

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 胡 仲遠 (こちゅうえん)

本研究は、腋芽伸長の抑制に関わるストリゴラクトン (Strigolactones) が、イネの発芽時におけるメソコチル伸長の抑制にも関与することを明らかにし、メソコチル伸長の分子機構の一端を解明したものであり、次の2つの章から構成されている。

### 1. ストリゴラクトンによるイネのメソコチル伸長の抑制

ストリゴラクトンは、植物の腋芽伸長を抑制する植物ホルモンとして同定された一群のラクトン構造を有するカロテノイド誘導体である。イネでは、多分げつ矮性を示す *dwarf (d)* 変異体の系統において、その原因遺伝子がストリゴラクトンの生合成やシグナル伝達に関与することが知られている。

メソコチル (中胚軸) は、イネ科植物の幼植物体の鞘葉 (子葉鞘) 節と種子根の基部の間に位置する組織であり、暗所でその伸長が促進される。イネのストリゴラクトンの生合成が低下した変異体 (*d10-1*、*d17-1*、*d27-1*) および感受性が低下した変異体 (*d3-1*、*d14-1*) の種子を暗所で8日間発芽伸長させたところ、これらの変異体のメソコチルは野生型のものよりも2-5倍長くなることが明らかになった。さらに、暗所で8日間、合成ストリゴラクトンである GR24 を含む培地上で *d* 変異体と野生型の種子を発芽伸長させたところ、ストリゴラクトン生合成変異体である *d10-1*、*d17-1*、*d27-1* におけるメソコチルの伸長が GR24 の濃度依存的に抑制されることが分かった。その一方で、ストリゴラクトン非感受性変異体である *d3-1*、*d14-1* では、GR24 処理によってメソコチル伸長は変化しなかった。

イネのメソコチルは、細胞分裂による細胞数の増加に加え、長軸方向の細胞伸長によって伸長する。そこで、暗所で8日間発芽伸長させたメソコチルにおける長軸方向の細胞の長さや細胞数を調査した結果、*d* 変異体におけるメソコチルの長軸方向の細胞数は野生型の細胞数の3-6倍であることが明らかになった。しかし、細胞の長さについては *d* 変異体と野生型の間で有意差がなかった。*d3-1*、*d14-1* では、GR24 処理による細胞数の変化はみられなかったが、*d10-1* の細胞数は、GR24 処理によって野生型と同程度まで減少することが示された。これらの結果から、ストリゴラクトンが細胞分裂を負に制御することで、メソコチルの伸長を抑制する機能をもつことが明らかになった。

### 2. ストリゴラクトンとサイトカイニンの拮抗作用によるイネのメソコチル伸長制御

サイトカイニン (Cytokinins) は細胞分裂を促進する活性をもつ植物ホルモンとして知られていることから、*d* 変異体におけるメソコチル伸長の促進が内生のサイトカイニン量の変化に起因

するかどうかを調査した。暗所での発芽 4 日目の *d* 変異体と野生型のメソコチルにおいて、活性型サイトカイニンとして知られている *trans*-zeatin (tZ)、*N*<sup>6</sup>- ( $\Delta^2$ -isopentenyl) -adenine (iP) とそれらの不活性型リボシド体 (tZR、iPR) の蓄積量を LC-MS/MS 法によって測定した。その結果、野生型と比較して、*d* 変異体のメソコチルでは tZ の蓄積量が有意に高いこと、さらに、ストリゴラクトン生合成変異体 *d10-1* における tZ の蓄積量が GR24 処理によって有意に減少することが明らかになった。しかし、iP、tZR、iPR の蓄積量については *d* 変異体と野生型の間で大きな差はみられなかった。これらのことから、ストリゴラクトンによってメソコチル内の tZ 量が制御されていることが示唆された。その制御に寄与する遺伝子を明らかにするために、マイクロアレイ解析を行い、野生型と比べて *d* 変異体で遺伝子の発現量が変動し、さらに、*d10-1* への GR24 処理によってその発現量が有意に変動する遺伝子の探索を行った。その結果、サイトカイニンの分解を担う cytokinin oxidase/dehydrogenase 9 (OsCKX9) をコードする遺伝子の発現が、*d* 変異体のメソコチルでは野生型と比較して低く、*d10-1* への GR24 処理によって野生型レベルまで戻ることが分かった。この結果より、野生型ではストリゴラクトンによって誘導された OsCKX9 が、tZ の蓄積を抑えることでメソコチルの伸長を抑制することが示唆された。さらに、暗所で 8 日間、サイトカイニン活性を持つカイネチン (kinetin) または CKX の阻害剤である 1-(2-chloro-4-pyridyl) -3-phenylurea (CPPU) で処理したところ、*d* 変異体では処理によってメソコチル伸長は変化しなかったが、野生型では濃度依存的なメソコチル伸長の促進が観察された。カイネチンまたは CPPU と GR24 を同時に処理した場合、GR24 処理によって抑制された *d10-1* のメソコチルの伸長が、カイネチンまたは CPPU によって促進されることから、ストリゴラクトンとサイトカイニンはメソコチルの伸長過程において細胞分裂を拮抗的に制御することが示された。

*d* 変異体を用いたマイクロアレイ解析の結果から、TCP ファミリーのクラス II に属する転写因子である OsTCP2 をコードする遺伝子の発現が、*d* 変異体のメソコチルでは野生型と比較して低く、*d10-1* において GR24 処理により野生型レベルまで戻ることが明らかになった。また、OsTCP2 遺伝子の発現は、カイネチンまたは CPPU で処理した野生型のメソコチルでは抑制されるが、*d* 変異体では影響されなかった。さらに、OsTCP2 遺伝子の過剰発現体では、カイネチンまたは CPPU 処理によるメソコチル伸長の促進が起こらないことから、OsTCP2 が、メソコチル伸長過程の細胞分裂を抑制する機能を持ち、その機能は OsTCP2 遺伝子の発現制御を介して、サイトカイニンによって抑制され、ストリゴラクトンによって促進されることが示唆された。

これらの結果より、野生型においては、ストリゴラクトンが OsCKX9 を発現誘導することで内生サイトカイニンの蓄積量を抑え、それにより細胞分裂の抑制に関わる転写因子 OsTCP2 の発現抑制が解除され、メソコチルの伸長が抑制されるというモデルを提唱した。*d* 変異体ではストリゴラクトンの生合成および感受性の低下により上述の経路が機能せず、細胞分裂が活性化されることで、メソコチル伸長が促進されると考えられた。

以上、本研究では、暗所でのイネの発芽伸長過程で、ストリゴラクトンとサイトカイニンの拮抗的な細胞分裂の調節によってメソコチルの伸長が制御されていることを世界に先駆けて発見し、学術上の価値が高い。したがって、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。