

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻

平成 21 年度博士課程 進学

氏 名 田中 伸裕

指導教員名 長戸 康郎

論文題目 イネにおける juvenile-adult 相転換の分子遺伝学的研究

顕花植物のライフサイクルは胚発生、栄養成長期を経て生殖成長期へと移行していく。栄養成長期はさらに初期の juvenile phase と後期の adult phase に区別される。adult phase は草本、木本植物において、適切な条件下では生殖成長期への移行が誘導される時期とされ、一年生植物では、juvenile-adult 相転換は劇的な形態変化を伴わずに短期間で起きる。また近年注目が集まっている植物のバイオ燃料としての利用の面で、juvenile phase の植物体では容易に糖類を抽出できることが報告されている。このように juvenile-adult 相転換は、植物の発生の時期を決定する上でも、バイオマスとしての利用の上でも重要であるにも関わらず、その制御機構の全容は不明のままであった。

近年シロイヌナズナ、トウモロコシを中心に、小分子 RNA である *miR156*, *miR172* と、植物ホルモンの 1 種であるジベレリンが、juvenile-adult 相転換の制御に関わることが報告された。2 つの miRNA のターゲット遺伝子はそれぞれ同定されている一方で、miRNA とジベレリン合成経路の上流で、juvenile-adult 相転換の制御機構の全体を決定するような因子は未だに

同定されていない。また、イネでは juvenile phase が永続する *mori1* 変異体の表現型が解析されているのみで、juvenile-adult 相転換の制御因子の報告はなかった。本研究ではイネにおける juvenile-adult 相転換異常変異体である、*peter pan syndrome (pps)*、*mori1* を用いて、adult phase への移行を促進、または決定する因子の同定と解析を行った。

1. juvenile phase が延長する *peter pan syndrome* 変異体の解析

野生型のイネにおける juvenile phase は第 2 葉期までとされ、第 3~5 葉期は転換期、第 6 葉期以降が完全な adult phase とされている。イネにおける juvenile phase と adult phase を区別する指標として、葉形、中肋の有無、節-節間の分化、茎頂分裂組織のサイズ、光合成速度の大小などの形質が報告されている。これらの形質に基づいて変異体のスクリーニングを行った結果、全ての形質に関して juvenile phase の延長が見られる *peter pan syndrome (pps)* 変異体を同定した。また juvenile-adult 相転換の分子マーカーである *miR156*、*miR172* の発現を調べたところ、*pps-1* では 2 つの miRNA の発現変化が野生型に比べて遅れていた。さらに adult phase への促進因子として知られるジベレリンの内生量を *pps-1* で測定したところ、野生型に比べて減少がみられ、ジベレリン合成に関わる酵素をコードする *GA3ox2*、*GA20ox2* の発現量も野生型に比べて低く抑制されていた。以上の結果は、*PPS* が *miR156*、*miR172* とジベレリン合成経路の上流で機能する、新規 juvenile-adult 相転換制御遺伝子であることを示している。

PPS の下流にジベレリンの生合成経路が存在することから、ジベレリンと juvenile-adult 相転換の関係をより詳細に解析するため、ジベレリン合成に関わる *GA3ox2* をコードする *D18* の変異体、*d18-dy* における juvenile-adult 相転換関連形質を調べた。*d18-dy* では葉形、中肋の有無、節-節間の分化、茎頂分裂組織のサイズに関して、juvenile phase の延長が観察された。以上よりジベレリンが adult phase への転換を促進していることが強く支持された。

現在に至るまでジベレリンによる adult phase への転換の促進経路と、*miR156* による経路との関係は明確には示されていなかった。そこで *d18-dy* における *miR156*、*miR172* の発現解析を行ったところ、野生型と *d18-dy* における 2 つの miRNA の発現パターンに変化は見られなかった。この結果から、ジベレリンと 2 つの miRNA は独立に juvenile-adult 相転換を制御

していると考えられた。

また、*pps-1*は juvenile phase が延長しているにも関わらず、野生型に比べて約 3 週間の早咲きを示した。*pps-1*における開花制御遺伝子の発現解析の結果から、*PPS*はイネのフロリゲンである *Hd3a*とは独立に、その下流の *RAP1B*を抑制する経路で機能していると考えられた。

2. *PPS* 遺伝子の単離とその機能解析

*PPS*は変異体の表現型解析から、新規 juvenile-adult 相転換制御遺伝子であることが予想されたため、ポジショナルクローニング法を用いてその原因遺伝子を同定したところ、*PPS*はシロイヌナズナの *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)*のオーソログであった。発現解析の結果、*PPS*は juvenile-adult 相転換の転換期で、葉で発現が強く誘導される一方で、茎頂ではその発現量が非常に低く抑制されていることが明らかになった。この結果は juvenile-adult 相転換時期が *PPS*によって葉で制御されていることを示唆した。相転換は茎頂分裂組織や茎でも起きることから、*PPS*が葉で発現することで、何らかのシグナルが葉から茎頂分裂組織や茎へと移動し、juvenile-adult 相転換を引き起こしていると考えられた。

シロイヌナズナの *cop1* 変異体は、暗所においても光形態形成を行うことが知られている。*pps-1*の暗所での解析から、光形態形成に対する *COP1*と *PPS*の機能は、保存されていることが示された。一方 juvenile-adult 相転換と *COP1*との関連性の報告は今までなかった。そこでシロイヌナズナにおける juvenile-adult 相転換の指標である葉の背軸側のトライコームの分布と、*miR156*, *miR172*の発現を *cop1-4*変異体で調べた結果、*COP1*は juvenile-adult 相転換の制御には関与していないことが明らかになった。以上より *PPS*における juvenile-adult 相転換の制御は、イネまたは単子葉植物で独自に獲得した機能であることが示唆された。

3. *MORI1* 遺伝子による juvenile-adult 相転換制御

Asai et al., (2002) によって同定された *mori1*変異体は、上位葉でも中肋の発達抑制され、播種後 10 週目の植物体の茎においても節-節間の分化が見られないなど、juvenile phase が永続する変異体である。これらの表現型から *MORI1*は juvenile-adult 相転換のマスター遺伝子

であると考えられるが、その原因遺伝子は単離されていなかった。

*pps-1*と同様に、juvenile-adult 相転換の分子マーカーである *miR156*, *miR172* の発現を野生型と、*mori1-1* で比較したところ、*mori1-1* では常に *miR156* の発現が高く、一方 *miR172* の発現が低く抑制されていた。また *mori1-1* では、内生のジベレリン量が野生型の 20%以下に減少しており、ジベレリン合成遺伝子である *GA3ox2*, *GA20ox2* の発現も低く抑制されていた。*mori1-1* の juvenile-adult 相転換に関わる表現型や 2 つの miRNA の発現変化、内生のジベレリン量の減少が、それぞれ *pps-1* に比べてよりシビアだったことから、*MOR11* は *PPS* のさらに上位で juvenile-adult 相転換を制御していることが示唆された。

ポジショナルクローニング法を用いて *mori1* の原因遺伝子の同定を行った結果、真核生物に広く保存された遺伝子に、*mori1-1* から *mori1-4* の 4 つのアリル全てで塩基置換が見つかった。*MOR11* の発現解析を行ったところ、*PPS* と同様に葉で発現が高く、茎頂では低く抑制されていたことから、*MOR11* も *PPS* と同様に葉で adult phase への移行を決定していると考えられた。

MOR11 と *PPS* の関係を調べるため、*mori1-1* における *PPS* の発現解析、*pps-1* における *MOR11* の発現解析をそれぞれ行った結果、*mori1-1* において *PPS* の発現は野生型と比べて強く抑制されていたのに対して、*pps-1* における *MOR11* の発現は野生型と変化がなかった。この結果は *MOR11* が *PPS* の上流で機能していることを示している。

以上、本研究では、イネにおける juvenile-adult 相転換の遺伝的制御機構の一端を明らかにした。juvenile-adult 相転換は、まず *MOR11* が、adult phase への転換期に下流の *PPS* の発現を葉で誘導することによって開始する。その後さらに下流の juvenile-adult 相転換の制御因子である *miR156*、ジベレリン合成が誘導され、それぞれの因子が独立に adult phase への移行を促進すると考えられた。