

論文の内容の要旨

論文題目

Molecular genetic studies of cell proliferation and differentiation in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナにおける細胞の増殖と分化に関する分子遺伝学的研究)

氏名 古水 千尋

植物は動物とは独立に単細胞生物から多細胞生物への進化が起きたと考えられている。この多細胞化に伴って単細胞生物にはみられない新たな現象がみられるようになった。例えば、多細胞生物を構成している多くの細胞は一様なわけではない。それぞれの細胞が特徴的な形や機能を持つ様々な細胞へと分化することがよく知られている。同時に、個々の細胞が無秩序に生命活動を行うのを防ぎ、秩序正しく生命活動を行うために、組織や器官のレベルで細胞同士がコミュニケーションを図ることで個体の発生や生理活動を円滑に進めていると考えられている。この多細胞化に伴う細胞の分化と相互作用の分子機構に興味を持って私はモデル植物のシロイヌナズナを用いた分子遺伝学的な研究を行ってきた。

細胞の分化と相互作用に関する研究を開始するにあたって、*ERECTA* 遺伝子に注目することにした。*ERECTA* 遺伝子の機能を欠損した *erecta* 変異体の示す多面的な表現型の解析から、*ERECTA* 遺伝子は茎頂分裂組織に由来し、植物の地上部を構成する器官の大きさと形態を制御していることが推測された [Torii et al. (1996) *Plant Cell* 8: 735-746]。*ERECTA* 遺伝子は植物に固有の遺伝子で、細胞外にロイシンリッチリピートモチーフを持ち、細胞内にセリン/スレオニン型キナーゼの特徴を持つ、受容体型レセプターキナーゼ様のタンパク質をコードしていることが明らかになっていた [Torii et al. (1996) *Plant Cell* 8: 735-746]。*ERECTA* 遺伝子は茎頂分裂組織や若い器官原基で特に強く発現している [Yokoyama et al. (1998) *Plant J.* 15: 301-310]。これらの知見から、*ERECTA* 遺伝子は、

側性器官の発生において、細胞間のコミュニケーションを通して器官の大きさや形態を制御していると推測された。さらに、近年の研究によって表皮細胞の分化過程における *ERECTA* 遺伝子の機能が明らかにされた。植物の地上部では気孔と呼ばれる特殊な表皮細胞が分化し、植物が呼吸や光合成のために水蒸気や二酸化炭素のガス交換を行う際の中心的な場となる。遺伝学的な解析から、*ERECTA* 遺伝子とその相同遺伝子から構成される *ERECTA* ファミリー遺伝子は気孔が形成される際の不等分裂を負に制御していることが明らかにされた [Shpak et al. (2005) *Science* 309: 290-293]。これらの知見から多細胞生物における細胞の分化とコミュニケーションを解析するうえで *ERECTA* 遺伝子は優れた材料になると考えられた。

ERECTA 遺伝子の気孔の形成における機能が明らかになったことにより、*ERECTA* 遺伝子の下流で機能すると考えられるシグナル伝達系や転写因子が同定されたが [Bergmann and Sack (2007) *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 163-181; Pillitteri and Torii (2007) *BioEssays* 29: 861-870]、これらの制御因子が働く分子機構に関してはまだ限られた知見しか得られていなかった。また *ERECTA* ファミリー遺伝子は互いに似た発現パターンを示すが、その発現パターンには違いもあることが報告されていた [Shpak et al. (2004) *Development* 131: 1491-1501; Shpak et al. (2005) *Science* 309: 290-293]。*ERECTA* ファミリー遺伝子のプロモーター領域内には特に保存された配列がないため、*ERECTA* ファミリー遺伝子の発現はそれぞれ異なる仕組みによって制御されている可能性が示唆されていたが、*ERECTA* ファミリー遺伝子の発現を制御するトランス因子に関してはこれまで知見がなかった。そこで、これらの未解決の問題に取り組むことによって、植物における細胞の分化と相互作用の分子機構に関する新たな知見を得ることを目指し、多角的な視点から以下のような研究を行った。

【第三章 *erecta* 変異体に類似した表現型を示す変異体の単離と研究】

気孔の発生の制御因子が近年、相次いで単離されたが、その分子機構に関してはまだ限られた知見しか得られていない。そこで新たな制御因子を同定するために、変異源処理した植物の中から *erecta* 変異体に似た表現型を示す変異体の単離と解析を行った。これにより *erecta* 変異の新たなアレルを多数単離した。さらに *munchkin* (*muc*) 変異体を単離した。*muc* 変異体では気孔の密度が増加するため、*MUC* 遺伝子は *ERECTA* 遺伝子と同じように気孔の発生の負の制御因子として機能していることが推測された。

マッピングにより原因遺伝子を単離したところ、*muc* 変異は *KNOPF* 遺伝子として解析されていた遺伝子のミスセンスアレルであることがわかった。*KNOPF* 遺伝子はタンパク質の翻訳後修飾の一つである N-glycosylation に関与する α -グルコシダーゼ I をコードし

ているが、他の *knopf* 変異体はいずれも胚発生が途中で停止するという強い表現型を示すことが報告されていた [Boisson et al. (2001) EMBO J. 20: 1010-1019; Gillmor et al. (2002) J. Cell Biol. 156: 1003-1013]。

本研究で得られた *muc* アレルは非常に弱い機能欠損型アレルとして機能することが示唆され、*muc* アレルを用いることによって植物の発芽後の発生における α -グルコシダーゼ I の機能を初めて明らかにすることが可能になった。

興味深いことに、気孔の発生を制御するシグナル伝達系の制御因子の多くは、その配列の特徴から、KNOPF が関与する糖鎖修飾を受けると推測されていた。そのなかで EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1 (*EPF1*) 遺伝子は分泌性の小さなペプチドをコードしており、遺伝学的解析から、ERECTA 様のレセプターのリガンドであると推測されていた [Hara et al. (2007) Genes Dev. 21: 1720-1725]。そこで *muc* 変異は *EPF1* の糖鎖修飾に影響を与える結果、*EPF1* の機能を損なっているのではないかと推測された。この仮説を検証するために *epf1 muc* 二重変異体を作製し、表現型を解析した。その結果、*epf1* 変異は *muc* 変異に対して遺伝学的に上位であることが示され、*KNOPF/MUC* 遺伝子は *EPF1* 遺伝子と同じ遺伝学的経路上で機能することが推測された。

ところで、多くの真核生物のゲノムにおいて、 α -グルコシダーゼ I をコードする遺伝子は単一コピーで存在する。しかし、シロイヌナズナのゲノムには *KNOPF* 遺伝子と非常に相同性の高い、*KNOPF-LIKE* (*KNL*) 遺伝子が存在することを明らかにした。変異体の解析から、*KNL* 遺伝子は根の発生に関与することが推測された。また、その配列上の特徴などから、*KNL* は *KNOPF* とは異なる生化学的な性質をもつことが推測された。

【第四章 OBERON と相互作用するタンパク質の単離と研究】

ERECTA 遺伝子の発現を制御する遺伝子の候補として単離された *OBERON1* 遺伝子とそのパラログである *OBERON2* 遺伝子は冗長的に機能し、分裂組織の形成と維持に関与する [Saiga et al. (2008) Development 135: 1751-1759]。

ERECTA 遺伝子と *OBERON* 遺伝子の関係をさらに詳しく調べるために、私は *OBERON1* と相互作用する因子を酵母 2 ハイブリッド法を用いて探索した。その結果、*OBERON* をコードするクローンが多数単離され、*OBERON* は二量体を形成する可能性があることを明らかにした。また、*OBERON1* 以外に、*OBERON INTERACTING PROTEIN2* (*BIP2*) を単離した。*BIP2* 遺伝子は plant homeodomain (PHD)フィンガーモチーフを持つ核局在タンパク質をコードしており、遺伝子発現制御に関与することが推測された。今までの解析結果からは、*BIP2* 遺伝子が *ERECTA* 遺伝子の発現を制御することを示す知見は得られていない。しかしながら、*BIP2* 遺伝子領域の大部分を欠損する *bip2-2* 機能欠損型変異体

が野生型よりも大きくなるという表現型を示したことから、*BIP2* 遺伝子は *ERECTA* 遺伝子とは逆に、器官サイズの負の制御因子として働いていることが示唆された。

野生型と *bip2* 変異体との間で細胞の大きさには違いがないことから、*BIP2* 遺伝子は細胞の増殖を制御することによって、器官サイズを調節していると推測された。先行研究では細胞周期を直接制御する遺伝子の変異体では器官サイズが変化することが報告されていたが、*bip2-2* 変異体では細胞周期関連遺伝子の発現には変化がなかった。一方、細胞の増殖を制御することによって器官サイズを正に制御していると考えられている推定転写因子をコードしている遺伝子などの発現が *bip2-2* 変異体では上昇していた。

これらの解析結果から、*BIP2* 遺伝子は器官サイズ制御因子の発現を抑制的に制御することによって、シロイヌナズナの器官サイズを制御していると推測することができる。

【第五章 *ERECTA* 遺伝子の発現を制御する *EMU* 遺伝子の研究】

ERECTA 遺伝子の発現を制御する分子機構に関する知見を得るために、*ERECTA* 遺伝子の発現パターンが変化する変異体を探索した。このために、*ERECTA* 遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合したキメラ遺伝子 *pER::GUS* を導入した形質転換植物を変異源処理し、レポーターの発現パターンが変化する変異体を選抜した。その結果、レポーター活性を低下させる劣性変異である *erecta mRNA under-expressed (emu)* 変異を単離した。*EMU* 遺伝子は *ERECTA* 遺伝子の発現の正の制御因子であると推測された。マッピングにより原因遺伝子を単離したところ、*EMU* 遺伝子は mRNA の代謝に関わる複合体の主要な構成因子の一つであることが明らかになった。

さらに *emu* 変異は *ERECTA* 遺伝子以外にも花成の制御因子などの発現に影響を与えることを明らかにした。また、*EMU* とともに複合体を形成することが推定される因子の変異体についても解析を行ったところ、胚性致死の表現型を示した。これらの結果から、*EMU* タンパク質とその複合体が植物の発生において重要な役割を担っていることが示唆された。