

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 ORDONIO Reynante Lacsamana

論 文 題 目

Analysis of gamma ray-induced sweet sorghum mutants  
(ガンマ線によって誘起されたスイートソルガム突然変異体の解析)

論 文 審 査 担 当 者

主 査	名古屋大学准教授	佐 塚	隆 志
委 員	名古屋大学教授	松 岡	信
委 員	名古屋大学教授	北 野	英 己

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、スイートソルガム(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)の一品種である SIL-05 を母本として用い、(1) ガンマ線照射によって得た突然変異体の表現型を網羅的に解析後、その結果を集積しデータベース化したこと、(2) このうち極矮性変異体については、原因遺伝子の分子遺伝学的解析に加え、ソルガムにおけるジベレリン欠乏による地上部茎葉の屈曲現象を発見し、その解析結果を報告したこと、(3) さらに、複数の徒長型変異体や半矮性変異体を材料とした分子遺伝学的、植物生理学的解析を通して新たな知見を見出したこと、の三点が主な内容である。

Ordonio は、高濃度の糖を稈に蓄積するスイートソルガムが今後重要なエネルギー作物となると考え、研究材料として選択した。また、スイートソルガムの分子遺伝学は、これまであまり行われていなかったことも研究対象とした理由である。Ordonio は、スイートソルガムを対象に研究を開始するにあたり、まず、突然変異体ライブラリーの構築を目指した。SIL-05 の種子に 175~250Gy のガンマ線を照射し M<sub>1</sub> 世代を育成後、この M<sub>1</sub> 個体の自殖により多数の M<sub>2</sub> 世代種子を得た。次に、この M<sub>2</sub> 種子を用いて 5000 系統以上の M<sub>2</sub> 世代を圃場展開し、主に幼苗期と出穂期を対象に、特徴的な形態を示す突然変異体の大規模スクリーニングを行った。その結果、調査対象とした 5,466 系統の中から 669 系統の突然変異体の選抜に成功し、これらの変異体を 11 の表現型(発芽、生長、葉色、葉形態、草丈、病害応答、分けつ、稈形態、出穂期、穂形態、その他)に基づいて大別した。このような突然変異体の大規模作出は、ソルガムでは数少ない実践例の一つであり、今後のソルガム研究の発展に貢献する成果であると評価した。

Ordonio は、同定した変異体のうち 5 種類の極矮性変異体(*bdw1* (*bending dwarf 1*), *bdw2*, *bdw3-1*, *bdw3-2*, *bdw4*)について、さらに詳細な解析を行なった。これらの変異体を解析する過程において、Ordonio は何れの変異体においても極度の矮化を示すだけでなく、生育中の茎葉が異常に屈曲する表現型も伴うことを見出した。そこで、*bdw3-1* の屈曲した茎部を組織解剖学的に解析した結果、屈曲部分の内側及び外側で細胞数が大きく異なることを明らかにし、この細胞増殖の不均一性が稈の屈曲性の原因であると結論した。

さらに、Ordonio は植物生理学的観点からも研究を進め、*bdw* 変異体の幼苗期と栄養成長期の重力屈性について実験を行った。その結果、幼苗期では変異体の地上部は重力刺激に応答したが、野生株に比べるとその反応は遅延した。また、変異体の地下部(根)も重力刺激に応答したが、野生株に比べ応答が遅延した。同様に、変異体では栄養成長後期における地上部の応答も遅延した。これらは、*bdw* 変異体の矮化茎葉部の伸長が阻害されることによって起きており、それが原因で重力刺激に対する反応が遅延したと考察した。

次に Ordonio は分子遺伝学的観点からも研究を展開した。この過程では、*bdw3* 変異体の原因遺伝子を決定するため、*bdw3-1* 変異体(母本は SIL-05)と別品種の *bmr-6* との交配を行い、その F<sub>2</sub> 雑種集団を用いたポジショナルクローニングを行った。この結果、*bdw3* 遺伝子の候補領域を約 4Mb に絞り込むことに成功した。この領域にはジベレリン(GA)合成遺伝子である *SbKO1* が座乗していたことから、Ordonio は *SbKO1*

のサザンハイブリダイゼーション解析及び PCR 解析を行い、この遺伝子領域を含む 45kb の領域が変異体で欠失していることを明らかにした。さらに、他の *bdw1*, *bdw2*, *bdw3-2*, *bdw4* 変異体でも GA 合成遺伝子である *SbCPS1*, *SbKSI*, *SbKO1*, *SbKAO1* にそれぞれ変異があることも明らかにした。それらの変異は順に、タンパク質コード領域を含む 16kb 領域の欠失変異、第 3 エキソンで 1 塩基欠失によるフレームシフト変異、タンパク質コード領域を含む 17kb の欠失変異、第 2 エキソンで 5 塩基欠失によるフレームシフト変異であり、全てヌル変異であると結論した。

また新たな試みとして、Ordonio はイネをソルガム遺伝子の形質転換実験の宿主植物として活用した。この過程では、アグロバクテリウム法によりソルガムのジベレリン生合成酵素の野生型遺伝子をイネの GA 合成遺伝子の変異体に導入した。この結果、イネの極矮性が野生型に回復したことから、ソルガム変異体で欠失した遺伝子が GA 合成遺伝子としての機能を有すると結論した。

さらに Ordonio は、変異体の表現型を GA 添加によって回復させた。また、野生株に対して GA 合成阻害剤であるユニコナゾール処理を行うことで、濃度依存的な茎葉の屈曲及び節間の短縮化を示した。この結果は変異体の表現型を模倣するものであり、変異体の屈曲性が GA レベルの低下によって引き起こされたと考えた。

以上のように、Ordonio はソルガムの GA 生合成酵素変異体における特徴的な茎葉の屈曲性を解明すべく、植物生理学的、分子遺伝学的解析を詳細に行い、その関係性を解明したことに独創性が認められ評価された。

また、GA 欠乏による矮性と稈の屈曲性はいつも同時に引き起こされることから、Ordonio は GA 関連変異がソルガムの育種では用いられなかった可能性を考えた。そこで、これまで行われてきたソルガムの稈長の QTL 解析やアソシエーション解析の結果を調べた。その結果、これまで明らかにされてきた矮性遺伝子座は GA 関連遺伝子座と一致しないことを明らかにした。このジベレリンとソルガム育種との関係性については、これまで全く報告のない独自性の高い研究結果であり評価された。

また Ordonio は、別の変異体についても解析を進め、この過程ではソルガム変異体とイネ変異体の表現型の類似性に基づき、双方の原因遺伝子はオルソログの関係であるという作業仮説を立て研究を進めた。まず、強い奇形葉の表現型を示すソルガム変異体を解析対象とし、イネのブラシノステロイド(BR)変異体の表現型との類似性から、ソルガム変異体における BR 合成遺伝子の配列を調べたところ、BR 合成遺伝子の一つである *BR6ox* の第 1 エキソンにおいてナンセンス変異を生じていることを明らかにした。また、前述のジベレリン生合成酵素遺伝子と同様に、ソルガム野生型 *BR6ox* 遺伝子をイネの *br6ox* 変異体に形質転換したところ表現型が回復したことから、このソルガム遺伝子が *BR6ox* としての機能をもつ酵素をコードしていることが明らかとなり、この変異が奇形葉の表現型の原因である可能性を示唆した。同様に、イネでは徒長型変異体の原因遺伝子の一つが *slr1* であることが知られていることから、Ordonio はソルガム徒長型変異体 3 系統の *SLR1* 遺伝子をシーケンスし、2 つの変

異を同定した。この2つの変異では、*SLR1* 遺伝子の転写抑制領域をコードする領域に、それぞれ独立に2bp欠失によるフレームシフト変異が生じていた。さらに Ordonio は、ソルガム矮性遺伝子 *Dw3* に変異を持つ新規な半矮性変異体も系統化した。

以上のように、Ordonio による本研究はスイートソルガムを材料とした突然変異体の網羅的解析という順遺伝学の展開を基盤とし、ジベレリン生合成及び情報伝達、ブラシノステロイド生合成の突然変異体を同定したこと、そして、ソルガムではこれまで報告のなかったジベレリンと茎葉の屈曲性を発見し解析したことなど、新規性、独自性の高い研究であり、高度の学術的価値を有し、関連研究分野に大きく貢献するものであると評価された。このことから、審査委員会は、本論文が博士(農学)の学位論文として十分な価値があると認め、論文審査において合格と判定した。

