論文の内容の要旨

論文題目　**A study of *ZeHB3*, an HD-Zip I homeobox gene expressed specifically in immature phloem.**

（篩部特異的 HD-Zip 型クラス I ホメオボックス遺伝子 *ZeHB3* の研究）

氏名　　西谷　千佳子

<序論>

維管束は、同化産物や水分の通道、植物体の機械的な支持などの機能を果たしている、高等植物の中心的組織である。維管束は、篩部、木部、形成層（前形成層）から構成され、それぞれの組織の形成機構に関して多くの研究がなされてきた。特に、木部分化に関しては、ヒャクニチソウ管状要素分化系などの *in vitro* 実験系を用いて解析されており、数多くの木部分化関連遺伝子が同定され、研究が進展しつつある。一方、篩部分化の研究は、形態的観察を除いて、十分に進展していない。この理由として、一つには、初期段階の篩部の分化を分子レベルで解析するための分子マーカーが無かったことが挙げられる。私は修士課程で、ヒャクニチソウ茎頂付近で未成熟な篩部特異的に発現するホメオボックス遺伝子 *ZeHB3*（*Zinnia elegans* homeobox gene）を単離し、この遺伝子が篩部分化の初期過程を解析するための良い分子マーカーになることを示した。そこで博士課程では、*ZeHB3* の発現を詳細に調べたうえで、*ZeHB3* の機能解析を進めることで篩部分化機構に迫ることを目的として研究を行った。

<結果と考察>

<u>(1) *ZeHB3* mRNA および ZeHB3 タンパク質の局在解析</u>

ZeHB3 mRNA の蓄積パターンを *in situ* hybridization で詳細に調べた。その結果、*ZeHB3* は調べた全ての器官において篩部に発現すること、その発現は篩部に篩管要素が形成される前から始まり、篩部が成熟する前までに終わることが分かった（図 1)。また、茎頂分裂組織において *ZeHB3* の発現が見られなかったことから、*ZeHB3* 発現は分裂活性とはリンクしないことが分かった（図 1L、M)。

次に抗 ZeHB3 抗体を作成し、この抗体を用いて ZeHB3 タンパク質の挙動を調べたところ、組織内では ZeHB3 タンパク質は、mRNA と同様に未成熟な篩部細胞に蓄積し、細胞内では細胞核に局在した（図 2)。以上の結果は *ZeHB3* が未成熟な篩部細胞の分子マーカー遺伝子として有用であることと、ZeHB3 タンパク質が篩部分化の初期段階で転写制御因子として機能することを示唆した。

(2) 分子マーカー遺伝子群を用いた切断傷害による維管束再生過程の解析

播種後 14 日目のヒャクニチソウの第一節間の維管束を切断すると、周囲の細胞が管状要素、篩管要素に分化し、維管束の連続性が回復する (図 3)。このような傷害による維管束の再生現象は、植物の発生現象を理解する上でとても重要である。しかしながら、その初期過程に関してはほとんど解析されていない。そこで、未成熟な篩部のマーカー *ZeHB3* に加え、管状要素前駆細胞のマーカー *TED3* を用いて、切断傷害に伴う維管束組織の再構築が時間的・空間的にどのように制御されているかを再生の初期段階から解析した。

未切断の節間では、*ZeHB3* は全ての維管束の篩部に発現しているが、切断後 24 時間目に、切断された維管束において特異的に発現が減少し、切断後 36 時間目に再び増大した (図 4、5A)。切断後 24 時間目の維管束では、篩管要素数は増大しないことから (図 5A)、この *ZeHB3* 発現量の減少は、篩部細胞の成熟の結果ではなく、元々 *ZeHB3* を発現していた細胞が篩部分化の活性を失った結果と解釈される。さらに、*ZeHB3* とは逆に、*TED3* の発現は切断後 24 時間で増大した (図 4、5B)。様々な植物種で、形成層からの篩部と木部の分化は同調しないことが知られている。ヒャクニチソウの節間での維管束再生過程では、篩部形成よりも木部形成の方が優先することが示唆された。

柔細胞からの篩管要素形成は、細胞分裂後に起きることが知られている。しかしながら、篩部分化への方向付けの前に細胞分裂が起きるのかは不明であった。切断した傷口に 10^{-3} M コルヒチンを与え、細胞分裂を阻害したところ、篩管要素形成のみならず、*ZeHB3* 発現も抑制された (図 6)。一方、*TED3* 発現と管状要素分化はコルヒチンによる阻害を受けなかった。このことから、篩部分化への方向付けの前に細胞分裂が起きることが示唆された。

(3) ヒャクニチソウ培養細胞系からの篩部に発現する遺伝子群の単離

篩部で発現する遺伝子はこれまでにも様々なものが単離されているが、ほとんどが篩管の内容物などを手がかりにして単離されたものであり、篩部分化に関連するものはあまり知られていない。一方、木部分化関連遺伝子はヒャクニチソウ単離葉肉細胞からの *in vitro* 管状要素分化系 (図 7) を利用して数多く同定されている。先述のように、植物体内では木部と篩部は関連しあいながら形成されることが知られており、この管状要素分化過程においても *ZeHB3* が発現していた (図 7B) ことから、培養細胞の中の一部の細胞で篩部細胞分化が進行している可能性がある。そこで、ヒャクニチソウ管状要素分化過程で *ZeHB3* と類似した発現パターンをする遺伝子群には、*ZeHB3* と同様の篩部分化関連遺伝子が含まれているのではないかと考えた。

ヒャクニチソウマイクロアレイの 1344 遺伝子を対象に、管状要素分化過程で *ZeHB3* と類似した発現パターンを示す 9 遺伝子を積率相関係数を基に選抜し、*in situ* hybridization を行った結果、篩部に発現する 5 つの遺伝子が単離された (図 8)。これらのうち 1 つは既知の遺伝子とのホモロジーが見られなかったが、ほかの 4 つの遺伝子の配列のホモロジーから、expansin (123)、polygalacturonase inhibitor (1274)、NADPH oxidase (1402)、xylogulucan endotransglycosylase (XETG) などが篩部形成に関与することが新たに分かった。

(4) *ZeHB3* の形質転換シロイヌナズナを用いた標的遺伝子の探索

植物の HD-Zip タンパク質は発生のキーとなる転写制御因子として働くことが予想されている。そこで、篩部分化における ZeHB3 の転写制御機構を明らかにするために、*ZeHB3* 過剰発現体を作成して、ZeHB3 により発現が誘導される遺伝子群を同定することにした。現段階では、ヒャクニチソウでは安定した形質転換体ができないためシロイヌナズナに 35S promoter-*ZeHB3* を導入した。シロイヌナズナにおいても *ZeHB3* に類似した遺伝子が存在することから、このようなヘテロの実験系でも *ZeHB3* の機能解析が出来ると考えた。また、ZeHB3 標的遺伝子の探索のためには、*ZeHB3* の発現のタイミングを人為的に制御することが必要と考え、DEX (デキサメタゾン) により *ZeHB3* mRNA の過剰発現を人為的に誘導できるシステムを用いた。

ZeHB3により発現が制御される遺伝子の候補はシロイヌナズナジーンチップを用いて探索した。30 μM DEXによる*ZeHB3* mRNA 発現誘導後4時間で、コントロール条件よりも2.5倍以上のシグナル強度を示した遺伝子群を選抜した。その結果、8297の遺伝子から7遺伝子が選抜され、内4つについては、ノザンでも*ZeHB3*の発現と呼応した発現パターンが確認された(図9)。また、これらの遺伝子の上流域には、HD-Zip I タンパク質の結合配列と考えられる配列が含まれていた。さらに、これらの遺伝子のmRNAの蓄積を*in situ* hybridizationで調べたところ、このうちの3遺伝子は、野生型の植物体内で篩部に強く発現していた(図10)。以上の結果から、ZeHB3は、シロイヌナズナにおいて篩部で発現する遺伝子群の発現を誘導することが明らかになった。これらの結果から、今回得られた遺伝子はZeHB3様の篩部特異的転写制御因子の直接の標的である可能性が示唆された。誘導される遺伝子群にはzinc finger proteinといった転写因子をコードすると予想されるものも含まれており、篩部分化における転写カスケードの存在が予想された。

＜まとめと展望＞

1) *ZeHB3*のmRNAとZeHB3タンパク質の蓄積パターンを詳細に解析した結果、*ZeHB3*が未成熟な篩部の有用なマーカーであることと、ZeHB3が未成熟な篩部細胞で転写制御因子として機能している可能性が示唆された。
2) *ZeHB3*を篩部分化のマーカーとして利用し、切断傷害による維管束再生過程では篩部分化よりも木部分化が優先すること、柔細胞からの篩部細胞への分化転換に先立って細胞分裂が起きることを示した。また、ヒャクニチソウ培養細胞を用いた研究では、管状要素分化過程における*ZeHB3* mRNAの発現を手がかりとして、篩部に発現する5つの遺伝子を新たに見いだした。
3) *ZeHB3*を導入したシロイヌナズナの研究で、ZeHB3が実際に、篩部発現遺伝子群を誘導できることを示した。
4) 今後は、ヒャクニチソウから単離した5つの篩部発現遺伝子やZeHB3の標的と考えられた遺伝子について、発現制御機構の解析、および機能解析を進めることで、篩部分化機構を明らかにしていくことができると期待される。

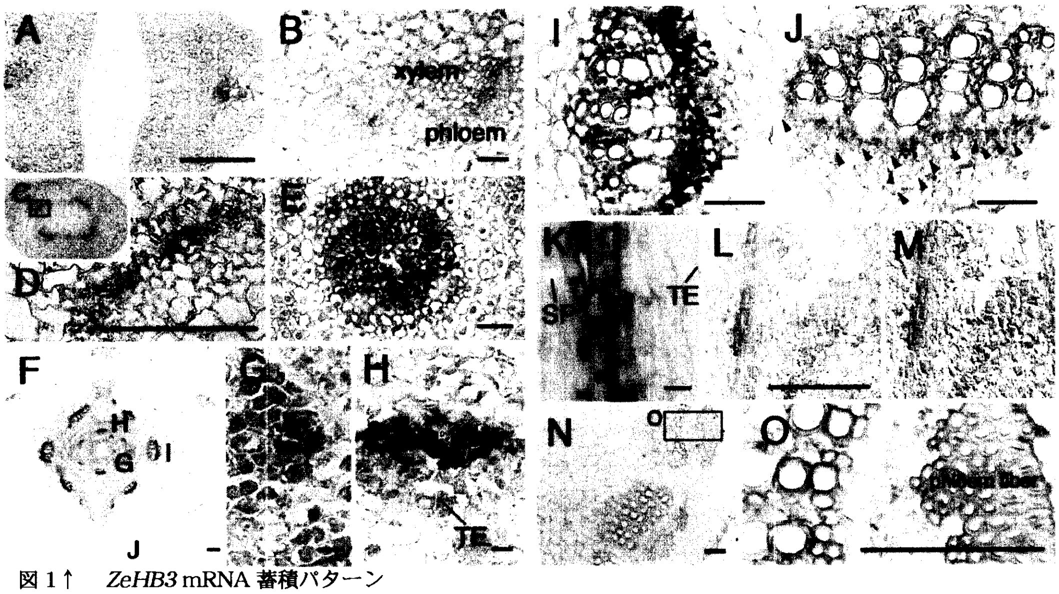

図1↑　*ZeHB3* mRNA 蓄積パターン
全てアンチセンスプローブで*in situ* hybridizationを行った像である。【A to E】播種後1日目の植物体の第一葉(A)、子葉(B)、胚軸(C、D)、根(E)の横断切片。全ての器官で篩部にシグナル(紫色)がみられる。【F to J】播種後14日目の植物体茎頂上方の全体像(F)、第四葉(G)、第三葉(H)、第二葉(I)、第一葉(J)の横断切片。篩管要素が分化する前の第四葉篩部にもシグナルがみられる。一方、多くの篩管要素(緑の矢尻)が分化した第一葉ではほとんどシグナルがみられない。【K to M】播種後14日目の植物体の縦断切片。第二葉維管束(K)ではやはり篩管要素の内側の細胞層にシグナルが見られる。一方、茎頂分裂組織(L and M、MはLのノマルスキー像)にはシグナルがみられない。【N and O】播種後50日目の茎の横断切片。シグナルが全くみられない。SP, 篩板、TE, 管状要素。Bars: A – F, I, J and L – O, 100 μm; G, H and K, 10 μm.

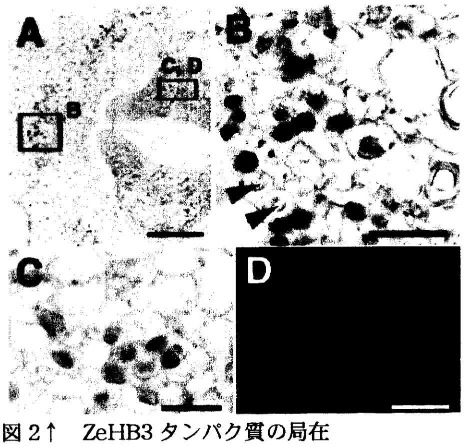

図2↑　ZeHB3タンパク質の局在
【A to D】播種後14日目の植物体の茎頂上方で抗ZeHB3抗体による組織染色を行った。全体像(A)、第二葉(B)、第三葉(C、D)。未成熟な篩部細胞にシグナル(茶色)がみられる。抗体を反応させなかったコントロールではシグナルはみられなかった(data not shown)。(D)は(C)をDAPIで染色したもの。シグナルが細胞核に局在していることが分かる。緑の矢尻は篩管要素。
Bars: A , 10 0 μm; B – D, 100 μm.

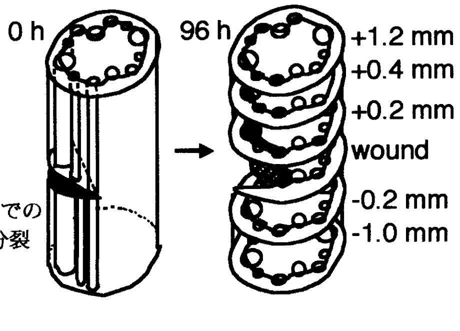

図3→　播種後14日目のヒャクニチソウ第一節間における切断傷害による維管束再生の模式図
(0 h) 切断直後のヒャクニチソウ第一節間。(96 h) 切断後96時間の節間の、切断部位上方から下方までの連続した横断切片の模式図。特に切断部位の上方で盛んに木部(茶)、篩部(緑)が再生する。斜線は細胞分裂の起きた部位。

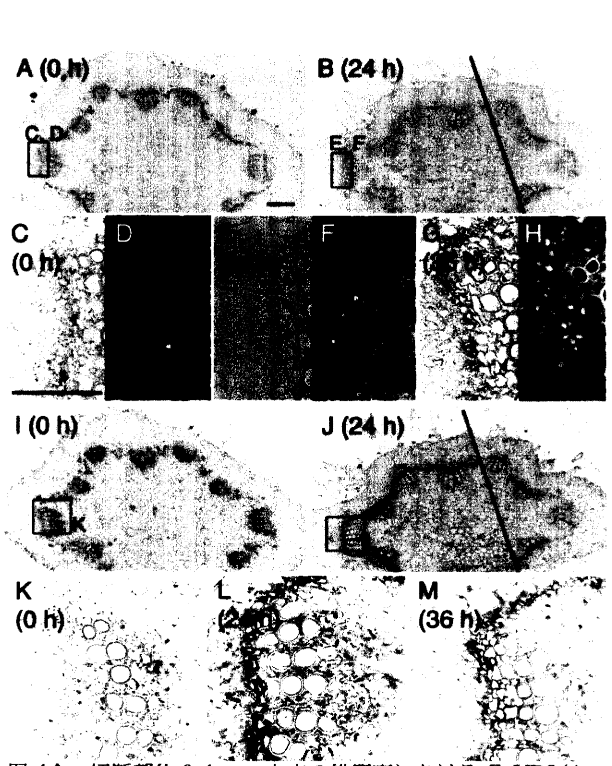

図 4↑　切断部位 0.4 mm 上方の維管束における *ZeHB3* (A to H) と *TED3* (I to M) mRNA 蓄積パターンの経時的変化（図中の数字は切断後の時間）

全てアンチセンスプローブで *in situ* hybridization を行った像である。(B) および (J) では赤線から左側が切断された維管束である。(D)、(F)、(H) はそれぞれ (C)、(E)、(G) のアニリンブルー染色像。緑の矢尻は篩管要素。Bar in A: 150 μm for A, B, I, J. Bar in C: 100 μm for C – H, K – M.

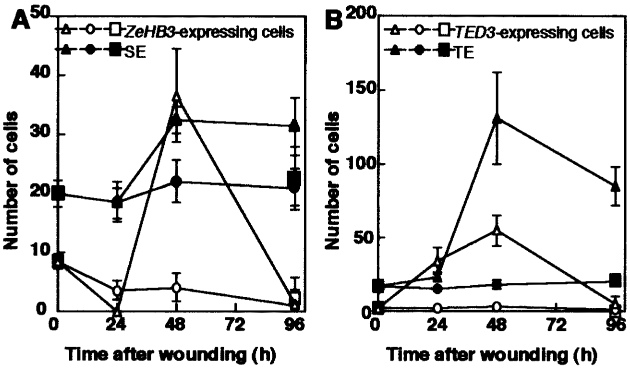

図 5←　切断部位 0.4 mm 上方の維管束における【A】篩管要素 (SE)、*ZeHB3* を発現する細胞 および【B】管状要素 (TE)、*TED3* を発現する細胞 の数の経時的変化

切断された維管束 (triangles)、傷害を与えた植物体のうちの切断されていない維管束 (circles) および無傷の植物体 (squares) におけるそれぞれの細胞の数を計測した。

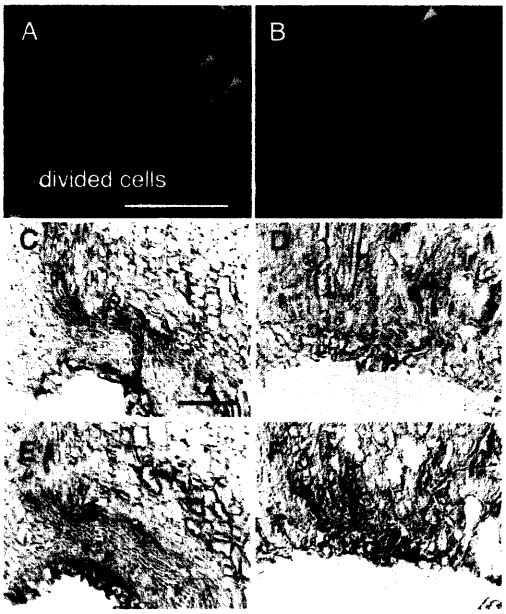

図 6←　コルヒチンによる細胞分裂阻害が篩管要素形成 または管状要素形成に与える影響

切断直後に傷口に DW (A 、C、E) またはコルヒチン (B 、D、F) を与え、96 時間後に観察した。(A) と (B) はアニリンブルー染色像である。コントロールの DW を与えた方では篩管要素（緑の矢尻）および管状要素（青の矢尻）の両方が分化し (A)、*ZeHB3* mRNA (C) および *TED3* mRNA (E) の発現が見られる。一方、コルヒチンを与えると篩管要素は分化しないし (B)、*ZeHB3* mRNA の発現も見られないが (D)、管状要素分化と *TED3* mRNA 発現は見られる (F)。Bars: 100 μm.

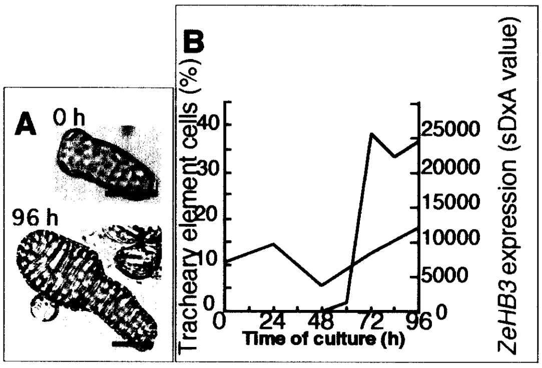

図 7←　ヒャクニチソウ単離葉肉細胞の *in vitro* 管状要素分化系と *ZeHB3* mRNA の消長

ヒャクニチソウの葉から機械的に単離した葉肉細胞は、植物ホルモンを含む培地で培養すると、培養約 72 時間で約 40 % の細胞が管状要素へと分化する。【A】単離葉肉細胞の形態変化。Bars: 25 μm.【B】培養時間と管状要素分化率（青）、管状要素分化過程での *ZeHB3* mRNA の消長（赤）。マイクロアレイの結果をグラフにした。

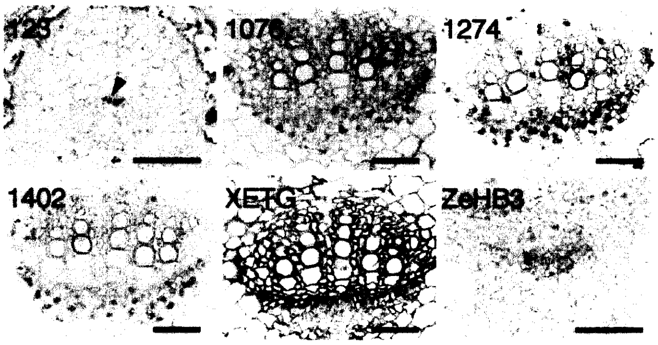

図 8↑　ヒャクニチソウ管状要素分化系のマイクロアレイにおいて *ZeHB3* と類似した発現パターンを示す遺伝子群の組織内での発現

篩部での発現を示した 5 遺伝子と *ZeHB3* の播種後 14 日目のヒャクニチソウの葉の維管束における *in situ* hybridization 像。全てアンチセンスプローブの像である。123 および *ZeHB3* は第三葉、その他は第一葉。123 は将来篩管要素になる細胞（緑の矢尻）を取り囲む 4 つの細胞、1076、1274、1402 は師管要素–伴細胞複合体、XETG は篩部のなかでも形成層よりの細胞にシグナルがみられる。Bars: 50 μm.

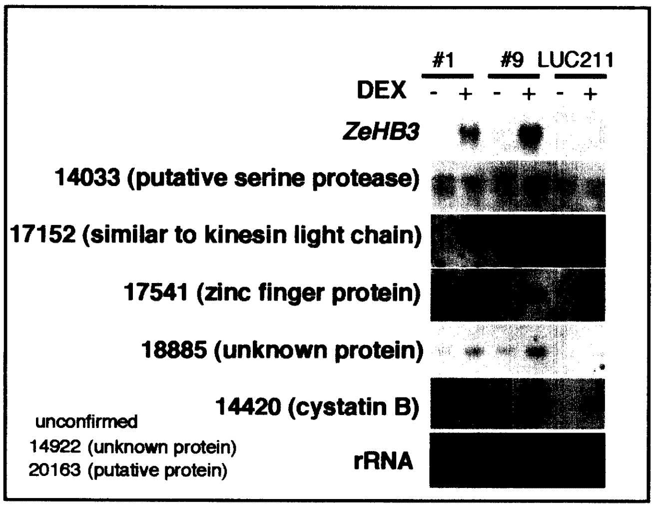

図 9←　ジーンチップで選抜された遺伝子群の発現パターン

選抜された 7 遺伝子のうち、5 つについてジーンチップに用いたサンプルとは別に DEX 処理したサンプルでノザンを行った。上の 4 つは *ZeHB3* 導入ライン (#1、#9) で特異的に、DEX により発現が誘導されており、*ZeHB3* の発現の影響を受けて発現していると考えられる。14420 は DEX の影響のみでの発現が見られる。

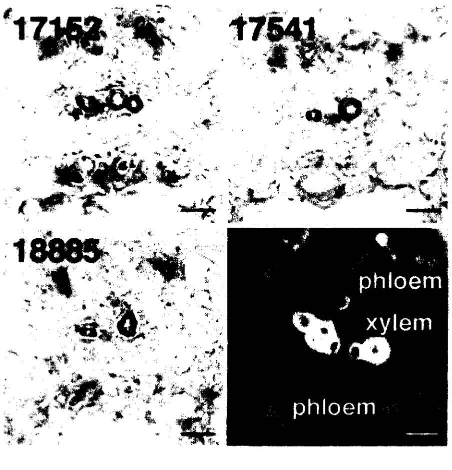

図 10→　ジーンチップとノザンで選抜された遺伝子群の組織内での発現

ノザン解析により *ZeHB3* の発現の影響を受けて発現していると考えられた 4 遺伝子のうち、篩部での発現がみられた 3 遺伝子の野生株のさやの維管束における *in situ* hybridization 像。全てアンチセンスプローブ。右下は、同等の部位を aniline blue で染色し、画像処理したもの。緑の矢尻は篩板の染色（黄緑）がみられる箇所。篩部は木部の両側にみられる。Bars: 10 μm.