

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 12 年度博士課程進学
氏 名 山口 貴大
指導教官名 平野 博之

論文題目 イネの花器官の決定と葉の中肋分化に関する分子遺伝学的研究

花は生殖を司る重要な器官であり、花の基本的構造を決定する最も重要なイベントが花の器官決定である。シロイヌナズナなどの双子葉植物においては、花の器官決定は ABC モデルにより説明されることが明らかにされているが、単子葉植物においては完全には解明されていない。高等植物において花器官決定機構がどの程度保存されているかという問題は、重要かつ興味深い。また、葉はその形態が高等植物の間で大きく多様化している。本研究においては、単子葉植物のイネにおける花器官決定機構および葉の形態形成を支配する遺伝子の機能を解明すること、さらには植物の形態の進化や多様性をもたらした遺伝的メカニズムを明らかにすることを目的に、以下の研究を行った。

1. 心皮のアイデンティティ決定を制御する *DROOPING LEAF* 遺伝子の単離と解析

イネの *drooping leaf (dl)* 変異体では、花の雌ずい雄ずいへと転換する。このような表現型を示すような変異体は、シロイヌナズナなど解析が進んでいる双子葉植物においても報告されておらず、イネの花器官決定には双子葉植物とは異なる機構が存在する可能性が示唆されている。そこでまずこの *dl* 変異体に着目し、遺伝子の単離を試みた。map-based cloning 法と

タギング法により *DL* 遺伝子を単離した結果、*DL* はジンクフィンガードメインと ヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフを持つ YABBY ドメインを持つ、植物特有の転写因子をコードする YABBY 遺伝子であることが明らかになった。次に *in situ* ハイブリダイゼーション法により花発生過程におけるその時間的・空間的発現パターンを解析したところ、*DL* は心皮原基が分化する予定領域および発生中の心皮原基で特異的に発現することが明らかとなった。変異体の表現型と総合し、*DL* はイネの花発生過程において心皮決定を制御すると結論した。また、*dl* 変異体においては *whorl4* に雄ずいが無限生長的に発生する。この *dl* 変異体の花分裂組織においては、分裂組織で特異的に発現する *OSH1* 遺伝子が *whorl4* に雄ずい原基が分化した後も発現し続けることを明らかにし、*DL* は花分裂組織の有限性を制御する機能も持つことを示した。*DL* はシロイヌナズナの *CRABS CLAW (CRC)* 遺伝子と高い相同性を示した。*crc* 変異体においては、雌ずいの形態に異常がみられる。したがって *DL/CRC* 遺伝子の機能はある程度高等植物の間で保存されていると考えられる。しかしながら、*CRC* は心皮決定に部分的にしか関与しておらず、イネの進化過程で、*DL* が心皮決定遺伝子としてより重要な役割を果たすよう進化してきたと推定される。

2. クラス C 遺伝子、*OsMADS3* および *OM55*, の解析

双子葉植物において心皮決定はクラス C の MADS ボックス 遺伝子により支配されている。*DL* がイネの心皮決定に必要な不可欠な機能を果たしているとする、イネにおけるクラス C 遺伝子がどのような機能を持つかという問題は興味深い。そこでイネにおけるクラス C 遺伝子の機能を明らかにしようと試みた。はじめに、イネにおいてはこれまで知られていた *OsMADS3 (RAG)* 遺伝子に加え、もう一つクラス C の MADS ボックス 遺伝子が存在することを明らかにした (*OM55* と仮称)。野生型の花の発生過程において、両遺伝子は、ともに *whorl3* および *whorl4* に特異的に発現している点では共通していたが、*OM55* が雄ずい原基および雌ずい原基で一様に発現するのに対し、*OsMADS3* は器官原基が発生する直前の予定領域でのみ強く発現することが明らかになった。次に *Tos17* や T-DNA タグラインのスクリーニングによるこれら遺伝子の挿入変異体の単離や、RNAi の手法による遺伝子抑制システムの作製を行った。*osmads3* のノックアウト変異体では、*whorl3* においてほぼ全ての雄ずいがりんぴへと転換し、*whorl4* においては、心皮のアイデンティティーは正常であるが、その数が増加していた。一方 *OM55* 遺伝子が特異的に強く抑制された RNAi 系統では、*whorl3* においては 1-2 本のみ雄ずいがりんぴへと転換した。*whorl4* においては異常な形態を示す心皮様器官が形成され、そのさらに内側に、りんぴ、雄ずい、心皮様器官のセットが繰り返し無限に発生を続け、

数十個の器官が形成されるという表現型を示した。また、両変異体においてりんぴ数の増加が観察された。これらの表現型から、*OsMADS3* 遺伝子と *OM55* 遺伝子は、りんぴ数の制御、雄ずいの決定、花の有限性の制御という点において、共通した機能を持つことが明らかになった。しかしながら、*whorl3* では *osmads3* 変異体において、より強い異常が観察され、*whorl4* においては *om55* RNAi 系統において、より強い異常が観察されたことから、これら 2 つの遺伝子は、*whorl* 依存的にその機能の重要性が異なっていると考えられる。データベース検索を行ったところ、他のイネ科植物もクラス C 遺伝子を 2 つ持ち、それぞれ *OsMADS3* サブグループと *OM55* サブグループに分類される事が明らかになった。イネにおける 2 つのクラス C 遺伝子のような *whorl* 依存的な機能分化が、他のイネ科植物における 2 つのクラス C 遺伝子においても共通しているかという問題は興味深い。

3. 花器官決定遺伝子間の遺伝的相互作用

次に花器官決定遺伝子間における遺伝的相互作用を解析した。まず *dl* 変異体における、イネの *PISTILLATA (PI)* 様クラス B 遺伝子である *OsMADS4* 遺伝子の発現、逆にイネの *APETALA3 (AP3)* 様クラス B 遺伝子である *SUPERWOMAN1 (SPW1)* 遺伝子の変異体および *SPW1* 遺伝子を過剰に発現させた系統における *DL* 遺伝子の発現を観察し、*DL* とクラス B 遺伝子は互いに負に制御し合っていることを明らかにした。また *spw1* 変異体および *SPW1* 過剰発現系統における *OsMADS4* 遺伝子の発現を解析した結果、*OsMADS4* 遺伝子の発現は *SPW1* 遺伝子により維持されることが明らかになり、イネにおいても *AP3/PI* 間のようなヘテロダイマー化による自己制御系が機能している可能性が示唆された。また *dl* 変異体における *OsMADS3* および *OM55* 遺伝子の発現、そして *osmads3* 変異体および *om55RNAi* 系統における *DL* 遺伝子の発現を解析した結果、*DL* とクラス C は独立に機能していることが示唆された。*om55RNAi* 系統では異常な心皮様器官が作られる。したがって *OM55* 遺伝子は正常な心皮形成にある程度必要であると考えられるが、この器官は依然心皮特有のキャラクターを持ち、*DL* 遺伝子の発現が観察された。また *osmads3* 変異体では正常なアイデンティティーを持つ心皮が作られる。したがってイネにおいてはクラス C 遺伝子の機能が無くても、*DL* によって心皮がある程度決定される可能性が示唆された。

4. 中肋形成における *DROOPING LEAF* 遺伝子の機能解析

dl 変異体においては、葉の中肋が形成されないという表現型も示す。このような変異体はこ

れまで高等植物において知られておらず、*DL* 遺伝子の機能を理解することは、葉の形態形成を理解する上でも重要であると考えられた。まず野生型および *dl* 変異体における中肋の発生様式を観察したところ、野生型においては P2 から P3 ステージの葉原基において、中央部の細胞が盛んに増殖し、葉の中央部が太く発達するのに対し、*dl* 変異体ではこの葉原基中央部における盛んな細胞増殖が観察されないことが明らかになった。次に野生型の葉原基における *DL* 遺伝子の発現を観察したところ、P1 から P4 ステージの葉原基の中央部に特異的な発現が観察された。さらに *DL* 遺伝子を植物体全体で過剰に発現する形質転換体を作成したところ、この系統においては、葉の中央部のみならず周縁部も厚く発達し、中肋状の構造を示すことが明らかになった。また、この *DL* 過剰発現個体における葉の発生様式を観察したところ、葉原基中央部に加え、周縁部においても盛んな細胞増殖を示す様子が観察された。以上の結果を総合すると、*DL* 遺伝子は葉原基中央部で特異的な細胞増殖を促進することにより中肋形成を制御するということが明らかになった。

DL は単子葉植物において唯一解析された *YABBY* 遺伝子である。シロイヌナズナの *YABBY* 遺伝子は、器官の背側の運命決定をするという共通の機能を持つと考えられている。しかしながら *DL* の発現パターンや過剰発現体の解析結果は、*DL* は背側の運命決定には関与しないことを示唆している。また、*DL* の相同遺伝子である *CRC* などの *YABBY* 遺伝子群は、*DL* のように中肋形成には関与していない。したがってイネ科植物の葉の中肋は、双子葉植物の葉の中央脈とは相同ではないと考えられる。このような *YABBY* 遺伝子の機能分化は、高等植物における葉の形態の多様性に深く関わっていると考えられる。

以上の研究を総合して、イネの花器官決定は以下のようなモデルにより説明されることを明らかにした。イネの花器官決定を説明するには *ABC* 遺伝子だけでは十分でなく、心皮の決定遺伝子として *DL* を加える必要がある。この *DL* は、クラス B 遺伝子と互いに負に制御し合う。また、2 つのクラス C 遺伝子は機能する領域がある程度分化しており、*whorl3* においては *OsMADS3* 遺伝子が、*whorl4* においては *OM55* 遺伝子がより重要な機能を持つ。また葉の中肋形成というユニークなイベントを制御する *DL* 遺伝子の機能を解明した。これらの研究により、植物発生遺伝学に新規の知見を提供することができたと考えられる。