

博士論文要約 (Summary)

平成 年 月入学

連合農学研究科

専攻

氏名 小澤 傑

タイトル	ダイズにおける juvenile-adult 相転換に関与する因子の解析 (Analysis of juvenile-adult phase change in soybean)
<p>[緒言]</p> <p>植物の栄養生長相では、juvenile phase から adult phase へ相転換 (JA 相転換) が起こる。シロイヌナズナやイネ、トウモロコシを中心に JA 相転換に関する研究が進められており、JA 相転換によって形態が変化することが報告されている。分子生物学的な解析も精力的に行われ、<i>micro RNA (miR) 156</i> や <i>miR172</i> の発現の変化が関連することや JA 相転換の制御に関わる遺伝子が同定されている。また、日長や温度などの外的要因、ジベレリンや糖などの内的要因なども JA 相転換に影響を与えることが報告されている。一方、世界的に重要な作物であるダイズの JA 相転換に関する知見は少ない。本研究は、ダイズにおける JA 相転換の知見を蓄積することを目的とした。</p> <p>[第1章 ダイズにおける JA 相転換に関する形態変化の一般性]</p> <p>「序論」</p> <p>現在までダイズの JA 相転換については栽培品種「エンレイ」を用い、葉序、葉形、葉の大きさ、葉のトライコーム数、托葉、光合成能力、shoot apical meristem (SAM) の形、<i>miR156</i> と <i>miR172</i> の発現量が解析されている。「エンレイ」の juvenile phase では、対生の葉序で単葉を形成し、葉が小さい、葉のトライコーム数が少ない、托葉が細長い、SAM の形が扁平、<i>miR156</i> の発現量が高い、<i>miR172</i> の発現量は低いという特徴を持つ。一方、adult phase では、互生の葉序で複葉を形成し、葉が大きい、葉のトライコーム数が多い、托葉が三角形、SAM の形がドーム状、<i>miR156</i> の発現量が低い、<i>miR172</i> の発現量が高い。また、juvenile phase と adult phase の中間の表現型を示す時期が存在し、この時期は intermediate と定義された。このように多くの形態が解析されたが、供試したダイズ品種は「エンレイ」のみであり、これらの形態変化がダイズの JA 相転換の一般的な特性であるかどうか不明である。本章では、「エンレイ」で報告された形態変化が、ダイズに共通する一般的な現象かどうかを明らかにすることを目的とした。</p> <p>「材料及び方法」</p> <p>植物材料には、世界のダイズコアコレクション 80 系統と岩手県で栽培されているダイズ品種 4 品種、基準品種として「エンレイ」を用いた。これらの系統で「エンレイ」において報告された JA 相転換に関連する形態変化を調査した。また、本章で選抜した 16 系統において、感光性関する <i>E1</i>~<i>E4</i> 遺伝子座の遺伝子型を解析し、感光性と JA 相転換の関係について調査した。</p> <p>「結果及び考察」</p> <p>85 系統を調査して結果、葉序、葉形、トライコームは、生育段階による変化が示されず、これらはダイズに共通した JA 相転換による形態変化ではないことが明らかとなっ</p>	

た。一方、葉の大きさと托葉は、生育段階によって変化しており、ダイズに共通する形態変化であることが示された。特に葉の大きさは、シロイヌナズナやイネにおいても、JA 相転換によって変化する形態の一つであり、植物種に共通した形態変化であることが示唆された。また、葉の大きさが変化する葉位は系統によって異なり、ダイズの JA 相転換が起こる時期には多様性が認められた。以上のことより、ダイズにおいて、葉の大きさが急激に変化する葉位は、JA 相転換の指標となると考えられた。85 系統から選抜した 16 系統で 2 ヶ年の調査を行ったが、JA 相転換が年度によって異なる生育ステージで起こる系統群とほぼ一定の生育ステージで起こる系統群の 2 つに分類された。調査を行った 2 ヶ年は日長条件が異なり、分類した系統群は、感光性に関する E3 遺伝子座の遺伝子型が異なる傾向が認められた。このことから、E3 遺伝子座の遺伝子型と日長が JA 相転換の制御に関わることが示唆された。

[第 2 章 日長は JA 相転換のステージを制御している]

「序論」

植物の JA 相転換に深く関与していると認識されている遺伝子として、*miR156* と *miR172* が存在する。シロイヌナズナやイネ、トウモロコシにおいて、*miR156* と *miR172* は、生育の初期と後期において相対する発現パターンを示すことが知られており、ダイズにおいても、同様の遺伝子発現パターンを示すことが報告されている。また、シロイヌナズナでは、日長によって JA 相転換が異なること、光受容体であるフィトクロムやクリプトクロム、概日時計に関する *GIGANTIA (GI)* などが *miR172* の発現に影響を与えることが報告されている。ダイズの花芽形成時の *miR156* の発現量は、短日条件よりも長日条件で発現量が高く、その発現量は、E1、E2、E3、E4 遺伝子座の遺伝子型によって異なる。また、*miR172* の発現量は、日長や E3、E4 遺伝子座によって影響されることも報告されている。第 1 章においても E3 遺伝子座が JA 相転換の制御に関わっていることが示唆された。しかし、*miR156* と *miR172* の発現パターンが初期の栄養生長期において、E 遺伝子座の遺伝子型や日長の影響を受けるのかは報告されていない。本章では、感光性と日長条件が JA 相転換に与える影響を明らかにすることを目的とした。

「材料および方法」

植物材料には、感光性の弱い品種である「エンレイ」と感光性の強い品種である「Peking」を用いた。「エンレイ」(*E1e2e3E4*) と「Peking」(*e1-pE2E3E4*) は、E2、E3 遺伝子座が異なり、E2 遺伝子座と E3 遺伝子座はそれぞれシロイヌナズナの *phytochrome A* 遺伝子、*GI* 遺伝子のオーソログである。この 2 品種を異なった日長条件で生育させ、葉の形態、および *miR156* と *miR172* の発現量について発達段階を追って調査した。

「結果および考察」

「エンレイ」は、日長条件によらず一定の葉位で葉の大きさが変化しており、*miR156* の発現量に大きな差が認められなかった。一方、「Peking」は、日長条件によって、葉の大きさが変化する葉位が異なり、*miR156* の発現量も異なっていた。これらのことより、JA 相転換は日長の影響を受けるが、その程度は品種の感光性によって異なることが考えられた。また、「エンレイ」と「Peking」は感光性に関する E2 と、E3 遺伝子座の遺伝子型が異なることから、E2、E3 遺伝子座が JA 相転換の制御に関与することが示唆された。さらに、ダイズの生育後期では、長日条件下において *miR172* の発現量が減少し、品種によってその程度が異なり、発現パターンがシロイヌナズナと異なるという新たな知見も得られた。

[第3章 日長に反応する JA 相転換の因子の解析]

「序論」

シロイヌナズナでは、*miR156* によって *Squamosa promoter binding protein like (SPL)s* の発現が抑制されており、*SPLs* は *miR172* の発現や葉形、トライコームの分布に関与することが知られている。生育と共に *miR156* の発現量が減少することにより、*SPL9* の発現量が増加する。*SPL9* は、*miR172* の転写開始位置の上流に結合することで転写を促進している。このような現象により、生育の初期と後期において *miR156* と *miR172* が相対する発現パターンを示すと考えられている。また、転写後の *miR172* は、DICLER-LIKE 1 (DCL1) や SERRATE (SE) といったタンパク質によって mRNA から *pri-miR172*、*pre-miR172*、*mature-miR172* の順に生合成が進み、*mature-miR172* はターゲットとなる遺伝子の発現を抑制する。この生合成において、日長条件によって、GI は *DCL1* や *SE* を介し、*miR172* の発現量を調節することが知られている。ダイズにおいても開花時に *GmSPL3*、9 の発現が高いことや、*GmSPLs* の塩基配列によって *miR156a/b* の発現抑制を受けるものと受けないものが存在することが報告されているが、ダイズの生育に伴う *GmSPLs*、*DCL1*、*SE* の発現量の変化、日長に対する反応は解析されていない。また、第2章において、長日条件下では生育後期に *miR172* の発現量が減少しており、ダイズの *miR172* の発現パターンがシロイヌナズナと異なることが示唆されたが、その原因については不明であった。本章では、品種による感光性の違いや日長によって、*miR172* の発現に関わる *SPLs* や *DCL1*、*SE* の発現量がどのように変化するのか解析した。

また、第2章では、「エンレイ」と「Peking」について JA 相転換に関する形質を解析し、*E2*、*E3* 遺伝子座が JA 相転換に関与する可能性を示唆した。しかし、両遺伝子座それぞれの JA 相転換への効果については、不明であった。そこで、本章では、感光性に関与している *E2*、*E3* 遺伝子座の JA 相転換における効果について解析した。

「材料および方法」

短日条件—または長日条件で生育した「エンレイ」と「Peking」において、*GmSPL2*、3、9、*GmDCL1*、*GmSE* の発現量を調査し、*miR172* のシークエンス解析を行った。また、「エンレイ」、「Peking」、「エンレイ」を背景に「Peking」の *E2*、*E3* 遺伝子座をそれぞれ導入した準同質遺伝子系統である「En-*E2*」、「En-*E3*」の4系統を用い、*E2* と *E3* 遺伝子の JA 相転換への影響を調査した。

「結果および考察」

「エンレイ」と「Peking」において、*GmSPL3c*、*GmSPL9d* は、日長条件に依らずに *miR156* の発現の減少に伴って、その発現量が増加しており、シロイヌナズナで報告されている *SPLs* と同様の発現パターンを示すことが明らかとなった。一方、長日条件において、*miR156* の発現量が減少した生育後期に *SPL3d*、*SPL9a*、*SPL2a*、*b* の発現量が減少した。このことより、ダイズにおいて開花が抑制される長日条件において、*SPL3d*、*SPL9a*、*SPL2a*、*b* は、*miR156* とは異なる経路によって制御、転写調節されることが示唆された。特に、*GmSPL9c* は「Peking」でのみ発現量が減少しており、*GmSPL9c* の制御には感光性に関与することが示唆された。また、長日条件下の「エンレイ」と「Peking」の生育後期において、*pri-miR172* の発現が示され、「Peking」では生合成に関わる *GmDCL1* と *SE* の発現量が減少していた。このことより、長日条件では、*miR172* の生合成経路も阻害され、*miR172* の発現量が減少していると考えられた。また、これらの減少の程度は、品種の感光性によって異なることが示唆された。

長日条件下の「En-E2」、「En-E3」は「エンレイ」よりも JA 相転換が遅延し、E2、E3 遺伝子座は個々に長日条件下で JA 相転換を遅延させることが示唆された。一方、短日条件下の「En-E2」、「En-E3」は、「Peking」よりも後期の生育段階で JA 相転換が起きており、「エンレイ」とほぼ同等の生育段階であった。E2 と、E3 遺伝子座の両方が機能型になると、短日条件下で「Peking」のように早期に JA 相転換が起きる可能性が示唆された。

[総合考察]

本研究は、ダイズの JA 相転換の知見を集積することを目的に行った。形態的には、JA 相転換によって葉の大きさが急激に変化し、葉の大きさが急激に変化する葉位は、ダイズにおける JA 相転換の指標となることが示唆された。この指標を用い、感光性の強弱によって、日長に対する JA 相転換の反応が異なることを明らかにした。感光性に関する E2、E3 遺伝子座が機能型であると、短日条件によって *miR156* の発現が抑制され、早期の生育段階で JA 相転換が起こる可能性が見出された。長日条件では、E2、E3 遺伝子座が個々に *miR156* の発現を促進し、JA 相転換の起こる生育ステージを遅延させることが考えられた。一方、E2、E3 遺伝子座が機能欠損型であると、日長に対する反応が弱くなり、一定の生育ステージで JA 相転換が起こると考えられた。シロイヌナズナにおいても、日長条件によって JA 相転換の起こる生育ステージが異なることが報告されており、ダイズにおいても日長によって JA 相転換が制御されており、E2、E3 が関与することが示唆された。また、ダイズの開花抑制に働く長日条件下で生育すると、生育後期にいくつかの *GmSPLs* の発現が抑制され、*miR172* の生合成も阻害されることで *Mature miR172* の発現量が減少することが示された。また、E2E3 遺伝子が機能型であると、前述の *SPL* の発現の抑制や生合成経路の阻害に加え、*SPL9c* の発現が抑制され、*GmDCL1* と *GmSE* の発現量も抑制されるために生合成経路の阻害が強くなり、さらに *Mature miR172* の発現量が減少することが示唆された。これまでに生育後期に *SPLs* や *miR172* の発現量が減少することは報告されておらず、新たな知見となった。

※注1 博士論文要約はインターネットの利用により公表されるので、記載内容については十分注意してください。

※注2 公表できない「やむを得ない事由」(特許、知的財産等に係る部分)は記載しないでください。

※注3 全体で4頁～5頁程度を目処にしてください。