OsTGAP1による根での momilactone 生産制御の生理的意義を追究するため、競合植物であるイヌビエとの混植実験によるアレロパシー活性試験を行い、イネの根において momilactone 生産を制御する OsTGAP1 が、イネのアレロパシー活性発現に必要であることを示している。さらに、根における OsTGAP1 の機能をより広範に調べるため、JA 未処理時もしくは処理 24 時間における *ostgap1-tos17* 挿入変異体と野生型株の根を用いた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い、OsTGAP1 が未解析の WRKY 型、ERF 型、bHLH 型の転写因子の発現や、シトクロム P450 酸化酵素、フェニルアラニン合成に関与する酵素などの二次代謝産物合成で働く遺伝子の発現に関与している可能性を見出している。

第4章では、OsTGAP1による DP 生合成遺伝子のクラスターレベルでの転写制御メカニズムを明らかにするため、OsTGAP1 の相互作用因子との協調作用を検討している。先行研究で yeast two-hybrid 法を用いて OsTGAP1 の相互作用因子 (OsTGAP1-Interacting Factor: OsTIF) として取得されていた遺伝子である OsTIF1 (ENT-domain タンパク質)、OsTIF3 (serine/threonine kinase)、OsTIF4 (Kinesin heavy chain) を解析対象として、BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) 法により植物細胞内での OsTGAP1 と各 OsTIF との相互作用を確認している。次に、OsTIF 単独もしくは OsTGAP1 との共導入において DP 生合成遺伝子のプロモーター活性に対する影響を解析し、全ての OsTIF が単独で *OsDXS3* および *OsKSL4* プロモーターにおけるレポーター活性を上昇させることを示している。また、OsTIF と OsTGAP1 との共導入により、*OsDXS3* および *OsKSL4* プロモーターに対する OsTGAP1 の転写活性が変化することを示したが、同時に、この OsTIF による転写活性への影響が、少なくとも *OsKSL4* 遺伝子プロモーターへの OsTGAP1 の結合性の変化に起因するものではないことも、ChIP-PCR により明らかにしている。これらのことから OsTIF と OsTGAP1 の相互作用による DP 生産制御においては、OsTGAP1 の結合性以外の要因の存在が重要であるとの結論を導き出している。

続く第5章において、2章から研究の総括と、今後の展望・課題について議論を行っている。

以上、本論文は、イネの根における JA 誘導的な DP 生合成において、OsTGAP1 が momilactone 生合成に関わる *OsDXS3* および *OsKSL4* 遺伝子のプロモーター領域に直接結合し制御する実態を明らかにし、さらに相互作用因子との協調的な作用による新たな転写活性制御のモデル構築を行ったものであり、これらの研究成果は、学術上、応用上寄与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。