

氏名	さい えん か 齊 艶 華
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	甲第356号
学位授与年月日	平成16年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Cloning and expression of submergence-induced genes in rice plant ( <i>Oryza sativa</i> L.) イネ( <i>Oryza sativa</i> L.)における冠水誘導の遺伝子のクローニングと発現
学位論文審査委員	(主査) 田中 淨 (副査) 北本 豊 柴田 均 滝本 晃一 東 政明

## 学位論文の内容の要旨

国内外のイネの冠水被害は深刻であり、イネの冠水耐性機構を分子レベルで解明し、冠水耐性に関わる遺伝子を単離し、将来的には高栄養、高収量、美味の優良イネ品種に冠水耐性を付与することを目指して本研究が成された。

冠水誘導性遺伝子を単離するため、未冠水と7日冠水したイネ(*Oryza sativa* L.FR13A, 冠水耐性品種)の cDNA サブトラクション・ライブラリーを作製した。Suppression subtractive hybridization (SSH) と 5', 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)を利用して、5つの新たな冠水誘導性遺伝子、OsMGD、OsCTP、OsGGT、OsCIP 及び OsGSH をクローニングした。OsMGD (AB112060)、OsCTP (AB112061) と OsGGT (AB164463) を GenBank に登録した。この3つの遺伝子の発現量はイネ FR13A の冠水中に増えた。そして、さまざまな環境ストレスと植物ホルモン処理による遺伝子の発現が調べられた。

1. イネ Monogalactosyldiacylglycerol synthase gene (OsMGD) のクローニング及び冠水と他のストレスによる発現

OsMGD 遺伝子は全長、1,671 bp で1,077 bp (181-1257)のオープン・リーディング・フレームから成り、358 個の アミノ酸残基をエンコードする。推定したアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の monogalactosyldiacylglycerol synthase (UDPgalactose: 1,2-diacylglycerol 3- $\beta$ -D-galactosyl transferase; EC 2.4.1.46, MGDG synthase)と高い相同性がある。OsMGD 遺伝子は、冠水耐性イネ品種 FR13A と感受性品種 IR42 の両方で冠水中に増加した。耐性品種 FR13A の

方が IR42 より高い発現が見られた。FR13A の OsMGD mRNA 発現は benzyladenine 及び光によって影響された。FR13A 及び IR42 両方の OsMGD の mRNA の蓄積はエチレン、ジベレリン、乾燥及び塩の処理によって高められたが、低温処理では遺伝子の発現は見られなかった。冠水等のストレス時に葉緑体膜の損傷が起こり、これを回復させる時に OsMGD が関与している可能性がある。

## 2. イネ Cation transport protein gene (OsCTP) 様遺伝子の単離と各種ストレスによる発現

OsCTP 遺伝子は全長、741 bp の cDNA で、1137bp (12-1148) のオープン・リーディング・フレームから成り、137 個のアミノ酸残基をエンコードする。推定されたアミノ酸の理論的な等電点(pI) は 5.35 であり、分子量(MW) は 15.2 KDa である。OsCTP 遺伝子にはイネゲノムの AAAA01013244 クローンの 3582~2296 区間に対応して 6 エキソンと 5 イントロンがある。OsCTP 遺伝子の発現は冠水だけでなく、アブシジン酸と塩及び乾燥ストレスにも誘導された。OsCTP 遺伝子は新型の陽イオン・トランスポータ類似の蛋白質をエンコードして、そして各種の環境ストレス耐性に寄与する可能性がある。ストレス時の細胞内のカチオン濃度の乱れを補うために本遺伝子の発現が誘導された可能性がある。

## 3. イネの冠水誘導性 OsGGT (*Oryza sativa* glycogenin glucosyltransferase) 遺伝子

OsMGD 遺伝子の全長 cDNA 塩基の配列は、1273 bp で、1,077 bp (181-1257) のオープン・リーディング・フレームから成り、379 個のアミノ酸残基がエンコードされる。推定されたアミノ酸配列は glycogenin glucosyltransferase と部分的な相同性を持っている。OsGGT 遺伝子は Indica 品種のイネゲノムの AAAA01002475.1 クローンの 17970-20077 区間にあり、Japonica 品種の染色体 10 の AC037426.12 クローンの 53293-51186 区間にある。経時的变化の研究によって OsGGT 遺伝子発現は FR13A における冠水の後期に増加した。FR13A において OsGGT 遺伝子発現は salicylic acid 及び benzyladenine 処理で増加した。その他に OsGGT mRNA の蓄積もエチレン、ジベレリン、アブシジン酸、乾燥及び塩によって高められたが、メチルジャスミン酸と低温では遺伝子の発現は見られなかった。一般に冠水耐性イネは多量のデンプンを含むことが多く、OsGGT はストレス時にデンプン合成を高める働きがあると思われる。

本研究においてイネで 5 種の冠水誘導性遺伝子を発見し、3 種の遺伝子について詳しく解析した。これらの遺伝子発現の発見は冠水耐性研究に新たな考え方を与える。冠水中に生長できる高栄養と多収量のイネ品種を得るため、これらの遺伝子を組換えたイネの作出と性質検討が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

国内外のイネの冠水被害は深刻であり、イネの冠水耐性機構を分子レベルで解明し、冠水耐性に関わる遺伝子を単離し、将来的には高栄養、高収量、美味の優良イネ品種に冠水耐性を付与

することを旨として本研究が成された。

冠水誘導性遺伝子を単離するため、未冠水と7日冠水したイネ (*Oryza sativa* L. FR13A, 冠水耐性品種) の cDNA サブトラクション・ライブラリーを作製した。Suppression subtractive hybridization (SSH) と 5', 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) を利用して、5つの新たな冠水誘導性遺伝子、OsMGD、OsCTP、OsGGT、OsCIP 及び OsGSH をクローニングした。OsMGD (AB112060)、OsCTP (AB112061) と OsGGT (AB164463) を GenBank に登録した。この3つの遺伝子の発現量はイネ FR13A の冠水中に増えた。そして、さまざまな環境ストレスと植物ホルモン処理による遺伝子の発現が調べられた。

### 1. イネ Monogalactosyldiacylglycerol synthase gene (OsMGD) のクローニング及び冠水と他のストレスによる発現

OsMGD 遺伝子は全長、1,671 bp で 1,077 bp (181-1257) のオープン・リーディング・フレームから成り、358 個の アミノ酸残基をエンコードする。推定したアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の monogalactosyldiacylglycerol synthase (UDPgalactose: 1,2-diacylglycerol 3-β-D-galactosyl transferase; EC 2.4.1.46, MGDG synthase) と高い相同性がある。OsMGD 遺伝子は、冠水耐性イネ品種 FR13A と感受性品種 IR42 の両方で冠水中に増加した。耐性品種 FR13A の方が IR42 より高い発現が見られた。FR13A の OsMGD mRNA 発現は benzyladenine 及び光によって影響された。FR13A 及び IR42 両方の OsMGD の mRNA の蓄積はエチレン、ジベレリン、乾燥及び塩の処理によって高められたが、低温処理では遺伝子の発現は見られなかった。冠水等のストレス時に葉緑体膜の損傷が起こり、これを回復させる時に OsMGD が関与している可能性がある。

### 2. イネ Cation transport protein gene (OsCTP) 様遺伝子の単離と各種ストレスによる発現

OsCTP 遺伝子は全長、741 bp の cDNA で、1137bp (12-1148) のオープン・リーディング・フレームから成り、137 個のアミノ酸残基をエンコードする。推定されたアミノ酸の理論的な等電点 (pI) は 5.35 であり、分子量 (MW) は 15.2 KDa である。OsCTP 遺伝子にはイネゲノムの AAAA01013244 クローンの 3582~2296 区間に対応して 6 エキソンと 5 イントロンがある。OsCTP 遺伝子の発現は冠水だけでなく、アブシジン酸と塩及び乾燥ストレスにも誘導された。OsCTP 遺伝子は新型の陽イオン・トランスポータ類似の蛋白質をエンコードして、そして各種の環境ストレス耐性に寄与する可能性がある。ストレス時の細胞内のカチオン濃度の乱れを補うために本遺伝子の発現が誘導された可能性がある。

### 3. イネの冠水誘導性 OsGGT (*Oryza sativa* glycogenin glucosyltransferase) 遺伝子

OsMGD 遺伝子の全長 cDNA 塩基の配列は、1273 bp で、1,077 bp (181-1257) のオープン・リーディング・フレームから成り、379 個のアミノ酸残基がエンコードされる。推定されたアミノ酸配列は glycogenin glucosyltransferase と部分的な相同性を持っている。OsGGT 遺伝子は Indica 品種のイネゲノムの AAAA01002475.1 クローンの 17970-20077 区間にあり、Japonica 品種の染色体 10 の AC037426.12 クローンの 53293-51186 区間にある。経時的変化の研究によって OsGGT 遺伝子発現は FR13A においての冠水の後期に増加した。FR13A において OsGGT 遺伝子発現は salicylic acid 及び benzyladenine 処理で増加した。その他に OsGGT mRNA の蓄積もエチレン、ジベレリン、

アブシジン酸、乾燥及び塩によって高められたが、メチルジャスミン酸と低温では遺伝子の発現は見られなかった。一般に冠水耐性イネは多量のデンプンを含むことが多く、OsGGTはストレス時にデンプン合成を高める働きがあると思われる。

本研究においてイネで5種の冠水誘導性遺伝子を発見し、3種の遺伝子について詳しく解析した。これらの遺伝子発現の発見は冠水耐性研究に新たな考え方を与える。冠水中に生長できる高栄養と多収量のイネ品種を得るため、これらの遺伝子を組換えたイネの作出と性質検討が期待される。