

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 桑野 美緒

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、その適切な管理が求められている。家畜飼料となる穀物種子では、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。ブタなどの家畜はフィチン酸分解酵素をもたず、フィチン態のリンを消化吸収できずに排出するため、栄養補助として餌に無機リンが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。リン汚染を低減するための低コストで効果的な戦略の一つが、穀物種子中のフィチン態のリンを無機リンに改変した低フィチン種子の開発である。フィチン酸生合成の最初の段階で働くイノシトールリン酸合成酵素を阻害することは、フィチン酸生合成の抑制に効果的であると考えられる。ただし、イノシトールリン酸合成酵素は植物の生育に必須なイノシトール代謝の最初の段階で働くことから、栄養器官で発現を抑制すると植物の生育に悪影響を及ぼす可能性が高い。そこで、本研究では、イノシトールリン酸合成酵素遺伝子(*RINO1*)の発現をフィチンの貯蔵器官である種子に限定して抑制することで、低フィチン・高無機リン米を作出することを目的とした。

1. グルテリンプロモーターを用いた低フィチン米の作出

イネの種子貯蔵タンパク質グルテリン遺伝子(*GluB-1*)のプロモーターを利用して登熟種子中でアンチセンス *RINO1* を発現させ、ジーンサイレンシングを誘発して *RINO1* の発現を抑制することで、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固定系統 G-22 では、種子の全リン量は変わらず、無機リン量が 5 倍に増え、フィチン酸量が 17%減少しており、分子育種による低フィチン米作出が可能であることが明らかとなった。しかし、登熟過程前半では *RINO1* の発現はほとんど抑制されておらず、無機リンの増加は低レベルであった。これは、*RINO1* と *GluB-1* の発現の時間的・空間的パターンのずれが原因であることが示唆された。

2. 穂の着生位置による導入遺伝子効果の違い

G-22 系統では組換え種子ごとの無機リン量に大きなばらつきが見られた。イネでは、穂の着生位置により、生育が早い種子をつける強勢穎花と遅い種子をつける弱勢穎花に分けられるが、着生位置により *RINO1* と *GluB-1* の遺伝子発現量やパターンが変化し、そのことが *RINO1* の発現抑制効果の差につながり、組換え種子に見られる無機リン量のばらつきをもたらしたことが明らかとなった。

3. オレオシンプロモーターを用いた低フィチン米の開発

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* と同じく登熟過程前半から胚とアリュールン層で発現することが知られているイネの 18kDa オレオシン遺伝子のプロモーターを利用することにした。得られた組換え固定系統 O-10 では、種子の全リン量は非組換え体と変わらず、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。O-10 系統では、登熟過程を通じて *RINO1* の発現は非組換え体の 30%程度に抑制され、また、穂の着生位置の影響を受けなかった。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明らかとなった。

4. アリュールン層特異的プロモーターの探索

オレオシン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種子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、アリュールン層に限定して *RINO1* を抑制することが重要であると考えられた。そこで、アリュールン層特異的発現を示す遺伝子を探索したところ、2つの遺伝子を見出すことができた。さらに、アリュールン層での発現調節に必要と考えられる 6 塩基モチーフの存在を明らかにした。以上より、アリュールン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。

本研究は、従来の育種方法では到達できなかった環境負荷低減飼料として実用に耐える低フィチン・高無機リン米を作出したものであり、育種目標達成のための遺伝子工学的アプローチの道筋を示した点で、基礎、応用両面から、学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本研究を博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。