

# 論文審査の結果の要旨

氏名 玉置 貴之

本論文は、植物細胞間シグナル伝達を担う重要な CLE (CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-related) ペプチドシグナルの合成と機能についてシロイヌナズナを材料に研究したものである。CLE ペプチドは、植物の茎頂・維管束・根端の3つのメリステムにおいて、細胞膜上の受容体である Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase (LRR-RLK) に受容され、細胞内では WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN (WOX) 転写因子を介して、幹細胞の分化と分裂を制御する。論文提出者は、CLE ペプチドのシグナル伝達過程で、重要でありながら未解決のまま残されていた、ペプチド合成におけるプロセッシングの機構とペプチド機能を最終的に決める WOX 転写因子の働きに焦点を当てて解析した。本論文は5章からなり、第1章では、研究の背景として CLE ペプチドに関する基礎的な知見がまとめられ、これと関連付けて研究の意義と目的が記されている。第2章では本研究で使われた材料と方法について記述されている。第3、4章は研究の結果とその考察であり、第3章では、SUPPRESSOR OF *LLP1* 1 (*SOL1*) のプロセッシングへの関与についての詳細な解析が、第4章では、WUSCHEL (*WUS*) と *WOX4* を用いた標的遺伝子の解析が述べられている。研究全体の総括が第5章に記されている。

*CLE* 遺伝子はおおよそ 100 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしている。このタンパク質は N 末端にシグナルペプチド、C 末端側にファミリー内で保存された領域である CLE ドメインを持っている。CLE ペプチドは植物体内において翻訳後にプロセッシングを受けて、CLE ドメインに対応する 12/13 アミノ酸残基からなる成熟ペプチドとして切り出されたあと、機能すると考えられている。しかし CLE ペプチドのプロセッシング機構の詳細についてはこれまでほとんど明らかになっていない。動物の *SOL1* ホモログはポリペプチドの C 末端のアルギニンまたはリシンを除去する活性を持つことが知られている。このことから *SOL1* も同様の活性を持ち、CLE ペプチドの C 末端アミノ酸のプロセッシングに関わるのではないかと予測された。

そこで、論文提出者は、*SOL1* に着目し、*SOL1* の酵素活性を明らかにすることにした。まず、*SOL1* を *Nicotiana benthamiana* 中で一過的に発現させたのちに、*SOL1* タンパク質を

単離・精製した。基質としては、先行研究で SOL1 によるプロセッシングを受けることが示唆された CLE19 ペプチドを用いた。その結果、精製 SOL1 は CLE19 の C 末端アルギニンのプロセッシング活性を示した。また、同様に、精製 SOL1 はペプチド前駆体の C 末端リシンに対してもプロセッシング活性を示した。このことから SOL1 が CLE19 を含む C 末端にアルギニンまたはリシンを持つ複数の CLE ペプチド前駆体のプロセッシングに関わることが明らかとなった。

次に、論文提出者は植物体内での SOL1 のプロセッシング機能を、遺伝学的解析により調査した。まず、*soll* 変異体と野生型シロイヌナズナを用いて、成熟 CLE19 ペプチドを投与したときと全長 CLE 遺伝子を発現させたときの感受性の違いを比較した。対照としては CLV3 を用いた。12 アミノ酸から成る成熟 CLV3 と CLE19 ペプチドを植物に直接与えると、ともに *soll* 変異体と野生型の根の伸長を阻害した。ところが、CLE19 全長遺伝子を発現誘導したときには、野生型の根の伸長は阻害したものの、*soll* 変異体では伸長が阻害されなかった。一方で、CLV3 全長遺伝子は、いずれの植物体でも根の伸長を阻害した。次に、アルギニンを最初から除去した CLE19 (CLE19 $\Delta$ R) 遺伝子を作成し、シロイヌナズナ内で発現誘導した。その結果、全長 CLE19 遺伝子の場合と異なり、*soll* 変異体においても野生型と同様に根の伸長阻害が起きた。この結果から SOL1 は CLE19 の C 末端アルギニンの除去に働いていて、CLE19 ペプチドの生成に必須であることが明らかとなった。以上の研究は、CLE ペプチドのプロセッシング過程を明らかにした世界初の研究として高く評価された。

次に、論文提出者は、WOX4 による維管束幹細胞の増殖機構を明らかにするため、WOX4 の標的遺伝子の網羅的な探索を行った。まず、エストロゲン誘導プロモーターの下流で WOX4 と WUS を発現するシロイヌナズナ培養細胞を形質転換によって作出し、エストロゲン処理によって導入遺伝子の発現誘導が起こることを確認した。次に、この培養細胞を用いて WOX4、WUS を発現誘導し、これら転写因子により速やかに発現が変化する遺伝子を、マイクロアレイを用いて網羅的に調査した。その結果、WOX4、WUS 発現により、多くの遺伝子が短時間に発現上昇あるいは減少することが明らかになった。興味深いことに、共に幹細胞の分裂に関与する転写因子であるにもかかわらず、多くのターゲット遺伝子は異なっていた。WOX4 特異的なターゲット遺伝子の中には、エチレンシグナル伝達に関わると予測される遺伝子が複数存在し、WOX4 がエチレンシグナル伝達経路を介して維管束幹細胞の増殖に関わっている可能性が推測された。これらの結果は、WOX4 による維管束メリステム制御と WUS による茎頂メリステム制御では、そのターゲット遺伝子に大きな違

いがあることを示した。以上の結果は、維管束メリステムの分裂制御に関連する遺伝子ネットワークを示した初めての成果として高く評価された。

なお、本論文に記載された研究は藤原正幸、深尾陽一郎、別役重之、澤進一郎、福田裕穂氏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、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上、ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うのに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、玉置貴之提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。