

論文内容の要旨

申請者氏名 Dang Thi Thu

植物においても、相同組換えを利用した遺伝子改変が活発化している。特に、ポジティブネガティブ選抜を利用した遺伝子組換えは、目的の遺伝子を自由に改変することが可能であり注目されている。植物の免疫には、膜貫通型のパターン認識レセプターを介した PAMP-triggered immunity と、細胞内レセプターである抵抗性タンパク質を介した Effector-triggered immunity の2つがある。

申請者の所属する研究室では、低分子量 G タンパク質 *OsRac1* が、PAMP-triggered immunity と Effector-triggered immunity のどちらにも関与するイネ免疫におけるマスター分子であることを明らかにしている。しかしながら、これまでの研究は、高発現の *CaMV35S* プロモーターの下流に恒常的活性化型 *OsRac1* を融合した遺伝子を、T-DNA を利用してランダムにイネゲノムに挿入して解析を行っていた。それらの解析から、恒常的活性化型 *OsRac1* の形質転換イネは、いもち病に対して抵抗性が向上していたが、矮化や不稔性など育種上好ましくない形質も示していた。

本研究で申請者は、相同組換えを利用したポジティブネガティブ選抜を用い、内在性の *OsRac1* 遺伝子に恒常的活性化型の点変異を導入し (*CA-gOsRac1*)、内在性 *OsRac1* の耐病性における役割や、農業上好ましくない形質を回避しつつ耐病性を向上させることが可能かどうかを検討した。その結果、*CA-gOsRac1* は、次世代にも安定して伝わるということが明らかになった。しかしながら、*CA-gOsRac1* のホモ個体では、内在性の *OsRac1* と比較してその発現が減少していた。*CA-gOsRac1* のホモ個体を用いて耐病性反応を検討したところ、*PAL1* や *PBZ1* などの耐病性関連遺伝子や、これまでにいもち病菌や白葉枯病菌の感染によって発現の上昇が確認されている遺伝子の発現上昇が確認された。さらに、いもち病菌の感染部位では、強い抵抗性反応で観察される過敏感反応死が観察された。次に、*CA-gOsRac1* のホモ個体での *CA-gOsRac1* の発現減少の原因を検討した。内在性 *OsRac1* と比較して、*CA-gOsRac1* のプロモーターやジーンボディのメチル化に顕著な変化はなかった。また、マーカフリー化の際に利用する *Cre-loxP* システムのフットプリントである *loxP* が *OsRac1* 発現に及ぼす影響を検討したところ、*OsRac1* 発現に顕著な効果は観察されなかった。また、ノーザンブロットを用いて異常なスプライシングがないか検証したが、異常なスプライシングは検出されなかった。現在のところ、*CA-gOsRac1* の発現がどのような原因で抑制されるのかは不明である。恒常的活性化型 *OsRac1* が自身の発現を抑制するのか、あるいは、*CA-gOsRac1* mRNA の安定性が低いため発現が抑制されるのかもしれない。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Dang Thi Thu

環境ストレスの中でも病害虫による生物的ストレスにより、全世界で年間約10億トンもの作物が失われており、病害虫に対する耐病性の向上は、有用バイオマス産生のための基盤技術として必須であると考えられている。これまでに、病害虫に対する抵抗性を付与するために、免疫受容体や植物免疫に関連する分子を過剰発現した植物体などが作成されている。しかしながら、過剰発現の影響によりストレスが誘導され、バイオマスが減少するケースが多い。したがって、バイオマスを減少させず、耐病性を付与するためには、新たな技術革新が必要であると考えられていた。

申請者の所属する研究室では、低分子量Gタンパク質がイネ免疫におけるマスターレギュレーターであることを既に明らかにしている。さらに、恒常的に高発現するプロモーターを用いて恒常的活性化型 *OsRac1* を過剰発現したイネでは、病原体に対する抵抗性は向上するが、稔性が低下しイネの収量が減少する。そこで申請者は、これまで用いられていた遺伝子導入法ではなく、名城大学の寺田博士らが開発した遺伝子ターゲティング法を用いて、内在性の *OsRac1* 遺伝子に恒常的活性化型となる点変異を導入することにより、*OsRac1* の機能解析や耐病性の付与を試みた。本研究で用いる遺伝子ターゲティング法は、目的遺伝子だけを自然変異に限りなく近い形で改変でき、選抜マーカーは部位特異的組換えの利用で排除できることから、マーカーフリーの画期的な遺伝子改変の技術である。申請者は、内在性の *OsRac1* 遺伝子に活性化型の点変異を導入したターゲッティングイネを作成し、点変異が次世代に正しい形で伝わることを確認した。*MAPKKK*, *WRKY* 等の転写因子や *PAL1* や *PBZ1* 等の防御関連遺伝子の発現が上昇することも確認した。さらに、いもち病菌の感染部位において、過敏感反応死様の抵抗性反応も観察した。残念ながら、恒常的活性化型の変異を導入した *OsRac1* の発現が低下するという予期せぬトラブルに見舞われ、顕著な耐病性の向上は見られなかった。しかしながら、申請者は、発現低下の原因解明にも取り組み、プロモーターやジーンボディのメチル化、異常なスプライシング、フットプリント *loxP* の影響などを丁寧に検討した。植物における相同組換えを用いたジーンターゲティングは未だ黎明期であり、申請者が行ったこれらの解析は、今後、ジーンターゲティングを効率的に行っていく上で重要な知見をもたらすと考えられる。

以上のように、本論文は免疫マスタースイッチである *OsRac1* の植物免疫の誘導機構を明らかにしたのみならず、相同組換えを用いたジーンターゲティングを普及させる上での学術上、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。