

氏 名	やまぐちともや 山 口 知 哉
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2600 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Analysis of genes expressed in rice anthers during the stage of maximal chilling sensitivity (イネ葯低温感受性期に発現する遺伝子の解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 關 谷 次 郎 教 授 矢 崎 一 史 教 授 河 内 孝 之

論 文 内 容 の 要 旨

稲作冷害は、米の安定生産の大きな障害となっており、とりわけ北日本で穂ばらみ期の低温により生ずる雄性不稔は最も減収に結びつきやすい。冷害回避のために育種による耐冷性向上や栽培技術開発の努力がなされてきたが、気象条件によっては十分な収獲を確保することは依然として困難であり、障害発生機構の知見に基づく飛躍的な耐冷性向上の手法開発が期待される。本論文は、穂ばらみ期の中でも最も低温感受性が高い減数分裂直後の小孢子解離期に着目して、稔性花粉の形成に重要な役割を果たすカロース壁の合成と分解を担う酵素の遺伝子および小孢子解離期に低温によって変動する遺伝子の単離・同定と発現解析を行った結果をとりまとめている。

第1章では、イネ葯で発現する β -1,3-グルカナーゼの単離と解析について述べている。既知の β -1,3-グルカナーゼでよく保存されているアミノ酸配列を元に設計したプライマーを用いてRT-PCRにより小孢子期イネ葯から708 bpの断片を増幅し、その断片をプローブとして小孢子期イネ葯 cDNA ライブラリーをスクリーニングして得た遺伝子を *Osg1* と名付けた。*Osg1* は β -1,3-グルカナーゼの触媒作用に必要なアミノ酸残基を保存しており、他のグルカナーゼとの系統解析から単子葉植物エンド- β -1,3-グルカナーゼサブファミリー A に属することを示した。RT-PCR 解析により、その転写産物を葉と根および葯で検出した。この発現様式はタバコ、シロイヌナズナ等の双子葉植物で見出された葯特異的に発現する β -1,3-グルカナーゼとは異なっており、系統的にもそれら β -1,3-グルカナーゼとは別のグループに属することから、単子葉植物と双子葉植物の葯に存在する β -1,3-グルカナーゼの間には分子進化的にも発現制御様式にも違いがあることを示した。

第2章では、イネ葯でカロース合成に関与するカロース合成酵素および Rho 型低分子 GTP 結合タンパク質遺伝子の発現解析について述べている。イネゲノム中にある全10コピーのカロース合成酵素遺伝子を同定し分子系統解析を行った。次に、遺伝子の発現部位について RT-PCR で解析したところ、大半は根、葉の器官でも構成的に発現していたが、*OsGSL5* のみが葯特異的に発現し、最高低温感受性期である小孢子初期の低温によってその発現が抑制されることを示した。また、イネミトコンドリアゲノムに *OsGSL5* と相同な配列が発見され、進化過程における同遺伝子の核ゲノムからミトコンドリアゲノムへの移行の可能性が示された。また、カロース合成酵素活性の調節因子と考えられる植物 Rho 型低分子 GTP 結合タンパク *Rop* 遺伝子について、イネに存在する7コピーの発現部位を RT-PCR で解析したところ、複数の *OsRop* 遺伝子が小孢子初期の葯で発現することを確認し、これら *OsRop* タンパクが *OsGSL* タンパクと相互作用して葯でのカロース合成を制御する可能性を示した。

第3章では、小孢子形成期イネ葯で低温ストレスに応答する遺伝子の cDNA マイクロアレイ解析について述べている。耐冷性の強い北海道早生品種「はやゆき」の葯から抽出した RNA を用いて、8987個のイネ cDNA クローンからなるマイクロアレイへのハイブリダイゼーションを行った。低温感受性期である小孢子初期から低温耐性を獲得していく小孢子中期にかけて、低温に応答した転写因子やシグナル伝達にかかわる遺伝子、また各種の代謝を触媒する酵素の遺伝子など非常に多くの遺伝子(合計160 cDNA)の発現量の増加や減少が起こっていることを示した。とりわけ、ジャスモン酸合成遺伝子 *OPDAR1* とタンパク質分解酵素に類似のドメインを持つ機能未知タンパク質をコードする遺伝子 *Radc1* が小孢子初期

の低温によって顕著に発現レベルを低下させること、逆に、ポリアミン生合成遺伝子 *SAMDC1* が小胞子初期の低温によって発現レベルを顕著に上昇させることを見いだした。*Radc1* 遺伝子の 5' 上流域の配列は塩ストレス応答遺伝子 *OsSalT* の上流にある転移因子 *Castaway* 配列と高い相同性を示した。またイネ葯の *OsSalT* 遺伝子の発現が低温により抑制されるという *Radc1* 同様の発現パターンを示したことから、新規なイネ葯低温応答シス因子として DNA トランスポゾン *Castaway* 配列を含む領域を見いだした。

論文審査の結果の要旨

穂ばらみ期の低温により生ずる雄性不稔は米の安定生産の大きな障害となっており、低温によるイネの花粉発育障害発生機構の知見に基づく飛躍的な耐冷性向上の手法開発が期待されている。本論文は、イネの穂ばらみ期の低温感受性が最も高い小胞子初期に着目して、稔性花粉の形成に不可欠であるカロースの合成・分解を担う酵素遺伝子および小胞子形成期に低温により変動する遺伝子の単離同定と発現の解析を行った一連の研究成果をとりまとめたもので、評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. 小胞子期イネ葯 cDNA ライブラリーから β -1,3-グルカナーゼ遺伝子 *Osg1* を単離し、系統解析から単子葉植物エンド- β -1,3-グルカナーゼサブファミリー A に属することを示すと同時に、その発現部位が葉、根および葯であることを明らかにした。この発現様式は、シロイヌナズナ等の双子葉植物で見出された葯特異的に発現する β -1,3-グルカナーゼとは異なっており、単子葉植物と双子葉植物の葯 β -1,3-グルカナーゼの間には分子進化的にも発現制御様式にも違いがあることを明らかにした。
2. 単子葉植物としては初めて、イネゲノム中にある全10コピーのカロース合成酵素遺伝子 *OsGSL* を同定し分子系統を明らかにした。大半の *OsGSL* が根や葉でも構成的に発現していたが、小胞子の一次壁に蓄積されるカロースの生合成に必須であるシロイヌナズナ *AtGSL2* 遺伝子のオルソログ、*OsGSL5* のみが葯特異的に発現し、低温感受性が最も高い小胞子初期の低温によってその発現が抑制されることを見いだした。カロース合成酵素活性の調節因子と考えられる植物 Rho 型低分子 GTP 結合タンパク *Rop* 遺伝子について、イネに存在する 7 コピーの発現部位を解析し、複数の *OsRop* 遺伝子が小胞子初期の葯で発現することを明らかにし、これら *OsRop* タンパク質が *OsGSL* タンパクと相互作用して葯でのカロース合成を制御する可能性を示した。
3. マイクロアレイ解析により、イネ葯の小胞子初期に、低温に応答して160種類の遺伝子の発現が増加あるいは減少していることを明らかにした。とりわけ、ジャスモン酸生合成遺伝子 *OPDAR1* とタンパク質分解酵素に類似のドメインを持つ機能未知タンパク質をコードする遺伝子 *Radc1* が小胞子初期の低温によって顕著に発現レベルを低下させること、逆に、ポリアミン生合成遺伝子 *SAMDC1* が小胞子初期の低温によって顕著に発現レベルを上昇させることを明らかにした。さらに、新規なイネ葯低温応答シス因子として DNA トランスポゾン *Castaway* を含む配列を見だし、転移因子が耐冷性に関係する遺伝子群の発現調節に関与している可能性を示した。

以上のように、本論文はイネ穂ばらみ期の低温感受性が最も高い小胞子初期に発現する遺伝子を単離・同定し、それらの構造と発現を詳細に検討したもので、作物耐冷性の分子機構の解明および植物分子生物学、植物生化学などの発展に寄与するところが大きい。

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、平成18年2月13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。