

## 冠水条件下におけるイネ子葉鞘及び茎葉部の伸長機構に関する研究

農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻

平成 15 年度博士課程入学 雑賀啓明

指導教員 東京大学助教授 中園幹生

現在進行している地球規模の気候変動は気温の上昇や干ばつ、局所的な豪雨などの異常気象をもたらしているため、農業生態系に対し甚大な影響を与えている。特に、洪水によってもたらされる作物の冠水害・湿害についての対策は、干ばつ対策と同様に重要な農業課題であるにも関わらず、その基礎的研究はほとんど進んでいない。本研究では、モデル作物であるイネを用いて、冠水条件下における子葉鞘や茎葉部の伸長に着目し、その分子機構の解明を試みた。

### 1. 冠水条件下での子葉鞘伸長が抑制される *reduced adh activity(rad)* 変異体の解析

冠水条件下で発芽したイネは、シュノーケルの役割を果たす器官である子葉鞘を特異的に伸長させる。子葉鞘の伸長は湛水直播栽培におけるイネの苗立ち性を向上させるための重要な因子であり、その伸長機構を解明することは重要な課題である。そこで本研究においては、冠水中で発芽しても子葉鞘が伸長しない *rad* 変異体を用いて解析を行った。

*rad* 変異体の子葉鞘において、これまでシュートや根で報告されていた結果と同様に、*ALCOHOL DEHYDROGENASE 1(ADH1)* 遺伝子の mRNA 量は野生型と大差ないにもかかわらず、ADH タンパク質の量は野生型に比べて減少していた。次に、*rad* 変異体の原因遺伝子を調べた。これまでの結果から、*rad* 変異体では、ADH1 タンパク質が減少していることから、*ADH1* 遺伝子に変異が生じていることが予想された。そこで、野生型と *rad* 変異体における *ADH1* 遺伝子の塩基配列を決定したところ、翻訳開始点から 106 番目の塩基である G が A に置換しており、それによって、推定アミノ酸配列の 36 番目のグルタミン酸がリジンに変化することが示された。また、遺伝子タイピング実験及び相補性実験の結果から、*rad* 変異体の原因遺伝子は *ADH1* 遺伝子であることが示された。

また、*rad* 変異体の子葉鞘においては、ATP 含量が野生型と比較して大きく減少していた。冠水条件下におけるエタノール発酵系の役割の 1 つとして解糖系への補酵素のリサイクルが挙げられる。解糖系では、補酵素のリサイクルによって ATP 合成を円滑に行うことができると考えられている。したがって、*rad* 変異体では、子葉鞘における ADH1 タンパク質が減少することで、解糖系の ATP 合成効率が低下し、子葉鞘の伸長が抑制されている可能性が考えられた。

さらに、ADH 活性が減少した子葉鞘において、遺伝子発現に変化が生じているかを調べた。Laser Microdissection を利用して吸水後 2 日目のイネ種子から子葉鞘を単離し、そこから抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、野生型に比べて *rad* 変異体の方が、mRNA 量が 3 倍以上増加していた遺伝子は 40 個あった。その中に、カルシウムを結合する能力を持つ EF-hand を含むタンパク質をコードする遺伝子や発現抑制ドメインを持つエチレン応答性転写因子をコードする遺伝子が確認できた。したがって、*ADH1* 遺伝子に変異が生じた *rad* 変異体の子葉鞘においては、ADH 活性の減少に伴い ATP が減少するだけでなく、遺伝子発現も変動していることが要因となり、伸長が抑制されるということが予想された。

## 2. 冠水条件下における三量体 G タンパク質の働き

イネは冠水中に茎葉部が伸長するが、短期間の冠水では伸長を抑制する方がエネルギーの浪費を抑えることができるため、その後の生存率が高いことが示されている。植物ホルモンの 1 つであるジベレリン (GA) は、冠水中の伸長を促進する働きをもっており、GA 処理によって冠水抵抗性が低下することが知られている。いくつかの品種を用いて冠水抵抗性及び冠水中の伸長量を調べたところ、GA 応答性の変異体で三量体 G タンパク質  $\alpha$  サブユニットが欠失した大黒 (*dl* 変異体) では、冠水中の伸長量が野生型に比べて小さいにも関わらず、冠水抵抗性が低いことが明らかとなった。

これまでの研究から、三量体 G タンパク質は遺伝子発現のシグナル伝達に関与していることが知られている。このことから、三量体 G タンパク質は冠水条件下における遺伝子発現を調節している可能性が考えられた。よって、*dl* 変異体においては、冠水条件下での遺伝子発現が変化していることが示唆された。そこで、冠水条件下における冠水誘導性遺伝子の発現を *dl* 変異体と野生型とで比較した。その結果、冠水処理を施した *dl* 変異体における *ADH* 遺伝子、*PYRUVATE DECARBOXYLASE (PDC)* 遺伝子の mRNA の蓄積量は、野生型よりも少ないことが明らかになった。また、冠水条件下における ADH タンパク質、PDC タンパク質の蓄積量は、mRNA と同様に、*dl* 変異体の方が野生型と比較して蓄積量が少なかった。それに対し、冠水誘導性遺伝子の 1 つである *ALDEHYDE DEHYDROGENASE 2a (ALDH2a)* 遺伝子の発現を調べたところ、mRNA 量、タンパク質量ともに野生型と *dl* 変異体との間に大きな差はみられなかった。

この結果から、三量体 G タンパク質は、冠水条件下における *ADH* 遺伝子、*PDC* 遺伝子の発現を制御しているが、*ALDH2a* 遺伝子の発現調節には関与していないことが示された。また、ADH や PDC は植物の嫌気ストレス耐性に不可欠な酵素であるので、*dl* 変異体の冠水抵抗性が低い原因の 1 つとしてエタノール発酵系の機能が低下していることが考えられた。

### 3. 冠水条件下における *ABA EIGHT-PRIME HYDROXYLASE 1 (AEH1)* 遺伝子の発現解析

浮稲や非浮稲性水稻において、冠水中の伸長に関しては、少なくともエチレン、GA、アブシジン酸 (ABA) の 3 つの植物ホルモンが関与していることが知られている。これらの植物ホルモンの量は、冠水初期に大きく変動する。気体であるエチレンに関しては、拡散効率の低下によりイネ体内のエチレン濃度が一過的に上昇するといわれている。次いで、冠水直後に ABA 量が減少するのに対し、GA 量は増加することが知られている。本研究では、あまり研究がなされていなかった冠水時の ABA の減少に関して、その分子機構を明らかにすることを試みた。

まず、冠水条件下におかれた日本晴の幼植物体において、内在性 ABA がどのように変化するかを調べた。その結果、冠水処理 1 時間という短時間で日本晴幼植物体における内在性 ABA 量が減少することが示された。また、ABA の主要代謝産物であるファゼイン酸 (PA) が冠水処理 1 時間で増加していることが明らかになった。このことから、冠水条件下での日本晴の幼植物体において、内在性 ABA が短時間で減少するという現象に、ABA を PA に代謝することができる ABA8 位水酸化酵素が関与していると予想された。そこで、冠水条件下におけるイネ ABA8 位水酸化酵素遺伝子である *ABA EIGHT-PRIME HYDROXYLASE (AEH)* 遺伝子の mRNA 量を調べた。その結果、*AEH1* 遺伝子に関しては、冠水処理後 30 分という短期間に mRNA 量が大量に蓄積していることがわかった。それに対し、*AEH2* 遺伝子は mRNA 量が冠水処理によって徐々に増加することがわかった。また、*AEH3* 遺伝子は冠水処理 30 分後に mRNA 量が数倍に上昇するが、ノーザンブロット解析の結果から mRNA 量が非常に少ないと考えられた。このことから、冠水条件下における内在性 ABA 量の減少、PA 量の増加には、*AEH1* 遺伝子の mRNA 量増加が寄与していることが示唆された。また、*AEH1* cDNA のクローニングを行い、細胞内局在と酵素活性を調べた。その結果、*AEH1* は小胞体に局在し、ABA の 8 位を水酸化する酵素活性があることが示された。

次に、冠水条件下の *AEH1* 遺伝子の発現を誘導している因子について調べた。冠水条件下での浮稲において、エチレンは直接節間伸長に関わっているわけではなく、伸長促進シグナルとして作用していることが知られており、ABA 量を制御していることが知られている。そこで、気体の植物ホルモンであるエチレンに着目した。まず、日本晴にエチレンの前駆体である 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) 処理を施したところ、冠水処理時と同様に、1 時間で内在性 ABA 量が半分程度に減少したのに対し、PA 量は増加していた。また、ACC 処理またはエチレン処理を施した日本晴の葉においては処理後 30 分で *AEH1* 遺伝子の mRNA 量が一過的に増加していることが示された。さらに、エチレンのレセプターを阻害する薬剤である 1-methylcyclopropane (1-MCP) を 6 時間前処理した後、冠水処理を施したときの *AEH1* 遺伝子の発現を調べたところ、1-MCP 処理を施したイネでは、処理していないイネに比べて、*AEH1* 遺伝子の mRNA 量が半分程度に抑えられていることが分かった。このことから、エチレンが *AEH1* 遺伝子の発現を制御していることが示された。

この結果から、冠水条件下におかれたイネの葉においては、エチレン濃度が一過的に上昇することで、ABA 水酸化酵素遺伝子である *AEH1* の mRNA 量が増加することが示された。増加した *AEH1* が急激な ABA 量の減少に寄与することが考えられた。

本研究により、冠水条件下におけるイネの子葉鞘及び茎葉部の伸長機構に関わる分子機構の一端を明らかにすることができた。いずれの研究からも冠水中の伸長はエネルギー代謝と関わっていることが示唆された。よって、冠水条件下においてエネルギーの合成と分解をいかに適切に制御するかがその後の生存に関わることを示唆していた。冠水条件下における各器官のエネルギー代謝を調節することが、抵抗性を付与する 1 つの方法となりうると考えられた。