

# 論文審査の結果の要旨

氏名 永田賢司

本論文は、モデル植物であるシロイヌナズナを材料に用いて、表皮細胞の分化機構を分子遺伝学的手法によって明らかにしたものである。表皮は、個体と外部環境との境界部に位置し、各種ストレスから個体内部を保護する、植物にとって不可欠な組織である。本研究は、シロイヌナズナにおける表皮分化の鍵因子である *ARABIDOPSIS THALIANA* MERISTEM L1 LAYER (*ATML1*) に着目し、その発現が最外層に限定される発現制御機構の解明を目指した。*HD-ZipIV*型転写因子である *ATML1* は、表皮細胞分化関連遺伝子群の転写制御領域に保存されたシス配列 (*L1 box*) に結合し、下流遺伝子群の発現を調節する。興味深いことに、*ATML1* 遺伝子自身の転写制御領域にも *L1 box* が存在するため、*ATML1* の自己活性化を介した転写制御機構が、表皮細胞分化において重要であることが強く示唆される。しかし、*ATML1* 遺伝子の表皮特異的発現パターンが達成されるためには、自己活性化機構を適切な位置、すなわち最外層に限定する未知のシグナル伝達経路が存在する必要がある。そこで、本研究では、表皮細胞が個体内における自らの位置を適切に認識し、*ATML1* の自己活性化機構を適切な場所で発動させる分子機構を解明することを目指した。

本論文は6章からなり、第1章では、研究の背景としてシロイヌナズナの表皮細胞分化に関するこれまでの知見、本研究の位置付け、着想に至った経緯がまとめられている。第2章では、表皮細胞分化の鍵因子である *ATML1* の発現動態についての詳細な解析結果が記されている。第3章、第4章では、*ATML1* と相互作用し、*ATML1* の機能制御に関わる極長鎖脂肪酸を含む脂質候補について、遺伝学的解析、生化学的解析、産生領域の探索に関する様々な研究の結果が記されている。第5章では、一連の結果の考察に加え、研究全体の総括と将来展望が記され、最終章においては引用文献がまとめられている。

シロイヌナズナ では、8-16 細胞期胚の原表皮細胞に並層分裂が生じ、表皮細胞と非表皮

細胞の違いが生じる。そこで、まずは胚発生時期における ATML1 の発現を詳細に解析した。その結果、ATML1 タンパク質は、原表皮細胞の並層分裂によって表皮細胞と非表皮細胞のどちらの娘細胞にも一旦は分配されるものの、16 細胞期以降の非表皮細胞では、ATML1 の発現は観察されなくなることが明らかになった。つまり、ATML1 タンパク質は細胞位置依存的に、その機能が制御されていることが予測される。そこで、細胞位置依存的な ATML1 動態を理解するために、ATML1 の一過的異所発現系を構築した。熱ショックプロモーターを用いて側根の全ての細胞で ATML1-EGFP を誘導したところ、ATML1-EGFP は最外層の細胞のみで安定的に維持され、内側細胞では速やかに観察されなくなった。一連の結果から、内外を区別する位置情報シグナルが ATML1 の安定性制御に関与し、その結果自己活性化機構の差異が生じている可能性が示唆された。

次に、永田氏は最外層における安定性制御に関わる位置情報シグナルの探索を試みた。ATML1 は脂質結合領域である START ドメインを有している。そこで、START ドメインに注目し、1 アミノ酸置換 (W471L 変異) を導入したところ、最外層細胞における ATML1 タンパク質の安定性が喪失することが判明した。また、野生型配列の START ドメインは極長鎖脂肪酸 (VLCFA) を含むセラミド (VLCFA-Cer) と結合すること、W471L 変異によって START ドメインと VLCFA-Cer の結合が特異的に阻害されることも明らかになった。さらに、VLCFA-Cer の生合成阻害によって、W471L 変異によって生じる最外層細胞における ATML1 タンパク質の安定性喪失が再現されることも明らかになった。こうした一連の結果から、VLCFA-Cer と ATML1 の相互作用が、最外層における ATML1 の安定性に関わることが示唆された。また、VLCFA-Cer の生合成阻害実験によって、ATML1 遺伝子の転写レベルが顕著に低下することが明らかになったことから、VLCFA-Cer と ATML1 タンパク質の相互作用が ATML1 の自己活性化に必要であることも示された。

VLCFA-Cer が位置情報シグナルの分子実体であることが示唆されたため、VLCFA-Cer の生体内局在について、さらなる検討を加えた。VLCFA 生合成の鍵酵素である PAS2 の発現解析から、PAS2 の最外層特異的な発現が明らかになった。また、*atml1-1; pdf2-1* 二重変異体においては、VLCFA を含むスフィンゴ脂質の有意な減少が確認された。VLCFA 生合成遺伝子群のプロモーター領域にも L1 box が保存されていることを考慮すると、VLCFA-Cer は ATML1 を介して最外層特異的に合成されることが予測される。また、VLCFA-Cer 生合成阻害剤による表皮細胞の極性形成への影響を検討したところ、VLCFA-Cer が、外部環境に接する頂端膜への細胞内輸送において重要なはたらきをもつことが示唆された。

以上、本論文では、表皮細胞分化の鍵因子である ATML1 の機能制御において、最外層細胞特異的に産生される VLCFA-Cer が重要なはたらきをしていることを明らかにした。今後は、非表皮細胞における ATML1 の安定性御機機構の理解を含め、表皮細胞分化の分子機構を詳細に理解することによって、植物における細胞位置情報の認識、体軸の形成といった植物の発生現象の根幹をなす現象の理解に結びつけていく事を考えている。

なお、本論文に記載された研究は阿部光知氏（東京大学）、高橋卓氏（岡山大学）、川合麻紀氏（埼玉大学）、石川寿樹氏（埼玉大学）との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行ったもので、論文提出者の寄与は十分である。

以上、本論文に記載された知見の多くは新規知見であり、いずれも植物発生研究の進展に重要な示唆を与えるものである。また、論文提出者本人が自立して研究活動を行うのに十分な研究能力と学識を有することも十分に示されている。よって、永田賢司提出の論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。