

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 雑賀 啓明

---

本研究は、冠水条件下におけるイネの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ものであり、次の3つの章から構成されている。

### 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。湛水直播栽培において、子葉鞘の伸長は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である。本研究では、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* (*ADHI*) 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。このことから、*rad* 変異体の *ADHI* 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 *ADHI* 遺伝子の塩基配列を決定したところ、*ADHI* 遺伝子内に一塩基置換が生じていた。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 *ADHI* 遺伝子であることが示された。さらに、*rad* 変異体の子葉鞘では、ATP 含量が野生型に比べて低下していた。また、Laser Microdissection を利用して吸水後2日目のイネ種子から子葉鞘のみを単離し、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ところ、野生型と *rad* 変異体との間で mRNA 量に3倍以上の差がある遺伝子が65個あった。

したがって、*ADHI* 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示唆された。

### 2. 冠水条件下における三量体 G タンパク質の働き

冠水条件下におけるイネ茎葉部の伸長量は冠水耐性にかかわる重要な形質である。いくつかの品種を用いて冠水耐性及び冠水中の伸長量を調べたところ、ジベレリン (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 *dl* 変異体では、野生型に比べて冠水中の伸長量が小さいにも関わらず、冠水耐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。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 量、タンパク質量は、野生型よりも少ないことが明らかになった。それに対し、冠

水誘導性遺伝子の1つである *ALDEHYDE DEHYDROGENASE 2a (ALDH2a)* 遺伝子では、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。

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

イネにおいて、冠水中の伸長には、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。本研究では、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イネ幼植物体において、内在性 ABA 量の変化を調べた。その結果、冠水処理 1 時間という短時間で内在性 ABA 量が減少し、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、冠水条件下における ABA 量の減少には、ABA を PA に代謝する 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。イネには 3 コピーの *AEH* 遺伝子が存在しているが、冠水条件下での ABA 量の減少には *AEH1* 遺伝子が関与していることが示唆された。そこで、*AEH1* 遺伝子に着目し、機能解析を行った。その結果、*AEH1* は小胞体に局在し、ABA の 8 位を水酸化する活性があることが示された。また、冠水条件下の *AEH1* 遺伝子の発現を誘導している因子としてエチレンに着目し、解析を行った。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、内在性 ABA 量の減少、PA 量の増加がみられた。また、ACC 処理またはエチレン処理を施すことで *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) を前処理することで、冠水条件下における *AEH1* 遺伝子の mRNA 量が処理しない場合と比較して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。

したがって、冠水条件下におかれたイネの茎葉部においては、エチレン濃度が一過的に上昇することで、ABA8 位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。

以上、本研究は冠水条件下におけるイネ子葉鞘・茎葉部の伸長に関わる因子を複数同定することに成功しただけではなく、将来的な冠水耐性イネの作出の可能性を示すことができ、学術上、応用上価値が高い。従って、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値があるものと認めた。