

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小林 薫

花序の基本構造は、メリステムの花アイデンティティ獲得パターンによって決定される。これまでの研究で、花メリステム形成を決定する「花アイデンティティ遺伝子」が明らかになった。イネの穂は分枝上に花（小穂）を形成するため、分枝形成から花形成への切替えが穂の形態を決定する。イネ科植物に特徴的な構造である小穂の進化も興味深い問題である。さらに、イネ科植物の花序形態の制御は穀物生産上も重要である。本研究では、イネの穂形成を制御する遺伝子メカニズムの解明を目指した。

第1章では、小穂形成が抑制される劣性突然変異体 *panicle phytomer 2-1 (pap2-1)* を解析した。*pap2-1* 変異体のもっとも顕著な異常は枝梗の増加である。特に2次枝梗が増加し、さらに野生型にみられない3次枝梗形成も認められた。このため、*pap2-1* では小穂アイデンティティの決定が遅れると解釈し、*PAP2* が小穂形成を促進する遺伝子であると考えた。*PAP2* 遺伝子を単離した結果、*PAP2* は *OsMADS34* をコードすることが明らかとなった。*PAP2* を過剰発現すると、2次枝梗数が減少し、1次枝梗の側生器官数も減少した。この表現型から、*PAP2* 遺伝子の発現増加により小穂形成が促進されると考えられた。*PAP2* 遺伝子の発現シグナルは生殖成長相の茎頂メリステム、小穂メリステム予定領域および副護穎の先端で検出された。以上の解析により、*PAP2* がイネの穂形成においてメリステムに小穂としての属性を付与する小穂アイデンティティ遺伝子であると結論した。

高等植物の *SEP* 遺伝子は *LOFSEP* と *SEP3* サブグループに分けられる。イネの5つの *SEP* 遺伝子のうち、*PAP2*、*OsMADS1*、*OsMADS5* が *LOFSEP*、*OsMADS7* と *OsMADS8* が *SEP3* サブグループに分類される。*SEP* 遺伝子の発現パターンを調べた結果、*PAP2* は小穂メリステム、*OsMADS1* と *OsMADS5* は小花メリステム、*OsMADS7* と *OsMADS8* は分化中の花器官で発現し、小穂形成過程で5つの *SEP* 遺伝子が異なるタイミングで発現することが示された。機能未知の *OsMADS5* について、*OsMADS1* との二重変異体の表現型観察した結果、*osmads1 osmads5* 二重変異体では *osmads1* の異常が亢進され、護穎状器官の形成が反復された。このため、*OsMADS5* は *OsMADS1* と冗長的に小花アイデンティティ、外穎と内穎の成長、小穂の有限性を制御することが明らかとなった。*OsMADS7* と *OsMADS8* を同時に発現抑制すると、鱗被より内側のすべての花器官において顕著な異常が生じ、雌蕊分化が反復したため、*OsMADS7* と *OsMADS8* は花器官形成を抑制することが示された。第2章では、イネの5つの *SEP* 遺伝子がサブグループごとに異なるタイミングで発現、機能することで小穂形成を制御することを明らかにした。

花序形成のはじめの段階は生殖成長相への相転換である。*PAP2* は茎頂メリステムの生殖成長相への相転換に伴って茎頂メリステムで発現することが明らかとなり、*PAP2* の相転換への関与が

示唆された。しかし、*pap2-1* の相転換は正常であるため、*PAP2* は他の遺伝子と協調的に機能する可能性がある。転換期の茎頂メリステムにおける遺伝子発現のマイクロアレイ解析によって、*OsFULs* (*OsMADS14*, *OsMADS15*, *OsMADS18*) が *PAP2* と同じ時期に発現することが明らかとなった。*pap2-1* で *OsFULs* の発現を抑制したところ、茎頂メリステムの相転換が阻害され、止葉様の葉が展開した後も繰り返し葉が形成された。四重抑制体の茎頂で形成される葉原基の腋部には側生メリステムが形成され、シュート様に発達した。マーカー遺伝子の発現解析、SEM 解析、組織観察の結果、これらの側生メリステムでは栄養成長の性質が維持されていた。以上より、*PAP2* は *OsFULs* と協調して茎頂メリステムを生殖成長へ相転換させることが明らかとなった。*Hd3a* の下流で *PAP2* と *OsFULs* が機能する可能性を考え、*Hd3a* を *pap2-1* 背景で過剰発現させたところ、*Hd3a* の花成促進効果が緩和された。このため、*Hd3a* の作用には *PAP2* の機能が必要である。*MADS box* 転写因子である *PAP2* と *OsFULs* は分子間相互作用する可能性があると考えた。酵母ツーハイブリッド法により、*OsMADS14* と *OsMADS15* の強い相互作用、*PAP2* と *OsMADS14*、*OsMADS15* の弱い相互作用が検出された。タバコを用いた一過的発現系で共免疫沈降法により、これらのタンパク質が植物細胞内でも相互作用することを確認した。以上の解析により、*PAP2* が *OsFULs* と協調的に、*Hd3a* シグナルの下流で茎頂メリステムの相転換を制御することを明らかにした。

本研究では、*PAP2* が小穂アイデンティティ遺伝子であることを同定し、イネ科植物で独自に進化したことを明らかにした。次に、イネの 5 つの *SEP* 遺伝子の機能を解析し、イネ *SEP* 遺伝子がサブグループごとに異なる機能と発現パターンを示して小穂構造を決定することを明らかにした。*PAP2* の発現解析により *PAP2* の相転換への関与が示され、遺伝子発現抑制と相互作用試験によって *PAP2* は *OsFULs* と相互作用して *Hd3a* の下流で機能することを明らかにした。すなわち、*PAP2* はイネの穂形成プログラム全般に関わる主要遺伝子であることが示された。以上、本研究で得られた知見は、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。