

論文内容の要旨

Studies on regulation of *DROOPING LEAF* gene expression and midrib formation in *Oryza sativa*

イネ *DROOPING LEAF* 遺伝子の発現制御と葉の中肋形成に関する研究

大 森 良 弘

<序論>

イネ科植物の葉では、中肋と呼ばれる構造が、薄く細長い葉を直立させるために重要な役割を担っている。中肋とは葉の主脈部に沿って形成される強い構造体である。イネ (*Oryza sativa*) では、*DROOPING LEAF (DL)* 遺伝子が中肋形成に必須な遺伝子として単離されている。dl変異体では完全に中肋が欠失し、著しく垂れ葉になるとともに、心皮 (雌ずい) が雄ずいにホメオティックに変異する。DLは、中肋予定領域と心皮予定領域で特異的に発現し、それぞれの細胞の運命を決定すると考えられている (Yamaguchi et al., 2004)。博士課程では、2つの特異的な領域で発現するユニークなDLの発現制御機構、および、DLの発現制御と中肋形成との関連を解明することを目的に研究を行った。

<結果および考察>

1. イネ科植物におけるDLオーソログの発現パターン解析と phylogenetic footprinting 法による非コード領域保存配列の検出

DLは種子植物に特異的なYABBY 遺伝子ファミリーに属し、シロイヌナズナではCRABS CLAW (CRC) 遺伝子が対応するオーソログである。シロイヌナズナのCRCの発現パターンや機能は、イネのDLとは大きく異なっている。そこで、イネ科内でのDLオーソログの保存性を確かめるために、キビ亜科に属するソルガム (*Sorghum bicolor*) からDLオーソログ (*SbDL*) を単離し、その空間的発現パターンを解析した。その結果、*SbDL*もイネのDLと同様に中肋予定領域と心皮予定領域で特異的に発現することが明らかとなった。この結果は、これまで当研究室が明らかにしてきたトウモロコシ (*Zea mays*) やコムギ (*Triticum aestivum*) のDLオーソログの発現パターンとも一致しており、DLの発現制御機構がイネ科植物の間で広く共通していることを示し、DLの機能が保存されていることを強く示唆している (2)。

次章では、DLの時間的・空間的発現パターンを制御するシス領域の同定を試みた。イネは世代時間が長く、形質転換植物作製にも相当の期間を要する。そこで、phylogenetic footprinting 法により、イネ科DLオーソログの非コード領域保存配列 (conserved non-coding sequence; CNS) の検出を試みた。CNSが存在すれば、その配列は発現制御に関わっている可能性があると考えられる。その結果、プロモーター領域に3カ所、第1イントロンおよび第2イントロンにそれぞれ1カ所、計5カ所、4種の DL で CNS が検出された。

2. DLの中肋予定領域特異的発現を制御するシス領域の探索

Phylogenetic footprinting 法により検出されたCNSを指標にGUSレポーターコンストラクトを作製し、DLの中肋予定領域特異的な発現を制御する因子の探索を行った。その結果、プロモーター領域を -147 bpまで欠失させても中肋予定領域特異的なGUSの染色パターンは維持されること、第1イントロンを欠失させた場合にはGUSの染色が弱くなること、第2イントロンを欠失させた場合には初期発現や中肋予定領域特異性が失われることが明らかとなった。一方で、これまでのコンストラクトでは維管束において異所的なGUSの染色が見られた。そこで、約6 kb上流に検出された保存領域をも含む、大きなGUSレポーターコンストラクトを作製し導入したところ、維管束におけるGUSの染色が抑制された。以上の結果から、DLの中肋予定領域特異的発現には、葉原基初期の発現誘導、中肋予定領域特異的発現、発現量の維持、ならびに維管束における発現抑制が存在することが明らかとなった。一方、DG1を用いた場合でも、心皮におけるGUSの染色は見られなかった。このことから、心皮特異的な発現を制御する領域は、コード領域の遙か上流、あるいは、下流に存在すると考えられる。

中肋予定領域での発現を制御する領域を絞り込むため、第2イントロン内を欠失させたコンストラクトを作製し、同様のGUSレポーター解析を行った。その結果、第2イントロン内のCNSの中でも、200 bpからなる R, S 領域に、葉原基初期から中肋予定領域で特異的に発現を制御するシス因子が存在することが明らかとなった (3)。現在、これら塩基配列に結合するトランス因子を解析中である。

3. 中肋形成におけるDL遺伝子の機能解析

これまでのイネDLの研究から、「DLは、葉原基の中央領域で向背軸に沿った細胞増殖を制御し、その増殖した細胞から中肋が形成される」という仮説が立てられている。本研究では、この仮説をさらに確証するために、2つの弱い*dl*変異体とDLタンパク質の人為的機能増強形質転換体を用いて、発生遺伝学的な解析を行った。

まず、新たに弱い垂れ葉を示す変異体を単離し、*dl-5*と名付けた (1)。*dl-5*ではDLの第4イントロンにトランスポゾン*Ping*が挿入していることが判明した。これは、*Ping*が植物体で転移することを示す初めての証拠でもある。DLの発現を解析した結果、*dl-5*では*Ping*の挿入によりスプライシング効率が低下し、正常なDL mRNAの量が低下していることが明らかになった。また、これまでに報告されている弱い*dl*変異体である*dl-1*では、*dl-5*よりもさらにDLの発現量が低いことを示した。野生型とこれら2つの弱い *dl* 変異体の茎頂部横断切片を作製し観察したところ、これらの系統間では、葉の向背軸に沿った細胞増殖程度が異なっており、その程度はDLの発現量と相関していることが明らかになった。また、最終的に形成される中肋の大きさは、細胞増殖の程度と発現量とも関連していた。以上の結果は、DLが向背軸に沿った細胞増殖を制御しているという仮説を強く支持するとともに、DLの活性に依存して中肋の大きさが決定されることを示唆している。

そこで、人為的に中肋構造を強化することを目的として、ヘルペスウイルス由来の強い転写活性化機能を持つVP16ドメインとDLとの融合タンパク質 (DL-VP16) を作製し、2章で明らかにした中肋予定領域特異的発現制御領域を用いて形質転換体を作成した。その結果、形質転換体は野生型よりも直立した草型を示した。葉身の横断切片を作製したところ、形質転換体では形成される中肋が野生型よりも大きくなり、野生型では中肋が見られない葉の先端部まで中肋を持つことを明らかにした。この結果は、DLの機能を制御することにより、中肋構造の大きさや葉の直立性を改変することが可能であることを示している。

<結論および展望>

本研究では分子生物学的、遺伝学的手法を用いて、イネの中肋形成に関わる*DL*の発現制御機構の解析を行った。その結果、*DL*の機能はイネ科植物に広く保存されていることを示唆した。また、中肋予定領域特異的な遺伝子発現は第2イントロン内の200 bpの領域により制御されることを明らかにした。今後はこの200 bpに作用するトランス因子を単離することで、中肋形成機構が明らかになっていくと期待される。葉の直立性は、日光の有効な利用、耐倒伏性、栽培面積の縮小とも関連しているため、本研究成果は、イネの分子育種による収量増加という応用面でも役立つと考えられる。