

論文内容の要旨

申請者氏名 Lai Kok Song

TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) 法は、特定の遺伝子の機能を多数の点突然変異体の同定を通じて明らかにするために開発された逆遺伝学的手法である。多くの生物種で TILLING 用のリソースの作出が進められてきたが、植物研究で最も利用されるシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* において整備されているのは、Columbia と Landsberg erecta の 2 系統に限られている。本研究では、様々な環境ストレスに対し特異な応答性を示し、また S 遺伝子座以外の自家不和合性関連遺伝子を全て保持していることが示されている C24 系統に着目し、新たな TILLING 用リソースを作出すると共に、本リソースを複数の有性生殖関連遺伝子候補の機能解明に適用した。

まず、C24 系統の種子を EMS 処理し、独立した M₁ 株に由来する計 3,509 個の M₂ 株よりゲノムと種子を回収し、TILLING 用リソース(C24TILL)を確立した。実際に以下に述べる機能未知遺伝子への TILLING 法の適用結果から、C24TILL は期待される G/C から A/T への点突然変異を高頻度に含み、変異率は約 1/433 kb であることが示唆された。

まず、花粉の発達に必須の R2R3 MYB 転写因子遺伝子 *DUO1* の機能解析に TILLING 法を適用した。当初期待した部分的に機能を欠失したミスセンス変異株を C24TILL より得ることはできなかったが、新たなナンセンス変異株が得られ、本遺伝子が花粉の雄原細胞から精細胞への分裂過程に必須の役割を果たしていることが確認された。

次に、*APK1b* (*Arabidopsis protein kinase 1*) と *PKA* (*protein kinase A*) という 2 種類の自家不和合性関連遺伝子候補の機能解析に C24TILL を利用した。それぞれ 3 種類および 7 種類のミスセンス変異を同定したが、交配によりこれら変異遺伝子を自家不和合性を付与させた C24 系統に導入しても自家不和合性の表現型に変化は認められず、これら遺伝子の自家不和合性への関与を示唆するデータを得ることはできなかった。

次に、花粉で発現する機能未知のエクソシスト構成因子 *Exo70C2* の機能解析に TILLING 法を適用した。C24TILL の中にナンセンス変異株は見出されなかったが、21 のミスセンス変異株が得られ、その内の C 末端側に変異を持つ 3 株が花粉の発達異常という同じ表現型を示した。発現解析により *Exo70C2* は発達ステージ 9~10 の花粉および葯のタペート細胞で強く発現し、同タンパク質は細胞質に局在することが示された。得られたミスセンス変異株の花粉では丁度同時期に形態が異常となり、受精能をほぼ欠失することから、*Exo70C2* は花粉あるいは葯のタペート細胞内における小胞輸送過程で重要な役割を果たしていることが示唆された。

本論文では、シロイヌナズナ C24 株を用いて新たなリソース C24TILL を作出すると共に、TILLING 法を適用することで機能解析に有効な点突然変異株を効率的に取得できることを証明した。本リソースは、今後自家不和合性関連遺伝子候補の機能解析など様々な研究分野で役立つことが期待される。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Lai Kok Song

TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes)法は特定遺伝子の機能を探るための逆遺伝学的手法の一つであるが、遺伝子ターゲティング効率の悪い植物では特に重要である。しかし、研究に汎用されているシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* においても TILLING 用リソースが整備されているのは Columbia と Landsberg erecta の 2 系統に限られている。*A. thaliana* の C24 系統は、病害菌に対する高い基礎抵抗性や、様々な環境ストレスに対する特異な抵抗性を保持しており、上記 2 系統に次いで良く用いられている系統である。特に、近縁の *Arabidopsis lyrata* 由来の自家不和合性関連遺伝子 *SRK* (*S*-receptor kinase) および *SP11/SCR* (*S*-locus protein 11/cystein-rich) を導入すると安定な自家不和合性を獲得することから、本機構の解明には極めて有用な系統である。そこで本研究では、C24 系統の TILLING 用リソースを確立すること、さらにそのリソースを自家不和合性など有性生殖過程に関わる遺伝子の機能解析に適用し、新たな知見を得ることを目的として進められた。

EMS 処理した C24 系統の種子から、変異遺伝子の重複を避けるために個別に M₂ 世代を育成し、最終的に 3,509 株分のゲノムと種子を回収し、TILLING 用リソース (C24TILL) を確立した。さらに、複数の生殖関連遺伝子について TILLING 法による機能解析を実施し、本リソースが G/C から A/T への置換を中心とする点突然変異を約 1/433 kbp の割合で含む実用的なものであることを証明した。

機能解析を進めた遺伝子の内、自家不和合性関連遺伝子候補の *APK1b* (*Arabidopsis protein kinase 1*) と *PKA* (*protein kinase A*) については、同定された複数のミスセンス変異を交配により *SRK/SP11* 遺伝子を持つ株に導入したが自家不和合性の表現型に変化は認められず、これら遺伝子の自家不和合性への関与の有無を検証するには至らなかった。一方、和合性関連遺伝子候補については明確な表現型を示す変異株を得ることに成功した。特に、これまでにタグラインが得られておらず機能が未解明であったエクソシスト構成因子遺伝子候補の *Exo70C2* について解析を進めた結果、ミスセンス変異を持つ 21 株を取得し、その内 3 種類の株が花粉の発達過程において同等の異常を示すことを見出した。さらに、詳細な発現解析から *Exo70C2* が発達ステージ 9~10 の花粉と葯のタペート細胞で特異的に発現することを見出し、恐らくこの時期の小胞輸送に関与し、花粉の発達に重要な役割を担っていることを明らかにした。

以上のように、本論文は *A. thaliana* C24 系統において新たな TILLING 用のリソースを確立すると同時に、エクソシスト構成因子 *Exo70* の一員 (*Exo70C2*) が花粉の発達に重要な機能を持つことを初めて明らかにするなど本リソースの有用性を証明したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。