

所属 (主指導教官)	植物分子遺伝学講座 (島本 功教授)		
氏名	早間良輔	提出	平成 14 年 1 月 8 日
題目	イネの開花時期を制御する遺伝子ネットワークの解析		
高等植物の多くは一年の間で規則的に変化する日長を識別し、開花反応を行う時期を厳密に決定する。日長に対する反応様式には複数のタイプがあり、長日条件下において花成を促進する植物や、逆に短日条件下において花成を促進する植物が存在する。日長による開花時期の決定機構はこれまで生理学的、分子生物学的研究が盛んに行われてきており、この機構には特定の光受容体と約 24 時間の内生リズムを発生させる概日時計が関与することが長日、短日植物の間で知られてきた。近年、シロイヌナズナを用いた分子生物学的解析により、長日植物における開花時期決定の分子機構に関する知見は飛躍的に増えたが、一方で短日植物においては、関連遺伝子の単離例の少なさから、開花時期決定の分子機構に関する知見は比較的乏しかった。そこで本研究では、短日植物に属するイネから関連遺伝子の単離、解析を行った。 フィトクロム発色団の生合成欠損変異株であるイネ <i>se5</i> 変異株は、花成の日長応答性を示さず野生型株に比べ早く開花する。まず、この変異株において野生型株と異なる発現様式を示す遺伝子群の単離を行った。<i>se5</i> 変異株における花成の表現型は長日条件下で顕著に現れることから、長日条件下で育成した <i>se5</i> 変異株と野生型株から経時的に RNA を収集し、これらの RNA を蛍光ディフアレンシャル・ディスプレイ法を用いて解析した。約 8,400 の独立な遺伝子を検証した結果、<i>se5</i> 変異株において mRNA の発現様式の変化した遺伝子が 27 見いだされた。うち 12 の遺伝子の mRNA の発現には野生型株において日周性の変動が見られ、これらの発現は概日時計により制御されと考えられた。これらの中から mRNA レベルが日長により変化する遺伝子を探索すると、5 つの遺伝子では mRNA 量が短日条件下において上昇しており、何らかの日長反応に関与することが示唆された。これら 5 つの全長 cDNA の塩基配列を決定した結果、NAC-ドメイン様転写調節因子あるいは花成制御の 1 因子である糖の代謝を調節するアルドラーゼ遺伝子などが同定された。			

一方、発現に日周性の変動が見られた遺伝子の中に、*GIGANTEA* (*GI*) のイネ相同遺伝子が見いだされた。*GI* は長日植物シロイヌナズナにおいて長日条件下での開花促進に機能する遺伝子である。近年になって、イネの開花時期決定に関与する遺伝子の単離がいくつか報告されたが、それらもシロイヌナズナの開花時期決定に関与する遺伝子の相同遺伝子であったことから、開花時期決定の分子機構はイネとシロイヌナズナとの間で一部保存されていると考えられる。本研究ではさらに、*GI* のイネ相同遺伝子の機能解析を行い、イネの開花時期を制御する遺伝的経路の同定を行うと同時に、この遺伝的経路をシロイヌナズナで働く遺伝的経路と比較した。

まず、*GI* のイネ相同遺伝子 (*OsGI*) の発現用式を調べたところ、*OsGI* mRNA の発現は明期の終わりにピークを迎える形での概日リズムを示し、*GI* のそれと同様のパターンを示した。この結果は、双方の *GI* mRNA の調節機構が保存されていることを示唆する。さらに、*OsGI* を過剰発現する形質転換イネを作成し、開花時期を調べた結果、*OsGI* 過剰発現株は開花が遅くなると同時にその日長反応が減少し、*OsGI* は長日条件下での花成の抑制に機能することが示唆された。以上の結果から、双方の植物種間に存在する日長応答性の違いは *GI* の下流の分子機構により引き起こされることが考えられた。*GI* は *CONSTANS* (*CO*) の発現を活性化し、さらに *CO* は *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) の発現を誘導する。そこで、*Hd1* (*CO* のイネ相同遺伝子) および *Hd3a* (*FT* のイネ相同遺伝子) の *OsGI* 過剰発現株における発現様式を調べたところ、*Hd1* の発現は *OsGI* 過剰発現株において上昇しており、*GI* による *CO* の発現調節と同一の関係を示した。このことから、*GI* (*OsGI*) による *CO* (*Hd1*) の発現制御機構も双方の植物種間において保存されていると考えられた。しかしながら、*Hd3a* の発現は *OsGI* 過剰発現株において減少しており、*GI* による *FT* の発現調節とは逆の関係を示した。以上の結果より、イネとシロイヌナズナのあいだの日長感受性の違いを決定する分子基盤は、*CO* (*Hd1*) による *FT* (*Hd3a*) の発現調節機構にあると考えられた。

以上の結果を総合すると、イネとシロイヌナズナとの間の日長感受性の違いは、それを制御する遺伝子ネットワークが全く異なるというよりはむしろ、イネとシロイヌナズナとの間で保存された遺伝的経路のうち一部の遺伝子の発現制御機構が逆転しているという比較的単純な違いで決定されていることが示唆される。このような発現制御機構の逆転を引き起こす分子機構の解明が今後の課題として考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 早間 良輔

本論文は、短日植物を代表するモデル植物のイネを材料に花成制御機構の研究を行ったものである。イネの花成制御に関わる遺伝子の同定は主に遺伝学的なアプローチによるものであるが、本論文ではその補完的なアプローチとして FDD 法を用いた関連遺伝子の同定を試みており、一定の成果を挙げていると考えられる。本研究は、花成の日長反応性が完全に失われた *se5* 突然変異株と野生型株の間に暗期中の発現様式に差のある遺伝子を探索することから始め、発現様式が日周性の変動を示す遺伝子群を探索、そして最終的に発現レベルが日長依存的に変化する遺伝子群 (5 つ) の同定に成功している。また同時に、シロイヌナズナの花成制御遺伝子 *GI* のイネ相同遺伝子を同定しており、遺伝子単離に用いた方法の妥当性が示される。イネの花成制御に関与する遺伝子の単離例は比較的少なく、故にイネの花成制御機構に関する知見は未だ乏しいが、同定された候補遺伝子は遺伝学的なアプローチから同定された遺伝子と同一ではなく、今後イネの花成制御機構に関する新規な分子生物学的知見が得られると期待される。また、イネは世界的な主要穀物のひとつと数えられ、その開花時期が栽培範囲や栽培時期を決定する上で大きな影響を及ぼす。本論文はイネの開花時期の人為的制御の可能性をさらに広げるものである。

本論文ではさらに同定遺伝子の中から特に *GI* のイネ相同遺伝子 (*OsGI*) の機能解析を行い、イネとシロイヌナズナとの間の日長応答性の違いを決定する分子的基盤について興味深い知見をもたらすに至っている。すなわち、*OsGI* の花成に対する機能が *GI* とは逆であることを発見し、イネとシロイヌナズナとの間の日長応答性の違いを決定する分子機構が双方の *GI* の下流にあることを突き止めている。さらに、*GI* の下流遺伝子 *CO* および *FT* それぞれのイネ相同遺伝子の発現に対する *OsGI* 過剰発現の影響を詳細に調査し、双方の植物種間における日長応答性の違いが *FT* の *CO* による発現制御機構にあることを強く示唆するに至っている。従って本論文は、高等植物の花成研究において非常に重要な問題の一つであった長日植物と短日植物との間の日長応答性の違いを発生させる分子的基盤について非常に重要な知見をもたらしたと同時に、生物の多様性が生み出される分子変化の一例の解明に今後大きく貢献するものと考えられる。以上のように、本論文は学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。