

論文内容の要旨

論文題目 Studies of HD-Zip class III homeobox genes involved in vascular cell differentiation

(維管束分化における HD-Zip 型クラス III ホメオボックス遺伝子機能の研究)

氏名 伊藤 (大橋) 恭子

序論

維管束は水分や栄養分のみならずシグナル分子をも植物体の隅々にまで運ぶ重要な組織である。今日陸上に植物が繁栄しているのも植物が維管束組織を獲得したからに他ならない。維管束は木部、篩部、前形成層からなる複合組織であり、また木部には、管状要素、木部柔細胞、木部繊維といった複数の種類の細胞が含まれる。それらの細胞が秩序だてて分化することで維管束が形成される。したがって維管束の細胞分化過程には厳密な転写制御が存在すると考えられる。これを司る因子の候補のひとつに HD-Zip 型クラス III ホメオボックス遺伝子群 (HD-Zip III) がある。シロイヌナズナに 5 つある HD-Zip III のうち *Athb-8*、*IFL1* は維管束分化に関わることが示唆され、また *Athb-9*、*Athb-14* は維管束で発現することが示されている。しかし、これら HD-Zip III 遺伝子が維管束分化のどのステージで、どのような機能を果たすかについては不明なままであった。そこで私は、遺伝子発現と機能を細胞レベルで解析できるヒヤクニチソウ培養系を用いて HD-Zip III 遺伝子の維管束分化における発現制御と機能を解析することにした。まず、修士課程でヒヤクニチソウ HD-Zip III 遺伝子 *ZeHB-10* (*Athb-8* ホモログ)、*ZeHB-11*、*-12* (*IFL1* ホモログ) を単離し、*in vitro* 木部分化系において木部分化特異的に発現することを示した。博士課程では、これまでに解析のなされていないシロイヌナズナ HD-Zip III に属する *Athb-15* と *Athb-15* ホモログ遺伝子 *ZeHB-13* を単離し、*ZeHB-13* を含めた HD-Zip III 遺伝子の

発現を詳細に調べた。さらに、これら遺伝子の過剰発現体を作成し機能解析を進めた。

結果と考察

1) *ZeHB-13* の単離と *Athb-15* および *ZeHB-10*, *-11*, *-12*, *-13* の発現解析

ヒヤクニチソウより *Athb-15* ホモログ遺伝子である *ZeHB-13* 全長 cDNA を単離した。まず、植物体における *ZeHB-13* の発現を調べた結果、*ZeHB-13* は維管束特異的に、特に前形成層特異的に発現することがわかった (図 1)。

次に、*Athb-15* の発現を *Athb-15* プロモーター GUS を用いて調べた。その結果、まだ維管束の分化していない本葉において前形成層で GUS の染色が観察された。根においても維管束特異的な染色がみられ、根端においては、静止中心に接するごく初期の前形成層細胞列から染色が見られたことから、*Athb-15* も前形成層特異的に発現していることがわかった。

in vitro 木部分化系における発現を調べた結果、*ZeHB-13* は *ZeHB-10*, *-11*, *-12* と同様に木部分化特異的に発現するが、木部分化過程での経時的な発現は *ZeHB-10*, *-11*, *-12* に先立っていることがわかった。次に、*ZeHB-10*, *-11*, *-12*, *-13* の相違を詳細に調べるために、*in situ* hybridization により mRNA 蓄積パターンを比較した。その結果、*ZeHB-13* は前形成層特異的に、*ZeHB-10* は木部前駆細胞および未成熟な管状要素細胞に、*ZeHB-11*, *-12* は木部前駆細胞に加え木部柔細胞で強く発現しており、それぞれの遺伝子の発現部位が少しずつずれていることがわかった。

これらの結果は、*ZeHB-13* は *Athb-15* のオルソログであること、および、*ZeHB-13* が *ZeHB-10*, *-11*, *-12* よりも木部形成の初期に、前形成層ではたらくことを示唆している。

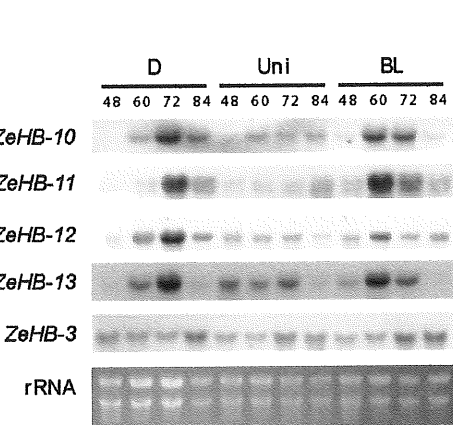


図 2 ヒヤクニチソウ *in vitro* 木部分化系における RNA ゲルプロット解析
通常の分化誘導培地 (D)、D 培地にブラシノステロイドの合成阻害剤、ウニコナゾールを培養開始時から添加した培地 (Uni) およびさらにブラシノステロイドを添加した培地 (BL) で培養した細胞から単離した RNA をプロットし、各遺伝子の発現量を比較した。

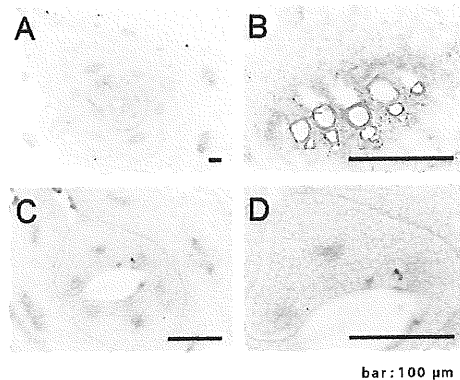


図 1 *ZeHB-13* mRNA の蓄積パターン
ZeHB-13 アンチセンスプローブで *in situ* hybridization を行った。
A: 播種後 14 日目の差頂部分 B: 第二葉の主脈部分の拡大像
C: 第三葉、第四葉部分の拡大像 D: 第四葉の拡大像

in vitro 分化系において、管状要素の分化にはブラシノステロイド (BR) が必須であり、*ZeHB-10*, *-11*, *-12* は BR 合成阻害剤を含む培地では発現が抑えられ、その抑制は BR 添加により回復することを修士課程で明らかにした。そこで本研究では *ZeHB-13* が BR の制御を受けるかどうかを調べた。その結果、*ZeHB-13* は *ZeHB-10*, *-11*, *-12* とは異なり BR による発現誘導を受けないことがわかった。ただし、BR による発現上昇は見られた (図 2)。

次に、BR の制御をより詳細に知るために、短時間における BR

の影響を調べた。その結果、*ZeHB-10, -11, -12* は BR により 1 時間で発現誘導を受けること、および *ZeHB-13* は BR 合成阻害剤存在下でも発現していることがわかった。これらの結果は、*ZeHB-10, -11, -12* が BR シグナルのごく近くの下流に存在することおよび *ZeHB-13* は BR 以外の因子により発現誘導されることを示唆している。

シロイヌナズナの葉が向軸化する変異体、*phabulosa/phavoluta* は *Athb-14/-9* が原因遺伝子であり、*Athb-14/-9* mRNA が過剰に蓄積していることがわかっている。これは、*Athb-14/-9* の microRNA 結合領域に変異が入り mRNA が分解されなくなったために起こると解釈されている。シロイヌナズナには HD-Zip III をターゲットとする microRNA は 2 つある (miR165/166)。この 2 つ microRNA の相違はわずか一塩基であるが、miR166 は *Athb-15* と、miR165 は残りの全ての HD-Zip III と相補的であった。*ZeHB-10, -11, -12, -13* の microRNA 結合配列を調べたところ、ヒヤクニチソウにおいても *ZeHB-13* だけが miR166 相補配列を、*ZeHB-10, -11, -12* は miR165 相補配列を保存しており、この 2 種類の microRNA のターゲットは種を超えて保存されていた。また、miR165/166 がヒヤクニチソウにおいても存在することを RNA ゲルブロット解析で確認した。

以上の結果から、*ZeHB-13* はブラシノステロイドおよび microRNA により *ZeHB-10, -11, -12* とは異なる発現制御を受け、前形成層で機能することが示唆された。

2) HD-Zip III 遺伝子の機能解析

HD-Zip III 遺伝子の機能に迫るため、まず各々の遺伝子の過剰発現体をシロイヌナズナで作成した。HD-Zip III は特異的な microRNA

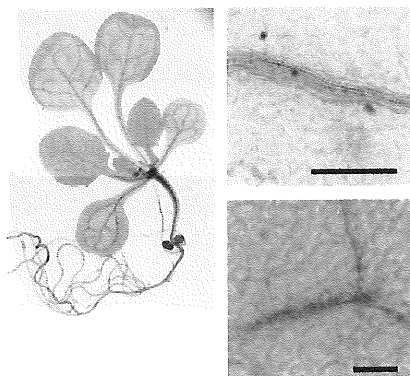


図 4 genechip により選抜した下流候補遺伝子 *WRKY18* の発現パターン
グループ A の遺伝子 *WRKY18* のプロモーター部分 (2.2kb) を GUS につなぎシロイヌナズナに導入した。
A: 植物体全体の GUS 染色像
B, C: 本葉維管束部分の拡大像 bar = 100 μm

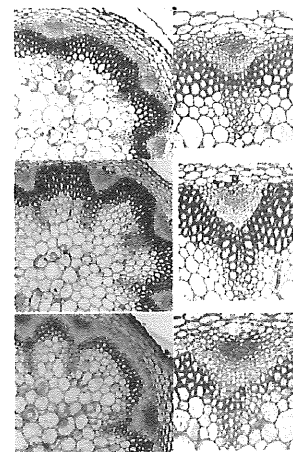


図 3 *ZeHB-10, ZeHB-12* 過剰発現体の解析
control (上段)、*mtZeHB-10* 過剰発現体 (中段)、*mtZeHB-12* 過剰発現体 (下段) の花茎の横断切片像。右列は維管束部分の拡大像を示す。

による mRNA の分解が示唆されている。そこで、microRNA のターゲット部分の塩基配列を一塩基置換した mRNA を持つ過剰発現体も同時に作成した (*35S-mtZeHB*)。その結果、wild の遺伝子の過剰発現体では表現型がみられなかったが、*35S-mtZeHB-10, -12* では、葉が上向きにカールする表現型が見られた。この表現型は特に *ZeHB-10* で顕著であり、その程度には発現量との相関が見られた。また、*35S-mtZeHB-10* では花茎の維管束でより多くの管状要素の分化がみられ、*35S-mtZeHB-12* では前形成層細胞あるいは木部前駆細胞の増加が見られた (図 3)。

HD-Zip III 遺伝子は転写因子であると考えられている。そこで ZeHB-10, -12 を用いて転写活性化能を調べた。その結果、wtZeHB-10, -12 は正の転写活性化能を有すること、また、mtZeHB-12 には wtZeHB-12 以上の転写活性化能があることもわかった。次に、ZeHB-12 の DNA 結合能を調べた。これまでに Athb-9 が GTAAT(G/C)ATTAC という配列に結合することがわかっていたためこれを基に調べたところ、ZeHB-12 は少なくとも TAATNATTA 配列に結合することがわかった。これらの結果は、ZeHB-12 が転写因子としてはたらしき得ることを示している。

3) ZeHB-12 標的遺伝子の探索

ZeHB-12 は維管束分化過程にはたらく転写制御因子であることが示唆されたため、ZeHB-12 が制御する下流の遺伝子の探索を行うことにした。デキサメタゾン (DEX) 存在下で目的遺伝子を過剰発現させる系を用い、シロイヌナズナに *mtZeHB-12* を導入した。50 μ M DEX で 30 分、3 時間、6 時間 *ZeHB-12* を発現誘導し、遺伝子発現の変化を genechip (affymetrix) を用いて検出した。DEX による *ZeHB-12* 誘導後に有意に (約 2.5 倍以上) 発現量が変動しかつコントロールでは変動しない遺伝子を選抜し、機能未知の遺伝子を除き残りの遺伝子をグループ化した。グループ A, B, C は *ZeHB-12* 誘導後発現が 30 分後、3 時間後、6 時間後にそれぞれ上昇していく遺伝子群で、転写因子が A には 14 個中 3 個、B には 54 個中 6 個、C には 94 個中 13 個含まれていた。

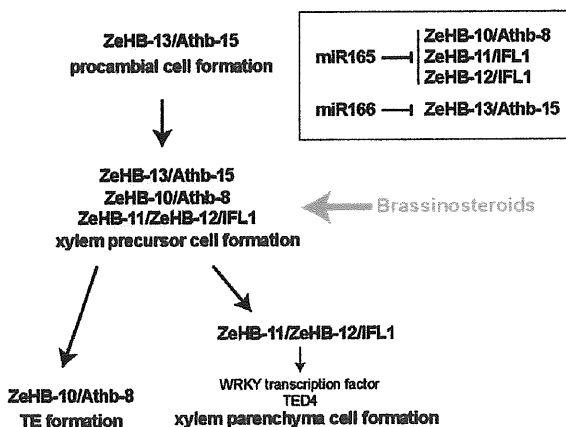


図 5 木部形成における HD-Zip III 遺伝子機能のモデル
木部は、前形成層細胞が木部前駆細胞に、木部前駆細胞が管状要素あるいは木部柔細胞へと分化していくことで形成される。ZeHB-13/Athb-15 は前形成層細胞の形成・維持に関与すると考えられる。前形成層細胞がブラシノステロイドを合成し、このブラシノステロイドが ZeHB-13/Athb-15 発現を促進し、正のフィードバックループを形成する。同時に、ブラシノステロイドにより ZeHB-10/Athb-8, ZeHB-11/IFL1, ZeHB-12/IFL1 の発現が誘導され、この細胞が木部前駆細胞となる。さらに、ZeHB-10/Athb-8 を発現している細胞が管状要素となり、ZeHB-11/IFL1, ZeHB-12/IFL1 を発現している細胞が、WRKY18 や TED4 などの発現を誘導し木部柔細胞となる。microRNA である miR166 は ZeHB-13/Athb-15 発現を前形成層と木部前駆細胞に、miR165 は ZeHB-10/Athb-8, ZeHB-11/IFL1, ZeHB-12/IFL1 発現を木部に制限するようにはたらく。

グループ A の一つ *WRKY18* 転写因子の発現をプロモーター-GUS を用いて調べた結果、*WRKY18* は維管束に発現していることがわかった (図 4)。また、グループ B と C には木部分化のなかでも特に木部柔細胞に発現すると考えられる遺伝子が複数あった。その中の一つ、*TED4* の発現をプロモーター-YFP を用いて根において調べたところ、維管束の細胞で発現していることがわかった。これらの結果から、ZeHB-12 制御下の転写カスケードの存在と、ZeHB-12 が木部柔細胞分化の進行に関与していることが示唆された。以上の結果は図 5 に示すようにまとめられた。