

学位論文題名

Molecular genetic and physiological studies on  
*PETIT1* gene affecting sucrose-dependent  
elongation growth in Arabidopsis

(シロイヌナズナのショ糖依存的な伸長成長に関する  
*PETIT1* 遺伝子の分子遺伝学的、生理学的研究)

学位論文内容の要旨

高等植物の形態形成において細胞伸長、ひいては伸長成長は重要な素過程の一つであり、遺伝的プログラムに従い様々な内的因子、外的因子により制御されている。申請者は伸長成長のメカニズムを分子レベルで理解するために、モデル植物シロイヌナズナを用いて分子遺伝学的、生理学的研究を行った。

双子葉植物であるシロイヌナズナの胚軸は発芽後、細胞分裂を行わず細胞伸長のみで伸長を行うことから伸長成長の研究には優れた実験系である。申請者はこの系を用いて新しい劣性の単一遺伝子座の条件伸長欠損突然変異体 *petit1* (*pet1*) を単離した。*pet1* の伸長欠損は、胚軸以外に根、花茎、葉、花弁、小花柄、鞘にもみられ、また培地にオーキシン、ジベレリン、ブラシノライドやエチレン生合成阻害剤を添加しても野生型への復帰はみられなかった。*pet1* には芽生えの矮性形質がショ糖添加培地で育てたときのみ現れるという特徴がある。これはショ糖の伸長成長に対する促進効果が *pet1* ではみられないためである。また *pet1* の芽生えは野生型と比べて糖と澱粉を過剰蓄積していた。この澱粉の過剰蓄積と伸長欠損の因果関係を明らかにするために澱粉生合成欠損突然変異体 *pgm* と *pet1* の二重変異体を作成したところ、*pet1* の表現型は澱粉の有無に関わらず現れることから、澱粉の過剰蓄積は伸長欠損の結果であることを明らかにした。さらに顕微鏡観察により、*pet1* の胚軸を構成している表皮細胞が野生型より縦方向に短いことと、しばしば細胞が異常に肥大したりつぶれる構造を示すことが明らかになった。以上の結果から *PET1* 遺伝子はショ糖依存的な細胞壁の構築に関与し、細胞伸長を制御していると考えられる。

次に伸長成長を調節している様々な内的因子、外的因子と *PET1* 遺伝子との相互作用を

解明するため、伸長成長を制御している光受容体やブラシノステロイド欠損突然変異体と *pet1* との二重変異体を作製してその表現型を調べた。その結果 *PET1* 伸長制御系はフィトクロムやクリプトクロム光信号伝達系とは独立に機能すること、ブラシノステロイド伸長制御系とは同一系路で働くか、または標的分子が同一であることが示唆された。

*PET1* の関与する伸長成長の分子レベルでの理解には、突然変異体の原因遺伝子のクローニングが不可欠である。そこで、現状で確実に遺伝子にたどり着くことのできる方法であるポジショナルクローニング法によって *PET1* 遺伝子のクローニングを試みた。*PET1* 遺伝子はシロイヌナズナ 2 番染色体の約 40cM 付近に座乗している。*PET1* 遺伝子の精密な遺伝的、物理的地図を作成するために、連鎖する可視マーカーならびに分子マーカーと *PET1* 遺伝子座間の組み換え体を約 2,400 本の染色体を調べて単離した。また、*PET1* 遺伝子座の近傍をカバーする YAC や BAC クローンの末端や内側の断片をクローニングし、その分子マーカー化も並行して行った。その結果、2 個のオーバーラップする BAC クローン TAMU7K15 と 28F22 が *PET1* 遺伝子をカバーすることが明らかになった。このことから、*PET1* 遺伝子の位置をゲノム上約 100kb の領域に限定することができた。

特定の遺伝子の機能を解明する上で、同一の遺伝子で優性と劣性の両タイプの突然変異体を単離することが有用である。*PET1* 遺伝子についても *PET1* 遺伝子内サプレッサー *pet1-1D* が存在し、優性に遺伝することがサプレッサーのスクリーニングによって分かった。この知見は今後 *PET1* 遺伝子がクローニングされ、遺伝子構造が明らかにできた際に、*PET1* タンパクの機能-構造相関関係を解析する上で重要な情報を与えることが期待できる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 興太朗  
副 査 教 授 田 中 歩  
副 査 助 教 授 奥 山 英登志  
副 査 助 教 授 山 崎 健 一

学 位 論 文 題 名

## Molecular genetic and physiological studies on *PETIT1* gene affecting sucrose-dependent elongation growth in *Arabidopsis*

(シロイヌナズナのショ糖依存的な伸長成長に關与する  
*PETIT1* 遺伝子の分子遺伝学的, 生理学的研究)

高等植物の形態形成は、主に分裂組織における細胞群の創出と、その後におこる細胞の肥大との二つの過程から成っている。後者は、植物では方向性を持っているのが普通で、多くの場合、一方向に肥大する伸長成長を示す。また、植物細胞は細胞壁によって互いに接着しているため、細胞が自由に相対的な位置関係を変えることができない。その結果、植物の最終的な形態は、細胞分裂後の細胞伸長の程度によることが大きく、細胞伸長の形態形成における重要性が他の分類群の生物に比べて大きい。このことは植物を特徴づける主要な性質の一つであり、伸長成長は古くから多くの研究者の関心をひいてきた。

従来の研究の結果、伸長成長の制御機構はある程度解明されてきたが、その多くは最上流の調節因子である各種の植物ホルモン単独の効果や、光に代表される環境因子による調節の生理学的または分子遺伝学的研究か、あるいは最下流に位置する細胞壁構成要素の生化学的研究である。伸長成長が単独のホルモンや環境因子によって調節されるような単純な系ではなく、多数の調節因子が関与する複雑なネットワークによって調節されていることは明白でありながら、今までそのようなネットワークを解明しようという努力は極めて少なかった。申請者は、そのような従来の研究の欠陥をただすために、モデル植物、シロイヌナズナを用いて伸長成長に欠損を持つ突然変異体 *petit1* (*pet1*) を単離し、その生理学的、分子遺伝学的研究をおこなった。

*pet1* は単一遺伝子座による劣性突然変異体で、胚軸伸長に欠損が生ずる突然変異体として単離した。*pet1* の胚軸伸長欠損は胚軸細胞の長さの減少が原因で、長期間、暗所で栽培すると胚軸伸長帯の細胞群が膨潤または萎縮し、細胞壁になんらかの欠陥が生ずることが示唆された。*pet1* の伸長欠損は胚軸ばかりでな

く、花茎、葉、花弁、鞘でも観察された。*pet1* 芽生えの伸長欠損はショ糖を加えて培養したときにのみ顕著なので、*pet1* は野生型で起こるショ糖による胚軸伸長促進効果が失われた突然変異体だと考えられる。実際、*pet1* では内生のブドウ糖や果糖、ショ糖、澱粉の量が増加しており、野生型では細胞壁合成等の伸長成長に消費されるべきショ糖が使用されずに蓄積していると考えられる。*pet1* ではアントシアニン量が増加し、クロロフィル量が減少しているが、これは細胞内の糖濃度の増加が原因であろう。*pet1* は芽生えばかりでなく成熟個体での伸長成長も部分的に阻害されているが、これは光合成により生産される糖の効果だと考えられる。

*pet1* の伸長成長欠損は外生のオーキシンやジベレリン、ブラシノステロイドを与えても回復しないので、*pet1* はこれら植物ホルモンの生合成欠損突然変異体ではない。*pet1* の種子はしばしば穂発芽するので、アブシジン酸の関与を調べたところ、*pet1* では発芽阻害や主根伸長促進を引き起こすアブシジン酸の効果が低下しており、*pet1* は新しいタイプのアブシジン酸非感受性突然変異体であることがわかった。

次に、従来より明らかにされている伸長成長制御系と *pet1* との関係を明らかにするために、二重突然変異体を作成してその表現型を調べた。光受容体欠損突然変異体である *phyA*、*phyB*、*cry1* や、光信号伝達系欠損突然変異体 *det1* と *pet1* との二重突然変異体は伸長成長に関して相加的な表現型を示したので、光によって制御される伸長成長制御系と *pet1* が関与している伸長成長制御系とは独立していることがわかった。細胞壁合成異常を示す *pom1* や *prc1* と *pet1* との二重突然変異体も相加的な表現型を示したので、これら遺伝子が関与する細胞壁合成と *pet1* とは独立であると考えられる。一方、ブラシノステロイド生合成酵素欠損突然変異体 *det2* と *pet1* の二重突然変異体は、それぞれ半矮性である *det2* や *pet1* よりはるかに小さい形態を示し、*det2* も *pet1* も示さない不稔性を示したことから、この二つの遺伝子座は相乗的な効果を持つことがわかった。

*PET1* 遺伝子は2番染色体の中央付近に座乗している。*PET1* を単離するために精密なマッピングをおこなった結果、2個のBACクローン、TAMU7K15か28F22上に存在することがわかり、近い将来の同遺伝子のクローニングが期待できるようになった。

以上の結果は、高等植物の成長制御機構に、細胞壁構築に関わる因子でショ糖とアブシジン酸の影響を受け、ブラシノステロイドによる調節系と相互作用するものがあることを示しており、複雑な同機構を解明する有力な手がかりを明らかにしたと評価できる。審査員一同は、この成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得などもあわせ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。