

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 27 年度博士課程進学
氏名 工藤 まどか
指導教員名 篠崎 和子

論文題目

乾燥ストレス耐性植物の成長促進制御

1. 序論

食糧とエネルギーは、私たち人類の生存のために必要不可欠である。これらの需要は増加の一途をたどり、供給に関して大きな課題を抱えている。安定した農作物生産を目指し、長年にわたり世界中で乾燥ストレス耐性植物の作出が試みられてきた。しかし、このような植物は耐性の向上の副作用として収量やバイオマス量の減少を示す例が多かった。この農業上の課題を解決するために、乾燥ストレス耐性と生産性の間にあるトレードオフを打破する可能性を探る必要があると考えた。本研究では、乾燥ストレス耐性遺伝子と成長促進遺伝子を共に過剰発現する形質転換シロイヌナズナの作製および解析を通じて、乾燥ストレス耐性植物の成長促進に挑戦した。導入する乾燥ストレス耐性遺伝子として、*DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 1A (DREB1A)* 転写因子遺伝子を用いた。成長促進遺伝子に関しては乾燥ストレス下で発現が抑制されるものに着目し、*PHYTOCHROME INTACTING FACTOR (PIF)* ファミリー転写因子遺伝子およびジベレリン合成酵素遺伝子 *GA REQUIRING 5/GIBBERELLIN 20-OXIDASE 1 (GA5/GA20ox1)* を選定した。これらの遺伝子を組み合わせた二重過剰発現体について個体レベルの解析 (乾燥ストレス耐性試験・成長解析) および分子レベルの解析 (遺伝子発現解析・代謝物解析) を行い、複数遺伝子の集積が植物に与える影響に関する基礎的知見を得た。

2. 乾燥ストレス耐性植物へ導入する成長促進遺伝子の探索

植物は乾燥ストレスに遭遇すると、転写制御を介して耐性を獲得する一方で、自らの成長を抑制する。本研究で着目した *DREB1A* は、その発現がストレス条件下で誘導される。*DREB1A* を過剰発現させた植物は乾燥ストレス耐性の向上を示すが、ロゼット葉の矮化や花成遅延といった生育抑制までも引き起こされる。そのため、乾燥ストレス条件下で発現が抑制される遺伝子を利用することで、*DREB1A* 過剰発現体の成長を促進できると期待された。本研究では、まず乾燥ストレス条件下において発現が抑制される成長促進遺伝子を探索した。成長促進遺伝子の候補として、植物の形態に影響を与えることが報告されている転写因子遺伝子、細胞壁関連遺伝子、植物ホルモン合成酵素遺伝子を選定した。培土上で生育させた野生型シロイヌナズナに対して 2 週間の乾燥ストレス処理を行い、顕著に成長が抑制されたロゼット葉を用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、複数の候補遺伝子の発現量が乾燥ストレス条件下で有意に減少することが明らかになった。これらの遺伝子を用いて *DREB1A* との二重過剰発現体の作製を試みた結果、*PIF4* と *GA5* を用いた場合に複数の形質転換体が得られた。

3. *PIF* ファミリー遺伝子の導入による乾燥ストレス耐性植物の成長促進制御

最初に、*PIF* ファミリー遺伝子の導入による *DREB1A* 過剰発現体の成長促進効果を検証した。*PIF* ファミリータンパク質は光に応答してフィトクロムと相互作用し、胚軸、葉柄、茎の伸長成長などの避陰応答を制御する。*PIF4* は乾燥ストレス条件下では発現が抑制されると共に、*DREB1A* 過剰発現体において発現が低下した。農業への応用的観点から、*PIF4* に加え、イネの相同遺伝子 *PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR LIKE1* (*OsPIL1*) も用いて解析を行った。二重過剰発現体の作製は、*PIF* と *DREB1A* のそれぞれの過剰発現体の交配により行った。得られた *PIF4 DREB1A* 二重過剰発現体では、交配親と同程度に *PIF4* の高発現が見られたが、*DREB1A* に関しては交配親の半分程度に発現が抑えられていた。何らかの植物中の制御機構によって、*PIF4* のような内在性の遺伝子の導入は、成長に負の影響を与える遺伝子の発現量を適度なレベルに調節する可能性が示された。一方、イネ由来の *OsPIL1* を導入した場合は、二重過剰発現体においても *DREB1A* の高い発現量が維持された。*OsPIL1* のような外来遺伝子を異種発現させることで、内在の制御機構の影響を受けずに植物の成長を促進できる可能性が示された。

表現型解析の結果から、*PIF* ファミリー遺伝子の導入によって *DREB1A* 過剰発現体の胚軸や茎の伸長成長および花成誘導を促進できることを明らかにした。さらに、*PIF DREB1A* 二重過剰発現体は乾燥ストレス耐性が向上したため、*PIF* ファミリー遺伝子の過剰発現は耐性の付与に負の影響を与えないことが確かめられた。メタボローム解析の結果、*DREB1A* の過剰発現によって適合溶質が蓄積すると共に、*PIF* ファミリー遺伝子の過剰発現によって糖や TCA サイクル中間体の蓄積量が増加することが明らかになった。さらに、トランスクリプトーム解析によって、*PIF DREB1A* 二重過剰発現体では環境ストレス耐性遺伝子群および細胞伸長関連遺伝子群の発現が誘導され、両転写因子は相加的に下流遺伝子の発現を制御することが示された。以上の結果より、乾燥ストレス耐性遺伝子と成長促進遺伝子を導入した植物は、基本的に両遺伝子の影響を相加的に受けた形質を示すことを明らかにした。

4. ジベレリン合成酵素遺伝子の導入による乾燥ストレス耐性植物の成長促進制御

次に、*GA5* の導入による *DREB1A* 過剰発現体の成長促進効果を解析した。活性型ジベレリン合成の律速段階で機能するジベレリン 20 酸化酵素は、その過剰発現によって多くの植物の成長を促進することが報告されているため、農業上の利用価値が高いと考えられる。遺伝子発現解析の結果、*GA5* の発現量は乾燥ストレス条件下では減少したが、*DREB1A* 過剰発現体における発現レベルに変化はなかった。*GA5 DREB1A* 二重過剰発現体においては、*DREB1A* 過剰発現体と同程度に *DREB1A* を高発現するラインが得られた。内在性の遺伝子を用いた場合でも、作用点が限定されている代謝酵素遺伝子を用いることで、形質転換後の *DREB1A* の発現量を維持できる可能性が示された。

GA5 の導入により、*DREB1A* 過剰発現体の胚軸伸長やロゼット葉サイズの拡大および花成誘導が促進されることを明らかにした。*PIF* ファミリー遺伝子の導入では見られなかった *DREB1A* 過剰発現体のロゼット葉サイズの拡大を実現できたことは、特筆すべき点である。この結果は、*GA5* の導入によって乾燥ストレス耐性植物の成長を効果的に促進できることを示している。さらに、*GA5 DREB1A* 二重過剰発現体は *DREB1A* 過剰発現体と同程度に乾燥ストレス耐性が向上したため、*GA5* の過剰発現も耐性の向上に負の影響を与えないことが明らかになった。トランスクリプトーム解析の結果からは、*PIF* ファミリー遺伝子を導入した場合と同様に、*GA5* と *DREB1A* は植物体内の遺伝子発現制御に対して相加的に影響を与えることが示された。

5. 結論

遺伝子集積法による植物の分子育種は、主に除草剤耐性や病虫害抵抗性の付与、物質生産のための代謝改変の目的で行われている。機能が類似した遺伝子群を集積させた植物については多くの報告がある一方で、乾燥ストレス耐性遺伝子と成長促進遺伝子のようにトレードオフの関係にある遺伝子を集積させた組換え植物についてはほとんど報告がない。本研究では、乾燥ストレス耐性を付与する *DREB1A* と、成長を促進させる *PIF* ファミリー遺伝子または *GA5* を共発現した二重過剰発現シロイヌナズナを作製し、複数遺伝子の集積が植物に与える影響を検証した。本研究において作製した二重過剰発現体は、乾燥ストレス耐性の向上と共に、胚軸や茎の伸長促進、ロゼット葉サイズの拡大、地上部サイズの増加、花成の早期化を示した。これらの結果により、成長促進遺伝子の導入によって、植物に元来備わっている乾燥ストレス耐性とバイオマス量のトレードオフの関係を打破できる可能性を見出した。二重過剰発現体の代謝物および遺伝子発現プロファイルの比較解析により、成長促進遺伝子と *DREB1A* の共発現は、下流の遺伝子発現や代謝物量へ相加的な影響を与えることを明らかにした。以上により、乾燥ストレス耐性遺伝子と成長促進遺伝子を導入した植物は、基本的に両者の影響を相加的に受けた形質となることが示された。そのため、成長促進遺伝子と *DREB1A* 遺伝子の共発現は、生産性を向上させた乾燥ストレス耐性植物の分子育種において有効な手法であると期待される。今後はイネやダイズなどを用いて解析を行い、植物種間の共通点や相違点を見出すことで、作物への応用に関する知見が得られると考えられる。本研究によって得られた植物の成長制御に関する基礎的知見は、高バイオマス生産性の乾燥ストレス耐性植物の創出に資する。植物の分子育種における新たなアプローチの開発によって作物の生産性を向上させることにより、人口増加による食糧問題、化石燃料の枯渇に伴うエネルギー問題および温暖化の問題を、複合的に解決に導くための一助となることが期待される。

6. 発表論文

Kudo, M., Kidokoro, S., Yoshida, T., Mizoi, J., Todaka, D., Fernie, A. R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017) Double overexpression of DREB and PIF transcription factors improves drought stress tolerance and cell elongation in transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal* 15, 458-471.