

論文内容の要旨

論文題目

Study on the CLV signalling pathway maintaining apical meristem in Arabidopsis

(シロイヌナズナ頂端分裂組織維持機構における CLV シグナル伝達系の解析)

氏 名 木下 温子

高等植物の胚発生以後の形態形成は、茎頂分裂組織と根端分裂組織からなる頂端分裂組織で行われる。頂端分裂組織は、未分化状態を保ちながら分裂・増殖する細胞群であり、茎頂-根端両軸方向への成長や各器官原基の形成に必要な細胞を提供する。この頂端分裂組織の維持機構に関して、興味深い突然変異体が単離されている。シロイヌナズナ *clavata* (*clv*) 突然変異体では茎頂分裂組織の肥大化や、花器官数の増大など顕著な表現型が観察され、一方で *wuschel* (*wus*) 突然変異体では茎頂分裂組織の縮小や、花器官数の減少など、*clv* 突然変異体とは対照的な表現型が観察される。これら突然変異体の解析から、茎頂分裂組織のサイズ決定には、細胞外ドメインに leucine rich repeat (LRR) をもつ受容体様キナーゼ CLV1 とキナーゼ領域を欠く LRR 型受容体様タンパク質 CLV2、さらに膜結合型タンパク質キナーゼである CORYNE (CRN)/SUPPRESSOR OF LLP1 2 (SOL2)が、分泌性のリガンドである CLV3 を認識することで、細胞非自律的な情報伝達系が駆動することが重要だと考えられている。この CLV シグナル伝達系の下流ではホメオドメイン型転写因子である WUS の遺伝子発現が抑制され、一方 WUS は CLV3 の発現を促進することから、WUS-CLV3 間の負のフィードバック機構の存在が示唆されている。しかしながら、CLV3 や WUS の単離から 10 年以

上経過しているにも関わらず、このシグナル伝達系で機能する分子は、未だ、ごくわずかしか単離されていない。また根端分裂組織においても、茎頂分裂組織の CLV シグナル伝達系に類似した経路が存在することが示唆されているものの、その分子実態はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、近年当研究室で確立された、MCLV3 ペプチドによるケミカルジェネティクスの手法を用い、CLV シグナル伝達系で機能する新規シグナル因子を単離するとともに、これを用いてシロイヌナズナ頂端分裂組織維持の遺伝的調節機構を包括的に理解することを目的として実験を行った。

1. MCLV3 ペプチドの作用機構の解析

MCLV3 は、CLV3 の C 末端に保存された CLE ドメインのうち、12 アミノ酸配列を化学的に合成したペプチドである。MCLV3 をシロイヌナズナ植物体に投与すると、茎頂分裂組織の欠失や根端分裂組織の縮小など、内生の CLV3 を過剰に発現させた場合と同様の表現型が観察された。一方、*clv1*、*clv2*、*clv3* 突然変異体を、MCLV3 ペプチドを含む培地中で生育したところ、*clv3* 突然変異体は野生型同様、茎頂分裂組織が欠失したのに対し、*clv1*、*clv2* 突然変異体はドーム状の茎頂分裂組織を維持していた。さらに、MCLV3 ペプチドを含む培地中で生育した *pWUS::GUS*、*pCLV3::GUS* 形質転換体の茎頂分裂組織を観察したところ、いずれのレポーター融合遺伝子も発現レベルが低下していた。このことから、MCLV3 ペプチドは CLV1、CLV2 を介した内生の CLV シグナル伝達系で機能し、*WUS* の発現を抑制していることが明らかとなった。

2. CLV シグナル伝達系で機能する新規因子の探索

高濃度 MCLV3 ペプチド添加時における花茎伸長抑制を指標に、EMS 処理種子、activation tag line 種子、Fox line 種子を用いたスクリーニングを行い、37 個体の MCLV3 ペプチド耐性突然変異体候補を得た。このうち EMS 処理種子から得られた突然変異体個体についてマップベースクローニングを行い、この原因遺伝子が LRR 型受容体様キナーゼをコードする *RPK2* であることを明らかにした。

rpk2 突然変異体の表現型を詳細に観察したところ、MCLV3 ペプチドに対する耐性に加え、茎頂分裂組織の肥大化や花器官数の増加など、*clv* 突然変異体と類似した表現型を示した。さらに、*in situ* hybridization、及びレポーター遺伝子の発現解析の結果、*RPK2* は茎頂分裂組織の広い領域に発現することが明らかとなった。また、*rpk2* 突然変異体において *WUS* 遺伝子の発現レベルの上昇が検出され、一方で *wus rpk2* 二重変異体においては *wus* 突然変異体と同様に茎頂分裂組織が欠失する表現型が観察されたことから、*WUS* 遺伝子発現は *RPK2* に制御されることが示唆された。さらに、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモー

ターを用いて *RPK2* 遺伝子の過剰発現体を作成したところ、複数の形質転換体において茎頂分裂組織の欠失や花器官数の減少など、*wus* 突然変異体に類似した表現型が観察された。以上の結果から、*RPK2* は *CLV3* の下流、かつ *WUS* の上流で、*WUS* 遺伝子の発現を抑制する機能をもつ因子であることが強く示唆された。

3. 受容体 *CLV1*、*CLV2*、*RPK2* 間における、遺伝学的・生化学的相互作用の解析

2.で得られた知見は、*CLV3* の既知の受容体である *CLV1*、および *CLV2* においても共通に観察される。そこで、本研究で単離された受容体 *RPK2* と、*CLV1*、*CLV2* との相互作用を検証するため、遺伝学的、生化学的な検証を行った。*clv1 rpk2*、*clv2 rpk2*、*clv1 clv2*、そして、*clv1 clv2 rpk2* という各二重、三重突然変異体を作成し、茎頂分裂組織の表現型を観察したところ、単一突然変異体、二重突然変異体、三重突然変異体の順に茎頂分裂組織のサイズは大きくなり、三重突然変異体は *clv3* 単一突然変異体とほぼ同サイズの茎頂分裂組織をもっていることが明らかとなった。このことから、*CLV1*、*CLV2*、*RPK2* は *CLV3* のシグナルを伝達する3つの独立な経路であることが遺伝学的に示唆された。次に、*RPK2* の生化学的性質を明らかにするため *Nicotiana benthamiana* の葉における一過的発現系を用いた免疫沈降実験を行った。この系においては、*RPK2* は *CLV1*、*CLV2* いずれとも結合しないことが明らかとなった。この結果は *RPK2* が *CLV1*、*CLV2* と独立の経路で機能するという、遺伝学的解析結果を支持するものである。一方、異なる二種類のタグを付加した融合タンパク質による免疫沈降実験から、*RPK2* が自身との結合能を持つことが示された。このことから、茎頂分裂組織において *RPK2* は自身と結合し、二量体あるいは多量体として機能している可能性が示唆された。

4. 根端分裂組織における *MCLV3* ペプチド作用機構の解析

clv1、*clv3*、および *soll* 各突然変異体を *MCLV3* ペプチド存在下で生育させ、主根長を計測したところ、野生型同様顕著な伸長阻害が観察された。一方、*clv2*、*crn/sol2*、および *rpk2* 各突然変異体は *MCLV3* ペプチドに対する耐性を示し、高濃度 *MCLV3* ペプチド存在下においても一定の主根伸長が観察された。以上の結果から、*MCLV3* は *CLV2*、*CRN/SOL2*、および *RPK2* を介して根端分裂組織の縮小効果をもたらしていることが推察された。一方、根端分裂組織の静止中心で特異的に発現する *WUS* 関連遺伝子、*WUS homeobox-containing (WOX)* 5 遺伝子に GFP を融合したキメラ遺伝子を導入した形質転換体に *MCLV3* ペプチドを投与しその表現型を観察したところ、*MCLV3* ペプチドの有無に関わらず GFP の蛍光が観察されたことから、*MCLV3* 投与による根端分裂組織の縮小には、*WOX5* は関与していないと考えられた。

以上、本研究ではケミカルジェネティクス的手法を用いて CLV シグナル伝達系で機能する新規受容体様キナーゼ RPK2 を単離した。遺伝学的・生化学的解析により、RPK2 は既知の受容体である CLV1 や CLV2 と独立に機能することが示され、CLV シグナル伝達系で働く第 3 の経路であることが示唆された。また、RPK2 および CLV2、CRN/SOL2 は茎頂のみならず、根端においても、CLV3 様リガンドの下流で分裂組織の維持機構に関与する可能性が示唆された。今後は RPK2 のリガンドの特定、さらに下流で機能する因子を探索するとともに、これら受容体の機能を詳細に解析することで、植物の頂端分裂組織を維持する制御系のメカニズムが明らかになると期待される。