

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻
平成 24 年度博士課程 進学
氏 名 三村 真生
指導教員名 伊藤 純一

論文題目 イネの葉間期を制御する遺伝的ネットワークの解析

植物にとって葉は生命活動に必須な光合成や蒸散などを行う地上部における最も重要な器官の一つである。葉は茎頂分裂組織(shoot apical meristem: SAM)から規則的な配置とタイミングで分化し、この分化様式は植物体地上部の体制に大きな影響を与える。従って、葉の分化様式の制御メカニズムを解明することは、作物の地上部の形態の改良を行う上で重要な知見を与えうると考えられる。葉が SAM から分化するタイミングは葉間期(plastochron)によって表すことができる。葉間期とは葉が分化してから次の葉が分化するまでの期間のことであり、葉間期の長さが変動すると、結果として時間あたりの出葉枚数が増える。イネにおいてはこれまでに葉間期を制御する三つの異なる遺伝子 *PLASTOCHRON1 (PLA1)*、*PLA2*、*PLA3* が同定されている。これらの遺伝子の機能欠損変異体は、葉の成熟が早まることで葉間期が短くなり、一定期間の間に多数の小さな葉を抽出する表現型を示す。しかし、*PLA* 遺伝子が実際にどのような制御過程を経て葉間期に関わっているのかは未解明である。また、*PLA* 遺伝子以外にも葉間期を制御する遺伝子が複数報告されているものの、これらの遺伝子間の相互作用や葉間期を制御する分子メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、イネの *PLA* 遺伝子を中心とした葉間期の遺伝的制御ネットワークの解明を目的とした研究を行った。

1, *PLA* 遺伝子とジベレリンとの相互作用の解析

植物ホルモンは、植物の形態形成の様々な場面において重要な役割を果たしている。*pla* 変異体では葉間期の短縮以外にも、草丈や葉の短縮など植物ホルモンとの関係が示唆される表現型を示す。そこで、*PLA* 遺伝子がどの植物ホルモンと関わりが深いか調べるために、各種の植物ホルモンに対する *pla* 変異体の応答性を調べた。その結果、*pla* 変異体ではジベレリンに対する応答性が弱まっており、*PLA* 遺伝子とジベレリンとの関連性が示唆された。

ジベレリンは茎や葉の伸長を促進する植物ホルモンだが、*pla* 変異体ではジベレリン処理による葉の伸長が抑えられた。さらに、野生型の幼苗にジベレリン処理をすることによって *PLA1* と *PLA2* の発現量が上昇することがわかった。また、葉が過伸長してしまうジベレリン恒常的応答性変異体の *slender rice 1 (slr1)* では *PLA1* と *PLA2* の発現が上昇し、逆に矮性の表現型を示すジベレリン低感受性変異体 *Slr1-d1* では *PLA1* と *PLA2* の発現が下がっていた。これらの結果から、ジベレリンの情報伝達経路の下流で *PLA* 遺伝子の発現が制御されていることが示唆された。このことを遺伝学的に裏付けるために、*slr1* 変異体と *pla* 変異体の二重変異体を作成し、表現型を解析した。その結果、*pla/slr1* の二重変異体では *slr1* の葉が伸長する表現型が部分的に抑えられることが判明した。

これらのことから、ジベレリンによる葉の伸長には *PLA* 遺伝子が部分的に必要であり、ジベレリンの情報伝達の下流で *PLA* 遺伝子が機能していることが明らかになった。

2, *PLA* 遺伝子の過剰発現体の解析

PLA 遺伝子の形態形成に果たす役割をさらに詳細に明らかにするため、遺伝子コピー数を増やした *PLA1* と *PLA2* の過剰発現体 *PLA1 High-Copy (PLA1HC)* と *PLA2HC* を作成した。栄養成長期における過剰発現体の表現型を調べたところ、*PLA1HC*、*PLA2HC* ともに野生型と比較して葉のサイズが大きくなると同時に、葉間期が長くなり、葉の枚数は少なくなった。また、*PLAHC* における第3葉の生長過程を調べたところ、野生型と比べて生長期間が長くなっていた。したがって、*PLAHC* では葉が成熟するまでの期間が長くなっており、それに伴い葉のサイズが増大すると考えられた。これらの結果から、栄養成長期における *PLA* の過剰発現は *pla* 変異と逆の効果を示すことが明らかになった。

次に、*PLAHC* の生殖成長期における表現型を解析した。*PLA1HC*、*PLA2HC* では穂の一次枝梗数と籾数が野生型と比べて少なくなっていたが、桿長、穂長、種子サイズ、20粒重は野生型と比較して大きくなっていた。このことは、*PLA* 遺伝子の発現量の制御により、種子などの器官サイズを改変できる可能性を示唆している。

PLA1 と *PLA2* は独立の経路で機能していることが報告されており、それぞれの遺伝子

が異なる経路で器官サイズに影響を与えると予想される。そこで、*PLA1HC* と *PLA2HC* を交配した二重ハイコピー体を作成し、両方の遺伝子発現の増大が植物体に与える影響を調べた。二重ハイコピー体ではそれぞれ単独のハイコピー体よりも葉のサイズが大きく葉間期も長くなった。従って、*PLA1*、*PLA2* の発現量を同時に増加させると、葉のサイズが相加的に大きくなることが判明した。

以上の結果から、*PLA* 遺伝子の発現量を増加させると葉や籾などの器官数が少なくなる一方で、器官のサイズが大きくなることが判明し、*PLA* 遺伝子の発現量を制御することで器官のサイズと数の調節ができる可能性が示唆された。

3, 葉間期制御に関わる遺伝子の遺伝的相互作用

イネでは *pla* 変異体の他にも葉間期に異常が見られる変異体が複数同定されている。転写因子をコードする *OsSPL14* 遺伝子の過剰発現体は葉間期が延長する表現型を示し、*OsSPL14* を抑制するマイクロ RNA の一つ *miR156* の過剰発現体では逆に葉間期が短縮する。さらに、*aberrant panicle organization1 (apo1)*、*apo2* 変異体は *pla* 変異体と同様に葉間期が短縮する。このように葉間期制御に関わる変異体が複数同定されているが、これらの遺伝的関係に着目した解析は *PLA* 遺伝子間、*APO* 遺伝子間の解析にとどまっている。そこで *PLA* 遺伝子と *SPL/miR156*、*APO* 遺伝子間における遺伝的相互作用を明らかにすることを目的として解析を行った。

まず、*PLA* 遺伝子と *SPL/miR156* 遺伝子との関係を調べるために、*PLA1*、*PLA2*、*OsSPL14* 遺伝子の過剰発現体の表現型を比較した。いずれの過剰発現体も野生型より葉間期が長く、葉の枚数が少なくなっていたが、*PLA1* や *PLA2* の過剰発現体よりも *OsSPL14* の過剰発現体の方がより葉間期が長く、葉の枚数が少なくなっていた。次に *OsSPL14* と *miR156* の発現量を *pla* 変異体で調査した。*pla1*、*pla2* 単独の変異体では *OsSPL14* の発現量がやや減少していたが、*pla1/pla2* 二重変異体ではそれぞれ単独の変異体よりもさらに相加的に減少していた。一方で、*miR156* の発現量は、*pla2* 変異体と *pla1/pla2* の二重変異体において同程度に増加しており、*pla1* 変異体ではやや増加していたものの有意差は認められなかった。これらの結果から、*PLA1* は *miR156* とは独立に、*PLA2* は *miR156* を介して *OsSPL14* の発現制御に関わっていることが推測された。

表現型と発現解析から *OsSPL14* が *PLA1* と *PLA2* の下流因子であることが示唆された。このことを遺伝学的に検証するため、*pla1*、*pla2* 変異体と *OsSPL14* 遺伝子の過剰発現体の二重変異体を作成した。これらの二重変異体では、*pla* 変異体の表現型を完全に回復させることはなかったが、いずれも初期生育において *pla* 変異体より葉が長く、葉の枚数が少なくなる表現型を示した。このことから *OsSPL14* の過剰発現により *pla* 変異体

の表現型を部分的に抑えられることが判明した。また、*OsSPL14* 以外の *OsSPL* 遺伝子も *pla* 変異体で発現が減少しており、*OsSPL14* の過剰発現の効果が部分的になった原因は、他の *OsSPL* 遺伝子の発現が低下しているためだと考えられた。以上の結果から、イネの葉間期制御において *OsSPL14/miR156* が *PLA1* と *PLA2* の下流で部分的に関わっていることが示された。

次に、*PLA* 遺伝子と *APO* 遺伝子の遺伝的相互作用を解析した。*pla* 変異体では野生型と比べて葉の枚数を約 2 倍多く抽出するのに対し、*apo* 変異体は野生型と比べて約 1.5 倍葉が多くなることが知られている。*pla1/apo1*、*pla2/apo1*、*pla1/apo2*、*pla2/apo2* の 4 種類の二重変異体を作成したところ、いずれの二重変異体も単独の変異体より葉の長さが短く、葉の枚数は多くなる相加的な表現型がみられた。これらの結果から、*APO* 遺伝子は *PLA* 遺伝子とは独立の経路で葉間期を制御していることが明らかになった。

以上、本研究の結果から、イネにおける葉間期制御の遺伝的ネットワークの一端を明らかにすることができた。イネの *PLA1*、*PLA2* 遺伝子はジベレリンによって発現が誘導され、そして下流の *OsSPL* 遺伝子の発現をそれぞれ異なる経路で制御することによって葉間期を調節していると考えられた。さらに、*PLA* 遺伝子とは独立の *APO* 遺伝子による葉間期制御の経路が存在することも明らかになった。過剰発現体の解析からは、*PLA* 遺伝子は器官サイズや数の決定に関与しており、その発現量を制御することによって、葉や種子のサイズ、数といった植物の形態形質を改変できる可能性が示唆された。