

論文の内容の要旨

Developmental genetic studies on spikelet formation in *Oryza sativa*

(イネの小穂形成に関する発生遺伝学的研究)

氏名 杉山 茂大

序論

被子植物の花の発生はABCモデルをはじめとした基本的には共通するメカニズムによって制御されている。一方、花の形態は植物種ごとに非常に多様な構造をしているため、植物種によって、独自のメカニズムも存在すると考えられる。イネ (*Oryza sativa*) は、小穂という花序の特殊な構造単位をもっている (図1)。

小穂は、心皮、雄蕊、リンピという花器官と、内穎、外穎などから構成されている。この小穂の発生・分化の仕組みには、未解明なことが数多く残されている。

本研究では、イネの小穂発生機構の解明を目的とし、次の2つのテーマについて発生遺伝学的な解析を行った。

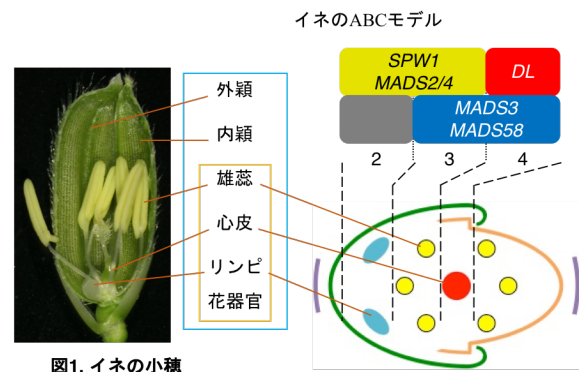


図1. イネの小穂

1. 花器官の発生を制御する遺伝子の機能と相互作用の解析

シロイヌナズナにおいてABCモデルのCクラス遺伝子は心皮アイデンティティーの決定と花メリステムの有限性の制御をすることが明らかになっている。一方、イネにおいては、心皮アイデンティティーの決定は *DROOPING LEAF (DL)* によって制御されていることが

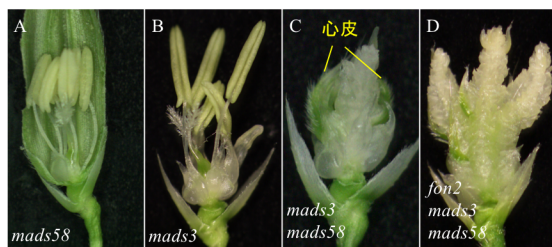
判明しているが、Cクラス遺伝子の機能の理解は不十分であり、論争にもなっている。本研究では、花の発生に関わる遺伝子の多重変異体を作成し、その遺伝子間の相互作用を解析するとともに、単独変異体のみからは困難な各遺伝子の機能を推定した。

[結果]

・Cクラス変異体を用いた解析

イネのCクラス遺伝子の一つ *MADS58* には完全機能喪失変異体がなかったため、CRISPR/Cas9 で *MADS58* を破壊した個体を作り、表現型を観察した (図 2 A)。その結果、*mads58* では明瞭な異常が見られなかった。次にもう一つのCクラス遺伝子の *MADS3* との二重変異体の解析を行った。その結果、*mads3 mads58* 変異体はリンピと心皮様の器官をくり返し形成し続けるという表現型を示した(図 2 C)。このことからイネCクラス遺伝子は有限性の制御に関わっていることが示唆された。

幹細胞増殖を負に制御する *FON2* 遺伝子とCクラス遺伝子の多重変異体を解析した。*fon2 mads3 mads58* では *mads3 mads58* の有限性の喪失がさらに亢進された(図 2 D)。よって、有限性と幹細胞数の制御とが密接に関連していることが示唆された。



E. *mads3 mads58* 模式図

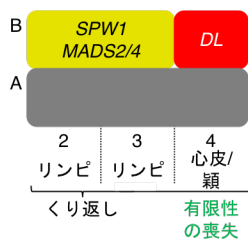
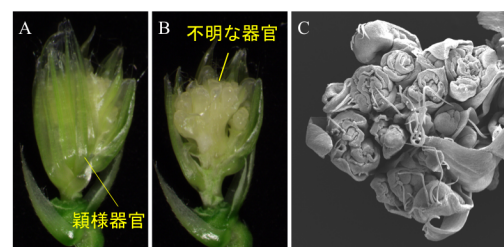


図2. Cクラス遺伝子と *FON2* の多重変異体の小穂



D *spw1 dl* 模式図

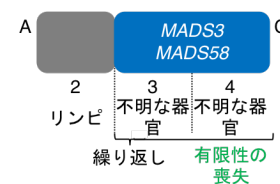


図3. *spw1 dl* の小穂

・ *dl spw1* の二重変異体を用いた遺伝子相互作用の解析

DL と B クラス遺伝子 *SUPERWOMANI* (*SPW1*) の機能が喪失した二重変異体の解析を行った。*dl spw1* では、第 2 ウォールで穎様器官が形成され、その内側でアイデンティティーが不明な器官がくり返し形成されることが判明した(図 3 A-C)。この変異体では *MADS3* が発現し

ているものの、心皮様器官は形成されなかった。このことからイネCクラス遺伝子だけでは心皮を決定する機能は持っていないと考えられる。また、器官のくり返しから有限性の喪失が考えられ、未分化細胞のマーカによる発現解析からこのことが支持された。

[考察]

Cクラス遺伝子は心皮の決定には重要でないこと、小穂の有限性の制御に関わっていることが判明した。また、DLが有限性の制御に関わっていることが示唆された。この解析から図4のようなモデルで小穂が発生すると考えられる。DLはシロイヌナズナのCRABS CLOW (CRC) に近縁だが、CRCは雌蕊の形態形成に関与するが心皮アイデンティティを決定する機能は持っていない。イネにおけるCクラス遺伝子やDLの機能といったイネ独自の花の発生機構はイネの進化の過程の中で作られたと考えられる。

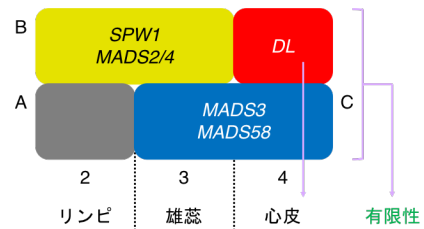


図4. イネの小穂発生モデル図

2. *tol* 変異体の発生遺伝学的解析

イネの小穂発生に関わる新規遺伝子を同定するために、小穂の形態が異常となった *two opposite lemma (tol)* を用いた発生遺伝学的な解析を行った。

[結果]

・ *tol* 変異体の表現型解析

tol 変異体の小穂は多面的な表現型を示したが、*tol* 小穂を3つのtypeに分類し、内穎の外穎への置き換わりと片方の外穎の形態のバリエーションによる連続的な変化として説明するモデルを考察した(図5)。

また、花器官では、器官の異所的な形成、器官どうしの融合、器官数の変化が観察された。発生途中の小穂を観察した結果、メリステムのサイズや形の異常、器官原基の配置や数などの異常が観察され、メリステムの正常な活性が損なわれていることが推定された。メリステムの異常が小穂の多面的な形態異常につながると考え、図6のようなモデルを考えた。

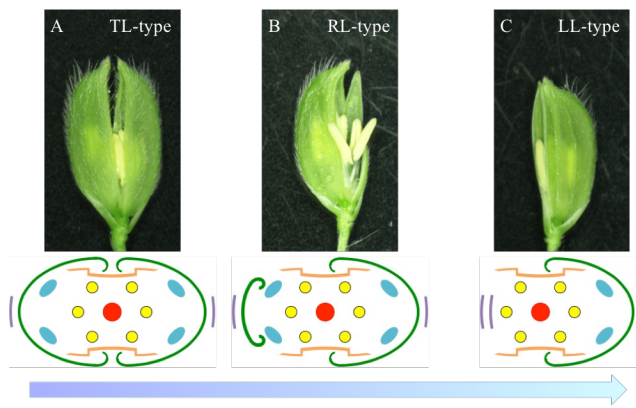


図5. *tol*の小穂の形態

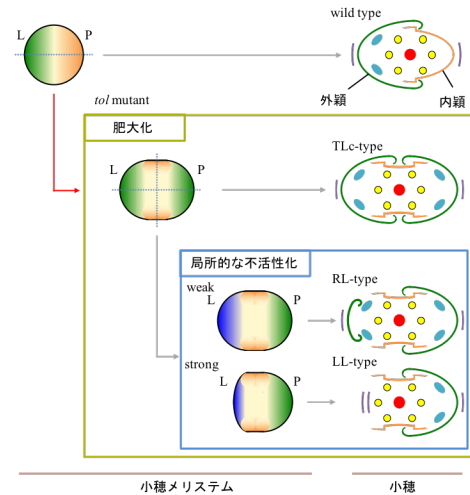


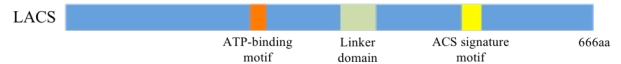
図6. メリステムと小穂の形態との関係性のモデル

・ *tol* 変異体の原因遺伝子の探索

tol 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、次世代シーケンサーによる全ゲノム配列を決定したところ、Long chain Acyl-CoA synthetase (LACS) をコードする遺伝子にレトロトランスポゾン

LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE (LACS)

長鎖脂肪酸 (LCFA) を acyl-CoA へと活性化させることで、超長鎖脂肪酸 (VLCFA) 合成に関与する



Tos17 が挿入されていることが判明した(図 7). 図7. *tol*の原因遺伝子

しかし、その後の解析から *tol* 変異体の表現型は *LACS* 遺伝子の単独変異のみでは説明ができず、第2の遺伝子との二重変異体であることが強く示唆された。

[考察]

LACS は超長鎖脂肪酸の合成に関与し、超長鎖脂肪酸の合成は茎頂メリステムの維持との関連が報告されている(Ito et al., 2011). したがって、*tol* 変異体におけるメリステムの異常は、超長鎖脂肪酸合成に異常が生じたことが1つの原因であると考えられる。

まとめ

第1部の研究では、イネのCクラス遺伝子の機能を明らかにした。また、*DL* が有限性の制御に関与することが示された。Cクラス遺伝子と *DL* の相互作用のさらなる研究は、有限性の制御の仕組みなど、小穂形成機構のさらなる理解につながると考えられる。

第2部の研究では、*tol* 変異体の解析から、*LACS* 遺伝子が小穂の発生に部分的に必要とされていることが示された。今後は、第2の遺伝子を同定するとともに、超長鎖脂肪酸の機能を解明することにより、イネの小穂の発生機構に関する理解が進むと考えられる。