

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	Rehenuma Tabassum
論文題目	Studies on the chalky grain mutant <i>floury endosperm11-2 (flo11-2)</i> of rice (<i>Oryza sativa</i> L.) (イネ (<i>Oryza sativa</i> L.) の白未熟粒変異体 <i>floury endosperm11-2 (flo11-2)</i> に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
イネ子実における白未熟粒は、高温により生じる主要な子実外観品質低下の一つであり、精米歩留まりの低下、食味の低下、および検査等級・取引価格の低下をもたらす。白未熟粒では、デンプン粒が疎に集積し、胚乳内に多くの空隙を生じる。白未熟粒は、白色化が生じる部位により幾つかのタイプに分類されるが（腹白粒、心白粒、乳白粒、基白粒、背白粒）、それらの違いは時期と程度の異なる環境ストレスにより生じると考えられている。イネ白未熟粒発生に関わる分子機構は複雑で、未解明な部分が多い。そのことが、耐性品種の効率的な育成や効果的な栽培技術の開発の妨げとなっている。近年、重イオンビーム照射イネ集団1,116系統の中から、圃場条件下で白未熟粒割合が年次により大きく変化する突然変異体として、新規の白未熟粒変異体 <i>floury endosperm11-2 (flo11-2)</i> が単離された。この変異体は高温感受性が高く、高温下での白未熟粒発生機構に関する研究に有用であると考えられた。そこで本研究では、<i>flo11-2</i>変異体における白未熟粒発生機構の解明を目指すとともに、白未熟化に最も重要な環境条件・生理的条件の解明を試みた。			
1. イネ白未熟粒研究を概観し、課題を明らかにした。これまでに、作物学・育種学・農業気象学の研究分野では、移植期の後進、かけ流し灌漑、深水、登熟期窒素追肥などや、経験的に育成された高温耐性品種の導入が行われてきたが、台風害、病虫害、倒伏などの問題が生じる一方で、白未熟粒発生を十分に抑制できないことが報告された。一方、植物生理学の分野では、子実登熟速度の上昇と登熟期間の短縮が共通して観察されることより、シンク活性とソース活性の不均衡が白未熟化の原因であることが推察されている。一方、オミックス解析を含む分子生物学の分野では、様々なデンプン合成系酵素・糖代謝酵素や貯蔵タンパク質プロラミンの発現量低下と一部の熱ストレスタンパク質発現量上昇が報告されている。さらに白未熟粒を生じる様々な突然変異体の解析も進められている。しかしながら、温度に対し高い感受性を有する変異体は<i>flo11-2</i>の他にはなく、<i>flo11-2</i>が白未熟粒研究において有用な材料である可能性が示唆された。			
2. 白未熟粒の発生程度を乳白率（玄米側部投影面積に対する白色部位面積）として調べる画像解析法を利用して、変異体の温度応答性の定量的解析を行った。登熟期平均気温28℃の圃場条件下では<i>flo11-2</i>は野生型よりも乳白率が著しく高く（0.4-0.6）、24℃ではこれが大きく低下することを明らかにした。このことから、同変異体が高温に対し高い感受性を持つことを定量的に確認した。エキソーム解析と、遺伝型がまだ分離していたM₃世代の遺伝型分析により、白未熟化の原因遺伝子がプラスチド型70 kDa熱ストレスタンパク質2遺伝子(<i>cpHSP70-2</i>)であることが示唆された。変異体の<i>cpHSP70-2</i>にはATPaseドメインの259番目のアスパラギン酸がバリンとなる変異（D259V変異）が生じていたが、その変異は多様な生物種のHSP70に高度に保存されたSignature 2ならびにMotif 5にあった。変異体型と野生型の組換え<i>cpHSP70-2</i>の解析および、DnaK（大腸菌HSP70）欠損大腸菌株を用いた相補性試験により、D259V変異をもつ<i>cpHSP70-2</i>はATPase活性が23%低下し、シャペロン機能が低下していることが示唆された。さらに、野生型<i>cpHSP70-2</i>遺伝子を発現する組換え<i>flo11-2</i>変異体を用いた解析			

から、変異体の原因遺伝子が *cpHSP70-2* 遺伝子であることを明らかにした。組換えイネ6系統と変異体において、乳白率と *cpHSP70* 蓄積量の間に負の相関が認められたことから、*cpHSP70* 発現量の高いイネ品種の育成や、プライミングによる *cpHSP70* 発現誘導栽培技術の開発が、温暖化適応技術として有用である可能性が示唆された。

3. これまでの白未熟粒の研究において、日平均気温、日最低気温（夜温）、日最高気温（昼温）のいずれが重要な環境条件であるのか明確な結論は得られていない。また、登熟期間の最も高温感受性が高い発育ステージについて、統一的な知見はない。そこで、変異体の高い高温感受性を利用して、登熟期の異なる5日間だけ高温処理を与える試験を4ヵ年行なった結果、これまで重視されてきた日平均気温や日最低気温よりも日最高気温が最も乳白率に影響することが示唆された。また、日最高気温が35.5-37.5℃の範囲では、開花後20日目前後に穎果の高温感受性が最も高くなることが示唆された。一方、空調付き温室と屋外の圃場条件下で登熟期の30日間連続した高温処理を施した試験より、乳白率に大きな差異をもたらした要因として、日最高気温、高温ストレス積算値、日射量の違いが考えられ、今後さらに詳細な解析の必要性が示唆された。

4. 総合考察を行った。種子貯蔵タンパク質プロラミンと小胞体局在HSP70 (BiP)、*cpHSP70-2* の相互作用が小胞体ストレスを介して白未熟化に関与する可能性を指摘し、野生型における白未熟粒発生機構に関する仮説を提唱した。また、既往の解析手法との相違点を考察し、穂上位置特異的画像解析、白未熟粒タイプ特異的画像解析技術の必要性を指摘するとともに、本研究で用いた画像解析法が正確かつ高スループットであり、白未熟粒研究において有用であることを指摘した。

以上より、高温感受性の高い突然変異体 *f1o11-2* における白未熟粒発生機構に *cpHSP70-2* が関与しており、白未熟化には日平均気温よりも日最高気温が強く影響すること、開花後20日目前後に穎果の高温感受性が最も高くなることが示された。高温を最初に感知する分子機構は *cpHSP70-2* とは別であり、それは野生型とも共通していると推察されることから、本研究で得られた知見は、野生型における白未熟粒研究にも有用であることが示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

地球温暖化の進行に伴い、イネ登熟期の気温が上昇し、玄米が白濁化してデンプン粒の充填不足が生じた白未熟粒が多発している。その発生メカニズムは十分に解明されておらず、したがって適応技術の開発も不十分である。本論文は、白未熟粒発生機構の解明を目指し、高温感受性の優れた突然変異体 *flo11-2* における白未熟粒発生分子機構の解析と、*flo11-2* 変異体を利用した白未熟粒発生要因の同定を試みたものであり、評価すべき点は、以下の3点に要約される。

1. 白未熟粒変異体 *flo11-2* における白未熟化の原因遺伝子が葉緑体型70 kDaヒートショックタンパク質2遺伝子 (*cpHSP70-2*) であることを、エキソーム解析、遺伝型分析、イネ形質転換による相補性試験により明らかにするとともに、変異体の *cpHSP70-2* のATPaseドメインに生じた1アミノ酸置換 (D259V変異) がATPase活性とシャペロン機能の低下をもたらしていることを示した。

2. 白未熟粒変異体 *flo11-2* の高い温度感受性を利用して、様々な環境条件のうち日最高気温が白未熟化に最も重要な要因であること、日最高気温が35.5-37.5℃の範囲では開花後20日目前後に穎果の高温感受性が最も高くなることを示した。

3. 先行研究との比較から、画像解析法による白未熟粒発生程度の定量的解析が有用であることを示すとともに、種子貯蔵タンパク質プロラミンと小胞体局在HSP70 (BiP)、*cpHSP70-2* の相互作用が小胞体ストレスを介して白未熟化に関与する可能性を指摘した。

以上のように、本論文は、高い高温感受性を有する *flo11-2* 変異体を用いた解析から白未熟粒発生の生理機構に新たな知見を加えたものであり、温暖化に適応した水稻生産技術の開発、ならびに作物学および品質設計開発学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和2年4月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：2020年6月1日以降（学位授与日から3ヶ月以内）