

学 位 論 文 題 名

The study of the transcriptional regulation of the
ERECTA gene in *Arabidopsis thaliana*

(アラビドプシスにおける *ERECTA* 遺伝子の発現調節機構の研究)

学位論文内容の要旨

植物は発芽後、栄養成長を経て生殖成長に入る。この生殖成長への移行に伴い植物は劇的な形態変化を引き起こし、その結果複雑な花序形態が生み出される。このような花成に伴う形態の変化、即ち花序形態形成の機構の解明は近年、植物分子遺伝学において注目されており、本研究はこのような形態形成に関与する遺伝子の解析を目標としている。

モデル実験植物シロイヌナズナにおいて *erecta* と呼ばれる突然変異体が知られている。この変異体は本来総状花序という形態をとるシロイヌナズナが散房花序に変わってしまったもので、花序形態を決定する機構を解明するための重要な材料と考えられていた。この突然変異体解析の第一歩として、その原因遺伝子である *ERECTA* 遺伝子の発現様式をノーザン・ハイブリダイゼーション法と *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて明らかにした。その結果、本遺伝子の発現と植物の形態変化との密接な関わり合いが示された。即ち本遺伝子の発現は植物体の茎頂部に限られており、頂端分裂組織が栄養生長から生殖生長へ移行するのに伴いその発現量が著しく増加していたのである。特にその発現は花が分化していく組織において強いことが示された。こうして総状花序形態の形成には、あらかじめ茎頂部での *ERECTA* 遺伝子の発現増加調節必要であると考えられた。*erecta* 突然変異体が花序形態形成に関与する突然変異体の一つであることから、*ERECTA* 遺伝子の発現変化を引き起こす機構を明らかにすることは、このような形態変化に必要な遺伝子群の発現調節機構を明らかにする糸口になることと期待された。そこで次に *ERECTA* 遺伝子の発現調節機構の解明を試みた。

ERECTA 遺伝子発現調節機構の研究の第一歩として、発現に必要なプロモーター上のシス領域を欠失 *ERECTA* プロモーターとレポーター遺伝子とのキメラ遺伝子を導入した形質転換植物体の解析より同定した。この結果、*ERECTA* プロモーター上の少なくとも二ヶ所の領域が *ERECTA* 遺伝子の発現に必要なことを明らかにした。これらの領域には現在植物で単離されている転写因子が結合する認識配列と相同な配列は存在しなく、既知の転写因子やそのファミリーに属する転写因子が関与している可能性は低く、新たにこれら領域と相互作用するような転写因子の単離、同定が必要とされた。そこで本研究においては、細胞内という状態で相互作用するということを重視した酵母を利用した生物学的手法を用いて *ERECTA* プロモーターのシス領域に相互作用するような転写因子の単離を試みた。具体的な方法は以下の通りである。同定した *ERECTA* プロモーターのシス領

域をミニマル・プロモーターの上流に複数連結し、その下流にレポーター遺伝子を連結し酵母に導入する。この酵母に植物由来の蛋白質が発現するようなライブラリーを導入する。植物由来の蛋白質がシス領域と相互作用した場合、その蛋白質が植物の転写因子であることが期待され、その転写因子がもつ活性ドメインが働いて下流にあるレポーター遺伝子の転写翻訳が起こることが期待された。レポーター遺伝子としてベータ・グルコシダーゼ遺伝子を利用することにより発色の有無でシス領域と相互作用している蛋白質が発現している株を選択することが可能であった。さらに発現ベクターとしてガラクトースで発現が誘導できるGALプロモーターを用いることで、偽陽性を示す株と植物由来の蛋白質に依存して発色を示す株を選別を可能にした。約百万クローンをこのようにスクリーニングし、7個の陽性クローンを単離した。これらのクローンより目的の遺伝子を単離し、全長あるいは部分的な塩基配列を決定した。ホモロジー検索による塩基配列の比較ではこれら遺伝子と相同性の高い既知の転写因子は見つからず、新たな転写因子である可能性が期待された。さらにこれらの遺伝子産物を大腸菌を用いて大量に精製し、それら遺伝子産物が *in vitro* で *ERECTA* プロモーターのシス領域と結合するかを確認した。この結果、少なくとも1遺伝子については *in vitro* におけるシス領域との結合活性が確認された。この遺伝子の発現様式を調べたところ、植物体の茎頂部で強い発現が見られ、またその発現量は頂端分裂組織の栄養生長から生殖生長へ移行に伴い著しく増加していた。このように *ERECTA* 遺伝子と酷似している発現様式は、本遺伝子が *ERECTA* 遺伝子の転写因子であることをさらに支持する結果となった。またこの遺伝子のアンチセンスRNAが転写される形質転換植物を作成したところ、形質転換植物体における *ERECTA* 遺伝子の発現の減少がみられ、*in vivo* においてもこの遺伝子の産物が *ERECTA* 遺伝子の転写因子であることを示した。この遺伝子の塩基配列より推定されるアミノ酸配列を調べたところ、動物で報告されている癌遺伝子の一つである *SKI* と部分的に非常に高い相同性を示した。*SKI* 遺伝子は細胞増殖や分化に関わる転写調節因子と推測されていることから、この転写因子も花序形態形成に関わる細胞増殖と分化に関与するものと期待され、*ERECTA* 遺伝子はそのような転写因子の調節下にあるものと推測された。

以上のように *ERECTA* 遺伝子の発現と花序形態形成との関係を示すとともに、その発現制御に必要なプロモーター上のシス配列、およびシス配列に相互作用する転写因子の同定を行った。

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 教 授 福 永 典 之
副 査 助 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

The study of the transcriptional regulation of the *ERECTA* gene in *Arabidopsis thaliana*.

(アラビドプシスにおける *ERECTA* 遺伝子の発現調節機構の研究)

植物は発芽後、栄養成長を経て生殖成長への移行に伴い劇的な形態変化を引き起こし、その結果複雑な花序形態が生み出される。このような花成に伴う形態の変化、即ち花序形態形成の機構の解明は近年、植物分子遺伝学において注目されており、本研究はこのような形態形成に関与する遺伝子の解析を目標とした。

モデル実験植物シロイヌナズナにおいて *erecta* と呼ばれる突然変異体は本来総状花序という形態をとるシロイヌナズナが散房花序に変わってしまったもので、花序形態を決定する機構を解明するための重要な材料と考えられていた。この突然変異体解析の第一歩として、その原因遺伝子である *ERECTA* 遺伝子の発現様式をノーザン・ハイブリダイゼーション法と *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて明らかにした。その結果、本遺伝子の発現は植物体の茎頂部に限られており、頂端分裂組織が栄養生長から生殖生長へ移行するのに伴いその発現量が著しく増加していたのである。特にその発現は花が分化していく組織において強いことを発見した。

erecta 突然変異体が花序形態形成に関与する突然変異体の一つであることから、*ERECTA* 遺伝子の発現変化を引き起こす機構を明らかにすることは、このような形態変化に必要な遺伝子群の発現調節機構発見の糸口になることと期待され、同遺伝子の発現調節機構の解明を試みた。

ERECTA 遺伝子発現調節機構の研究の第一歩として、発現に必要なプロモーター上のシス領域を欠失 *ERECTA* プロモーターとレポーター遺伝子とのキメラ遺伝子を導入した形質転換植物体の解析より同定した。この結果、*ERECTA* プロモーター上の少なくとも二ヶ所の領域が *ERECTA* 遺伝子の発現に必要であることを明らかにした。これらの領域には現在植物で単離されている転写因子が結合する認識配列と相同な配列は存在せず、新規な配列を発見した。新たにこれら領域と相互作用するような転写因子の発見が必要とされた。

本研究においては、細胞内という状態で相互作用するということを重視した酵母を利用した生物学的手法を用いて *ERECTA* プロモーターのシス領域に相互作用するような転写因子の単離を少なくとも 1 遺伝子については試みた。植物由来の蛋白質がシス領域と相互作用した場合、その蛋白質が植物の転写因子であることが期待され、その転写因子がもつ活性ドメインが働いて下流にあるレポーター遺伝子の転写翻訳が起こることが期待された。約百万クローンをこのようにスクリーニングし、7 個の陽性クローンを単離した。これらのクローンより目的の遺伝子を単離し、全長あるいは部分的な塩基配列を決定した。ホモロジー検索による塩基配列の比較ではこれら遺伝子と相同性の高い既知の転写因子は見つからず、新規な転写因子である可能性が期待された。さらにこれらの遺伝子産物を大腸菌を用いて大量に精製し、それら遺伝子産物が *in vitro* で *ERECTA* プロモーターのシス領域と結合するかを確認した。この結果、*in vitro* におけるシス領域との結合活性が確認される 1 つの遺伝子を発見した。この遺伝子の発現様式を調べたところ、植物体の茎頂部に強い発現が見られ、またその発現量は頂端分裂組織の栄養生長から生殖生長へ移行に伴い著しく増加していた。この *ERECTA* 遺伝子と酷似している発現様式は、本遺伝子が *ERECTA* 遺伝子の転写因子であることをさらに支持する結果である。またこの遺伝子のアンチセンス RNA が転写される形質転換植物を作成したところ、形質転換植物体における *ERECTA* 遺伝子の発現の減少がみられ、*in vivo* においてもこの遺伝子の産物が *ERECTA* 遺伝子の転写因子であることを示した。この遺伝子は、植物で新発見の遺伝子であり、その塩基配列より推定されるアミノ酸配列を調べたところ、動物で報告されている癌遺伝子の一つである *SKI* と部分的に非常に高い相同性を示した。*SKI* 遺伝子は細胞増殖や分化に関わる転写調節因子と推測されていることから、この転写因子も花序形態形成に関わる細胞増殖と分化に関与するものと期待された。したがって *ERECTA* 遺伝子はそのような転写因子の調節下にあるものと推測された。

以上のように独自の手法を用いて、新たな *ERECTA* 遺伝子の発現と花序形態形成との関係を示すとともに、その発現制御に必要なプロモーター上のシス配列、およびシス配列に相互作用する転写因子の新発見を行った。

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。