

# 論文審査の結果の要旨

氏名 坂口 潤

本論文は6章からなり、第1章では、Preface として、この研究の背景と研究を始めるにあたっての動機を述べている。第2章では本研究で使われた材料と方法について記述されている。第3、4、5章は研究の結果とその考察であり、第3章では、単子葉植物のイネとトウモロコシを用いて「平行脈と連絡脈から構成されるあみだくじ状の葉脈パターン」の形成過程を追跡し、第4章ではイネの葉脈パターンに一部過剰な形成を示す変異体 *coe1* の単離とその原因遺伝子の同定、そして植物ホルモンの一種であるオーキシンとイネの葉脈パターンの関係について、第5章では、*coe1* 変異体と植物ホルモンであるブラシノステロイドとの関係が述べられている。第6章では得られた結果を受けて、総合的にイネの葉脈パターン形成を制御する *COE1* 遺伝子の機能と植物ホルモンの作用について考察している。

論文提出者は、まず、単子葉植物の基部領域の連続切片を作成して、形成途中の葉の組織切片を連続して観察することで、葉脈の組織分化・パターン形成を詳細に観察することから始めた。この観察の結果、平行脈は周縁部に1層の細胞層を持つ前形成層を形成し、次にその内部に葉の表裏に沿って極性を持って原生木部と篩部組織が分化し、後生木部の分化を経て円周部の細胞層が鞘構造となって維管束を包むことを明らかにした。更に、連絡脈の形成時期とその開始位置が平行脈の発生に密接に関連することを初めて明らかにした。この結果は、単子葉植物の葉脈パターン形成における基本的な仕組みを提供するものとして、高く評価された。

続いて、論文提出者はイネの葉脈パターンに異常を示す変異体の探索を行った。その結果、連絡脈の形成間隔が変わる変異体を11ライン単離することに成功した。このうち、連絡脈の形成間隔が狭くなる表現型を示した変異体（連絡脈の密度が高まる表現型から *commissural vein excessive 1; coe1* と名付けた）に着目し、研究を進めた。*coe1* 変異体は、連絡脈の形成間隔が野生型の2/3程度に狭くなることに加え、10%程度の頻度で塊状の連絡脈を形成することを見いだした。この変異体の原因遺伝子を同定するために、ポジショナルクローニングを行い、Os08g0442700 遺伝子上に1塩基置換を見出した。野生型のOs08g0442700 遺伝子を *coe1* 変異体に導入することにより、その表現型が回復したことから、Os08g0442700 遺伝子が *coe1* 変異の原因遺伝子であると確定した。Os08g0442700 はロイシンの繰り返し配列をリガンド受容部にもつ膜貫通受容体キナーゼ (LRR-RLK) をコードしていた。遺伝学的な解析のために、この遺伝子の他のアレルをデータベースから探索し

た。その結果、*COE1* 遺伝子に T-DNA 挿入がされた 2 ラインを見いだした。これらを取り寄せて、その性質を調査した。その結果、連絡脈形成に *coe1* 変異体と同様の表現型を示したことから、これらを *coe1* 変異体のアリルとして解析を進めた。3 ラインの *coe1* 変異体の塊状の連絡脈の形成頻度を比較した結果、初めに単離された *coe1-1* では 10%弱だったのに対し T-DNA 挿入された *coe1-2*、*coe1-3* は 40%強という高い頻度を示すことを明らかにした。更にその形成距離の分布調査から、*coe1-2*、*coe1-3* では野生型や *coe1-1* にみられる分布ピークが消失していることを明らかにした。この結果から連絡脈の形成位置の決定は *COE1* を介した抑制的な制御機構が深く関わることを示した。次に植物ホルモンの一種であるオーキシンと連絡脈の形成間隔の関連について調査した。その結果、野生型のイネでは培地中のオーキシン濃度に比例して連絡脈の形成間隔が広がることを明らかにした。一方で *coe1* 変異体は連絡脈の形成間隔に関してオーキシンに非応答だったことから *COE1* はオーキシンシグナルの下流で機能する可能性が示唆された。この成果は、葉脈パターン形成機構における抑制的な制御機構の存在を初めて具体的に提示したものであり、高く評価された。

次に、論文提出者は、植物ホルモンの一種であるブラシノステロイドと連絡脈の形成間隔の関連について調査した。その結果、*coe1* 変異体は半矮性や節間伸長の低下など一部のブラシノステロイド応答に関わることが示された。次に、ブラシノステロイド受容体に変異を持つ *d61* 変異体の解析と野生型イネへのブラシノステロイド添加実験を行い、ブラシノステロイドもまた連絡脈の形成間隔の制御に関与することを明らかにした。一方で、塊状の連絡脈形成にブラシノステロイドは抑制的に働くことを明らかにした。このように、論文提出者は、*COE1* はブラシノステロイドシグナルの一員として、連絡脈の間隔制御に働く可能性を世界に先駆けて提案することに成功した。

本論文中で得られた結果を統合的に考察し、論文提出者は、*COE1* は近傍での連絡脈形成の阻害シグナルとして働き、オーキシンシグナルとブラシノステロイドシグナルはその下流にある *COE1* を正に制御することで連絡脈の形成間隔を制御するというモデルを提示した。この *COE1* を介した連絡脈の形成間隔の制御機構のモデルは、葉脈パターン形成機構における空間的な抑制機構とそれに対する植物ホルモンの働きを理解するための新規のアイデアを提案するもので、高く評価された。

なお、本論文第 3 章は福田裕穂氏と、4 章は伊藤純一氏、伊藤幸博氏、山口（中村）郁子氏、澤進一郎氏、福田裕穂氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上、ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うのに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、坂口潤提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。