

氏 名 鳴坂 真理

授与した学位 博士

専攻分野の名称 農 学

学位授与番号 博乙第4246号

学位授与の日付 平成20年 3月25日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者

(学位規則第5条第2項該当)

学位論文の題目 Transcriptome analysis of plant defense mechanisms against biotic and abiotic stresses using a microarray

(マイクロアレイを用いた高等植物における病害および環境ストレス応答機構の解明)

論文審査委員 教授 白石 友紀 教授 一瀬 勇規 准教授 豊田 和弘

### 学位論文内容の要旨

モデル実験植物シロイヌナズナは初めて全ゲノム配列が決定された高等植物である。1995年に45遺伝子の発現の差異が報告されて以来、マイクロアレイは数千から数万の遺伝子の発現を網羅的に解析できる技術として注目されてきた。私共は、世界に先駆けてシロイヌナズナの完全長cDNAを整備し、我が国で初めてシロイヌナズナのマイクロアレイの開発に成功した。そこで、本研究では、開発した7KシロイヌナズナcDNAマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析から、病害ストレス応答の分子機構の解明を試みた。Necrotrophに属するキャベツ黒すす病菌に抵抗性のエコタイプColumbia(Col-0)および感受性変異体の*pad3-1* (ファイトアレキシン生合成酵素欠損)において、黒すす病菌接種後に発現が変動する遺伝子群について比較解析した。その結果、抵抗性関連遺伝子群の発現が遅延または抑制されることが明らかとなった。次に、シロイヌナズナCol-0に感染するhemibiotroph属菌を探索し、アブラナ科野菜類炭そ病菌を見いだした。炭そ病菌接種により発現が誘導される遺伝子群の7KシロイヌナズナcDNAマイクロアレイによる階層クラスタリング解析、および、マーカー遺伝子のノーザン解析から、シロイヌナズナは本菌の攻撃に対して、ジャスモン酸/エチレン系の防御応答を活性化することが明らかとなった。

次いで、各種ストレスを与えたシロイヌナズナのマイクロアレイ解析から、ストレス応答の指標となる遺伝子の探索を試みた結果、13種のストレスに応答する*phospholipase A II A*遺伝子を同定し、ストレス誘導性のマーカー遺伝子として有用であることを示した。また、チトクロームP450遺伝子ファミリーの解析から、29遺伝子が14種のストレス処理のいずれかに応答して発現が上昇すること、さらに、そのうち10遺伝子は生物および非生物学的ストレスの両ストレスで発現することが明らかとなった。

植物科学分野におけるゲノム創薬へのマイクロアレイ利用の第一歩として、薬剤効果評価用のマイクロアレイキットの開発を試みた。これまでに私共が解析したマイクロアレイデータベースからストレス誘導性遺伝子を選抜し、病害および環境ストレスに応答する約1,200の遺伝子を搭載した1.2Kシロイヌナズナ・フォーカスマイクロアレイを構築した。本1.2Kマイクロアレイを用いて病害抵抗性誘導資材の評価を試みた結果、サリチル酸シグナル系に作用するINAおよびBTHに応答する遺伝子群が、サリチル酸処理区と同一のカテゴリーに分類されることが明らかとなった。以上の結果は、今回開発した1.2Kマイクロアレイキットが抵抗性誘導剤の迅速な評価に有効であることを強く示している。

最後に、モデル実験植物で得た知見を、栽培植物へ移管する方法論を構築することを目的として、シロイヌナズナと同じアブラナ科作物のハクサイにおいて、2KハクサイcDNAマイクロアレイを構築し、シロイヌナズナのカウンターパート遺伝子である145遺伝子を同定した。さらに、炭そ病菌の接種により発現誘導される遺伝子プロファイルが類似することを明らかにした。

本論文では、マイクロアレイ解析を用いた研究戦略として、グローバルマイクロアレイによる遺伝子の探索、目的遺伝子の機能解析と、データの統計学的解析による遺伝子の選抜、ミニマイクロアレイの作製、多検体解析への流れを述べるとともに、モデル植物と作物の情報の共有化により、病害抵抗性に関わるハクサイ遺伝子の網羅的探索や機能予測の可能性を示した。

## 論文審査結果の要旨

マイクロアレイ技術は数千から数万の遺伝子の発現を網羅的に解析できる技術として注目されてきた。鳴坂氏は、理化学研究所において、世界に先駆けてシロイヌナズナの完全長cDNAを整備し、我が国で初めて7KシロイヌナズナcDNAマイクロアレイの開発に成功した。本研究では、開発した7Kマイクロアレイを用い、病害や環境ストレス応答を調べ、以下の知見を得た。キャベツ黒すす病菌に抵抗性のエコタイプColumbia(Col-0)および感受性変異体の*pad3-1* (ファイトアレキシン生合成酵素欠損) を比較解析した結果、*pad3-1*変異体では*WRKY3*や*PDF1.2*等の抵抗性関連遺伝子群の発現が遅延または抑制されることを明らかにした。さらに、Col-0に感染するアブラナ科野菜類炭疽病菌を見だし、本菌接種Col-0で発現が変動する遺伝子群の解析から、ジャスモン酸/エチレン系の防御応答が活性化されることを突き止めた。次いで、各種ストレスを与えたシロイヌナズナの解析から、ストレス応答の指標となる遺伝子の探索を行い、ストレスに応答する13種の*phospholipase AIIA*遺伝子を同定した。また、チトクロームP450遺伝子ファミリーの解析から、29遺伝子が14種のストレス処理のいずれかに応答して発現が上昇すること、さらに、そのうち10遺伝子は生物学的および非生物学的ストレスの両ストレスで発現することを突き止めた。同氏は、抵抗性誘導剤等の評価用のマイクロアレイキットの開発を試み、1.2Kシロイヌナズナ・フォーカスマイクロアレイを、さらに、栽培植物への応用を目指し、2KハクサイcDNAマイクロアレイを構築した。これらの成果は、大変優れており、一連の研究の成果は、著名な国際的学術誌を含め6報(参考論文)の原著論文として公表され、関連論文はこれ以外に20編にのぼっている。以上のように、同氏の研究は博士(農学)の学位に十分値するものと判定した。