

ふりがな	おいかわ てつお
氏名	及川 鉄男
学位	博士 (農学)
学位記番号	新大院博 (農) 第 59 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	ジベレリン生合成遺伝子群によるイネの草丈制御機構に関する分子遺伝学的研究

論文審査委員	主査 教授	芦川 育夫
	副査 教授	三ツ井敏明
	副査 教授	山口 武志
	副査 教授	児島 清秀
	副査 助教授	川田 元滋

博士論文の要旨

植物種を特徴づけ、その形態を決定づける要因の 1 つは茎の長さである。また、穀類等の生産量に大きく関わる草丈は育種上最も重要な形質の 1 つである。そのため、草丈制御の分子機構を解明することは植物の形態形成や多様性を分子遺伝学的に理解し、作物育種に応用する上で重要な意義をもつ。作物育種への応用として最も代表的な成功例は「緑の革命」と呼ばれる多収性半矮性品種の導入である。半矮性化に伴う耐倒伏性の向上がより多肥条件での栽培を可能にし、穀物の収量を増大させた。近年、「緑の革命」の原因遺伝子がコムギとイネから相次いで単離・同定された。コムギの *RHT* はジベレリンのシグナル伝達に関わる負の制御因子をコードしており、またイネの *SD1* (*OsGA20ox2*) はジベレリン生合成酵素の 1 つをコードしていた。これらの結果はジベレリン関連遺伝子が草丈を制御するために重要且つ有用な遺伝子であることを示している。

ジベレリン (GA) はトランス-ゲラニルゲラニルニリン酸より多段階の生合成過程を経て得られる植物ホルモンであり、植物の発生・生長過程の様々な局面において重要な役割を担う。生合成の後期段階に関わる酵素 (GA 20-酸化酵素及び GA 3 β -水酸化酵素) と異化に関わる酵素 (GA 2 β -水酸化酵素) は GA-ジオキシゲナーゼと呼ばれ、それらをコードする遺伝子は多くの植物種で小遺伝子群を形成している。また、それら遺伝子は GA 活性によりその発現が制御されること (フィードバック或いはフィードフォワード制御) が知られており、これが GA ホメオスタシス (恒常性維持) のメカニズムである。GA-ジオキシゲナーゼの内、GA 20-酸化酵素は活性 GA (GA_1 及び GA_4) に至る 1 つ手前の段階を触媒する酵素で、様々な植物種において遺伝子単離が報告されている。

イネにおいては、2 つの GA 20-酸化酵素遺伝子が単離されている。*OsGA20ox2* (*SD1*) 遺伝子は「緑の革命」の原因となった遺伝子であり、草丈制御に対する寄与が確認されている。一方 *OsGA20ox1* については、遺伝子単離及びタンパク質の酵素活性は確かめられているものの、対応する変異体が存在しないために草丈への寄与は不明である。また、近年成し遂げられた全塩基配列の決定により、イネのゲノム中には更に 2 つ (合計 4 つ) の GA 20-酸化酵素遺伝子の存在が示唆されているが、これら 2 つについては解析

の報告例が無い。そこで本研究では育種上有用性の高い GA 生合成遺伝子、特に GA 20-酸化酵素遺伝子群に着目し、これら遺伝子を介したイネの草丈制御機構の解明を試みた。

イネの徒長型突然変異体 B142 が、ディフェンシン遺伝子 (*AFPI*) 及びハイグロマイシン耐性遺伝子 (*HYG*) を導入した 1000 系統以上の組換え体の中から 1 系統のみ見出された。この突然変異体は野生型である「どんとこい」と比べて著しい徒長を示す。この集団中に同様の表現型を示す個体が見られなかったこと、及び T-DNA の挿入と表現型に連鎖が認められたことから、この表現型は導入した抗菌タンパクによる影響ではなく、また組織培養過程によって生じる変異 (培養変異) にも起因しないと考えられた。B142 由来のゲノミックライブラリーより *AFPI* cDNA をプローブとして挿入位置周辺のクローンを単離し、配列を調べたところ、*OsGA20ox1* の ORF 上流に 2 つの T-region がタンデムに挿入されていた。T-DNA 内の CaMV 35S-プロモーターによって同遺伝子の転写が促進されたのではないかと考え、*OsGA20ox1* mRNA 蓄積量及び内生の活性 GA 濃度を測定したところ、共に有意な上昇が確認された。更に CaMV 35S-プロモーターでドライブされた *OsGA20ox1* cDNA のイネへの導入により、B142 の表現型を再現することが出来た。従って、B142 変異体の表現型は挿入された T-DNA 内の CaMV 35S-プロモーターにより *OsGA20ox1* の転写が促進され、その結果活性 GA 濃度が上昇した為に生じたものであると結論した。また、*OsGA20ox1* 遺伝子の特異的な発現抑制により、草丈を有意に低下させることが出来た。これらの結果から、*OsGA20ox1* もまた *OsGA20ox2* (*SD1*) と同様に草丈の伸長制御に関わることが示された。

またイネゲノム配列の情報を基にして、残る 2 つの GA 20-酸化酵素遺伝子 (*OsGA20ox3* 及び *OsGA20ox4*) の全長 cDNA を単離し、推定されたアミノ酸配列より系統解析を行ったところ、これら 2 つの遺伝子が GA 20-酸化酵素遺伝子群に属することが示唆された。CaMV 35S-プロモーター制御下に単離した cDNA 配するコンストラクトを作製し、これをイネに導入した。その結果 *OsGA20ox1* の時と同様に顕著な徒長が確認された。従って、これら 2 つの遺伝子も機能的な GA 20-酸化酵素をコードしていると考えられた。遺伝子特異的なプライマーを用いた発現解析の結果、*OsGA20ox3* 遺伝子は花器官のみで発現し、他の 3 つの遺伝子 (*OsGA20ox1*、*OsGA20ox2* 及び *OsGA20ox3*) はほぼ調べた全ての器官で発現が確認された。GA₃ 及び GA 生合成阻害剤処理による遺伝子発現の変化 (フィードバック及びフィードフォワード制御) を定量的 RT-PCR により調べたところ、*OsGA20ox1* 遺伝子が内生 GA 量維持の主役であることが示された。これらの結果に加え、RNAi 技術を使った遺伝子特異的な発現抑制による形態変化の違いなどから、4 つの GA 20-酸化酵素遺伝子の特徴付け、及び分子育種へ向けた有用性の評価を行った。

審査結果の要旨

平成 17 年 2 月 21 日 (月)、専攻として公開発表会を行った。その後、審査委員会を開催し、発表内容、質疑応答、論文を査読しての感想、意見交換を行い、特記すべき事項として以下の 3 点が挙げられた。

- 1、イネ徒長型突然変異体「B142」を単離し、変異の原因がジベレリン 20-酸化酵素遺伝子の 1 つである *OsGA20ox1* の過剰発現にあることを明らかにした。
- 2、RNA 干渉法を用いた遺伝子特異的な発現抑制により、*OsGA20ox1* 遺伝子の草丈に対する寄与を明らかにした。
- 3、イネゲノム中に存在する 4 つのジベレリン 20-酸化酵素遺伝子の単離を行い、それら遺伝子の特徴及草丈制御に対する役割について、新たな知見を得た。

また、本論文に記載されている内容の主要部分は国際誌、国内学会誌に記載されていることから、植物分子遺伝学分野へ新知見を加えることに大きく貢献したと評価した。よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として十分であると認定した。