

# 論文内容の要旨

## 論文題目

Molecular genetic analysis of *OBE1*

and *OBE2* in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナにおける *OBE1* 遺伝子

及び *OBE2* 遺伝子の分子遺伝学的解析)

西駕 俊祐

モデル生物である高等植物シロイヌナズナの発生における連続的な器官形成には、茎頂及び根端の分裂組織に存在する幹細胞集団が必要不可欠である。そのため、シロイヌナズナの生命維持にはこの2つの分裂組織は必須であり、その形成/維持の機構を理解することは高等植物の発生を理解する上で非常に重要であると考えられる。

私は本研究において *ERECTA* (*ER*) 遺伝子の茎頂分裂組織における発現を制御する DNA 領域の解析と、茎頂及び根端分裂組織の発生を制御する *OBERRON1* (*OBE1*) 遺伝子及び *OBERRON2* (*OBE2*) 遺伝子の解析をおこなった。

*ER* 遺伝子は茎頂分裂組織において強く発現し、その発現は翻訳開始点の上流-586 から-278 の DNA 領域によって制御されていることがこれまでの研究によって明らかにされている。私はリンカースキャニング法を用いて、*ER* の発現制御領域のより詳細な解析をおこなった。*ER* の上流 1.3 kb のプロモーター DNA 断片内に 50 塩基のリンカーを挿入した 10 種類の改変プロモーターによっ

て GUS 遺伝子を発現させるコンストラクトを導入した形質転換植物を作製し、リンカーの挿入による *ER* の茎頂分裂組織における発現に対する影響を調べた。10 種類の形質転換植物のうち、9 種類の形質転換植物では、野生型の *ER* プロモーターと同様の GUS 発現パターンを示したが、-390 から-341 の領域にリンカーを挿入した形質転換植物では茎頂分裂組織において GUS 染色が観察されなかった。-430 から-381 及び-350 から-301 にリンカーを挿入した形質転換植物では GUS の発現パターンに野生型との違いは観察されなかったことから、*ER* の茎頂分裂組織における発現には、翻訳開始点の上流-380 から-351 の領域が必要であることが示唆された。今回同定された 30 塩基の DNA 配列をデータベースを用いて解析したところ、既知の転写因子の結合配列と一致する配列は見出されなかったため、今後は Yeast one-hybrid を用いて、*ER* の発現を制御するタンパク質を同定することにより、*ER* の茎頂分裂組織での発現とその機能をより理解することが期待される。

*OBE1* と *OBE2* はコードするタンパク質のアミノ酸レベルで 84%の相同性を持つ非常によく似た遺伝子である。*OBE1* と *OBE2* は推定アミノ酸配列から、plant homeodomain (PHD) finger ドメインと coiled-coil ドメインを持つタンパク質をコードしていることが分かった。PHD finger ドメインは4つのシステイン、1つのヒスチジン、3つのシステインの順で、それぞれの間で一定の数のアミノ酸を含む約60のアミノ酸から構成されているドメインであり、これまでに動物や植物の核に局在するタンパク質で見つかっている。そこで *OBE1* と *OBE2* 遺伝子をレポーター遺伝子の GFP 遺伝子と結合させた融合遺伝子を 35S プロモーターで発現させるような形質転換植物の根毛においてそれらの融合遺伝子の細胞内局在を調べた結果、*OBE1* と *OBE2* はどちらも核に局在することが分かり、*OBE1* と *OBE2* は他の PHD finger タンパク質と同様に核内で働くタンパク質であることが示唆された。

次に *OBE1* と *OBE2* の植物体における機能を調べるために、T-DNA 挿入変異体及び点突然変異体の解析をおこなった。T-DNA 挿入変異体 *obe1-1* と *obe2-2* はそれぞれ *OBE1*, *OBE2* の発現が検出できなかったことからヌル変異体であることが推測された。また点突然変異体 *obe2-2* は PHD finger ドメインの途中で翻訳が停止してしまうような塩基置換を持っており、このアレルも *OBE2* が正常な機能を失っていることが推測された。これら3つの変異体の形態観察をおこなったところ、野生型との違いは全く観察されなかった。*OBE1* と *OBE2* は非

常によく似た遺伝子であることから、この2つの遺伝子はシロイヌナズナにおいて冗長的に機能している可能性が考えられたので、*obel-1 obe2-1* と *obel-1 obe2-2* の2通りの組み合わせで二重変異体を作製し、その形態観察をおこなったところ、どちらの組み合わせの二重変異体においても、野生型と比べて著しい発生異常が観察された。シロイヌナズナの野生型では発芽後、2枚の子葉を展開し、8枚から12枚のロゼット葉を形成した後、花芽を形成し抽台する。一方、*obel-1 obe2-1* は発芽後、まず1枚から4枚の子葉を展開し、1組のロゼット葉（1枚から3枚）を生じた後、花芽を形成せずに発生を停止し、枯死した。*obel-1 obe2-2* も *obel-1 obe2-1* と同様の表現型を示したので、*obel-1 obe2-1* を *obel obe2* 二重変異体としてより詳細な解析をおこなった。*obel obe2* が1組のロゼット葉を形成した後に発生を停止してしまうことから、茎頂分裂組織に異常があることが推測されたので、電子顕微鏡及び切片作製による茎頂分裂組織の観察をおこなったところ、*obel obe2* では茎頂分裂組織の領域が発芽後の時間の経過と共に縮小していくことが分かった。また、*obel obe2* では地上部だけではなく地下部においても異常が観察された。*obel obe2* の根は発芽後、全く伸長せず、根端分裂組織の形態は野生型のような規則正しい細胞配列は全く観察されなかった。この結果から、*obel obe2* では茎頂分裂組織だけではなく、根端分裂組織においても異常があることが示された。

*obel obe2* で観察された茎頂及び根端の分裂組織の異常は発芽直後から観察されたことから、これらの異常は胚発生において既に起こっていることが示唆されたので、遺伝子型が *OBE1obel obe2obe2* の個体のさやの中に存在する胚の観察をおこなった。*obel obe2* の形態異常は主に transition ステージから観察された。野生型では transition ステージにおいて皮層/内皮の幹細胞から皮層及び内皮の2つの層が形成されるが、*obel obe2* では大部分の個体で皮層/内皮の幹細胞由来の層が1層しか観察されなかった。また、将来地上部になる部分の原表皮の細胞層は、植物の一生を通じて垂層分裂しかおこなわないが、*obel obe2* の transition ステージ胚では、一部の原表皮細胞で並層分裂が観察された。heart ステージになると、*obel obe2* の発生の異常はより顕著となり、将来胚軸や根の維管束になる細胞の縦方向への伸長欠損や子葉の数の増加、コルメラ層の欠失が観察された。以上の形態観察から *obel obe2* では胚発生において既に茎頂及び根端の分裂組織の形成/維持に異常があることが示唆された。

*obel obe2* は分裂組織の形成/維持に異常があることが示唆されたので、その

異常と類似した表現型を示す他の突然変異を交配によって導入し、その形態観察をおこなった。*WUSCHEL (WUS)*や*CLAVATA3 (CLV3)*、*SHOOT MERITLESS (STM)*遺伝子は茎頂分裂組織の形成／維持において重要な役割を果たしていることがこれまでに明らかになっている。*wus* 変異体は胚発生における茎頂分裂組織の形成に欠損があり、発芽後に発生を停止してしまうが、10日前後経過した後、本来茎頂分裂組織が形成されるはずの領域の脇から新たに葉やシュートを形成する。*clv3* 変異体は *wus* 変異体とは逆に、茎頂分裂組織が肥大化する表現型を示す。しかし、*obel obe2 wus* 及び *obel obe2 clv3* 三重変異体はどちらも *obel obe2* 二重変異体と同じ表現型を示したことから、*obel obe2* 二重変異体は *wus* 変異体や *clv3* 変異体に対して遺伝的に上位であることが示された。一方、*obel obe2 stm* 三重変異体ではロゼット葉形成されず、*obel obe2* 二重変異体と *stm* 変異体を足したような表現型が観察されたことから、茎頂分裂組織の形成／維持において *OBE1* と *OBE2* は *STM* とは別な経路で働いていることが示唆された。

形態観察や遺伝学的解析の結果から、*obel obe2* 二重変異体では分裂組織の形成／維持に異常があることが明らかとなったので、その分子メカニズムをより詳細に明らかにするためにまず、茎頂分裂組織の形成／維持に必要な遺伝子の発現解析を GUS 染色及び *in situ hybridization* を用いておこなった。茎頂分裂組織のマーカー遺伝子である *CLV3* と *WUS* の発現は *obel obe2* の heart ステージまでは観察されたが、それ以後のステージでは観察されず、*obel obe2* の形態観察で示された茎頂分裂組織の異常と一致していた。一方 *STM* の発現は胚発生の間は野生型と *obel obe2* 二重変異体の間で違いは観察されなかったことから、*OBE1* と *OBE2* は *STM* の発現には関与していないことが示唆され、これらの遺伝子が別な経路で働いているという遺伝学的解析によって示唆された結果と一致した。

次に *obel obe2* 二重変異体において、根端分裂組織の形成／維持に必要な遺伝子の発現解析を GUS 染色及び *in situ hybridization* を用いておこなった。根端分裂組織のマーカーである QC マーカーと *WUSCHEL RELATED HOMEBOX5* の発現は *obel obe2* ではどの時期においても観察されなかったことから *obel obe2* では根端分裂組織が形成されていないことが示唆された。次に根端分裂組織の形成に必要な遺伝子である *MONOPTEROS (MP)* や *PLETHORA1 (PLT1)*、*SCARECROW (SCR)* の発現解析をおこなった。野生型では *MP* は胚発生初期から発現し、根端分裂組織の前駆体であるレンズ型細胞の形成に必須の遺伝子で

あることが知られている。*PLT1* や *SCR* も胚発生初期から発現しており、この2つの遺伝子はレンズ型細胞が静止中心に特定化される時に独立に働くことが知られている。*obe1 obe2* の胚では *MP* の発現は観察されたが、*PLT1* や *SCR* の発現は観察されなかったことから、*obe1 obe2* ではレンズ型細胞が静止中心に特定化される過程において異常があることが示唆された。

以上の形態観察及び発現解析の結果から、*OBE1* と *OBE2* は茎頂及び根端分裂組織の形成／維持に必要な遺伝子であることが示されたが、この2つの遺伝子がコードするタンパク質の具体的な機能については本研究では明らかにすることができなかった。しかし、近年、動物において *PHD finger* タンパク質が、ヒストン H3 の4番目のリジン残基のうち、トリメチル化修飾されたリジン残基を特異的に認識し、結合することが明らかにされており、ヒストン H3 のトリメチル化修飾された4番目のリジン残基は、発現することが示されている遺伝子の5'側の発現制御領域に多く存在することが知られている。*obe1 obe2* において茎頂及び根端分裂組織の形成／維持に必要な遺伝子の発現が欠失していたことから、*OBE1* と *OBE2* は、トリメチル化修飾されたリジン残基を特異的に認識することによって、これらの遺伝子の転写を活性化させるようなタンパク質である可能性が考えられる。今後はクロマチン免疫沈降を用いた解析をおこなうことにより、*OBE1* と *OBE2* の機能を明らかにしていくことが必要であると考えられる。