

氏 名 安 柄 玉

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第637号

学位授与の日付 平成14年9月30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4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Map-based cloning of *PLAI*, a heterochronic gene,  
in rice(*Oryza sativa* L.)

論文審査委員 主 査 教授 佐々木 裕之  
教授 城石 俊彦  
助教授 角谷 徹仁  
教授 長戸 康郎 (東京大学)  
助教授 高野 敏行 (国立遺伝学研究所)

## 論文内容の要旨

The rice *PLASTOCHRON1* (*PLA1*) locus is considered to regulate the leaf initiation rate (plastochron) and the duration of vegetative phase without affecting reproductive phase (Itoh *et al.* 1998). To elucidate the mechanisms that regulate the plastochron and the duration of vegetative phase, I have isolated the *PLA1* gene through map-based cloning and investigated the *in situ* expression pattern during rice development. The molecular cloning of the *PLA1* gene should provide a clue to understand the mechanisms of temporal regulation of developmental programs in rice.

Genetic and physical maps were constructed to isolate the causal gene for *PLA1* syndrome. A small-scale mapping was carried out to determine approximate map position of the *PLA1* locus and then a high-resolution genetic mapping was performed for *PLA1-2*, one of the *PLA1* alleles, using an F<sub>2</sub> population comprising 578 *PLA1-2* homozygous plants. In the high-resolution genetic map, the *PLA1* locus was mapped between the restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers C961 and R1738A on chromosome 10, within a 3.6-cM genetic distance.

A physical map encompassing the *PLA1* locus was constructed with overlapping bacterial artificial chromosome (BAC) clones isolated through chromosome walking. PCR-based RFLP markers from the BAC-ends were developed and mapped relative to the *PLA1* locus. The physical map indicated that a BAC clone B44A10 contained the *PLA1* locus within a 74-kb region corresponding to a 0.52-cM genetic distance. Gene prediction was performed on the 74-kb region carrying the *PLA1* locus using gene prediction programs and several candidate genes were identified, including a cytochrome P450 gene, a putative GTPase regulator protein gene and some transposable element-like sequences.

Nucleotide sequence comparisons between the wild-type allele and the four mutated alleles of *PLA1* (*PLA1-1*~*PLA1-4*) revealed that all *PLA1* mutants had a mutation in the P450 gene but not in other candidate genes. A genetic complementation experiment using *PLA1-2* homozygous plants confirmed that all transgenic plants transformed with pBGH1-*PLA1*, which contained the P450 gene, completely recovered to the wild-type phenotype, while those transformed with the pBGH1 vector did not.

The *PLA1* gene was designated CYP78A11 according to the cytochrome P450 nomenclature committee guidelines. This was the first plant protein classified to the CYP78A subfamily of cytochrome P450. The CYP78A11 gene was 1.8 kb in size and consisted of two exons and one short intron. The gene coded for a 555-amino-acid protein with a calculated molecular mass of 59 kD. Sequence comparisons showed that the *PLA1* protein possesses conserved sequences such as the heme binding domain near the C-terminus, a potential oxygen-binding domain and a steroid-binding domain, which were conserved in all cytochrome P450 superfamily.

*In situ* hybridization experiments revealed the spatial and temporal expression patterns of the *PLA1* gene. *PLA1* mRNA was localized in developing leaves but not in the shoot apical meristem (SAM) through vegetative and reproductive phases. The mRNA localization gradually changed during leaf development. Since the *PLA1* mutants exhibits several defects in leaves and the SAM,

the leaf specific expression pattern suggested that the *PLAI* gene affects leaf development and SAM activities in a non-cell-autonomous manner. The *PLAI* expression pattern in leaves showed a correlation with the leaf development pattern in monocotyledous plants, suggesting a possible role of the *PLAI* gene in regulating maturation of leaves.

In future works, transgenic plants overexpressing CYP78A11 may provide a clue to elucidate the function of the *PLAI* gene. The cytochrome P450 proteins, however, form a largest plant enzyme family and have a wide diversity of substrates and a high degree of amino acid sequence variation. Though CYP78A11 could function in a given step of plant hormone biosynthesis or degradation, measurement of limited amounts of plant hormones in restricted regions would be difficult. However, biochemical analysis of CYP78A11, including a search for substrates, should give us a clue to unravel the molecular mechanism of phase change in plant growth and development.

## 論文の審査結果の要旨

植物のライフサイクルは胚発生、栄養生長、生殖生長などの生長相に分かれ、各生長相では独自の発生様式が展開される。しかし、各生長相に特異的な発生プログラムが時間的にコーディネートされる遺伝的な調節機構は明らかになっていない。「Map-based cloning of *PLA1*, a heterochronic gene, in rice (*Oryza sativa* L.)」と題する安君の学位論文では、葉間期の短縮、栄養生長期の延長、植物体の矮小化、穂の shoot への転換などの形質を示すイネの劣性ヘテロクローニック変異 *PLA1* について、ポジショナルクローニングによりその原因遺伝子の同定に成功したことが述べられている。

まず、イネゲノム上の多型マーカーを用いて *PLA1* 遺伝子座を遺伝学的にマッピングしたところ、第 10 染色体短腕のセントロメア近傍に位置することが分かった。そこで最も近接するマーカーをプローブとして BAC ライブラリーをスクリーニングし、得られたクローンから染色体ウォーキングを試みた。最終的に単一 BAC クローン内の 74 kb の領域に *PLA1* 遺伝子を追い込み、既にゲノムプロジェクトにより決定されていた配列をもとに、この領域内に 3 つの遺伝子が存在することを見つけた。そこで、*PLA1* 変異株においてこれら 3 つの遺伝子の配列を決定したところ、これまでに分離されている 4 つの変異株 *PLA1-1* ~ *PLA1-4* はいずれもチトクローム P450 ファミリーの遺伝子 (CYP78A11 と命名) 内に変異をもつことが分かった。この遺伝子が *PLA1* 遺伝子であることを確定するため、安君は *PLA1-2* 変異株にこの遺伝子を導入し、表現型が正常に復することを示した。最後に、この遺伝子の発現と表現型との関係を明らかにするため、*in situ* ハイブリダイゼーション法により *PLA1* 転写物の局在を調べた。その結果、*PLA1* 遺伝子は葉の原基および分化途中の葉 (主に背軸面) において一過性に発現し、茎頂分裂組織や発達した葉では発現しないことが分かった。また、*PLA1* 遺伝子の葉における発現は栄養生長期に限らず、生殖生長期の包葉の原基や発生中の包葉においても見られた。以上の結果を総合して、安君は、*PLA1* 遺伝子は発現する葉の細胞自身を調節するのではなく、茎頂分裂組織や遅れて発生する葉に影響を与えて (おそらくそれらを未熟な状態に保つことで) 葉間期を正常に保つというモデルを提案した。CYP78A11 の P450 としての機能が如何にしてこの調節に作用しているかは今後の問題としている。

審査員全員でこの論文を審査し、(1) イネで初めてヘテロクローニック変異の遺伝子同定に成功した極めて独自性の高い仕事であること、(2) マッピングや形質転換などの膨大な仕事を主体的に進めたこと、(3) 葉間期の調節の機構を理解する上で有用な新しいモデルの提案に至ったことなどを評価し、当大学院の水準を十分に満たしていると判断した。また、学位論文が的確な英語で書かれていること、既に本論文の一部が申請者を筆頭著者として英文誌へ掲載されていることから、英語の能力も充分であると判断した。