

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻
平成14年度博士課程 入学
氏名 小松 契史
指導教員名 経塚 淳子

論文題目 イネの腋芽分裂組織形成に関する分子遺伝学的研究

枝分かれは、植物の地上部での形態を規定する大きな要因の一つである。枝分かれは、葉の向軸側腋部に新しく分裂組織が形成され、それが分化・生長する現象である。この新しく生み出される分裂組織は腋芽分裂組織と呼ばれ、胚発生の段階で形成される1次分裂組織とほぼ同じ性質を持つと考えられている。枝分かれの段階は、腋芽分裂組織が形成される段階と、確立した腋芽が休眠状態に置かれるか生長し成熟した枝になるかを決定づけられる段階に分けられる。本研究では、枝分かれの最初の段階である腋芽分裂組織の形成に焦点を絞り、イネを材料に枝分かれ現象を遺伝子のレベルで理解することを目的とし実験を進めた。

第1章 腋芽分裂組織が形成されない *lax* 変異体

イネにおける栄養生長期の枝分かれは分けつと呼ばれ、生殖生長期の枝分かれは穂の枝梗や側生穎花の分化に相当する。第1章では、分けつの形成や穂の枝分かれに欠失が起きるイネの *lax panicle (lax)* 変異体の表現型を解析した。

栄養生長期の表現型に関して、シオカリ品種である *lax-1* 変異体、および *lax-2* 変異体では葉齢の若い葉で分げつ芽が欠失していた。日本晴品種である *lax-3* 変異体、金南風品種である *lax-4* 変異体、台中 65 号品種である *lax-5* 変異体では、葉齢の若い葉で分げつ芽が欠失したあと、しばらくは正常な分げつ芽の形成が続くが、出穂前の段階で再び分げつ芽の欠失が起きる。また、*lax-3*、*lax-5* 各変異体に関して、野生型に比べ変異体では抽出している葉が数枚多かった。それぞれの野生型と変異体と出穂期は変わらないため、*lax-3*、*lax-5* 変異体では葉間期が短くなったと考えられる。

生殖生長期の表現型に関して、*lax-1* 変異体では、枝梗と頂端穎花の分化は正常であるものの、側生穎花の分化が抑制されていた。*lax-2* 変異体では、側生穎花に加え、枝梗の分化も抑制されていた。また、頂端穎花も正常に分化しなかった。*lax-3* 変異体も、*lax-2* 変異体と同様に、枝梗、側生穎花の減少と頂端穎花の異常分化が起きていた。*lax-4*、*lax-5* 変異体では、枝梗、頂端穎花は正常に分化するが、低頻度で側生穎花の欠失が認められた。

以上、それぞれのアレルについてまとめると、*lax-2*、*lax-3* 変異体が強い表現型を示すアレル、*lax-1* 変異体が中間型、*lax-4*、*lax-5* 変異体が弱いアレルであった。

次に、*lax* 変異体において腋芽分裂組織が欠失していることを確認するため、分裂組織のマーカー遺伝子である *OSHI* の発現を組織レベルで観察した。*lax-2* 変異体の枝梗分化期茎頂において、胚発生時に形成される 1 次分裂組織および維管束柔細胞では *OSHI* の発現が観察されたが、それ以外の場所では発現が観察されなかった。さらに、若葉の分子マーカーとして *PLA1* の発現を *lax-2* 変異体の枝梗分化期茎頂で観察したところ、野生型と同様に葉原基分化予定領域で発現していた。形態面でも *lax* 変異体では、ブラクトの形成は確認される。以上のことより、*lax* 変異体は葉の分化までは正常に進行するが、その後の腋芽分裂組織が形成されない変異体であることが示された。

第 2 章 *LAX* 遺伝子の単離と機能解析

腋芽分裂組織の形成を遺伝子レベルで理解するために、ポジショナルクローニング法により、*LAX* 遺伝子の同定を試みた。*lax-2* 変異体イネ（シオカリ品種、日本型）と野生型イネ（カサラス品種、インド型）の交雑 F2 世代を材料に *LAX* 遺伝子の座上部位を決定したところ、第 1 染色体長腕部の約 82kbp の領域に *LAX* 遺伝子が座場していることが判明した。この領域内に存在する ORF のシーケンス

により、*LAX* 遺伝子の単離が終了した。

LAX 遺伝子は、N 末端側に bHLH ドメインを持つ 215 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、その翻訳産物は転写因子として機能すると予測された。*LAX*-GFP 融合タンパク質によるタマネギ表皮細胞での局在解析により *LAX* タンパク質が核内に局在することが確認されたことから、*LAX* タンパク質は転写因子として機能すると考えられる。*LAX* 遺伝子は、シロイヌナズナには存在しておらず、今のところ、トウモロコシの *ba1* 遺伝子が *LAX* 遺伝子のオーソログであると報告されている。*LAX* 遺伝子は、イネ科に特有に存在する遺伝子なのかもしれない。

lax 変異体の各アレルにおける *LAX* 遺伝子内への変異部位は、*lax-1* 変異体では、遺伝子にトランスポゾン様配列が挿入されており、*LAX* の翻訳途中でストップコドンが生じてしまう。そのため、もし *lax-1* 変異体でタンパク質が翻訳されているならば、C 末端側の 65 アミノ酸はなくなるものの、転写制御に重要な役割を果たす bHLH ドメインは含むタンパク質となる。*lax-2* 変異体では、*LAX* 遺伝子を含む約 36kbp の領域が欠失していた。このため、*lax-2* 変異体は、*LAX* の完全な機能欠失変異体と考えられる。*lax-3* 変異体では、bHLH ドメインに 59bp の塩基欠失が起きており、bHLH ドメインの途中からフレームシフトしたタンパク質が合成されると推測される。このため、*lax-3* 変異体は、*lax-2* 変異体と同様に、*LAX* の完全な機能欠失変異体と考えられる。*lax-4*、*lax-5* 変異体では、それぞれ N 末端側に 1 塩基置換を原因とする 1 アミノ酸置換が起きていた。以上の変異の強弱は、変異体の表現型の強弱と相関関係にある。

in situ hybridization 法により *LAX* mRNA の組織内の局在解析を行った。その結果、*LAX* mRNA は、栄養生長期において分げつ原基が形成される際にも、生殖生長期において枝梗や側生穎花が形成される際にも、主茎と腋芽分裂組織が形成される領域の境界部で層状に発現していた。以上のことから、イネにおけるすべての枝分かれが共通の分子機構によって制御されていることが示唆された。

また、胚発生における茎頂分裂組織、根端分裂組織の形成時には、*LAX* mRNA の発現は観察されなかった。このため、*LAX* 遺伝子は腋芽分裂組織の形成に特異的な遺伝子であることが示唆された

第 3 章 分子マーカーを用いたイネの栄養生長期における腋芽分裂組織形成過程の解析

腋芽分裂組織形成過程のどの段階に *LAX* が関与しているのかを検討するため、

分げつ原基が形成される際の *LAX* の発現のタイミングと分裂組織のマーカー遺伝子である *OSHI* の発現のタイミングの比較を行った。枝梗分化期の茎頂ではなくて分げつを用いた理由は、穂の複雑な分化様式に比べ、分げつはシンプルな互生分化として生ずるからである。

分げつ原基を材料に腋芽分裂組織形成の解析を行ったところ、腋芽分裂組織が形成される予定領域で、最初に *OSHI* の発現が確認された。その後、将来、腋芽分裂組織となる細胞群が分裂し膨らみを作り始める時に *LAX* の発現が始まった。その後、腋芽分裂組織がはっきりとした膨らみにまで生長した段階では、*OSHI* の発現を囲うように *LAX* は層状の発現を示した。これらのことは、*LAX* が発現を開始する前に腋芽分裂組織が形成される領域では分裂組織能が確立していることを示す。以上のことより、腋芽分裂組織形成において、*LAX* は、分裂組織能の誘導ではなくて、新しく確立した腋芽分裂組織の形成をより先に進める促進役を担っていると考えられた。

以上、本研究では、*LAX* 遺伝子が、イネの栄養生長期においても、生殖生長期においても腋芽分裂組織の形成に重要な働きをすることを報告した。イネにおいて、腋芽分裂組織の形成に関わる遺伝子は、*LAX* 遺伝子の他に *MOC1* 遺伝子のみが報告されているに過ぎない。また、トウモロコシ、シロイヌナズナ、トマトでも同様に腋芽分裂組織形成に関与する遺伝子が報告されているが、種の違いもあり、それぞれの遺伝子間の関係は不明な点が多い。また、近年、オーキシシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンが分裂組織や器官原基の発生に重要な役割を果たしていることが報告されている。今後は、それぞれの遺伝子がコードするタンパク質の働きを解析すると同時に、植物ホルモンと腋芽分裂組織形成の関係について解析することも、枝分かれを遺伝子のレベルで理解するための研究課題になると考えられる。