

## 論文内容の要旨

論文題目 **A study on the regulation mechanism of the expression of a tracheary element differentiation - specific gene, *ZCP4* (*Zinnia cysteine protease 4*)**  
(管状要素分化特異的遺伝子 *ZCP4* の発現制御機構の解析)

氏名 表 賢珍

管状要素分化過程では管状要素特異的形態変化に伴い、二次細胞壁形成に関連する遺伝子および細胞死特異的遺伝子群の一過的な発現が起こる。これらの管状要素分化特異的遺伝子の制御機構については未だ不明なままである。システインプロテアーゼをコードする *ZCP4* 遺伝子は、管状要素の自己分解に先立って一過的に発現する。

### 結果と考察

#### 1. シロイヌナズナ芽生えの発達過程における道管分化パターンの追跡

##### (1) 原生木部道管分化パターン

道管の初期発生過程を、*ZCP4* プロモーター::*GUS* 融合遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを用いて解析した(図 1-7)。T3 ホモラインの種子を吸水させ、吸水後 3 時間ごとに 20 個以上のサンプルを回収し *GUS* 発現を観察した結果、原生木部道管の分化は子葉の主脈の基部側と胚軸先端側で始まるがわかった。子葉の主脈の基部側と胚軸先端側で分かれて始まった道管分化は、子葉の先端から根の先端までほぼ同時に不連続的に進み、これがつながって連続した道管を形成することが分かった。

##### (2) 後生木部道管分化パターン

後生木部道管に由来する *GUS* 発現は、成熟した原生木部道管の内側に観察された。この発現は胚軸・根の境界付近(図 3B2)で始まり、求頂的、求基的の両方向に順次進んだ(図 3, 4B4)。

##### (3) 子葉の二次脈における道管分化パターン

子葉の二次脈に由来する *GUS* 発現は、子葉の一次脈の先端と中央部に観察された(図 5C1)。その後、一次脈の先端付近を起点とした求基的な道管分化と中央部からの求頂的な分化が起こり、ループ状の二次脈が形成された(図 5C2)。

#### 2. *ZCP4* の未成熟管状要素特異的発現に関わるシス配列/トランス因子の探索

##### (1) シス配列の探索

*ZCP4* 上流域 403 bp 中に存在する未成熟管状要素特異的発現制御領域の決定を行った。-403 bp までの *ZCP4* プロモーターの領域を 5' 側から 54 bp ずつ、さらに 9 bp ずつ欠失させたコンストラクトをシロイヌナズナに導入し発現を調べた。その結果 -106bp から -97bp 付近の配列が *ZCP4* プロモーターの未成熟管状要素特異的発現に必要であることが分かった。そこで、次に -111 bp から -92 bp までを 2 bp ずつ異なる配列に置き換えたリンカーキャンを行った。その結果、-105 ~ -102 (ACTT)、-99 ~ -96 (AAGC) の配列を換えると発現量が著しく低下し、-95 ~ -94 (AA) の配列を換えると発現が全くなかったことから、これらの配列が *ZCP4* プロモーターの発現量や組織特異性決定に重要であることが示された(図 9)。この -105 ~ -94 (ACTTGAAAGCAA) の配列を、*ZCP4* のシロイヌナズナホモログである *XCP1*、*XCP2* およびシロイヌナズナの管状要素分化特異的遺伝子群のプロモーター領域と比較したところ、多数の遺伝子のプロモーター領域に相同性の高い配列が共通に存在することが明らか

になった。そこで、これらの配列が管状要素分化特異的発現制御に関わる共通のシス配列である可能性を検討した。その結果、ZCP4 の 11 bp の配列と 6 種類の類似配列が管状要素特異的発現を誘導することがわかり、これらの配列が未成熟管状要素分化特異的発現制御に関わるシス配列として機能していることが明らかとなった (図 10)。そこで、このシス配列 CTNAAAGCNA を TERE (Tracheary Element Regulating cis Element) と名付け、さらに解析した。

## (2) トランス因子の探索

TERE に特異的に結合し、未成熟な管状要素特異的発現制御を担うトランス因子を単離するために、酵母の one-hybrid 法を行った。シロイヌナズナとヒヤクニチソウのライブラリーのスクリーニングを行った結果、シロイヌナズナは 1 種 (AtbZIP51 /VIP1)、ヒヤクニチソウは 2 種 (ZebZIP1、 ZebZIP2) のタンパク質をコードするクロンを単離した (図 11)。さらに、今回単離した遺伝子産物は、ZCP4 プロモーターおよび ZCP4 のシロイヌナズナホモログ XCP1 に結合すること、一方、異なるグループの bZIP 転写因子 (AtbZIP57) はいずれにも結合しないことが明らかとなった (図 12)。

## 3. シロイヌナズナ bZIP 遺伝子の発現および機能解析

### (1) ZebZIP1、ZebZIP2、AtbZIP51 およびシロイヌナズナ bZIP ファミリーの発現解析

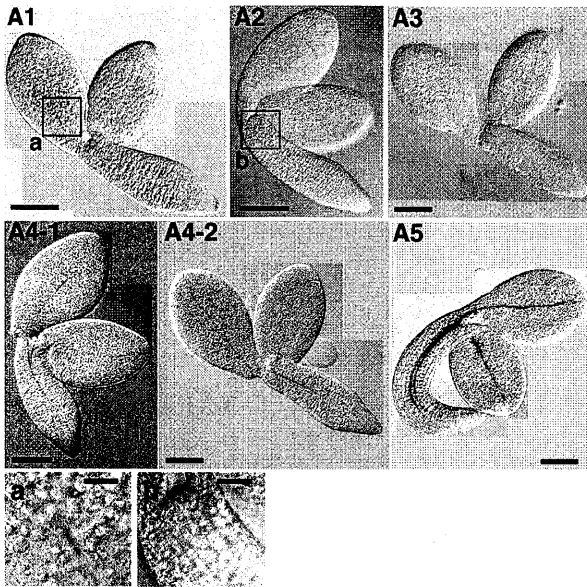
ヒヤクニチソウの ZebZIP1、 ZebZIP2 とシロイヌナズナの AtbZIP51 は、シロイヌナズナ Group I bZIP 遺伝子と bZIP ドメイン領域で高い相同性を示し、遺伝子ファミリーを成していることがわかった (図 13)。そこで、AtbZIP51、AtbZIP18、AtbZIP29、AtbZIP30、AtbZIP52、AtbZIP59 および AtbZIP69 の 7 つのシロイヌナズナ bZIP 遺伝子について発現を調べた。その結果、AtbZIP18 は若い子葉において維管束と葉肉細胞で (図 14A, B)、AtbZIP51 は根の維管束で (図 14C, D)、AtbZIP52 は子葉および根・胚軸の維管束での発現が観察された (図 14E, F)。また AtbZIP59 は子葉の維管束と根の中心柱での発現が観察され (図 14G, H)、これら遺伝子が維管束で働いている可能性を示唆した。一方、AtbZIP29、AtbZIP30 および AtbZIP69 は維管束特異的発現を示さなかった。

### (2) 過剰発現 および dominant repression を用いたシロイヌナズナ bZIP 遺伝子の機能解析

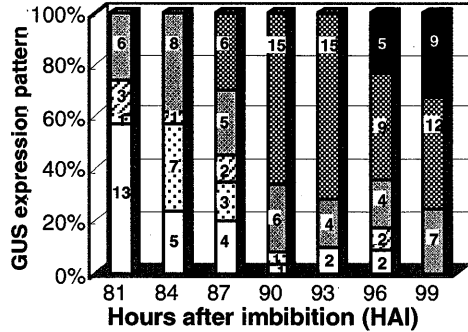
7 つのシロイヌナズナ遺伝子の過剰発現体を作成した。また、遺伝子の後ろに repression ドメインをつないだ機能阻害型植物体を作成した。その結果 AtbZIP18 の過剰発現体、dominant repression 形質転換体の子葉においては、顕著な維管束形成異常が見られ、AtbZIP18 の維管束分化への関与が示唆された (図 15)。

## まとめと展望

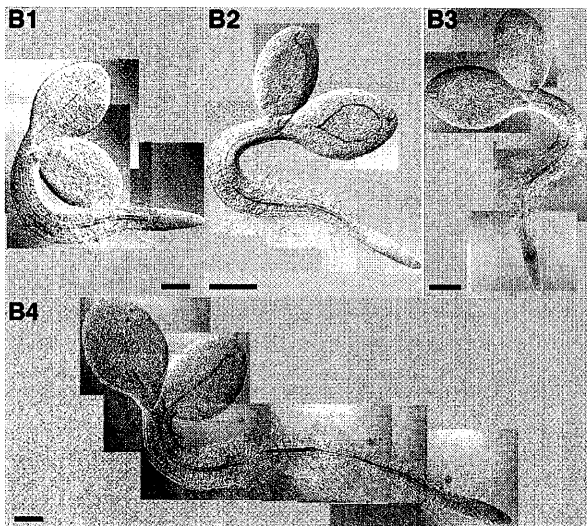
1. ZCP4 のプロモーターを道管分化の分子マーカーとして用い、シロイヌナズナの芽生えにおける時間的・空間的道管分化パターンを追跡した。
2. ZCP4 遺伝子の詳細なプロモーター解析を行い、ZCP4 およびシロイヌナズナホモログ XCP1、XCP2 を含め、未成熟管状要素特異的発現に関わる共通のシス配列 TERE (CTNAAAGCNA) を決定した。
3. 酵母の one-hybrid 法を用い、ZCP4 のシス配列に結合するトランス因子の候補として、ヒヤクニチソウから 2 種、シロイヌナズナから 1 種の bZIP 転写因子を単離した。
4. シロイヌナズナ Group I bZIP 遺伝子の発現解析により、4 つの遺伝子が維管束で強く発現することを明らかにした。また、そのうちの 1 種は過剰発現および dominant repression により維管束異常が誘導されることが分かり、維管束形成における関与が強く示唆された。



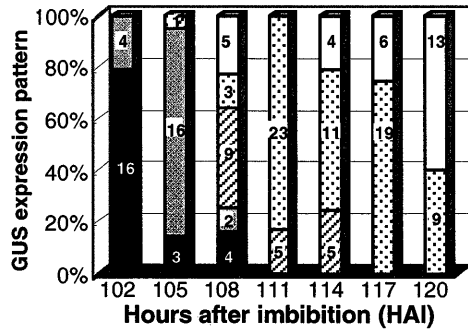
◀ 図1. 形質転換シロイヌナズナ子葉の主脈、胚軸、根の原生木部道管分化過程におけるZCP4プロモーター::GUSの発現パターン  
T3ホモラインの種子をGM培地に蒔いた。発芽を同調させるため、4℃、暗黒下で72時間培養した後、22℃の連続光下で培養した。(A1), 子葉主脈の基部側での発現; (A2), 胚軸の先端部での発現; (A3), (A1)と(A2)両方での発現; (A4-1, 2), 子葉の主脈から胚軸-根の中央部に沿った不連続な発現; (A5), 子葉の主脈から胚軸-根の中央部に沿った連続的な発現。aとbはそれぞれA1, A2の黒いボックスで囲んだ部分の拡大像。(A1-A3), 84HAI (hour after imbibition); (A4-1, 2), 90HAI; (A5), 99HAI目の芽生え。バーは(A1-A5) 200 μm; (a, b) 30 μm。



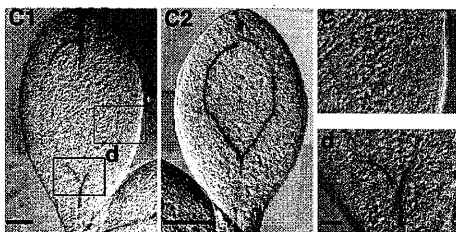
◀ 図2. 原生木部道管分化過程におけるZCP4プロモーター::GUS発現の経時変化  
20個以上の形質転換シロイヌナズナの芽生えを3時間ごとに回収し、GUS発現パターンの変化を観察した。



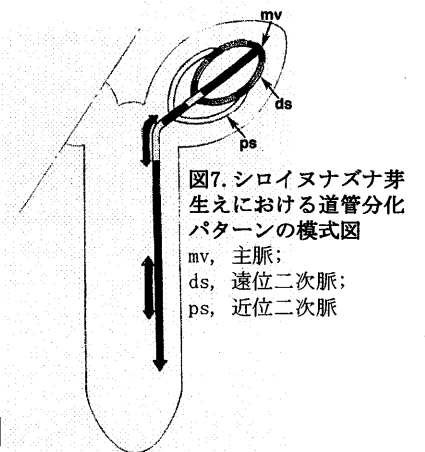
◀ 図3. 形質転換シロイヌナズナの胚軸-根の後生木部道管分化過程におけるZCP4プロモーター::GUSの発現パターン  
(B1), 根の先端側の原生木部での発現; (B2), 胚軸-根junctionの後生木部道管での発現; (B3), 子葉-胚軸junctionの後生木部道管での発現; (B4), 後生木部道管での不連続な発現。(B1), 105HAI; (B2), 117HAI; (B3), 114HAI; (B4), 120HAI目の芽生え。バーは(B1-B4) 200 μm。



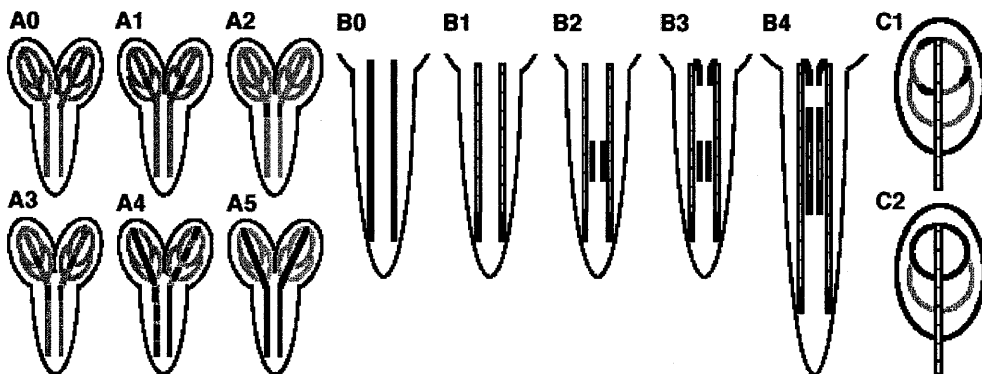
◀ 図4. 胚軸-根での後生木部道管分化過程におけるZCP4プロモーター::GUS発現の経時変化  
20個以上の形質転換シロイヌナズナの芽生えを3時間ごとに回収し、胚軸-根でのGUS発現パターンの変化を観察した。



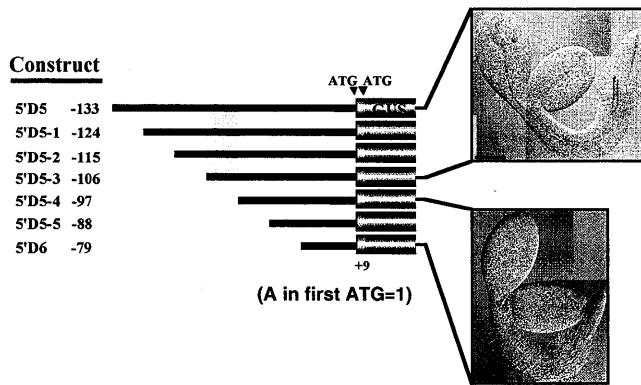
◀ 図5. 形質転換シロイヌナズナ子葉の二次脈におけるZCP4プロモーター::GUSの発現パターン  
(C1), 遠位二次脈の先端と基部側での発現; (C2), 遠位二次脈に沿ったループ状の発現(c, d)はそれぞれ(C1)の黒いボックスで囲んだ部分の拡大像。(C1), 111HAI; (C2), 117HAI目の芽生え。バーは(C1, C2) 100 μm; (c, d) 50 μm。



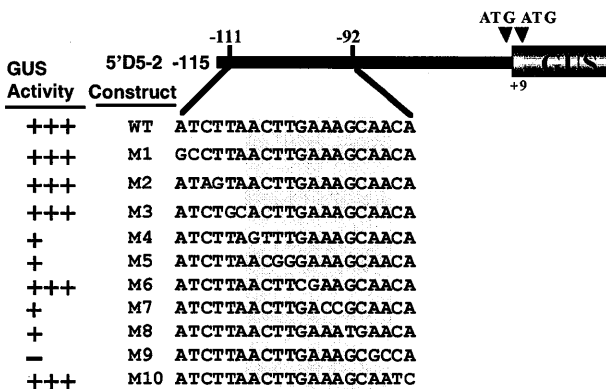
◀ 図7. シロイヌナズナ芽生えにおける道管分化パターンの模式図  
mv, 主脈;  
ds, 遠位二次脈;  
ps, 近位二次脈



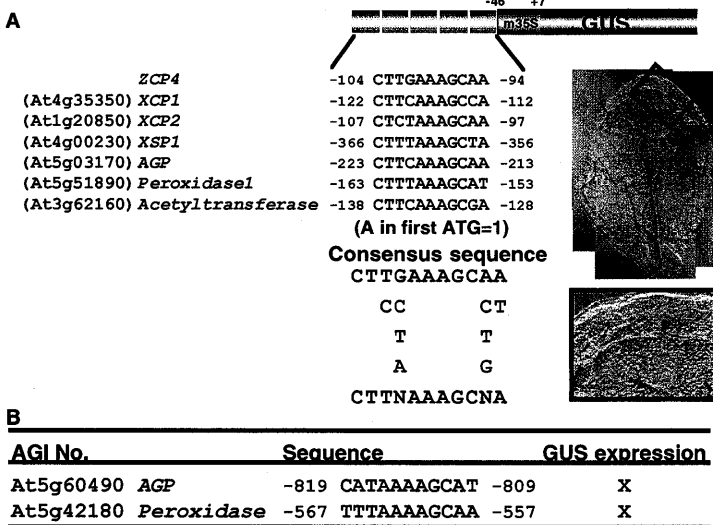
◀ 図6. シロイヌナズナ芽生えにおけるZCP4プロモーター::GUSの発現パターンの模式図  
灰色, 青, 赤, ストライプラインはそれぞれ前形成層, GUSを発現する原生木部道管, GUSを発現する後生木部道管, 成熟した道管を示す。



▲ 図8. ZCP4 プロモーター解析I: 5'欠失変異体 -133bpまでのZCP4プロモーター領域を5'側から9bpずつ欠失させたクローンをシロイヌナズナに導入し発現を調べた。



▲ 図9. ZCP4 プロモーター解析II: リンカースキャン 5'D5-2 (-115~+9)の-111~-92の領域を、2bpずつ別の配列に置き換えたコンストラクトを作成し、シロイヌナズナに導入し発現を調べた。GUS活性の強さは道管での発現が確認できる染色時間で示している。



▲ 図10. 未成熟管状要素特異的発現に関わるシス配列のGain-of-function解析 ZCP4プロモーターの-104~-94配列とZCP4のシロイヌナズナホモログXCP1, XCP2を含む8種類のシロイヌナズナ道管分化関連遺伝子のプロモーター上に見られる類似配列を、それぞれ5つのタンデムリピートとし、35S minimalプロモーターにつないだ。これらをシロイヌナズナに導入、発現を調べた。Aは未成熟管状要素での発現が観察された配列を、Bは発現が観察されなかった配列を示す。右の写真はAcetyltransferaseの配列を導入した場合を示している。

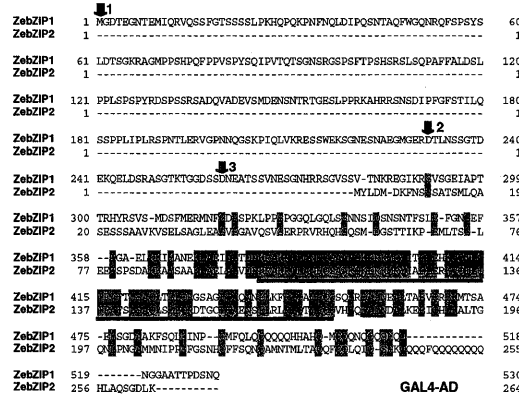


図11. ヒヤクニチソウ bZIP遺伝子のアミノ酸配列比較 酵母one-hybrid法で単離された遺伝子断片の塩基配列から予想されるアミノ酸配列。同一アミノ酸をボックスで囲んだ。bZIPドメイン領域を赤線で示した。矢印はone-hybrid法で単離されたZebZIP1の3クローンのN末端を示している。

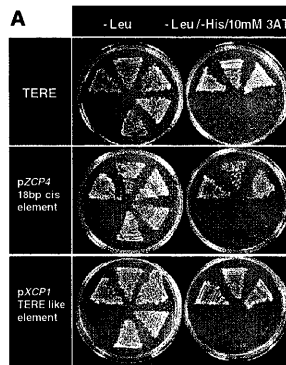


図12. AtbZIP51, ZebZIP1, ZebZIP2のZCP4プロモーターの11bp, 18bpシス配列およびXCP1プロモーター配列への結合 A: HIS3 遺伝子をレポーターとした検定。シス配列に結合するものは-His, 10mM 3AT入りプレートで生育している。写真左はbaitとしたシス配列を示す。B:Aの各プレートにおける、形質転換酵母の塗布位置。GAL4の活性化ドメインに融合させた各bZIPタンパク質を示している。

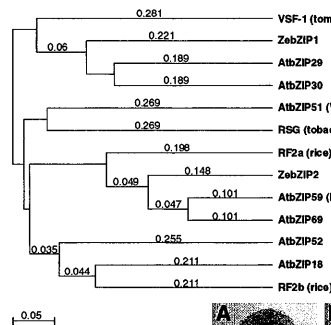


図13. ヒヤクニチソウとシロイヌナズナ bZIP ファミリーおよび既知のbZIP遺伝子のアミノ酸配列をもとに作成した系統樹

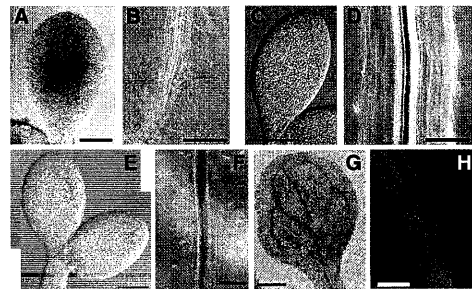


図14. シロイヌナズナbZIP遺伝子プロモーター::レポーターの発現パターン 約2kbのプロモーター領域にGUSあるいは核局在YFPレポーター遺伝子を繋ぎ、シロイヌナズナに導入し、その発現を観察した。(A, B) AtbZIP18プロモーター::GUS; (C, D) AtbZIP51プロモーター::GUS (E, F) AtbZIP52プロモーター::GUS; (G) AtbZIP59プロモーター::GUS; (H) AtbZIP59プロモーター::YFP-NLS (核局在シグナル)。バーは(A, B, C, E, G, H) 200 μm; (D) 50 μm; (F) 100 μm。

図15. AtbZIP18の過剰発現体およびdominant repression (DR)形質転換体における表現型

(A) 野生型; (B, C) 過剰発現体; (D, E) DR形質転換体 (C)は(B)の拡大図 (C)の黒枠は異なる管状要素分化を示している。

