

博士（農 学）久 野 裕

学 位 論 文 題 名

ペレニアルライグラスにおけるフルクタン合成酵素遺伝子の  
解析および耐凍性分子育種への応用

学位論文内容の要旨

温帯以北に生息する多年生の植物は、秋から冬にかけて気温の低下に伴い徐々に耐凍性を獲得し、氷点下でも生存できる。この現象を低温驯化と呼ぶ。低温驯化過程の植物細胞内では、各オルガネラで貯蔵物質の蓄積や液胞の小型化など劇的な変化が起こる。スクロースを基質とするフルクトースのポリマーであるフルクタンも、低温驯化過程で液胞に蓄積する多糖類の1つである。フルクタンは、温帯起源のC3植物、特にイネ科、ユリ科およびキク科植物に多く蓄積することが知られており、ペレニアルライグラス(*Lolium perenne L.*)もフルクタンを蓄積する植物の1種である。本研究は、ペレニアルライグラスの耐凍性の向上を目的として、フルクタン代謝の遺伝機構を明らかにして耐凍性との関連をみたものである。本論文は5章で構成され、第1章が緒論、第2章がフルクタン合成酵素遺伝子の単離および同定、第3章がフルクタン合成酵素遺伝子のマッピングおよびフルクタン含有量のQTL解析、第4章がコムギ由来のフルクタン合成酵素遺伝子を導入した形質転換植物の特性および第5章が総合考察となっている。

第1章の緒論では、ペレニアルライグラスの有用性やその耐冬性育種の重要性を論じた後、国内外のこれまでの研究の経緯や最近の情報を踏まえ、低温驯化過程における植物細胞内の変化や植物が耐凍性を獲得していくメカニズムを述べ、フルクタンと環境ストレス耐性との関連について展開した。

第2章では、ペレニアルライグラスからフルクタン合成酵素遺伝子を単離し、その機能解析および低温驯化過程での発現解析を行った。まず、低温驯化冠部組織由来のcDNAライブラリーから、既知のフルクタン合成酵素遺伝子と相同性が高い2.2～2.5 kbpの6種類のクローンを単離した。それらのクローンを $prft1$ ～ $prft6$ と名付けた。特に $prft4$ はペレニアルライグラスから既に単離されている sucrose-sucrose 1-fructosyltransferase(1-SST)遺伝子と相同性が高かった。次に、 $prft1$ ～ $prft5$ について、酵母(*Pichia pastoris*)発現システムを用いた機能解析の結果、 $prft1$ および $prft2$ は fructan-fructan 1-fructosyltransferase(1-FFT)を、 $prft3$ および $prft5$ は fructan-fructan 6G-fructosyltransferase(6G-FFT)をそれぞれコードし

ていることを明らかにした。*prft4* は 1-SST 遺伝子であることを確認した。6G-FFT 遺伝子に関しては、本研究においてイネ科植物から初めて単離できた。また、植物を低温処理させたとき、葉部および冠部組織では、低温驯化に伴いフルクタンの含有量が増加した。Realtime RT-PCR 法を用いて、フルクタン合成酵素遺伝子の発現解析を行った結果、*prft1* および *prft2* は、低温驯化過程で葉部および冠部組織において著しく発現が増加したが、*prft3*、*prft4* および *prft5* に関しては、顕著な発現増加は見られなかった。これらのことから、低温驯化過程におけるフルクタン含有量の増加と *prft1* および *prft2* の発現量の増加が密接に関連していることを示唆した。

第 3 章では、連鎖解析集団を用いて単離した遺伝子のマッピングおよびフルクタン含有量の QTL 解析を行った。連鎖解析集団内で多型検出が可能な *prft1*、*prft3* および *prft4* の PCR ベースのマーカーを作製した。それらの遺伝子の連鎖解析を行った結果、*prft3* は第 3 連鎖群 (LG3) に座乗し、*prft1* および *prft4* は LG7 インベルターゼ遺伝子の近傍に座乗した。続いて重合度 3~7 のフルクタンを「低分子フルクタン」、重合度 8 以上のフルクタンを「高分子フルクタン」と定義し、2002 年および 2003 年における越冬前冠部組織のフルクタン含有量の QTL 解析を行った。その結果、LG1 および LG4 に高分子フルクタンの QTL を、LG3 に低分子フルクタンの QTL をそれぞれ検出した。フルクタン合成酵素遺伝子のマッピング位置とフルクタン含有量の QTL 検出位置が一致しない結果となった。このことは、フルクタン含有量が直接合成に関与する酵素遺伝子以外の因子によっても支配されている可能性を示唆している。

第 4 章では、コムギ由来のフルクタン合成酵素遺伝子をペレニアルライグラスに導入し、その特性を調査した。コムギ由来のフルクタン合成酵素遺伝子 *wft1* (sucrose-fructan 6-fructosyltransferase) および *wft2* (1-SST) を過剰発現する形質転換ペレニアルライグラスを作出した。形質転換体および非形質転換体の葉部におけるフルクタン含有量を調査した結果、*wft1* を導入した 1 個体、*wft2* を導入した 3 個体において、非形質転換体と比べてフルクタン含有量の増加が見られた。続いて、電気伝導度法による耐凍性検定の結果、非形質転換体に比べてフルクタンを多く蓄積している形質転換体で耐凍性が向上していた。このことから、フルクタン合成酵素遺伝子を導入することは植物の耐凍性を向上させる手段として有効であることが示唆された。

第 5 章の総合考察では、低温驯化過程でフルクタン含有量と合成酵素遺伝子発現の増加が見られたこと(第 2 章)や、フルクタン含有量が増加した形質転換体の耐凍性が向上していたこと(第 4 章)から、フルクタンが植物に耐凍性を付与させる重要な物質の 1 つであると考え、耐凍性の QTL と第 3 章で明らかにしたフルクタン含有量の QTL との関連について総合的に考察した。また、本研究成果のペレニアルライグラス耐冬性育種への応用について論じた。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 喜多村 啓介

副査 教授 中嶋 博

副査 助教授 金澤 章

## 学位論文題名

### ペレニアルライグラスにおけるフルクタン合成酵素遺伝子の 解析および耐凍性分子育種への応用

本論文は 5 章 119 頁からなる和文論文であり、図 24、表 7、英文要約および付表 3 を含む。

フルクトースのポリマーであるフルクタンは、寒地型イネ科植物に多く蓄積することが知られている。フルクタンは植物細胞内では液胞に蓄積しており、低温ストレスに対して浸透圧調整を行う生理調節物質として、また、越冬後の再生のためのエネルギー源（貯蔵物質）としての働きを持つ。本研究では、ペレニアルライグラスを研究対象としてフルクタン合成の基本的知見を得るとともに、フルクタンの特徴を利用した植物の耐凍性分子育種への応用について検証した。

得られた結果は以下の通りである。

#### 1. フルクタン合成酵素遺伝子の単離および同定

はじめに、ペレニアルライグラス低温馴化冠部組織由来の cDNA ライブラリーから既知のフルクタン合成酵素遺伝子と相同性の高い 6 つの cDNA クローンを単離した。それらを *prft1*～*prft6* と名付け、その特性解析を行った。それらの遺伝子がコードするタンパク質の機能解析を行った結果、*prft1* および *prft2* は fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) 活性を、*prft3* および *prft5* は fructan: fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT)活性を、*prft4* は sucrose: sucrose 1-fructosyltrasnferase (1-SST)活性をそれぞれ持つことが明らかとなった。*(prft6* の翻訳産物では反応が起らなかった。) 6G-FFT 遺伝子は、本研究によってイネ科植物から初めて単離できた。低温馴化過程で、ペレニアルライグラスの葉部および冠部においてフルクタン含有量の増加が見られた。同時に、*prft1*～*prft5* の発現量の調査を行った結果、*prft3*～*prft5* は低温馴化と関係のある発現の増加は見られなかつたが、*prft1* および *prft2* は低温馴化に

伴い著しく発現量が増加していた。これらのことから、*prft1* および *prft2* の発現量の増加とフルクタン含有量の増加は密接に関連していると予想された。

## 2. フルクタン合成酵素遺伝子のマッピングおよびフルクタン含有量の QTL 解析

はじめに、ペレニアルライグラス  $F_2$  連鎖解析集団を用いて *prft1*、*prft3* および *prft4* のマッピングを行った。*prft3* は第 3 連鎖群 (LG3) に座乗し、*prt1* および *prft4* は LG7 のインベルターゼ遺伝子の近傍に座乗した。次に、同じ  $F_2$  連鎖解析集団を用いてフルクタン含有量を測定し QTL 解析を行った結果、高分子（重合度 8 以上）フルクタンは LG1 と LG4 に、低分子（重合度 3～7）フルクタンは LG3 に検出された。フルクタン合成酵素遺伝子がマッピングされた位置とフルクタン含有量の QTL 検出位置は一致しない結果となった。このことから、フルクタン含有量は、直接合成に関与する酵素遺伝子以外の因子（例えば、転写因子や転流・蓄積に関わる因子）によって支配されていると推察した。

## 3. コムギ由来のフルクタン合成酵素遺伝子を導入した形質転換植物の特性

ペレニアルライグラスよりも耐凍性が高いコムギ由来のフルクタン合成酵素遺伝子をペレニアルライグラスに導入した形質転換体を作出し、その特性解析を行った。バクテリア由来のフルクタン合成酵素遺伝子は液胞標的シグナルが無いために、植物に導入すると奇形になる場合が多いが、コムギ由来のフルクタン合成酵素遺伝子の導入では、形態的に正常な形質転換体を得ることができた。形質転換体のフルクタン含有量を調査した結果、非形質転換体よりもフルクタン含有量が増加していた。また、電気伝導度法で耐凍性検定を行ったところ、形質転換体の耐凍性の向上が確認できた。これらのことから、フルクタン合成酵素遺伝子を導入することでペレニアルライグラスの耐凍性を向上することが可能であると考えた。

本研究は、フルクタン合成酵素遺伝子の特性を明らかにするとともに、ペレニアルライグラスの耐冬性（耐凍性を含む）育種への応用に重要な道筋を立てるものであり、学術的に高く評価できる。

よって、審査員一同は、久野 裕が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。