

## 論文内容の要旨

### 論文題目 Molecular genetic studies on meristem maintenance in *Oryza sativa*

イネのメリステムの維持制御に関する分子遺伝学的研究

氏名 寿崎 拓哉

#### <序論>

動物は成体におけるほとんどの器官が胚発生の過程で形成され、胚発生後にはおもに各器官の成長と成熟を行う。これとは対照的に、植物では、葉や花など成体のほぼすべての器官は、胚発生後にメリステム（分裂組織）から新たに形成される。したがって、メリステムの維持制御は、植物の発生・形態形成にとって極めて重要である。これまで、メリステムの制御機構については、真正双子葉類のモデル植物であるシロイヌナズナを中心にして分子遺伝学的な研究が進められ、CLAVATA (CLV) シグナル伝達経路が重要な機能を果たしていることが明らかにされてきた。しかし、他の植物に関しては、ほとんど未解明のままである。そこで本研究では、単子葉類のモデル植物であるイネを研究材料とし、メリステムの維持制御に重要な役割を果たしている *FLORAL ORGAN NUMBER1 (FON1)* および *FON2* 遺伝子の機能解析を行うことを目的として研究を進めてきた。さらに、それを発展させ、イネのメリステム維持制御の遺伝的機構を包括的に理解するための研究を進めた。

#### <結果と考察>

##### 1. レセプター様カイネースをコードする *FON1* 遺伝子の機能解析

*fon1* 変異体では花器官数が増加している。*fon1* 変異体の花の初期発生を調べたところ、花分

裂組織のサイズが増大していることが判明し、花器官が形成される場が増大することにより、花器官数が増加することが明らかとなった (図 1B, E, F). ポジショナルクローニング法による遺伝子単離の結果、*FON1* は leucine-rich repeat (LRR) 型のレセプター様カイネースをコードしていることが判明した (図 2A). *in situ* ハイブリダイゼーションによる時間的・空間的発現パターンを解析した結果、*FON1* は花分裂組織をはじめとして、シュート頂 (茎頂) や花序分裂組織など、メリステムに特異的に発現していることが明らかとなった (図 3A, B). また、遺伝子の系統解析の結果、*FON1* はシロイヌナズナのメリステムの維持制御に関わる *CLV1* のイネのオルソログに相当することが明らかになった. したがって、本研究により、メリステムの維持制御の遺伝的機構の基本骨格が被子植物一般に保存されている可能性が強く示された.

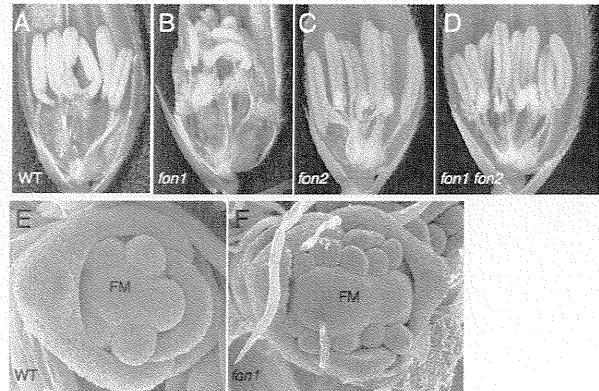


図 1 *fon1* および *fon2* 変異体の表現型. (A-D) 花の表現型. (E-F) 花の初期発生. *fon1*, *fon2* 変異体では花分裂組織のサイズが増大した結果、花器官数が増加する. FM, 花分裂組織.

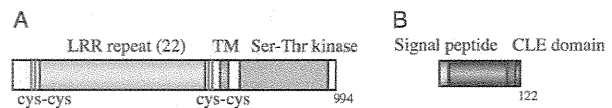


図 2 *FON1* および *FON2* 遺伝子がコードするタンパク質. (A) *FON1*. (B) *FON2*. *FON1* は LRR 型のレセプターカイネースをコードし、*FON2* は CLE ドメインをもつペプチド性のシグナル分子をコードしている.

## 2. ペプチド性シグナル分子をコードする *FON2* 遺伝子の機能解析

*fon2* 変異体は *fon1* 変異体と類似した表現型を示し、花分裂組織のサイズが増大していた. *fon2* と *fon1* の 2 重変異体を作製したところ、相加的な表現型を示さなかったことから、*FON2* と *FON1* は遺伝的に同一の経路で機能することが示唆された (図 1D). 次に、*FON2* 遺伝子を単離した結果、*FON2* は CLE ドメインをもつペプチド性シグナル分子をコードしていることが明らかとなった (図 2B). *FON2* は地上部のすべてのメリステムにおいて、幹細胞と推定される領域で発現し、*fon1* 変異体ではその発現領域が拡大していた (図 3C-E). したがって、*fon1* 変異体では幹細胞の領域が増大していると考えられる. また、*FON2* を過剰発現させた植物では、花器官数が極度に減少し、メリステムのサイズが著しく縮小していることが示唆された (図 4A-C). この *FON2* 過剰発現の効果は *fon1* 変異体では全く見られないため、*FON2* の機能には *FON1* が必要であることが示され、2

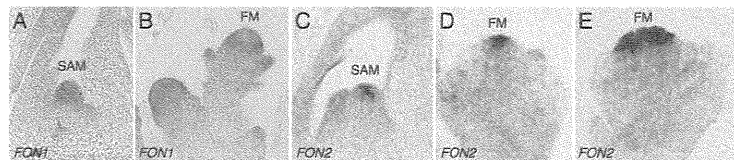


図 3 *FON1* および *FON2* 遺伝子の発現パターン. (A-D) WT. (E) *fon1*. *FON1* は地上部のメリステム全体で、また *FON2* は幹細胞に相当する領域で発現がみられる. また、*fon1* 変異体では *FON2* の発現領域が拡大している. SAM, シュート頂分裂組織. FM, 花分裂組織.

重変異体の結果とも一致した (図 4D). FON2 と FON1 がコードするタンパク質と, 遺伝学的・逆遺伝学的な解析により得られた結果から, FON2 と FON1 が同一のシグナル伝達経路のリガンドとそのレセプターとして機能することが推定されるとともに,

FON2-FON1 のシグナル伝達経路はメリステムの幹細胞の増殖を負に制御していることが示された. この FON2-FON1 の遺伝的關係はシロイヌナズナのメリステムの幹細胞の制御における CLV3-CLV1 の遺伝的關係と類似している. 一方, *fon1* および *fon2* 変異体では, シュート頂や花序などのメリステムでは大きな異常が見られず, この点は, シロイヌナズナのメリステム制御とは大きく異なっている. 以上の結果を総合して, FON の経路とは冗長的に機能する第 2 のシグナル伝達経路 (X をリガンド, Y をレセプターと仮定した X-Y 経路) の存在を想定し, イネのメリステムを制御する遺伝的モデルを提唱した (図 6).

### 3. シュート頂メリステムと根端分裂組織の維持制御に関わる *FCP1* 遺伝子の機能解析

第 2 の経路のシグナル分子を明らかにすることを目的とし, CLE ドメインをもつペプチド性シグナル分子をコードし, FON2 に類似性の高い FON2-LIKE CLE PROTEIN1 (*FCP1*) に関する機能解析を行った. まず, *FCP1* を過剰発現させると, シュート頂分裂組織の維持を正常に行うことができなかつた (図 5A-E). この結果は, *FCP1* が第 2 の経路のリガンド (X) に相当し, シュート頂分裂組織の維持制御に関わっていることを示唆している. さらに *FCP1* の CLE ペプチド添加実験の結果から, *FCP1* が根端分裂組織の維持制御にも関わることを示唆された (図 5F-I). シュート頂および根端分裂組織に対する *FCP1* の作用には, FON1 が必要ないことも判明し, *FCP1* は独自のレセプターを必要とすることが示唆された. さらに, *FCP1* と FON2 の作用の違いを決定する重要なアミノ酸を同定することに成功した.

### 4. *fon2* 変異のサプレッサーの単離とその機能解析

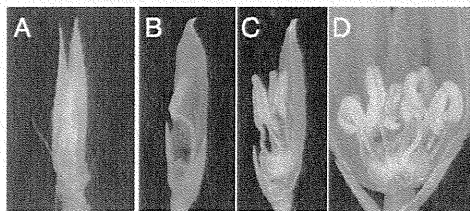


図 4 *FON2* 遺伝子構成的発現体の表現型. (A-C) *ACTIN:FON2/WT* の花. (D) *ACTIN:FON2/fon1* の花. *FON2* を構成的に発現させると花器官数が減少する. しかし, *fon1* 変異存在下ではこの影響はみられない.

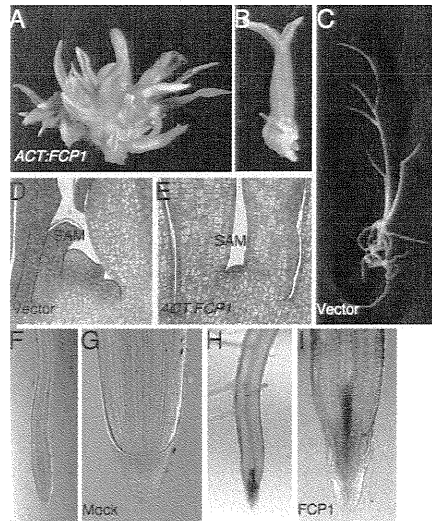


図 5 *FCP1* 遺伝子構成的発現体の表現型と *FCP1* CLE ペプチド投与の影響. (A-C) イネ幼苗の表現型. A-B, *ACTIN:FCP1*; C, Vector control. (D, E) シュート頂. (F-I) 根. *FCP1* を構成的に発現させると SAM のサイズが減少し, SAM の維持を正常に行うことができず, 幼苗致死となる. また, *FCP1* の CLE ペプチドを与えた植物では根端分裂組織のサイズが減少する. SAM, シュート頂分裂組織.

ポジショナルクロニング法により、*FON2* を単離する過程で、インディカの遺伝的背景がジャポニカの *fon2* 変異を抑圧している可能性が示唆された。そこで遺伝学的・分子生物学的な解析を進めた結果、*fon2* サプレッサーとして、FON2 SPARE (FOS2) と名付けたペプチド性シグナル分子を同定した。インディカの FOS2 は *fon2* と *fon1* 両方の変異を抑圧した。この結果は、FOS2 が FON2-FON1 のシグナル伝達経路とは異なる経路のシグナル分子としてメリステムの制御に関わることを示唆している。また、ジャポニカの栽培種では FOS2 の機能が喪失あるいは低下していることを示唆しており、イネにおけるメリステム制御の多様性と複雑性が示唆された。さらに、FOS2 の構成的発現体の解析と FOS2 の CLE ペプチドの添加実験の結果から、FOS2 が花分裂組織だけではなく、シュート頂分裂組織と根端分裂組織の維持制御にも関わることを示唆された。

### <結論と展望>

本研究では、遺伝学・分子生物学的手法を用いて、イネのメリステムの制御に関わる遺伝子の単離とその機能解析を行った。その結果、イネにおいては、シロイヌナズナと基本的には同じ遺伝的制御により、メリステムの維持制御が行われていることが明らかになった。その一方で、ジャポニカを除くイネでは、少なくとも3つの並列なシグナル伝達経路の組み合わせによりメリステムが維持制御されていることが明らかとなった。これら

の各シグナル伝達経路はシュート頂、花序、花の地上部の各メリステムに対して、それぞれ貢献度が異なっていると考えられる(図6)。このイネのメリステムの複雑な遺伝的制御機構は、CLVの単一なシグナル伝達経路により地上部のすべてのメリステムが制御されているシロイヌナズナとは大きく異なっている。今後は、FCP1の花および花序のメリステムにおける機能を明らかにするとともに、FCP1やFOS2のレセプターを単離し、イネのメリステムの遺伝的制御機構をより詳細に明らかにすることにより、高等植物のメリステムの制御の共通性・多様性がより明確になっていくことが期待される。

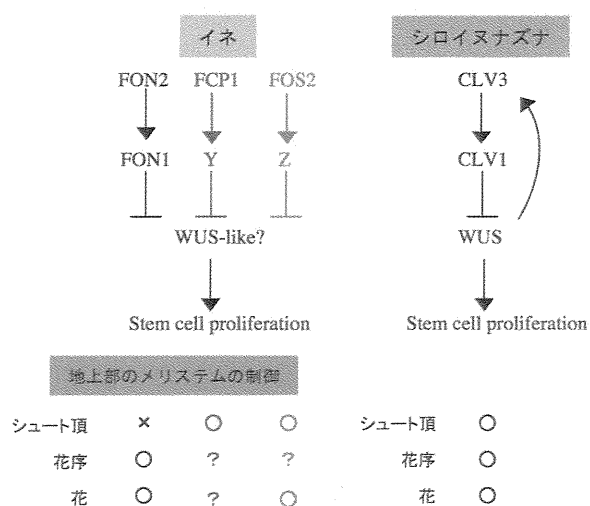


図6 イネとシロイヌナズナのメリステムの維持制御モデル。ジャポニカを除くイネでは、少なくとも3つの並列なシグナル伝達経路の組み合わせによりメリステムが維持制御されている。これらの各シグナル伝達経路はシュート頂、花序、花の地上部の各メリステムに対して、それぞれ貢献度が異なっていると考えられる。このイネのメリステムの複雑な遺伝的制御機構は、CLVの単一なシグナル伝達経路により地上部のすべてのメリステムが制御されているシロイヌナズナとは大きく異なっている。