

論文の内容の要旨

論文題目

Analysis of gene function involved in plant organ development using *Arabidopsis thaliana* mutants.

(シロイヌナズナ変異体を用いた植物器官形成に関わる遺伝子の解析)

氏名

鎌田 直子

胚発生の段階で個体を形成する器官の分化がほぼ完了する動物と異なり、植物は胚発生終了後も、茎頂および根端の分裂組織を維持したまま成長を続け、形態形成の過程は個体の生涯を通じて行われる。植物体を構成する器官分化の部位やタイミング、器官数、器官サイズ・形状などは、遺伝的にによって決められている部分も大きいものの、環境要因も形態を決定する遺伝子の発現や機能に大きな影響を及ぼす。植物発達に影響を与える環境要因としては、気温、光条件、乾燥、土壌中の栄養組成などの非生物的なものと、害虫による傷害や病原菌の感染などを含む生物的なものがある。これらの環境要因の状態や変化が植物に感受されると、植物体内でのシグナル経路に変化が起こり、遺伝子の発現変化等を通じて形態形成への影響が現れる。周囲の環境により適応するためにも、環境応答に関わる経路は必要時のみに活性化され、正確に制御される必要があると考えられる。植物体内で環境応答を制御する因子及び、環境要因により植物の形態変化を引き起こす背景にある遺伝子経路の解明を目的として、本研究を開始した。

本研究の第一章では、高等植物のモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に変異原処理をして得られた *acaulis1* (*acl1*) 変異体を用いて、環境応答と形態形成に関わる遺伝子の機能について解析を行った。*acl1* 変異体は、花茎伸長が抑制され、形成される花器官数が少ない。葉も小さく縮れた形状を示す。独立の変異体スクリーニングから計3つの変異アレル (*acl1-1*, *acl1-3* および本研究で *acl1* 変異アレルと判明した *acl1-4*) が得られており、共に生育温度の上昇により植物形態の異常が緩和し、26°C 以上では完全に変異表現型が回復するという温度感受性の表現型を示す。また、培地中の窒素栄養の種類と濃度によっても成長の度合いが大きく変化し、比較的弱い表現型を持つ *acl1-3* 変異アレルは、アンモニウム塩の培地への投与で形態が野生株と見分けがつかない程に回復する。これらの非生物的な環境要因の他、*acl1* 変異体の形態的特徴および温度感受性の表現型が、病原菌感染時に活性化する一連の遺伝子の過剰発現に起因することを、本研究では遺伝学的に明らかにした。病原菌感染時に機能する

Resistance 遺伝子のうち、TIR-NB 型のタンパク質をコードする遺伝子群の機能に必須の *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 (EDS1)* の変異により *acl1* 表現型が完全に回復したことから、*ACL1* と *EDS1* の密接な関連性が示唆された。一方で、同じく TIR-NB 型の R タンパク質の機能に必要とされる *PHYTOALEXIN-DEFICIENT4 (PAD4)* や、R 遺伝子の安定性に関わる *REQUIRED FOR MLA12 RESISTANCE1 (RAR1)* の変異では *acl1* 植物形態の回復は不十分であり、これら二つの因子の機能に非依存的な経路が *acl1* 植物の形態形成に関与する

と考えられる。*acl1* 同様に、病原菌抵抗性関連遺伝子が恒常的に活性化する変異体では、抵抗性に必要なサリチル酸の合成酵素をコードする酵素やサリチル酸下流で機能する *NON-EXPRESSOR of PATHOGENESIS RELATED GENES1 (NPR1)* 遺伝子に形態形成が依存するケースも見られるが、それらの変異では *acl1* 表現型が回復しないことから、*acl1* 変異体での形態形成は、*EDS1* 以下、サリチル酸合成の間の経路で機能する遺伝子経路によることが示された。

ACL1 遺伝子単離のために map-based cloning を行ったところ、その過程で *acl1-1* 変異アレル特異的に形態異常をエンハンスする逆位が存在することを突き止めた。また、4 番染色体上 9.5 Mb 付近に存在する Col 系統特異的な RPP5 遺伝子クラスター領域と呼ばれる複数の *R* 遺伝子をコードする領域と強いリンクがあることが判明し、*acl1* 表現型に RPP5 クラスターに含まれる *R* 遺伝子の存在が不可欠であることも示唆された。実際の *ACL1* 遺伝子の同定は、次世代シーケンサーを用いて行われ、その結果、4 番染色体上の tetratricopeptide repeat-containing protein をコードする *SRFR1* 遺伝子に、3 つの *acl1* 変異アレルで共通に変異が存在する事が分かった。*SRFR1* は、*EDS1* および *R* 遺伝子の安定性と機能に重要な SUPPRESSOR OF THE G2 ALLELE OF SKP1 (*SGT1*) とタンパク質相互作用することが報告されており、植物の病原菌抵抗性経路の制御に重要な機能を持つ因子と考えられる。既知の *srfr1* 変異アレルは、*acl1-1* 同様強い形態異常が観察される系統のみであるのに対し、*acl1-3* 変異体は弱い表現型を持つ。*acl1-3* 変異によるアミノ酸置換による *SRFR1* 機能の変化の解析を通じ、今後更に、*SRFR1* とその周辺の遺伝子機能が明らかになることが今後期待される。

表皮組織は植物体が外部環境と接する場であり、植物を乾燥や病原菌の感染から防御し、物理的な強度をあたえる働きがある。加えて、表皮組織特異的に発現された遺伝子機能によって個体全体の成長が影響を受ける事例も報告されていることから、表皮からの発信される何らかの情報が内部細胞層・器官全体へ伝わるのが植物の形態形成に重要な役割を持つことが考えられる。そこで、第二章として本研究では、逆遺伝学的なアプローチで、表皮特異的な発現を示す遺伝子の器官形成への関与を解析することにした。homeodomain-leucine zipper クラス IV (*HD-ZIP IV*) 遺伝子群には、地上部表皮で特異的に発現が誘導され、表皮組織の分化と維持に必要な不可欠な *PROTODERMAL FACTOR2 (PDF2)* と *ARABIDOPSIS THALIANA MERITEM*

*LAYER1 (ATML1)*を始めとして計16個の遺伝子が含まれる。*PDF2*、*ATML1*同様に地上部の表皮組織特異的な発現パターンが示唆されているHD-ZIP IV遺伝子として、*HOMEODOMAIN GLABROUS2 (HDG2)*、*HDG5*、*HDG11*および*HDG12*が先行研究で挙げられているが、*hdg11*単一変異体がトライコームの分岐数の異常を示し*hdg12*変異によりその表現型が亢進されることの他は、これらの遺伝子の機能は不明である。単一変異体においては、外見上大きな表現型の異常が確認されなかったこれらの遺伝子の変異を*pdf2-1*変異体背景に導入した結果、*pdf2-1 hdg2-3*、*pdf2-1 hdg5-1*および*pdf2-1 hdg12-2*花弁及び雄蕊の形成にホメオティックな異常を観察した。単一変異体においても、花器官に着目して詳細な観察を行ったところ、*pdf2-1*、*hdg2-3*単一変異体でも雄蕊の本数が減少する等、花器官の形成にHD-ZIP IV遺伝子が関与している事を示す結果を得ることができた。また、その他のHD-ZIP IV遺伝子群内での多重変異体作製の過程において、*pdf2-1 hdg1-1*二重変異体にも*pdf2-1hdg2-3*同様の表現型、*pdf2-1 hdg1-2*変異体では雄蕊の減少が確認された。*HDG1*も花芽表皮での発現が確認されたため、*HDG1*にも花芽表皮での器官形成への関与が考えられる。*pdf2-1hdg1-1*、*pdf2-1 hdg2-3*、*pdf2-1hdg5-1*二重変異体での花弁の萼片化および雄蕊の雌蕊化という表現型から、二重変異体では花弁および雄蕊の器官形成に必須の*APETALA3 (AP3)*と*PISTILLATA (Pİ)*遺伝子機能に異常があるのではないかと推測された。発現解析の結果、*AP3*の発現量が顕著に低下している事が確認され、また*AP3*の過剰発現により*pdf2-1hdg2-3*表現型が回復したことから、二重変異体の花器官形成異常の表現型の原因は*AP3*の発現低下にあることが示された。これらの表現型に関わるHD-ZIP IV遺伝子が表皮組織特異的に発現するのに対し、*AP3*の発現低下は花弁および雄蕊の器官全体で起きていること、また、二重変異体での花弁の形態異常は表皮層だけでなく内部の細胞層にも及んでいることから、HD-ZIP IV遺伝子の異常が、細胞非自立的に内部の細胞層にまで影響を与えていると考えられる。*PDF2*および表皮で発現するHD-ZIP IV遺伝子の機能が、細胞非自立的な影響を持ち、花器官の正常な分化と形成に必要であることを新たに示すことができた。