

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 永千

本論文は、シロイヌナズナ種子成熟過程におけるジベレリン(GA)の生理機能の解析に関するもので、序章に続き四章で構成される。GAは種子発芽や茎部伸長など高等植物の様々な生理現象に関与する。特に、穀類種子の発芽過程では、胚乳中のデンプン分解へのGAの寄与が広く知られる。近年、茎部伸長過程についてもそのシグナル伝達経路の全貌が明らかになりつつある。一方、ヒルガオ科やマメ科など一部の双子葉植物では、種子成熟過程でGAが蓄積するがその役割は不明な点が多いが、ヒルガオ科のアサガオ種子の成熟初期においてGAが $\alpha$ -アミラーゼの誘導を介してデンプン粒の分解に関与することが示唆されている。申請者はシロイヌナズナ種子を対象として、アサガオ種子で確認された事象が双子葉植物に普遍的であるか否かを明らかにすることを目的として、組織化学的解析を中心に研究を展開した。

第一章は序章にあてられ、研究の背景と目的について述べ、第二章では種子成熟過程におけるGA生合成酵素遺伝子の発現状況を精査した結果について述べている。GA生合成酵素3-oxidase遺伝子と20-oxidase遺伝子に着目して長角果における発現状況をRT-PCRで解析した結果、*AtGA20ox2*, *AtGA20ox3*, *AtGA3ox1*, *AtGA3ox4*のみ発現を認めた。うち、*AtGA3ox1*は胎座を主な発現部位とし、残る3クローンは種子が主な発現部位であった。この3クローンを対象としてノーザン解析で発現時期を特定すると共に、*in situ*ハイブリダイゼーションにより、*AtGA20ox3*は珠皮内で、*AtGA20ox2*, *AtGA3ox4*は珠皮と胚の表層の2カ所での発現を明らかにした。

第三章では2種の変異株を用いて、目的にあった材料の調製について行った検討結果について述べている。GA生合成欠損変異株*gal-3*は内生GA量が減少しており、正常な発芽や稔実には適度なGA処理を要求する。このためGA処理濃度を調節して中程度のGA欠乏状況にある長角果を調製した。一方、*AtGA3ox4*の発現に関し未熟種子特異性を認め、T-DNA挿入ラインを入手してノックアウト(3ox4-K0)株を選抜した。

第四章では珠皮に存在するGAの機能を解析した。長角果切片を用いてヨウ素デンプン反応を行い、粒子状デンプンを珠皮内で検出した。これらは、各GA生合成酵素の遺伝子発現が活性化されて以降、次第に分解されることから、GAのデンプン消化への関与が示唆された。そこで、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子に焦点を当て発現様式を調べた。8種の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のうち、*Amy1-6*, *Amy1-7*, *Amy3*の3種のみ発現が認められ、中でも*Amy3*の発現レベルが最も高く、かつ、種子での強い発現を確認した。そこで、*in situ*ハイブリダイゼーションを行い*Amy3*の発現部位を解析した結果、*AtGA20ox2*や*AtGA3ox4*と同様に珠皮と胚の表層で発現していた。また、GA処理により*Amy3*発現量の増加を認めGA応答能も確認した。これらの結果について、GAは $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現を誘導し、珠皮デンプン粒の分解を促すと考えて矛盾がないと判断してい

る。続いて、3ox4-K0株を用いてデンプン粒の分解状況を野生種と比較し、有為にその分解過程の遅れを認めた。また、その種子中の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現状況として、*Amy3*をはじめ全クローンの発現量の低下も確認した。さらに、*gal-3*株と3ox4-K0株を用いて、走査型電子顕微鏡による種子表面の観察を行い、野生株で認められる六角模様の配列が両変異株においては、いずれも大きく乱れ、また、吸水時に膨潤するmucilageも不均一な膨潤を呈することが判明した。これらの結果から、珠皮におけるGAはデンプン粒の分解過程に関与して種子表面構造の形成に影響を及ぼすとの結論を得た。

第五章では胚の表層に着目した。変異株の形態観察から胚の表層に関する差異は特に確認できず、また、デンプン粒の存在も確認できなかったため、解明の手がかりを得るべくGA応答性遺伝子を網羅的に探索した。野生株と3ox4-K0株から同時期の種子を採取し、アレイチップを用いて両株間で有為に発現量に変化する遺伝子情報を収集した。これらは機能解明のための重要な基盤情報としての活用が今後期待される。

以上、本論文では、双子葉植物の種子成熟過程で存在するGAに関して、珠皮と胚の表層の各部位で生合成されることを初めて明らかにした。そして、珠皮ではアサガオ種子と同様、 $\alpha$ -アミラーゼの誘導を介してデンプン粒を分解すること、また、その分解過程の適切な進行が種子表面の形態形成に深く関わることを変異株との比較より明らかにした。これらの成果は学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。