

## 論文内容の要旨

### 論文題目

Molecular genetic studies on apical meristem neof ormation  
during shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナの器官再生系における頂端分裂組織の新形成に関する分子遺伝学的研究)

氏 名 玉置 裕章

### 序論

植物の組織片を適切な条件下で培養すると、シュートや根が再生する。これらの再生器官は、新たに形成された頂端分裂組織、すなわち茎頂分裂組織 (SAM) および根端分裂組織 (RAM) に由来する。器官再生の初期過程では、胚発生・胚後発生を通して築かれた位置情報が組織培養によって大きく乱された状態から、頂端分裂組織の新形成が始まる。これより、頂端分裂組織の構築の基層に、自立性の高い統御機構が存在することが窺われる。このような機構は通常の発生過程にも関与することが考えられるが、器官再生に際して頂端分裂組織の新形成が起きるときにはとくに大きな役割を担っているはずである。こうしたことから私は、頂端分裂組織新形成の分子基盤に着目し、これを分子遺伝学的に捉えることを目指して、器官再生が温度感受性を示すシロイヌナズナの変異体 *rid3*、*rgd3*、*rpd2* の解析を行ってきた。修士課程では、組織学的観察によりシュート再生に関する各変異体の表現型を調べるとともに、既知の SAM 制御遺伝子の発現レベルに対する変異の影響を調べた。その結果、どの変異体も制限温度下では SAM 形成不全のためにシュートを再生できないこと (図 1)、*rid3* 変異は *CUC-STM* 経路の遺伝子発現を異常に亢進し *rgd3* 変異は逆に抑制することを見いだした。また、変異体の責任遺伝子のうち *RID3* のポジショナルクローニングを行って、新規 WD40 リピードタンパク質をコードすることを明らかにした。博士課程では、*RGD3* 遺伝子の同定を行い、*RID3* と *RGD3* による *CUC-STM* 経路の制御を中心に、シュート再生における SAM 新形成の分子機構について解析を進めた。

### 結果と考察

#### 1. 温度感受性変異体 *rid3*、*rgd3*、*rpd2* におけるシュート再生障害の解析

シロイヌナズナの胚軸外植片をカルス誘導培地 (CIM) で培養した後にシュート誘導培地 (SIM) に移植すると、表面に細胞質に富む細胞の集塊が生じ、やがてそこに SAM が構築されてシュート再生に至る。

*CYCB1;1p::CYCB1;1*: GUSレポーターを分裂期マーカーに用いて、このシュート再生過程における細胞増殖のパターンを観察した結果、SIM 移植後速やかにカルス全域で細胞分裂活性が低下し、その後カルス表層で活性化された細胞分裂により細胞集塊が形成される、という過程を辿ることがわかった (図2)。これと比較すると、制限温度の28°Cで培養した*rid3* の外植片では、カルス表層の細胞分裂活性が著しく高く、それを反映して細胞集塊も大きく発達した。逆に*rgd2* では、カルス表層の細胞分裂が不活発であり、細胞集塊の成長が停滞している様子が観察された。*rgd3* では細胞分裂の活性化がほとんど見られず、細胞集塊が形成されなかった。これらの結果から、SAMの基となる細胞集塊の形成に際して、細胞増殖の開始に*RGD3* が、始まった細胞増殖の維持に*RPD2*がそれぞれ関与し、一方で*RID3*が細胞増殖を負に制御していると予想された。

次に、RT-PCR 解析で*rid3* 変異と*rgd3* 変異の影響が認められた*CUC-STM* 経路の遺伝子*CUC1* および*STM* について、シュート再生過程における発現の時空間的变化をGUSレポーターを用いて調べた。より早い段階で発現変動が見られたのは*CUC1*で、野生型の外植片をSIM に移植したときには2日以内にカルス全体で発現が高まり、その後表層では発現がモザイク状となって、発現が高い部位から細胞集塊が発達しSAM が構築された (図3)。制限温度で培養した*rid3* の外植片ではこのような*CUC1* 発現のパターン変化が見られず、一様で高レベルの発現が持続し、*rgd3* では*CUC1* 発現が検出されなかった (図3)。*rid3* で観察されたような均一な*CUC1* 発現を再現するために、分解制御を受けないようmiRNA標的サイトを改変した*CUC1* を過剰発現させると、シュート再生が抑制された。また、*rgd3* において*CUC1* を強制発現させたところ、不完全ながらシュート再生能力が回復した。これらより、*rid3*、*rgd3* ともに、シュート再生障害は (少なくとも部分的には) *CUC1* 発現の異常に起因すると考えられた。

## 2. *RGD3* 遺伝子の同定およびその発現パターンに関する解析

*rgd3* 変異の位置を染色体マッピングにより絞り込み、この領域の塩基配列解析を行った結果、TATA-binding protein associated factor の一種AtBTA1 をコードする*At3g54280* 内に塩基置換を発見した。相補性検定によりこの遺伝子のT-DNA 挿入変異と*rgd3* 変異が対立遺伝子の関係にあることが確認されたので、*At3g54280* が*RGD3* 遺伝子であると結論した。次に、GUS レポーター遺伝子を作成して、同定した*RGD3*について発現解析を行った。播種後2週間目の芽生えでは、SAMおよびRAM全体で*RGD3*が強く発現していた。この発現パターンは、制限温度で育てた*rgd3*の芽生えではシュート及び根の成長が著しく抑制されることと一致している。シュート再生過程においては、*RGD3* は初めカルス全体で発現していたが、表層では次第に限局化していった (図4)。*RGD3* の高い発現が残った部位に細胞集塊が発達していたが、これは*CUC1* の発現が高い部位でもあり、*rgd3* 変異により*CUC1* 発現と細胞集塊形成が抑制されることとよく対応していた。以上より、SAM 新形成における*RGD3* の働きには、AtBTA1 による*CUC1* 発現と細胞増殖の促進が関わっていることが示唆された。

## 3. *RID3* 遺伝子の発現パターンと機能に関する解析

GFP 融合*RID3* タンパク質を*RID3* プロモーターの制御下に発現する植物体を作成して観察を行った結果、*RID3* が初期胚などに多く、細胞内では核に局在していることが明らかになった。シュート再生過程における*RID3* の発現パターンについては、*RID3p::GUS* をレポーターとして追跡した。*RID3* はSIM 移植時にはカルス全体で発現していたが、カルス表層における発現はその後不均一に低下し、細胞集塊が盛り上がってくる頃にはこれを避けるような発現を示した (図4)。細胞集塊との位置関係で見れば、この発現パターンは*CUC1* と逆であり、

*rid3* 変異が *CUC1* 発現と細胞増殖を亢進したと合致していた。さらに *RID3* を過剰に発現させて、*CUC-STM* 経路への影響を調べた。その結果、*RID3* 過剰発現体では *CUC1*、*STM* の発現が著しく低下していることがわかった。また、本葉形成の抑制など、*stm* 変異体と似た表現型も見られた。これらの結果と先述した *rid3* 変異体の解析結果から、*RID3* は *CUC-STM* 経路を抑制的に制御することにより、SAM 構築に先立つ細胞増殖を調節していると推定された。

### まとめと展望

以上全てを総合すると、シュート再生時の SAM 新形成には、主に *CUC-STM* 経路の遺伝子発現制御を介して行われる、*RID3* による細胞増殖の負の調節と *RGD3* による正の調節が深く関与していると考えられる (図5)。またこのとき、*RPD2* は既知の SAM 制御系とは独立に細胞増殖に関わっているようである (図5)。今後各遺伝子の一次機能とこれらの作用とを結びつけていくことで、頂端分裂組織構築の基本機構の新たな側面が明らかになると期待される。

図1. シュート再生に対する各突然変異の影響

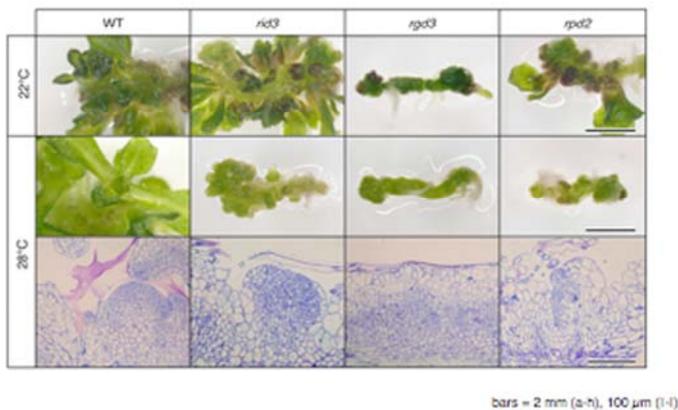


図4. シュート再生過程における *RID3*、*RGD3* の発現パターン

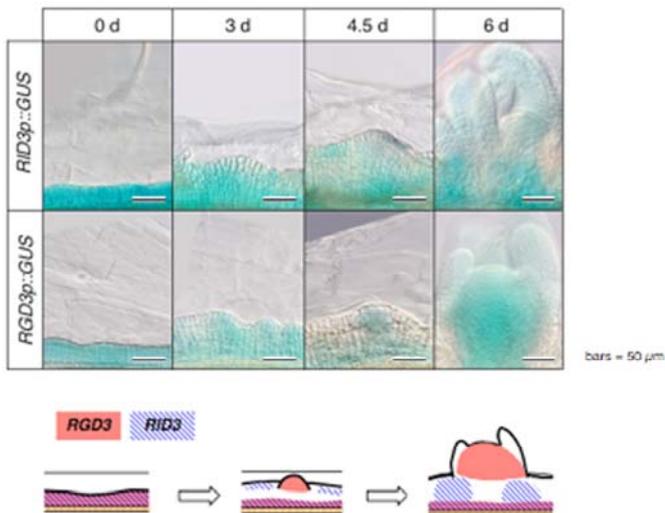


図2. シュート再生過程における細胞増殖パターン



図3. シュート再生過程における *CUC1* の発現パターン

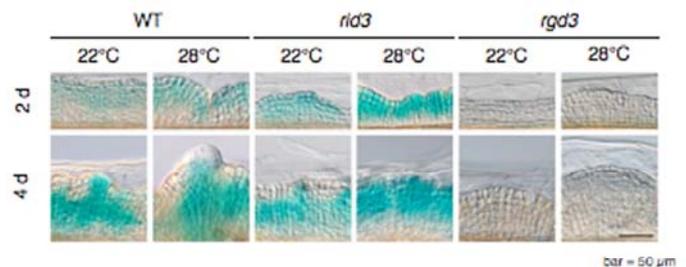


図5. シュート再生における *RID3*、*RGD3*、*RPD2* の役割

