学位論文題名

Molecular and genetic analyses of L1 layer-specific genes in *Arabidopsis thaliana*.

(シロイヌナズナのL1層特異的遺伝子に関する分子遺伝学的解析)

学位論文内容の要旨

シロイヌナズナを含む高等植物の茎頂分裂組織は厳密な層構造をもつことがこれまでの研究から知られている。外衣一内体説に基づく解剖学的研究によれば、シロイヌナズナの茎頂分裂組織はL1、L2の二層の細胞層からなる外衣と、L3と呼ばれる内体から構成されている。外衣においては垂層分裂だけが行われ、その結果、分裂組織の厳密な層構造が維持されている。地上部の各器官は全てL1、L2、L3に由来する細胞から構成されており、複雑な形態を生み出すためには各層間の協調的な細胞分裂が必要とされてきた。こうした成果の多くは、層間キメラ植物を用いた研究によって得られてきたものである。他方、近年になり細胞層特異的な発現を示すホメオボックス遺伝子として、トウモロコシのL2、L3で発現するKNOTTED1、シロイヌナズナのL1で発現するMERISTEM LAYER1 (ATML1)などが報告されてきた。KNOTTED1、ATML1遺伝子は、それぞれ転写因子をコードしていることから、厳密な層構造をもつ茎頂分裂組織の構築、維持に関わる分子レベルでの制御機構の存在が示唆される。しかしながら、これらの因子が関与する遺伝子発現制御機構に関する解明はほとんどなされていない。そこで、L1層特異的に発現する遺伝子に注目し、その発現制御機構を解明することを目指した。

第一章においては、L1層特異的遺伝子発現に重要なシス配列の同定について記述する。私が1999年に報告した $PROTODERMAL\ FACTOR1$ (PDF1)遺伝子は、新規のプロリン・リッチ領域を持つ細胞壁タンパク質をコードしていることが予想され、これまでにL1層並びに器官原基の原表皮組織で特異的に発現することが確認されている。また、レポーター遺伝子を用いた解析の結果、PDF1遺伝子のプロモーター領域約1500bp以内にL1層特異的な発現制御領域が存在することも判明した。このことから、PDF1遺伝子のプロモーター解析を行い、L1層特異的な発現に関与するシス配列を明らかにすることを目指した。まず、PDF1プロモーターのdeletion seriesを作成し、形質転換シロイヌナズナにおけるレポーター遺伝子の組織特異的発現を観察した。10種類のPDF1プロモーターを β -glucronidase (GUS)遺伝子上流につなぎ、野生型シロイヌナズナに導入した。形質転換シロイヌナズナにおけるレポーター遺伝子の発現解析の結果から、PDF1上流-260~-111の領域にL1層特異的発現を制御する配列が存在することが明らかになった。この領域に存在する8塩基の配列(TAAATGCA)は、ATML1を含めた複数のL1層特異的遺伝子のプロモーター領域にも共通して存在することから、L1 boxと名付け更なる解析を行った。

ATML1タンパク質を用いたEMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)の結果から、in vitroにおいて ATML1がL1 box配列に特異的に結合することが示された。また、このシス配列への変異の導入によって、ATML1タンパク質との相互作用が阻害されることも明らかになった。L1 boxに同様の変異を導入したコンストラクトを用いて野生型シロイヌナズナを形質転換したところ、形質転換植物においてはL1層特異的なレポーター遺伝子の発現が消失した。以上の結果から、L1 boxの8塩基の配列がL1層特異的な遺伝子発現に極めて重要であることが示唆された。

次に、第二章においてPROTODERML FACTOR2 (PDF2) 遺伝子の単離と機能解析の 結果について報告する。分裂組織のアイデンティティーの転換に伴い発現が変化する遺伝 子群の一つとして、cDNAサブトラクション法によってPDF2遺伝子を単離した。PDF2 遺伝子はその推定アミノ酸配列からHD-GL2クラスのホメオドメインタンパク質をコー ドしていると予想され、同じ遺伝子ファミリーに属するATML1とはアミノ酸レベルで86 %の高い相同性を示した。in situ hybridizationによる発現解析の結果、 PDF2遺伝子は 茎頂分裂組織のL1層で特異的に発現していることが明らかになった。シロイヌナズナに おいてL1層特異的な遺伝子発現をPDF2タンパク質が制御している可能性を検討するため に、PDF1プロモーターのL1 box配列とPDF2タンパク質を用いてEMSAを行った。その 結果、PDF2がL1層特異的な遺伝子発現に重要なシス配列にin vitro で結合することが分 かった。次に、形質転換シロイヌナズナを作成し表現型の観察と遺伝子発現の解析を行っ た。カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター下流にPDF2cDNAをつないだコ ンストラクトをシロイヌナズナに導入したところ、花の形態異常と花成遅延の二種類の表 現型が観察された。花の形態に異常を示すラインでは、走査型電子顕微鏡の観察により花 弁、萼片の表皮細胞の分化に異常が認められ、この表現型が、co-suppressionによる PDF2のmRNAレベルの低下によって引き起こされることがノーザン解析によって示され た。興味深いことに、同様な形態の異常はATML1の過剰発現を示す形質転換シロイヌナ ズナにおいても観察された。一方、花成遅延を示すラインでは、野生型に比べてPDF2は 強い発現を示し、in situ hybridizationによってL1層以外の組織において異所的に PDF2 が発現していることが明らかになった。最後に、これらの形質転換シロイヌナズナにおけ るL1層特異的遺伝子の発現を解析した結果、ATML1の過剰発現によってPDF2遺伝子の 発現が誘導されることが分かった。しかしながら、PDF2の過剰発現ではATML1遺伝子 の誘導は認められないことから、両者の機能的な分担が存在することが予想される。以上 の結果から、L1層特異的なHD-GL2クラスのホメオドメインタンパク質PDF2、ATML1 が表皮細胞の分化に重要な役割を果たす可能性が考えられる。

これまでの結果から、ホメオドメインを持つ転写因子がL1 boxに結合することにより L1層特異的遺伝子群の発現が制御されている可能性が示唆された。植物の発生、分化に 関わるホメオドメインタンパク質において、その標的配列を明らかにしたのは本研究が最 初である。今後、各遺伝子の機能欠失変異体の探索ならびに表現型の観察によって、シロ イヌナズナの発生における機能の解明がされることが期待される。また、それに伴い層構 造の構築と維持に関する分子レベルでの制御機構も明らかになるものと考える。

学位論文審査の要旨

 主 査 教 授 米 田 好 文

 副 査 教 授 落 合 廣

 副 査 助教授 加 藤 敦 之

学位論文題名

Molecular and genetic analyses of L1 layer-specific genes in *Arabidopsis thaliana*.

(シロイヌナズナのL1層特異的遺伝子に関する分子遺伝学的解析)

シロイヌナズナを含む高等植物の茎頂分裂組織は厳密な層構造をもつことがこれまでの研究から知られている。外衣-内体説に基づく解剖学的研究によれば、シロイヌナズナの茎頂分裂組織はL1、L2の二層の細胞層からなる外衣と、L3と呼ばれる内体から構成されている。そこで、L1層特異的に発現する遺伝子に注目し、その発現制御機構を解明することを目指した。

第一章においては、L1層特異的遺伝子発現に重要なシス配列の同定について記述する。私が1999年に報告した $PROTODERMAL\ FACTOR1\ (PDF1)$ 遺伝子は、新規のプロリン・リッチ領域を持つ細胞壁タンパク質をコードしていることが予想され、これまでにL1層並びに器官原基の原表皮組織で特異的に発現することが確認されている。また、レポーター遺伝子を用いた解析の結果、PDF1遺伝子のプロモーター領域約1500bp以内にL1層特異的な発現制御領域が存在することも判明した。このことから、PDF1遺伝子のプロモーター解析を行い、L1層特異的な発現に関与するシス配列を明らかにすることを目指した。まず、PDF1プロモーターのdeletion seriesを作成し、形質転換シロイヌナズナにおけるレポーター遺伝子の組織特異的発現を観察した。10種類のPDF1プロモーターをb-glucronidase (GUS) 遺伝子上流につなぎ、野生型シロイヌナズナに導入した。形質転換シロイヌナズナにおけるレポーター遺伝子の発現解析の結果から、PDF1上流・260~・111の領域にL1層特異的発現を制御する配列が存在することが明らかになった。この領域に存在する8塩基の配列(TAAATGCA)は、ATML1を含めた複数のL1層特異的遺伝子のプロモーター領域にも共通して存在することから、L1 boxと名付け更なる解析を行った。ATML1タンパク質を用いたEMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)の結果から、 $Invitroにおいて\ ATML1がL1\ box配列に特異的に結合することが示された。また、このシス$

ATML1タンハク質を用いたEMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)の結果から、in vitroにおいて ATML1がL1 box配列に特異的に結合することが示された。また、このシス配列への変異の導入によって、ATML1タンパク質との相互作用が阻害されることも明らかになった。L1 boxに同様の変異を導入したコンストラクトを用いて野生型シロイヌナズナを形質転換したところ、形質転換植物においてはL1層特異的なレポーター遺伝子の発

現が消失した。以上の結果から、L1 boxの8塩基の配列がL1層特異的な遺伝子発現に極めて重要であることが示唆された。

次に、第二章においてPROTODERML FACTOR2 (PDF2) 遺伝子の単離と機能解析の結 果について報告する。分裂組織のアイデンティティーの転換に伴い発現が変化する遺伝子 群の一つとして、cDNAサブトラクション法によってPDF2遺伝子を単離した。PDF2遺伝 子はその推定アミノ酸配列からHD-GL2クラスのホメオドメインタンパク質をコードして いると予想され、同じ遺伝子ファミリーに属するATML1とはアミノ酸レベルで86%の高 い相同性を示した。in situ hybridizationによる発現解析の結果、PDF2遺伝子は茎頂分裂 組織のL1層で特異的に発現していることが明らかになった。シロイヌナズナにおいてL1 層特異的な遺伝子発現をPDF2タンパク質が制御している可能性を検討するために、PDF1 プロモーターのL1 box配列とPDF2タンパク質を用いてEMSAを行った。その結果、PDF2 がL1層特異的な遺伝子発現に重要なシス配列にin vitroで結合することが分かった。次 に、形質転換シロイヌナズナを作成し表現型の観察と遺伝子発現の解析を行った。カリフ ラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター下流にPDF2 cDNAをつないだコンストラクト をシロイヌナズナに導入したところ、花の形態異常と花成遅延の二種類の表現型が観察さ れた。花の形態に異常を示すラインでは、走査型電子顕微鏡の観察により花弁、萼片の表 皮細胞の分化に異常が認められ、この表現型が、co-suppressionによるPDF2のmRNAレベ ルの低下によって引き起こされることがノーザン解析によって示された。以上の結果か ら、L1層特異的なHD-GL2クラスのホメオドメインタンパク質PDF2、ATML1が表皮細胞 の分化に重要な役割を果たす可能性が考えられる。

これまでの結果から、ホメオドメインを持つ転写因子がL1 boxに結合することにより L1層特異的遺伝子群の発現が制御されている可能性が示唆された。植物の発生、分化に 関わるホメオドメインタンパク質において、その標的配列を明らかにしたのは本研究が最 初である。今後、各遺伝子の機能欠失変異体の探索ならびに表現型の観察によって、シロ イヌナズナの発生における機能の解明がされることが期待される。また、それに伴い層構 造の構築と維持に関する分子レベルでの制御機構も明らかになるものと考える。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認める。