

氏 名 手塚 拓海

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2502 号

学位授与の日付 2024 年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 A study on the mechanism of dorsoventral axis formation in
rice embryo

論文審査委員 主 査 野々村 賢一
遺伝学コース 准教授
齋藤 都暁
遺伝学コース 教授
澤 斉
遺伝学コース 教授
津田 勝利
遺伝学コース 助教
伊藤 純一
東京大学 大学院農学生命科学研究科 准教授

博士論文の要旨

氏 名 : Tezuka, Takumi

論文題目 : A study on the mechanism of dorsoventral axis formation in rice embryo

Monocots and dicots are the two major groups of angiosperms. The number of cotyledons produced during embryogenesis is one of the well-recognized differences between them. In a dicot embryo, two cotyledons are arranged symmetrically at the opposite flanks of the shoot apical meristem. On the other hand, in a monocot embryo, the shoot apical meristem is formed at the axil of one cotyledon. In grasses, the largest family in monocots, the scutellum, an organ equivalent to a cotyledon or a part of a cotyledon in monocots, absorbs nutrients from the endosperm to feed embryo. This embryo-endosperm communication is pertinent for embryo development and seedling growth of monocots and becomes possible by the arrangement of the embryonic organs where scutellum locates adjacent to endosperm and shoot faces to the outside of the seed. Hereafter, I refer to the side of the shoot in embryo as the ventral side, while the side of scutellum in the embryo is the dorsal side.

The dorsoventral axis is a unique body axis in monocot embryos and is one of the novel characters acquired when monocots are diverged from dicots. Therefore, studies on the mechanism of dorsoventral axis formation in monocot embryos are expected to give insights into the evolution of monocotyledonous plants. In my thesis, I analyzed the function of rice *BABY BOOM* genes (*BBMs*) in embryogenesis to elucidate the mechanism of dorsoventral axis formation.

bbm triple mutant embryos (hereafter called *bbm* embryos) showed morphological abnormalities associated with irregular dorsoventral axis formation. I conducted transcriptomic and *in situ* hybridization analyses and showed that the mutant embryos exhibit abnormal expressions of dorsal and ventral specific genes. Furthermore, the

expression levels of several *PIN* genes were reduced in the mutant embryos compared to those of normal ones. PIN is known to be involved in the polar auxin transport. In addition, *in situ* hybridization analysis revealed that the localized expressions of *PINs* were lost in the mutant embryos. Therefore, I hypothesized that, in the *bbm* embryos, auxin localization and response became abnormal. I tested this using an auxin response reporter. I showed that, in the wild-type embryo, a single auxin response focus is observed at the apical tip corresponding to a part of future scutellum in the embryo, while in the *bbm* embryos, auxin response becomes irregular and unstable. Thus, it is suggested that properly localized *PIN* expressions mediated by *BBMs* followed by the formation of the auxin response focus are associated with the correct organization of the dorsoventral axis. Considering the ubiquitous expression of *BBMs* in the embryo and localized *PIN2* expression in the dorsal side, a cue for the dorsoventral axis formation must exist other than *BBMs*.

I hypothesized that auxin or other substances supplied from the endosperm, which is in contact with the dorsal side of the embryo, could be a cue to form the dorsoventral axis in the embryo. I analyzed auxin content in the embryos of *endospermless1 (enll)* mutants, which lack endosperm in the seed, and checked dorsoventral axis formation in *enll* mutants. I found that auxin contents in *enll* embryos were greatly reduced compared to the normal embryos. Notably, I did not find any change in the gene expressions of auxin biosynthesis and catabolism-related genes between *enll* and normal embryos. Thus, it is likely that the reduction of auxin content in *enll* is not due to defects of auxin metabolism in *enll* mutant embryos, rather a part of auxin amount in embryo depends on development of endosperm. The expression patterns of ventral and dorsal marker genes were abnormal in *enll* embryos. These results indicate that auxin or its precursor derived from the endosperm is required for the formation of the dorsoventral axis in the embryo.

Overall, I propose a model that the embryo-endosperm communication mediated by

auxin or its precursor and regulation of localized expression of *PINs* by *BBMs* operates to establish the dorsoventral axis in rice embryos.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 手塚 拓海

Title
論文題目 A study on the mechanism of dorsoventral axis formation in rice embryo

被子植物のうち、双子葉植物の初期胚は左右対称の形状を示すが、単子葉植物の初期胚は左右非対称な背腹性（イネ科では胚乳側が背側）をもつ。手塚さんは、先行研究で示されたイネ *bbm* 三重変異体の初期胚の形状が、胚の極性異常を示す他の変異体の胚形状と酷似することに気づき、初期胚の発生軸形成における *BBM* 遺伝子の機能解析を開始した。

bbm 三重変異を有する初期胚のほとんどは致死となり種子は発芽しない。受粉後 3~5 日の初期胚の切片観察、および初期胚の極性マーカー遺伝子発現の組織局在性解析から、*bbm* 三重変異胚は、背腹性の完全な欠損に加え、背腹方向の逆転、あるいは腹-背-腹のように 2 つの背腹軸が鏡面对称で形成される軸極性の異常が原因で致死する可能性を見出した。顕微鏡下で切り出した初期胚切片を用いた mRNA-seq 解析から、*bbm* 三重変異体の初期胚は 2 群に分類され、分類群 1 の胚では背側マーカー遺伝子の発現低下および腹側遺伝子の発現上昇が検出され、背腹軸欠損型の胚との対応が推察された。一方分類群 2 の胚は、一部の遺伝子を除いて野生型胚と類似の発現パターンを示すことから、背腹軸極性異常型の胚との対応が推察され、形態観察結果を支持すると考えられた。

次に、胚の背腹軸制御に重要な遺伝子を抽出するため、分類群 1 と分類群 2 の胚で共通して発現低下する遺伝子群を検索し、植物ホルモンの一種オーキシン (*Aux*) の極性輸送に機能する 2 つの *PIN* 遺伝子を見出した。イネが保存する 4 つの *PIN* パラログ遺伝子は野生型の初期胚で極性をもって発現するが、*bbm* 三重変異体の胚ではいずれの *PIN* も発現極性を失っていた。また、*PIN* タンパク質の局在性および *Aux* レポーターの発現パターンから、野生型初期胚では胚乳と接する胚盤の前表皮細胞が、胚の頂部に向けた *PIN* 依存的 *Aux* 流路である可能性が示された。

手塚さんは更に考えを進め、胚乳から胚に供給される *Aux* が、胚における *PIN* と *Aux* 流路の背側細胞への偏在、ひいては背腹性の決定に重要な役割を果たす可能性の検証のため、胚乳が欠損する *en11* 変異体を用いた解析を行い、*en11* でも *bbm* 三重変異体と同様に初期胚における背腹性の欠損を観察した。また、受粉後 5 日目の *en11* 胚では *Aux* 生合成経路で働く遺伝子群の発現が変化しないにも関わらず *Aux* 量が有意に低下していた。

本論文の結果から、イネ *BBM* は *PIN* 依存的な *Aux* 輸送を介して背腹軸形成を制御する可能性、また胚乳から供給される *Aux* が背腹軸の決定に重要な役割を果たす可能性が示唆された。胚乳依存的な胚軸形成に関する仮説は更なる検証が必要だが、単子葉植物の初期胚の発生軸形成に新たな知見をもたらす成果であり、博士論文として十分な水準に達していると審査員一同が判断した。