

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高橋 宏和

本研究は、好気条件下及び嫌気条件下におけるイネの発芽時期に着目し、子葉鞘および本葉の伸長のメカニズムについて明らかにしたものであり、次の3つの章から構成されている。

1. *reduced adh activity (rad)* 変異体における嫌気代謝経路に関する研究

嫌気条件下の ATP 合成に重要な解糖系に NAD^+ を供給する代謝経路にアルコール発酵と乳酸発酵がある。特にアルコール発酵は、解糖系によって生成されるピルビン酸の約 90% を代謝していることから、嫌気代謝においては非常に重要な経路である。そこで、このアルコール発酵において重要な働きをもつ酵素である alcohol dehydrogenase (ADH) の活性が低下した *reduced adh activity (rad)* 変異体を用いて、ADH 活性の低下が他の嫌気代謝系へ及ぼす影響について調査した。その結果、*rad* 変異体の種子胚では野生型に比べ乳酸が最大で約 5 倍多く蓄積していることが明らかとなり、ピルビン酸の代謝系の一つであるアルコール発酵が阻害されたため、別のピルビン酸代謝系である乳酸発酵が活性化されていることが明らかとなった。また、グルコースやフルクトースといった解糖系に必要な単糖の蓄積量が変異体で減少していたことから、変異体において胚乳からの糖の供給が滞っている可能性が示唆された。そこで、胚乳におけるデンプン量を測定したところ、野生型では発芽後経時的にデンプン量が減少したのに対し、変異体ではデンプンの減少がほとんど観察されなかった。また、*rad* 変異体の表現型は、外部から糖を与えても回復しないことから、変異体においてデンプンの分解や糖の代謝・吸収などが抑制されていることが示唆された。

このような *rad* 変異体の種子胚における代謝産物の測定から、ADH 活性の低下が胚乳におけるデンプンの分解や胚における糖の代謝や輸送に影響を及ぼすことが明らかとなり、その結果として、変異体の種子胚における ATP 合成が抑制されていることが考えられた。

2. Laser microdissection (LM) を用いた *rad* 変異体の遺伝子発現解析

rad 変異体の特徴的な形質に、冠水発芽時の子葉鞘の伸長抑制がある。そこで、ADH 活性の低下が、冠水条件下の子葉鞘における遺伝子発現にどのような影響を与えているかを調査した。吸水直後の種子胚から子葉鞘のみを回収し解析することは非常に困難であったため、Laser microdissection (LM) 法を用いることにした。しかし、植物の LM 法は確立されていなかったことから、その実験系の最適条件を検討し、世界に先駆けて植物の LM 法を確立させることに成功した。その方法を用いて、子葉鞘のみを単離後、マイクロアレイ解析を行った。その結果、変異体の子葉鞘において細胞周期関連遺伝子の転写産物の蓄積量が減少していた。さらに、M 期の

細胞の測定と BrdU の取り込み実験により、野生型のイネの子葉鞘では吸水後数日間は細胞分裂を行っており、*rad* 変異体の子葉鞘では細胞分裂が抑制されていることが明らかとなった。また、*rad* 変異体の子葉鞘では ABA において転写が誘導される *OsWRKY24* や *OsWRKY71* の転写産物量が増加していた。そのため、*rad* 変異体の子葉鞘では野生型に比べ、ABA が蓄積していることが示唆された。これらの転写因子は、デンプンの分解に必要な α -amylase の転写を抑制することが報告されていることから、変異体におけるデンプン分解抑制の要因となっている可能性が考えられた。

3. 低酸素環境下におけるイネの発芽伸長時の子葉鞘・本葉の遺伝子発現解析

イネは、他のイネ科作物とは異なり、嫌気環境下でも発芽・伸長をすることが可能である。しかし、好気条件下と嫌気条件下で同じメカニズムによって発芽伸長しているわけではなく、好気条件下では子葉鞘と本葉の両方が伸長するのに対して、嫌気条件下では子葉鞘は伸長するものの、本葉は伸長しない。そこで、好気条件下と嫌気条件下での吸水後 1 日以内のイネ子葉鞘と本葉における遺伝子発現の変化をマイクロアレイ解析により網羅的に調査した。

乾燥種子、好気条件下または嫌気条件下で 0.5、1 日間吸水させたイネ種子胚から LM 法を用いて子葉鞘と本葉を回収し、マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析の結果、嫌気条件下の本葉において特異的に細胞周期関連遺伝子の転写産物の蓄積量が減少していた。この結果は、EdU の取り込み実験からも支持され、嫌気条件下の本葉において、細胞分裂が抑制されていることが示された。また、嫌気条件下の本葉で特異的に転写産物量が増加していた遺伝子の中には、糖飢餓状態で誘導される遺伝子が存在した。つまり、嫌気条件下では胚乳から胚へ供給された可溶性糖が本葉へと分配されていないため、糖の欠乏状態になりエネルギー生産が行えず、その結果、細胞分裂が抑制され、本葉の伸長が抑制されている可能性が示唆された。

以上、本研究では、低酸素条件下での ATP 合成に重要な ADH 活性の低下は、解糖系だけではなく、胚乳におけるデンプンの分解や胚における糖の代謝・輸送にも影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、好気条件下と嫌気条件下におけるイネの発芽伸長機構が異なることを遺伝子発現レベルで明らかにしたことは、学術上価値が高いといえる。したがって、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。