

学位論文題名

Cloning and analysis of the *CORYMBOSA2* gene
in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナ *CORYMBOSA2* 遺伝子の単離と解析)

学位論文内容の要旨

シロイヌナズナは典型的なロゼット型の植物であり、栄養成長期から生殖成長期に移行すると、花芽形成にともなって花茎を伸長させる。そして花茎における花芽の配列をもとにした花序形態で分類すると野生型は通常総状花序に分類される。野生型の花序形態が常に総状花序の形態を示すには、花芽形成、花茎伸長などといった個々の器官の形態形成に関与する遺伝子が時間的かつ空間的に正確に機能していることを意味する。これまで多くの突然変異体の解析から、花序形態形成機構には様々な遺伝子群の関与が示唆され、近年の遺伝子機能解析から、ようやく形態形成機構に関する解析が進展しようとしている。しかし、花序の形態形成過程でどのような遺伝子が相互作用し、どのようなカスケードを形成しているかはほとんど明らかにされていない。

そこで私は花序形態形成機構を分子遺伝学的手法により解析するために、花序形態に異常を示す散房花序様変異 *corymbosa2* の表現型の解析を行った。さらにポジショナルクローニングにより *CRM2* 遺伝子の単離を目指した。

crm2 変異の散房花序様への形態的変化の最も顕著な特徴は花序先端における花芽の増加であった。Smythら(1990)が同定した花芽の発達段階を示す指標をもとに *crm2-1* 変異と野生型の花序先端を構成する花芽の数を比較したところ、花芽の開花を示すステージ13までの花芽の数が *crm2-1* 変異で増加していた。この原因を解剖学的に解析した。長日条件下において、*crm2-1* 変異のロゼット葉の数は野生型と同じであったのに対して、茎生葉は約2枚増加していた。しかし、花芽原基で初めて発現がみられる *API* 遺伝子の発現を指標に花成時期を検討したところ、*crm2-1* 変異と野生型との間にははっきりとした差異は観察されなかった。しかし、*crm2-1* 変異は花茎伸長開始(bolting)および開花時期が遅れることがわかった。これらの結果はboltingと花芽器官の発達の遅れが原因で花序の先端で花芽の蓄積が起きていることを示唆した。事実、野生型では既に花茎が伸長し最初に分化した花芽が鞘として発達している一方で、同じ時期の *crm2-1* 変異では花茎伸長が起こらず、開花前の花芽の蓄積が観察された。野生型と *crm2-1* 変異において、茎頂分裂組織の形態を走査型電子顕微鏡で観察したところ、茎頂分裂組織の形態、大きさおよび花芽原基の出現パターンに差異はなかった。さらに、ステージ1からステージ6までの花芽の数は *crm2-1* 変異で増加がみられた。これらの結果から、*crm2-1* 変異では、ある特定のステージの花芽が増加しているわけではないことから、*CRM2* 遺伝子は花芽発達過程において全てのステージで機能していることが示唆される。

また、*crm2-1* 変異の散房花序様の表現型に加えて、稔性の低下がみられた。開花時の花芽

器官の長さを測定したところ、*crm2-1*変異で雄ずいの伸長欠損が観察された。この結果から、*crm2-1*変異での稔性の低下は、雌雄器官の伸長のタイミングのずれが原因であると考えられる。

CRM2遺伝子の機能を解析するために、ポジショナルクローニングによる遺伝子単離を試みた。CAPS法およびSSLP法を用いたマッピングにより、CRM2遺伝子は第4染色体のCAPSマーカーg13838-1.4とPG11の間に座位しており、CRM2遺伝子の存在範囲をゲノムプロジェクトの塩基配列をもとに限定したところ、二つのBACクローンの約80kbpの範囲に存在することがわかった。そこで、この範囲に存在する19の推定遺伝子に関して野生型と*crm2-1*変異のDNA塩基配列を比較したところ、一つの推定遺伝子で3塩基対の欠失が見つかった。そこで、この推定遺伝子を含む約6kbpのゲノム断片を植物に導入し相補性検定を行ったところ、*crm2-1*変異の変異形質が完全に相補された。さらに、この推定遺伝子のアンチセンス植物を作成したところ、*crm2-1*変異の表現型を示した。これらの結果から、この推定遺伝子がCRM2遺伝子であると断定した。

こうして単離されたCRM2遺伝子は10のエキソンからなり、推定分子量104kDa、942残基のアミノ酸をコードしていると推測された。*crm2-1*変異では結果として第2エキシソンの一つのアミノ酸リジンが欠失すると推定された。相同性検索(BLAST検索)の結果、CRM2タンパク質は現在までに機能が解明されている既知タンパク質とは相同性をもたないことから、新規のタンパク質であると期待される。しかしながら、同じBACクローンT13K14でCRM2遺伝子とタンデムに並ぶT13K14.80遺伝子が相同性をもつ配列であることがわかった。CRM2遺伝子はこの相同性遺伝子(T13K14.80)とアミノ酸配列で約64.2%の相同性をもち、*crm2-1*変異は両遺伝子の相同性部位に存在した。さらに、モチーフ検索(PSORTおよびPfam検索)の結果、CRM2タンパク質のN末側に核移行シグナルおよびDouble-stranded RNA-binding motifと相似性をもつ配列があることがわかった。

CRM2遺伝子の発現はノーザン法では検出できなかったため、RT-PCR法を用いて器官別に解析した。CRM2遺伝子の発現はすべての器官でみられたが、他の器官と比較して主にSeedling、根および花序先端で強く発現していた。また、相同性遺伝子T13K14.80の器官別発現パターンはCRM2遺伝子とほぼ同様であった。さらに発現部位を特定するためにCRM2遺伝子のプロモーター領域とGUS(β -glucuronidase)との融合遺伝子を野生型に導入したところ、GUS遺伝子の発現はRT-PCRの結果とほぼ一致していた。特にGUSの発現は若い花芽器官を含む花序先端と花茎上部および第2花序の先端で観察された。これらの結果から、CRM2遺伝子は主に花芽の分化と発達に関与していると示唆される。

花序形態形成機構におけるCRM2遺伝子の役割を解析するため、茎頂分裂組織および花芽分裂組織の維持と発達に関与するERECTA、CLAVATA1およびTERMINAL FLOWER1の遺伝子座位に変異をもつ突然変異株と*crm2-1*変異との二重および三重変異体を作成したところ、その表現型は全て相加的となった。この結果はCRM2遺伝子がこれらの遺伝子とは異なる過程で花序形態形成に関与していることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 米 田 好 文

副 査 教 授 山 口 淳 二

副 査 助 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

Cloning and analysis of the *CORYMBOSA2* gene in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナ *CORYMBOSA2* 遺伝子の単離と解析)

シロイヌナズナは典型的なロゼット型の植物であり、栄養成長期から生殖成長期に移行すると、花芽形成にともなって花茎を伸長させる。そして花茎における花芽の配列をもとにした花序形態で分類すると野生型は通常総状花序に分類される。野生型の花序形態が常に総状花序の形態を示すには、花芽形成、花茎伸長などといった個々の器官の形態形成に関与する遺伝子が時間的かつ空間的に正確に機能していることを意味する。これまで多くの突然変異体の解析から、花序形態形成機構には様々な遺伝子群の関与が示唆され、近年の遺伝子機能解析から、ようやく形態形成機構に関する解析が進展しようとしている。しかし、花序の形態形成過程でどのような遺伝子が相互作用し、どのようなカスケードを形成しているかはほとんど明らかにされていない。そこで申請者は花序形態形成機構を分子遺伝学的手法により解析するために、花序形態に異常を示す散房花序様変異 *corymbosa2*(=*crm2*)の表現型の解析を行った。さらにポジショナルクローニングにより *CORYMBOSA2*(=*CRM2*)遺伝子の単離を目指した。

*crm2*変異の散房花序様への形態的変化の最も顕著な特徴は花序先端における花芽の増加であった。*crm2-1*変異と野生型の花序先端を構成する花芽の数を比較したところ、開花を示す花芽の数が*crm2-1*変異で増加していた。この原因を解剖学的に解析した。長日条件下において、*crm2-1*変異のロゼット葉の数は野生型と同じであったのに対して、茎生葉は約2枚増加していた。これらの結果から、*crm2-1*変異では、ある特定のステージの花芽が増加しているわけではないことから、*CRM2*遺伝子は花芽発達過程において全てのステージで機能していることが示唆される。

また、稔性の低下がみられた。開花時の花芽器官の長さを測定したところ、*crm2-1*変異での稔性の低下は、雄器官の伸長欠損が原因であると考えられた。

*CRM2*遺伝子の機能を解析するために、ポジショナルクローニングによる遺伝子単離を試みた。CAPS法およびSSLP法を用いたマッピングにより、*CRM2*遺伝子は第4染色体のCAPSマーカーg13838-1.4とPG11の間に座位しており、*CRM2*遺伝子の存在範囲をゲノムプロジェクトの塩基配列をもとに限定したところ、二つのBACクローンの約80kbpの範囲に存

在することがわかった。そこで、この範囲に存在する19の推定遺伝子に関して野生型と $crm2-1$ 変異のDNA塩基配列を比較したところ、一つの推定遺伝子で3塩基対の欠失が見つかった。そこで、この推定遺伝子を含む約6kbpのゲノム断片を植物に導入し相補性検定を行ったところ、 $crm2-1$ 変異の変異形質が完全に相補された。さらに、この推定遺伝子のアンチセンス植物を作成したところ、 $crm2$ 変異の表現型を示した。これらの結果から、この推定遺伝子がCRM2遺伝子であると断定した。

こうして単離されたCRM2遺伝子は10のエキソンからなり、推定分子量104kDa、942残基のアミノ酸をコードしていると推測された。 $crm2-1$ 変異では結果として第2エキシンの一つのアミノ酸リジンが欠失すると推定された。相同性検索(BLAST検索)の結果、CRM2タンパク質は現在までに機能が解明されている既知タンパク質とは相同性をもたないことから、新規のタンパク質であると期待される。また、同じBACクローンT13K14でCRM2遺伝子とタンデムに並ぶT13K14.80遺伝子が相同性をもつ配列であることも発見した。CRM2遺伝子はこの相同性遺伝子(T13K14.80)とアミノ酸配列で約64.2%の相同性を持ち、 $crm2-1$ 変異は両遺伝子の相同性部位に存在した。さらに、モチーフ検索(PSORTおよびPfam検索)の結果、CRM2タンパク質のN末側に核移行シグナルおよび Double-stranded RNA-binding motifと相似性をもつ配列があることがわかった。

CRM2遺伝子の発現はノーザン法では検出できなかったため、RT-PCR法を用いて器官別に解析し、さらに発現部位を特定した。遺伝子発現は若い花芽器官を含む花序先端と花茎上部および第2花序の先端で観察された。

以上のように、シロイヌナズナの花序形態形成に関わる遺伝子を世界に先駆けてクローン化した。この情報を基に、今後花序の発生・分化機構の解明に大きく貢献すると考えられる。

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があるものと認める。