

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻

平成 15 年度博士課程 進学

氏 名 川勝 泰二

指導教員 東京大学教授 長戸 康郎

### 論文題目 イネの葉間期制御に関する発生遺伝学的研究

葉は植物の生命活動に必須な光合成や蒸散などを行う地上部における最も重要な器官である。光合成機能の強化や受光体制の改良を目指した研究はなされているものの、葉の分化パターン・葉形そのものを改変しようとする試みはほとんどなされていない。イネの地上部の体制は葉の分化パターン、草丈、分げつによって決定されるが、分げつは葉腋に形成されるので、葉の分化パターンが大きな要因になっている。したがって、葉の分化パターンの制御機構を明らかにすることは、葉だけでなく、イネ全体の体制の決定機構に対して重要な知見を与えられと考えられる。本研究では、葉の時間的分化パターンの制御機構を明らかにすることを目的とし、葉間期(葉を分化する時間間隔)が短くなった変異体の解析を行った。

#### 1. 葉間期と葉の成熟速度を変更する *plastochron1*, *plastochron2* 変異体の解析

変異原処理した M2 集団から、葉間期が短くなる変異体を同定した。そのうち 3 系統は対立関係にあり、また既報の *PLASTOCHRON1* (*PLA1*) とは異なる遺伝子座に由来していたので、*plastochron2-1* (*pla2-1*), *pla2-2*, *pla2-3* とした。*pla2* は野生型及び *pla1* よりも短い葉を短い葉間期で分化していた。*pla2-2* の茎頂分裂組織 (SAM) は野生型よりも大きかったが、*pla1-4* よりも小さかった。*pla1*, *pla2* とともに野生型より高い細胞分裂活性を示したが、*pla2* の方が *pla1-4* よりも高かった。従って、SAM のサイズよりも、細胞分裂活性の方が葉間期と密接な関

連があると考えられる。生殖生長期において、*pla1* と同様に、*pla2* も節間伸長の異常により矮性を示したが、節間伸長パターンは *pla1* と *pla2* で異なっていた。また、*pla2* は、*pla1* と同様に、野生型では退化してしまう苞葉が過伸長し、一次枝梗原基がシュートに転換した。このことは、本来退化してしまう苞葉が栄養生長期の終了に重要であることを示唆している。また、*pla1 pla2* 二重変異体は、それぞれの単一変異体よりもシビアな表現型を示したことから、*PLA1* と *PLA2* は独立の経路で冗長的に機能すると考えられる。

野生型、*pla1*、*pla2* において、葉間期と葉のサイズの間に関連が見られた。このことは、葉の生長と葉間期に何らかの関係があることを示唆している。葉の生長過程を解析したところ、*pla1*、*pla2* の葉の短化は生長期間の短縮が原因であった。生長期間の短縮にもかかわらず、組織分化など葉の発生イベントは正常に行われていた。このことは、*pla1*、*pla2* では葉の成熟が早まったこと、従って *PLA1*、*PLA2* 遺伝子は葉の成熟の時間的制御に関わっていることを示している。実際、*PLA1* のコピー数を増加させた個体では、葉の成熟が遅くなり、葉間期が長くなっていた。

従来、葉序の決定に関し、若い葉原基が新たな葉原基の分化を抑制することが示唆されてきた。*pla1*、*pla2* で、葉の成熟の促進と葉間期の短縮が同時に観察されたことは、未熟な葉原基が新しい葉原基の分化を時間的にも抑制していること、成熟した葉では抑制効果が解除されていることを示している。生殖生長期において、*PLA1*、*PLA2* は苞葉の成熟を非常に強く抑制しており、野生型の苞葉は生長することなく退化してしまうが、*pla1*、*pla2* では、苞葉の成熟抑制がある程度解除されるために、短いながらも成熟が進むようになり、一次枝梗原基からシュートへの転換が起こると考えられる。

## 2. *PLASTOCHRON2* 遺伝子の単離と機能解析

*PLA2* 遺伝子の機能をさらに明らかにするために、*PLA2* 遺伝子の単離を行った。*pla2-1* ヘテロ個体とインディカ品種 Kasalath の F2 集団を用いたマッピングにより、*PLA2* は第 1 染色体長腕 158cM 付近の約 66kb 内に座乗していることが明らかになっていた。この領域には、*pla2* に類似した表現型を示すトウモロコシの *terminal ear1 (te1)* の原因遺伝子のオーソログが存在していた。野生型と *pla2* の 3 つのアリルについて、*TE1* オーソログの塩基配列を決定したところ、いずれのアリルにも塩基置換が存在した。*pla2-2* は台中 65 号由来、*pla2-3* は金南風由来であるが、両者は全く同じ部位に塩基置換が起きていた。*TE1* オーソログを含むゲノム断片を *pla2-1* ホモ個体に導入したところ、完全に表現型が相補された。したがって、*PLA2* は *TE1* のオーソログであり、分裂酵母における減数分裂のマスタースイッチである MEI2 様 RNA 結合タンパク質をコードしていることが明らかになった。MEI2 は、non-coding である meiRNA と結合することが報告されている

が、イネゲノム配列情報内において、meiRNA と高い相同性を示す配列は存在しなかったため、PLA2 は meiRNA とは異なる RNA と結合すると考えられる。

次に、PLA2 の発現パターンを解析した。PLA2 は、胚発生から発現しており、栄養生長期においては、葉を分化する SAM では発現せず、若い葉原基の頂部と葉縁部で強く発現していた。このことは、PLA2 は葉原基の頂部、葉縁部の成熟を抑制していることを示唆している。また、葉原基の分化速度は、SAM が直接制御しているのではなく、葉原基からのシグナルを介して制御されていると考えられる。生殖生長期になると、PLA1 が苞葉でのみ発現するのに対し、PLA2 は苞葉全体と花序分裂組織で発現するようになった。従って、PLA2 は、苞葉の成熟制御を介して花序分裂組織のアイデンティティを制御するだけでなく、花序分裂組織のアイデンティティを直接制御している可能性も考えられる。

### 3. *plastochron3* 変異体および原因遺伝子の解析

PLA1, PLA2 とは異なる遺伝子座 (PLA3) に由来する変異体 *pla3-1*, *pla3-2* を同定した。*pla3* は、*pla1* および *pla2* よりも更に短い葉間期を示した。*pla3* は、栄養生長期において、葉間期の短縮以外にも、胚の巨大化、休眠異常、葉の融合、SAM の分裂、葉による SAM の消費などの多様な表現型を示した。*pla3* においても、葉の成熟が早まっており、PLA3 は、PLA1 もしくは PLA2 と同様の機構によって葉間期の制御をしていると考えられる。生殖生長期において、*pla3* でも節間伸長パターンの異常、一次枝梗原基からシュートへの転換が起きていたが、節間伸長パターンは *pla1* のものと同様であった。また、*pla3-1/pla1-4* 二重変異体は *pla3-1* と区別がつかなかった。このことから、PLA3 は PLA1 の上流で機能すると考えられる。

PLA3 遺伝子の機能を明らかにするために、ポジショナルクローニングを行った。*pla3-1* ヘテロ個体とインディカ品種 Kasalath の F2 集団を用いたマッピングにより、PLA3 は第 3 染色体長腕 147cM 付近に座乗していることが明らかになった。この領域には、葉間期の短縮など多様な表現型を示すシロイヌナズナの変異体 *altered meristem program1 (amp1)* の原因遺伝子のオーソログが座乗していた。野生型と *pla3* の 2 つのアリルについて、AMP1 オーソログの塩基配列を決定したところ、いずれのアリルにも塩基置換が存在した。したがって、*pla3* の原因遺伝子は AMP1 オーソログであると考えられる。PLA3 はグルタミン酸カルボキシペプチダーゼをコードしており、小さいシグナルペプチドの生成に関わっていると考えられる。*amp1* では、サイトカイニン含量が増加しており、*pla3* の多様な表現型もサイトカイニンの異常が原因であることと考えられる。

次に、PLA3 の発現パターンを解析したところ、全ての器官において発現していた。し

たがって、*PLA3*は植物体全体で、様々なシグナルペプチドを生成することにより、多様な発生現象を制御していると考えられる。

#### 4. イネの A-type レスポンスレギュレーターの発現解析

サイトカイニンシグナリングにはTwo-Component-Signaling(TCS)と呼ばれる、普遍的なシグナル伝達系が用いられている。シロイヌナズナやトウモロコシではその主要因子の解析が進められているが、イネでは行われていないため、主要因子の 1 つである、*OsRRA*(*Oryza sativa response regulator, A-type*)を同定した。イネゲノム配列上には、13 の *OsRRA*が存在した。このうち、8 つの *OsRRA*はサイトカイニンに応答して発現が誘導された。サイトカイニン応答性の *OsRRA*の発現解析により、*pla*変異体におけるサイトカイニン含量を推定した。*pla1*, *pla2*, *pla3*のいずれの変異体でも、複数の *OsRRA*の発現が野生型に比べ、上昇していたことから、*pla*変異体のサイトカイニン含量が増加している可能性が示された。

以上、本研究では、イネの葉間期が短くなる *pla1*, *pla2*, *pla3* 変異体の解析により、*PLA* 遺伝子が葉の発生プログラムの時間的制御を介して葉間期を制御していることを明らかにした。これまでのシュート構築における研究では SAM から葉へのシグナルに重点が置かれていたが、本研究により葉の分化・発生のフィードバック機構の存在が明らかになった。*PLA1*, *PLA2*, *PLA3*のさらなる解析は、葉の分化・発生のフィードバックシグナルの正体を突き止め、しいてはイネのシュート構築機構解明の重要なキーになっていくと考えられる。