

## 論文の内容の要旨

生圏システム学 専攻  
平成17年度博士課程 進学  
氏名 桑野 美緒  
指導教員名 吉田 薫

論文題目 Studies on generation of low-phytate rice grains through seed-specific suppression of phytic acid biosynthesis  
(フィチン酸生合成の種子特異的抑制による低フィチン米作出に関する研究)

湖沼の富栄養化は世界規模で進行している深刻な環境問題である。農業によって排出されるリンは汚染の主な原因であり、その大部分は家畜の排泄物に含まれるリンであるため、その適切な管理が世界的に求められている。家畜飼料の原材料である穀物種子では、リンの約80%がイノシトール六リン酸（フィチン酸）として貯蔵されており、残りは無機リンである。ブタやニワトリなどの家畜はフィチン酸分解酵素をもたず、フィチン酸態のリンを消化吸収できずに排出するため、栄養補助として無機リンが餌に大量に添加されており、これが畜舎周辺へのリンの過剰流出をまねいている。穀物種子中のリンを家畜にとって利用しやすい無機リンに改変することが、リン排出による汚染を低減するために必要である。これまでに、そのためのさまざまな方策が研究されたが、低コストで効果的な戦略として低フィチン酸種子の作出が求められてきた。その一つの方法が、遺伝子工学的手法による種子におけるフィチン酸生合成経路を抑制した遺伝子組換え植物の作出である。植物のフィチン酸生合成は、グルコース六リン酸からイノシトール一リン酸の合成で始まる。その後の生合成経路は完全には解明されておらず、複雑である可能性が指摘されているため、最初の段階で働くイノシトール一リン酸

合成酵素を阻害することが、フィチン酸生合成の抑制に効果的であると考えられた。イネでは、登熟種子のフィチン酸生合成にきわめて重要な役割を担っているイノシトールリン酸合成酵素遺伝子(*RINO1*)が同定されているため、*RINO1* の発現を抑制することで効果的にフィチン酸量を減少させることができると考えられた。ただし、イノシトールリン酸合成酵素は植物の生育に重要なイノシトール代謝の最初の段階でも働くことから、発現を種子以外の栄養器官でも抑制すると植物の生育に悪影響を及ぼす可能性がある。*RINO1* の発現をフィチン酸の貯蔵器官である種子に限定して抑制することが、栄養器官へ悪影響を与えることなく効果的にフィチン酸含有量を減少させた種子を作出するために必要であると考えられた。そこで、本研究では、種子特異的発現を誘導するプロモーターを利用して *RINO1* 遺伝子の発現を抑制することで低フィチン・高無機リン米を作出することを目的とした。

イネの貯蔵タンパク質グルテリン遺伝子(*GluB-1*)のプロモーターは種子特異的に強い発現を誘導することで知られている。そこで、*GluB-1* プロモーターを利用して、登熟種子中でジーンサイレンシングを誘発し、*RINO1* の発現を抑制した低フィチン米を作出することにした。得られた遺伝子組換え系統について種子の無機リン量を指標として選抜を繰り返した結果、T<sub>4</sub> 世代において形態的に非組換え体と変わらない固定系統(G-22)を得ることができた。G-22 系統では、種子の全リン量が非組み換え種子と変わらず、無機リン量が平均して約 5 倍増え、フィチン酸量が約 17%減少していた。登熟種子における *RINO1* タンパク量を調べたところ、登熟過程後半で非組換え種子の 8%以下にまで減少していることがわかった。以上の結果から、ジーンサイレンシングにより *RINO1* の発現を抑制した低フィチン米の作出が可能であることが示された。しかし、*GluB-1* プロモーターを用いた分子育種にはいくつかの問題点が指摘された。一つは、種子の無機リン増加量およびフィチン酸減少量が既に報告されているイネの低フィチン酸変異体に及ばない点である。その原因として、*RINO1* と *GluB-1* の時間的・空間的発現パターンが影響している可能性が考えられた。*RINO1* は登熟過程のごく初期から発現し、発現部位はフィチン酸の蓄積部位である胚とアリュuron層に限られていた。一方、*GluB-1* の発現は胚乳を中心として見られ、胚では全く発現しない。さらに、*GluB-1* の発現を詳しく調べたところ、登熟過程の初期には発現部位が種子の下部に限定されることが明らかとなった。以上の結果から、*RINO1* と *GluB-1* の発現には時間的・空間的隔たりが大きく、そのため *GluB-1* プロモーターを用いたジーンサイレンシングには限界があることが示唆された。*GluB-1* プロモーターを用いた場合の

もう一つの問題点は、G-22 系統の種子ごとの無機リン量に大きなばらつきが見られる点である。この原因として、イネの穂における着生位置の違いが導入遺伝子の発現に影響を及ぼしている可能性が考えられた。イネでは、穂の着生位置によって種子の登熟パターンが異なることが知られている。生育が早い種子は強勢穎花、遅い種子は弱勢穎花と呼ばれる。強勢穎花と弱勢穎花では遺伝子の発現パターンおよび発現量に差が見られることが既に報告されており、*RINO1* および *GluB-1* の発現も着生位置の影響を受け、それが原因で遺伝子組換え種子の無機リン量にばらつきが生ずる可能性が考えられた。そこで、着生位置により種子の無機リン量に差が見られるかを調べたところ、非組換えイネでは差は見られなかったが、G-22 系統では弱勢穎花の方が強勢穎花よりも無機リン量が有意に大きいことが明らかとなった。さらに、登熟過程における *RINO1* 遺伝子と *GluB-1* 遺伝子の発現量を比較した結果、強勢穎花では *RINO1* 発現のピークが弱勢穎花よりも約 7 日早まることが明らかとなった。一方、*GluB-1* 遺伝子では、その経時的な発現パターンは強勢穎花と弱勢穎花で変わらず、*RINO1* の弱勢穎花の発現パターンに類似していること、弱勢穎花の方が強勢穎花よりも発現量が高いことが明らかとなった。さらに、G-22 系統で *RINO1* タンパク量の変化を調べたところ、登熟過程後半で *RINO1* の発現が抑制されるというパターンには差がないものの、弱勢穎花では強勢穎花よりも早い時期から *RINO1* タンパク量の減少が認められた。以上の結果から、弱勢穎花では *GluB-1* の発現量が高く、また *RINO1* と *GluB-1* の発現パターンに経時的な差が見られないことが高い *RINO1* 抑制効果につながり、*RINO1* タンパクの減少と無機リン量の増加が大きくなったと推察された。

以上の結果から、導入遺伝子による *RINO1* 抑制効果をさらに高め、種子ごとのばらつきを生じないようにするためには、*RINO1* 遺伝子と同じ発現部位と発現パターンをもつ遺伝子のプロモーターの利用が重要であることが示唆された。そこで、*RINO1* と同じく胚とアリューロン層で発現を誘導することが知られているイネの 18kDa オレオシン遺伝子(*Ole18*)のプロモーターを利用することにした。種子の無機リン量を指標として選抜を行った結果、T<sub>3</sub> 世代において、形態的に非組換え体と変わらない固定系統(O-10)を得た。O-10 系統では全リン量は非組換え種子と変わらず、無機リン量が約 21 倍増加し、フィチン酸量が約 68%減少していた。このフィチン酸減少量および無機リン増加量は過去に報告されたイネの低フィチン変異体よりも大きく、導入遺伝子効果の高い系統を選抜できたことが示唆された。また、強勢穎花と弱勢穎花で差が見られないことも O-10 系統の優れた点であった。さらに、O-10 系統で *RINO1* タンパク量の変化を調べたところ、登熟過程

を通じて非組換え種子の約 30%に減少していることが明らかとなった。一方、*Ole18* と *RINO1* の遺伝子発現を調べたところ、発現部位はよく一致しているものの、発現ピークには約 14 日の差が見られた。以上の結果から、発現部位が一致していることが *RINO1* の効果的な発現抑制を可能にし、低フィチン米の作出につながったと考えられた。

*Ole18* プロモーター利用系統育成過程において、O-10 系統を超える低フィチン系統では胚の形態異常が観察され、発芽が抑制されることが示唆された。今以上の低フィチン種子作出を実現するためには、胚ではなくアリュuron層でのみ *RINO1* を抑制することが重要であると考えられた。しかしながら、アリュuron層特異的な発現を示す遺伝子はこれまでに報告がない。そこで、アリュuron層特異的な発現を示す遺伝子を探索するとともに、アリュuron層での発現に必要な cis 配列を探索し、今後の分子育種の方角を示したいと考えた。マイクロアレイ解析を用いて、アリュuron層で高い発現を示し、胚、胚乳、および種子以外の器官で発現しない遺伝子を選抜した結果、2 つのアリュuron層特異的な遺伝子 *ALI* および *AL2* を見出した。両遺伝子のプロモーターをレポーター遺伝子に連結させ、その発現を調べた結果、*AL2* では発現が確認できず、*ALI* では登熟種子の背側の通導維管束群に隣接したアリュuron層でのみ発現が見られることが明らかとなった。これとは別に、*ALI* およびアリュuron層で強く発現することが知られている 7 つの遺伝子の転写開始点から上流 1kb の塩基配列を比較した結果、共通のいくつかの 6 塩基モチーフの存在を明らかにし、これらのモチーフがアリュuron層での発現を調節している可能性を示唆することができた。以上より、アリュuron層特異的な発現を誘導するプロモーター開発に向けた重要な情報を提示することができた。

本研究の結果より、分子育種において導入遺伝子効果の高い系統を作出するためには、適切なプロモーターの選択が重要であることを示すとともに、従来の育種方法では到達できなかったイネ種子の全リン量の半分以上を無機リンにするという育種目標を達成できることを明らかにした。これは、環境負荷低減飼料として実用に耐えうる低フィチン・高無機リン米を作出できたことを意味しており、分子育種の大きな可能性を示したものと考えられた。