

京都大学	博士（農学）	氏名	Ayesha Siddika
論文題目	Analysis of the gene regulatory networks controlling flowering time in rice (イネの開花時期を調整する遺伝子調整ネットワークの解析)		
(論文内容の要旨)			
開花期（出穂期）はイネの生産性を左右する農業上重要な特性である。このため開花期を制御する遺伝因子の解明は、地域毎に異なる日長や温度に応じた最適な生育期間を品種に付与する上で極めて重要である。短日植物であるイネは、短日条件下ではFT様遺伝子（イネのプロリゲン）の発現をHd1あるいはEhd1が促進することで、長日条件下ではHd1およびEhd1のFT様遺伝子発現促進効果を抑制することで、開花時期を制御している。既に多くの開花期関連遺伝子が同定され、それらの機能に関する知見も増えてきたが、制御に関わる遺伝子間の相互作用に関しては未解明の部分が多い。本論文は、イネ品種銀坊主に誘発された突然変異遺伝子の二重突然変異系統の利用が遺伝子間相互作用の解明に極めて有用であることを示した。また、銀坊主に誘発された多様な突然変異遺伝子間の相互作用を網羅的に解析するため、銀坊主への効果的な遺伝子組み換え系ならびに緑色プロトプラストを用いた一過的発現系の確立を目指したものであり、以下のよう に要約される。			
1. 銀坊主に誘発された2種の突然変異遺伝子se13およびef7はアラビドプシスのHY2およびEFL3のオーソログ遺伝子の機能喪失型対立遺伝子であり、前者は光シグナル受容に必要なファイトクローム（PHY）の活性化を担うファイトクロモビルン合成に関与しており、機能喪失したse13遺伝子を有する系統は長日シグナルを受容できず日長による開花遅延反応を失う。後者は赤色光受容体のPHYB分解に関与しており、Ghd7を介した長日シグナル抑制因子である。両遺伝子の二重突然変異系統は長日条件で短日条件よりも開花期が遅くなり、Ghd7の発現上昇が確認された。これらのことから、se13単独突然変異系統は極少量のファイトクロモビルン合成能を有しPHYBを活性化できるが、Ef7によるPHY分解を受けて長日シグナルを伝達できないこと、ならびに二重変異体ではPHYが分解を受けないためGhd7を介した開花遅延が生じることが確認できた。			
2. 遺伝子の形質転換は突然変異遺伝子の相補性試験ばかりでなく、遺伝子ノックアウト体もしくは過剰発現体作製を利用した遺伝子機能の解析に不可欠である。当分野に保存されているイネ品種銀坊主に由来する多様な開花期突然変異系統は、二重突然変異解析に有用であるばかりでなく銀坊主ゲノム特異的にコピー数が多い転移因子mPingを利用した変異遺伝子の迅速な同定が可能であるなど他にはない利点がある。しかし、銀坊主はアグロバクテリウム感染に極めて感受性が高く、アグロバクテリウムを用いた形質転換効率が極めて低い。このため相補性検定ばかりでなく遺伝子の機能解析にも支障をきたすことが多い。この点を克服するため低い感染濃度、除菌剤の改変、風乾による形質転換効率の改善等を組み合わせた結果、銀坊主に対する効率的な形質転換系の作出に成功した。			
3. 遺伝子の一過的発現系を利用すれば遺伝子間相互作用の検定を多数の組み合わせに関して効率的に実施できる。このためには、イネの日長応答性に関わる遺伝子			

間の相互作用の検定に必要な葉肉細胞から調整した緑色プロトプラストを用いた一過的発現系が不可欠である。銀坊主より調整した葉肉細胞プロトプラストで*Ehd1*遺伝子とその標的となる*Hd3a*あるいは、*RFT1*のプロモーター領域を一過的に発現させて、遺伝子間相互作用の有無をルシフェラーゼ・レポーター検定によって観察した。その結果、短日条件下で*Ehd1*が直接*Hd3a*の発現誘導に関与していること、*Ehd1*の過剰発現は*RFT1*の発現をむしろ抑制することが明らかであった。観察された相互作用の結果は、従来の報告と一致しており、イネ葉肉細胞由来の緑色プロトプラストとルシフェラーゼ・レポーター検定を組み合わせた一過的発現系によって、日長応答性に関わる遺伝子間の相互作用の網羅的解析が可能であることを明らかにした。

以上より、同一品種に由来する突然変異系統間の交雑から得られる二重突然変異体は遺伝子間の相互作用が複雑に組み合わさった発現制御系の解析に極めて有効な手段であることを明らかにし、多数の突然変異遺伝子間の相互作用の検出・検定に有効な手段となる形質転換系ならびに一過的発現系を品種銀坊主に関して確立した。この結果、銀坊主に由来する多様な変異遺伝子に関して網羅的な発現制御ネットワークの解析が可能になり、イネの開花期制御系の解明に貢献することが期待された。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

イネの開花期突然変異は開花期を制御する遺伝的機構の解析に不可欠の材料である。この分野で先行しているシロイヌナズナの花成制御に関する分子遺伝学的解析においても多様な突然変異系統の利用が研究の推進を支えてきている。イネにおいても多様な突然変異系統の利用が盛んになりつつあるが、シロイヌナズナのように体系的に収集された突然変異系統のコレクションは極めて少ない。本研究は、銀坊主を原品種として誘発、収集された多様な開花期突然変異系統の解析に必要な基盤を確立したものである。本研究の評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. 同一品種由来の突然変異系統を利用すれば、二重突然変異系統の作出は極めて容易である。この利点を生かして日長感应性を喪失して極早生となった系統と日長条件とは無関係に開花が遅延する晩生系統との交雑により二重突然変異系統を作出した。二重突然変異系統が日長感应性を回復することから、イネの*Ef7*遺伝子がシロイヌナズナにおいて見出されるオーソログである*ELF3*と同様にファイトクロームの分解に関与していることを明らかにした。
2. 銀坊主に由来する突然変異系統はゲノム内に分子マーカーとして利用できる多コピーの転移因子*mPing*を有しており、この特徴を生かして突然変異遺伝子が座乗する染色体断片を極めて容易に同定できる。この特徴を最大限に活用するため、形質転換が極めて困難である銀坊主に対して最適な形質転換系を確立した。この結果、交雑による二重突然変異系統作出では膨大な時間が必要となる多数の突然変異遺伝子間の相互作用解析を遺伝子ノックアウトや遺伝子過剰発現によって効率的に実施できるようになった。
3. 開花期関連遺伝子間の機能解析には、遺伝子産物間での直接的な相互作用の確認が必要である。この目的のために用いられる一過的発現系を葉肉細胞由来の緑色プロトプラストを用いて確立した。これにより、光応答に関しては正常な状態の緑色プロトプラストを用いた遺伝子間相互作用の解析を可能にした。

以上のように、本論文は二重突然変異系統を用いた遺伝子間相互作用の解析がイネの開花期制御系の解析にも極めて有効であることを明らかにするとともに、豊富な突然変異系統を用いた網羅的な遺伝子間相互作用の解析を可能にする形質転換系および一過的遺伝子発現系の確立に成功したものである。本論文は、育種学のみならず、作物学、栽培学、植物生理学ならびにイネ育種の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成25年 2月 12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Web での即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降