論文審査の結果の要旨

氏名　西駕　俊祐

本論文は、4 章からなる。第 1 章は、イントロダクションであり、本研究の背景意義などを述べている。第 2 章は、ER 遺伝子の発現調節領域の解析を行った。第 3 章が中心的な成果であり、以下に述べる。第 4 章は、この研究全体の総括・総合考察となっている。

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。

本研究では *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 *OBERON1 (OBE1)* 遺伝子及び *OBERON2 (OBE2)* 遺伝子の解析をおこない、植物の発生分化過程における重要な遺伝子を新発見した。

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、それぞれの間に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。植物における新規の遺伝子である。　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。その結果から、*OBE1 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。

OBE1 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、*OBE1 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、*OBE1 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、*OBE1 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 *OBE1 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。このように新規な遺伝子を発見し、その機能を推定した。

OBE1 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。*OBE1 OBE2 wus* 及び *OBE1 OBE2 clv3* 三重変異体はどちらも *OBE1 OBE2* 二重変異体と同じ表現型を示したことから、*OBE1 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、*OBE1 OBE2 stm* 三重変異体ではロゼット葉形成されず、*OBE1 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。

OBE1 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、茎頂分裂組織の形成／維持に必要な遺伝子の発現解析をおこなった。茎頂分裂組織のマーカー遺伝子である *CLV3* と *WUS* の発現は *OBE1 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、*OBE1 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 *OBE1 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、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 HOMEOBOX5* の発現は *OBE1 OBE2* ではどの時期においても観察されなかったことから *OBE1 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重要な遺伝子である *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。

以上のように、シュート頂・根端における重要な遺伝子機能を発見し、シロイヌナズナ発生分化過程に新たな一歩を前進させたことが特筆される。

なお、本論文第 3 章は、古水千尋、横山隆亮、倉田哲也、佐藤修正、加藤友彦、田畑哲之、鈴木光宏、米田好文との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の伊予が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。