

## 論文内容の要旨

申請者氏名 澤 田 和 敏

本論文は、イネいもち病菌から単離されたエリシター、セレブロシドの処理により、転写が活性化される遺伝子のうち機能未知のセレンウム結合タンパク質遺伝子のホモログ、*OsSBP* (*Oryza sativa selenium binding protein*) の機能解明と耐病性植物の育種への応用について述べたものである。SBP は細菌、線虫、昆虫、動物、植物から相同遺伝子が報告されており、耐病性、ストレス応答、微生物応答等の広く生物種に保存された重要な機能を有する遺伝子であると考えられた。そこで *OsSBP* を恒常発現させた形質転換イネを作成し、イネいもち病菌およびイネ白葉枯病菌に対する耐病性検定を行い病害抵抗性との関連を調べた。その結果、過剰発現体に親和性いもち病菌を接種した場合、野生型に比べ有意な病徴進展の抑制がみられた。また親和性イネ白葉枯病菌の接種においても過剰発現体は野生型に比べ有意に病徴進展を抑制し、葉中の白葉枯病菌増殖抑制もみられ、*OsSBP* がイネいもち病菌だけでなく、より広範囲にイネの病害抵抗性に寄与することが示された。

*OsSBP* の機能を推定するため、イネいもち病菌親和性レース接種後のファイトアレキシン (モミラクトン A) の蓄積を調べたところ、過剰発現体は野生型の 20-25 倍蓄積していた。また防御遺伝子である *PBZ1* および *PR1* の 2 つの PR 遺伝子もいもち病菌接種に反応して野生型よりも早く転写活性化がおり、転写量も増大していた。NADPH オキシダーゼにより生成される活性酸素種が PR 遺伝子の発現やファイトアレキシン生成を活性化することから、培養細胞系を用い NADPH オキシダーゼ脱リン酸化阻害剤のカリクリン A (CA) 添加時に培地中に放出される過酸化水素を調べたところ、過剰発現体は野生型に比べ有意な過酸化水素量の増大がみられた。このことから *OsSBP* 過剰発現体でみられたいもち病菌接種時のファイトアレキシン生成促進や PR 遺伝子の転写活性化は活性酸素種量の増大に起因するものと結論した。植物は病原菌の感染により活性酸素種の生成と並行して活性酸素種を消去する抗酸化酵素の活性を一時的に低下させる。そこで、主要な活性酸素種消去酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) とカタラーゼ (CAT) の酵素活性を測定した結果、過剰発現体においては CA 処理後の両酵素活性は野生型に比べ有意に低下しており、過剰発現体の APX および CAT の酵素活性は CA 処理前後でほとんど差がないことが明らかになった。

*OsSBP* がイネ以外の植物でも同様の機能を示すか調べるため、*OsSBP* 形質転換サツマイモを作成し、重要病害の黒斑病菌に対する耐病性検定を行った。その結果、*OsSBP* を過剰発現した複数の系統は野生型に比べ病徴進展の遅延を示した。また過剰発現体の CAT 遺伝子の転写量は野生型に比べ低下していることが明らかとなり、*OsSBP* はイネ以外の植物でも抗酸化酵素活性の抑制を通じ耐病性向上に関与することが示唆された。

以上の成果は、*OsSBP* が広範囲の植物に病害抵抗性を付与し、植物の生産性向上に極めて有用な遺伝子であることを示している。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 澤 田 和 敏

植物の耐病性の研究は、基礎・応用の両面に重要であり、多くの耐病性に関与する遺伝子がこれまで単離されてきた。本論文は、イネいもち病菌から単離されたエリシター、セレブロシドの処理により、転写が活性化される機能未知のセレンウム結合タンパク質遺伝子のホモログ、*OsSBP* (*Oryza sativa* selenium binding protein) を単離し、その機能解析と耐病性植物の育種への応用について述べている。SBP は生物界に広く存在し、耐病性、ストレス応答、微生物応答等に重要な機能を有する遺伝子であると考えられているが、その詳細は不明であった。そこで *OsSBP* を恒常発現する形質転換イネを作成し、その表現型を解析している。*OsSBP* 過剰発現イネにいもち病菌または白葉枯病菌を接種した場合、野生型に比べ、いずれも有意な病徴進展が抑制されること、そして、白葉枯病菌では葉中の菌の増殖を抑えることを明らかにし、*OsSBP* がイネの重篤な病原菌の病害に抵抗性を与えることを示している。

次に *OsSBP* の機能を推定するための幾つかの実験を行っている。イネの *OsSBP* 過剰発現体は、いもち病菌の接種後にファイトアレキシン (モミラクトン A) 蓄積量が野生型の 20-25 倍になること、防御遺伝子である *PBZ1* および *PRI* もいもち病菌接種に反応して野生型よりも早く転写量が増大することを示している。NADPH オキシダーゼにより生成する活性酸素種が防御遺伝子の発現やファイトアレキシン生成を活性化することから、過剰発現体イネから培養細胞を誘導し、これに NADPH オキシダーゼ脱リン酸化阻害剤のカリクリン A (CA) 添加し、培地中に放出される過酸化水素を調べている。その結果、過剰発現細胞は野生型細胞に比べ有意な過酸化水素量が増大することを観察した。このことから *OsSBP* 過剰発現体でのいもち病菌接種時のファイトアレキシン生成促進や防御遺伝子の転写活性化は活性酸素種の増大に起因すると結論している。植物は病原菌の感染により活性酸素種を消去する抗酸化酵素の活性を一時的に低下させる。そこで、主要な活性酸素種消去酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) とカタラーゼ (CAT) の酵素活性を測定した結果、過剰発現体においては両酵素活性は野生型に比べ有意に低下していた。

*OsSBP* がイネ以外の植物でも同様の機能を示すか調べるため、*OsSBP* 形質転換サツマイモを作成し、重要病害の黒斑病菌に対する耐病性検定を行っている。*OsSBP* を過剰発現したサツマイモ高系 4 号の形質転換体は野生型に比べ病徴進展が遅延すること、また過剰発現体の CAT 遺伝子の転写量は野生型に比べ低下していることを明らかにし、*OsSBP* がイネ以外の植物でも抗酸化酵素活性の抑制を通じ耐病性向上に寄与することを示唆している。

以上、*OsSBP* を導入し、過剰発現した植物を用いて *OsSBP* の機能を詳細に解析し、また、*OsSBP*

がイネ、サツマイモに病害抵抗性を付与し、植物の生産性向上に極めて有用な遺伝子であることを示している。

以上のように、本論文はイネで発見したセレンウム結合タンパク質遺伝子の機能を明らかにし、耐病性植物の分子育種に利用できることを形質転換イネとサツマイモで証明したもので、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（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。