

学位論文題名

Isolation and characterization of two spatially regulated genes in *Arabidopsis thaliana*; proliferative region-specific gene, *AtRBP1*, and xylem-predominant gene, *AtXyn1*.

(シロイヌナズナにおける特徴的な発現パターンを示す二つの遺伝子、細胞増殖領域特異的に発現する *AtRBP1* 遺伝子と木部を中心に発現する *AtXyn1* 遺伝子の単離と解析)

学位論文内容の要旨

(シロイヌナズナにおける特徴的な発現パターンを示す二つの遺伝子、細胞増殖領域特異的に発現する *AtRBP1* 遺伝子と木部を中心に発現する *AtXyn1* 遺伝子の単離と解析)

最近、シロイヌナズナのゲノムプロジェクトが完了し、ゲノムの全塩基配列が明らかになった。しかし、様々な生命現象の分子メカニズムを理解するためには、塩基配列のみならず、着目する生命現象に関わるとされる遺伝子の機能・特性について解析していかねばならない。

私は高等植物の花茎がどのような遺伝的プログラムによって伸長していくのかに興味を持ち、モデル植物であるシロイヌナズナを材料に解析を行った。その手法として、花茎の伸長にきわめて重要であると考えられる細胞増殖と維管束の発達に注目し、細胞増殖領域特異的に発現する *AtRBP1* 遺伝子と維管束の木部を中心に発現する *AtXyn1* 遺伝子についてその発現特性の解析を中心に行った。

<AtRBP1>

*AtRBP1* はアミノ末端側に RNA 結合ドメインを二つ持ち、中央部分にはタンパク質-タンパク質相互作用に関わると考えられる PY モチーフを一つ持つ一方で、カルボキシル末端側には既知のタンパク質と相同性のある配列を持たなかった。GST との融合タンパク質を大腸菌で発現させて SDS-PAGE 後、South-Western 法及び North-Western 法により核酸との結合能を調べたところ、RNA プローブ及び一本鎖 DNA プローブとの結合は見られたが、二本鎖 DNA プローブとは結合しなかった。また RNA プローブ及び一本鎖 DNA プローブとの結合はコールドの RNA 及び一本鎖 DNA を加えることにより競争的に阻害されたが二本鎖 DNA を加えても阻害されなかった。このことから *AtRBP1* は植物体内でも RNA 結合タンパク質として機能しうることが示された。

ゲノミックサザン解析の結果は *AtRBP1* 遺伝子がゲノム内に 1 コピーであることを示した。

ノーザン解析及びレポーターに  $\beta$ -グルクロニダーゼを用いたプロモーター解析により *AtRBP1* 遺伝子はシュート頂や根端などの分裂組織及びつぼみ、若い花のめしべ、未成熟なさやの付け根や小花柄の付け根といった発達中の器官で発現していることがわかった。発現パターンの特性を考えると *AtRBP1* は細胞増殖の過程で必要なのかもしれない。植物

では細胞増殖活性の高い領域で発現しているRNA結合タンパク質はシロイヌナズナのAtRBP37とアルファルファのnucMS1がこれまでに報告されている。細胞増殖や分裂に関わる遺伝子の発現パターンは2種類に分類することができる。一つは増殖活性の高い領域全体で発現し、もう一方は細胞分裂の特定のステージにある極めて限定された細胞で発現しているグループである。NucMS1は細胞分裂のG1期で発現し、後者に属すると考えられている。AtRBP1とAtRBP37に関しては詳細は不明であるが、カルスを用いたin situでは増殖活性の高いと推定されるカルスの縁でAtRBP1遺伝子の発現が観察されたのでAtRBP1遺伝子は前者に属するかもしれない。

RNA結合ドメインがアミノ末端側に二つあるRNA結合タンパク質は植物では開花に関与するFCAとこのAtRBP1だけしか見つかっていない。AtRBP1のRNA結合ドメインに最もよく似ているのはマウスmusashi-1の結合ドメインであった。Musashi-1は中枢神経系幹細胞で発現しているRNA結合タンパク質であり、幹細胞がニューロンに分化して増殖活性が落ちるとmusashi-1の発現は下がりelavというRNA結合タンパク質が発現してくる。FCAのRNA結合ドメインと最もよく似ている結合ドメインはelavの結合ドメインであった。こうしたことを考えるとAtRBP1はFCAとともに植物の発生において協調的に機能しているのかもしれない。

### <AtXyn1>

AtXyn1はカルボキシル末端側が大麦のキシラナーゼX-1と53%の相同性を示すタンパク質をコードしていた。一方、アミノ末端側には既知のタンパク質と相同な配列は見られなかった。キシラナーゼはアミノ酸配列の相同性からfamily 10とfamily 11の2種に分類できる。X-1はfamily 10に属し、シグナルペプチドとfamily 10キシラナーゼの触媒ドメインからなっている。カルボキシル末端近くのglycosyl hydrolases family 10 active siteはAtXyn1もX-1も完全にコンセンサス配列を保存していた。

ノーザン解析及びプロモーター解析によりAtXyn1遺伝子は茎や根で筋状に発現していることがわかった。茎における発現は縞模様のある特徴的な部位(管状要素)で検出され、AtXyn1遺伝子は木部を中心に発現していることがわかった。また、GFPとの融合タンパク質を植物体内で発現させてその蛍光を観察したところ蛍光は細胞の縁に観察された。この植物を0.8Mマンニトールに漬けて原形質分離を起こさせても観察される蛍光パターンは変わらなかった。このことからAtXyn1は細胞壁タンパク質であることが示唆された。

各種植物ホルモンがAtXyn1遺伝子の発現にどのような影響を与えるかを調べたところブラシノステロイドで発現量が増加し、アブシジン酸では逆に発現が阻害された。ヒャクニチソウ葉肉細胞を用いた研究によると管状要素分化は3つのステージに分けられ、ブラシノステロイドが蓄積するとステージ2からステージ3へと移行する。ステージ3に入ると2次細胞壁が凝集・沈着して管状要素特有の縞模様や螺旋模様を作る。2次細胞壁はキシランを主用構成要素とするヘミセルロースやセルロースからなっている。こうしたことを考えるとAtXyn1は2次細胞壁の代謝に関与しているのではないかと考えられる。

アブシジン酸で発現が阻害される理由はよくわからないが、アブシジン酸が花茎の伸長に阻害的に働くことを考えると、AtXyn1は花茎の伸長に能動的に寄与するという考えと矛盾しない結果である。

X-1は発芽時に粉層で発現し、その発現はジベレリンで誘導される。AtXyn1はジベレリンによる発現誘導は受けず、発現場所も異なるため植物体内での役割はX-1とは異なると考えられる。

シロイヌナズナゲノム内にはfamily10キシラナーゼ遺伝子がAtXyn1遺伝子を含め5個存在していた。AtXyn2は分子構造がAtXyn1とよく似ているがノーザン法では発現を検出できなかった。AtXyn3, AtXyn4, AtXyn5はAtXyn1の約半分の大きさとfamily 10キシラナーゼの触媒ドメインが分子全体の8割近くを占める。AtXyn3の発現はAtXyn1とよく似ていたが、AtXyn4, AtXyn5の発現はノーザン法ではほとんど検出できなかった。こうしたことから植物はそれぞれの分子を使い分けていることが予想される。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 米 田 好 文  
副 査 教 授 福 永 典 之  
副 査 助 教 授 加 藤 敦 之  
副 査 助 教 授 山 岡 直 人

### 学 位 論 文 題 名

Isolation and characterization of two spatially regulated genes in *Arabidopsis thaliana*; proliferative region-specific gene, *AtRBP1*, and xylem-predominant gene, *AtXyn1*.

(シロイヌナズナにおける特徴的な発現パターンを示す二つの遺伝子、細胞増殖領域特異的に発現する *AtRBP1* 遺伝子と木部を中心に発現する *AtXyn1* 遺伝子の単離と解析)

最近、シロイヌナズナのゲノムプロジェクトが完了し、ゲノムの全塩基配列が明らかになった。しかし、様々な生命現象の分子メカニズムを理解するためには、塩基配列のみならず、着目する生命現象に関わると思われる遺伝子の機能・特性について解析していかなければならない。本論文では高等植物の花茎伸長の機構を解明するために、モデル植物であるシロイヌナズナを材料として、細胞増殖と維管束の発達に関連し、花茎の伸長に重要であると考えられる2種の遺伝子に関して発現、及び機能を解析している。

1つめの*AtRBP1*はアミノ末端側にRNA結合ドメインを2つ持ち、中央部分にはタンパク質-タンパク質相互作用に関わると考えられるPYモチーフを1つ持つという、植物で報告されているRNA結合タンパク質としてはきわめて珍しい構造をしていた。大腸菌内で発現させたタンパク質を使った実験より、*AtRBP1*が実際に一本鎖核酸に強い親和性を持つことが確かめられた。ノーザン解析及びレポーターに $\beta$ -グルクロニダーゼを用いたプロモーター解析により*AtRBP1*遺伝子はシュート頂や根端などの分裂組織及びつぼみ、若い花のめしべ、未成熟なさやの付け根や小花柄の付け根といった発達中の器官で発現していることがわかった。このようにきわめて限定された領域で発現しているRNA結合タンパク質の報告は少なく、構造の新奇さと共に重要な情報である。

2つめの*AtXyn1*は、カルボキシル末端側約半分のアミノ酸配列がこれまでに報告されているキシラナーゼの触媒ドメインと高い相同性を示したことから、キシラナーゼであると予想された。ノーザン解析及びプロモーター解析により*AtXyn1*遺伝子は茎や根で筋状に発現していることがわかった。これは*AtXyn1*が維管束で働いていることを示してい

る。特に茎における発現は縞模様のある特徴的な部位（管状要素）で検出された。この縞模様は2次細胞壁が凝集・沈着してできあがる特有な模様である。つまり、AtXyn1は2次細胞壁形成に働き、木部を形成することに参与していることが推察される。AtXyn1とGFPの融合タンパク質を植物体内で発現させてその蛍光を観察したところ、蛍光は細胞の縁に観察された。さらに、この植物を0.8Mマンニトールに漬けて原形質分離を起こさせても観察される蛍光パターンは変わらなかった。これらの結果はAtXyn1は細胞壁タンパク質であることを示唆している。さらに、管状要素の分化はブラシノステロイドによって進行すると考えられているが、AtXyn1遺伝子の発現はブラシノステロイドにより増大することが示された。以上の結果は、AtXyn1遺伝子は、その産物が高等植物にとって成長に重要な維管束の形成に深く関わることで、花茎伸長にとって重要な遺伝子であることを示している。これまでキシラナーゼ遺伝子に関する解析は、細菌やカビに関する物がほとんどであり、高等植物に関しては、大麦で1つの遺伝子が報告されているのみであった。しかも、報告されている大麦の遺伝子は発芽時に発現しており、維管束の形成との関連は考えがたい物であった。従って、植物の成長との関連が予想されるキシラナーゼの遺伝子の報告は今回が初めてであると考えられる。

以上のように、著者は植物の花茎伸長を考える上で重要な2種類の新規な遺伝子を同定し、各種の実験によって、これらの産物の機能推定を行った。ここで得られた新知見は、植物の成長という現象の分子メカニズムを解析する上で貢献するところ大なる物がある。

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あるものと認める。