

学 位 論 文 題 名

Molecular genetic and physiological studies
on a semidominant mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
that displays constitutive differential growth in various organs

(シロイヌナズナの種々の器官で構成的に偏差成長を示す
半優性突然変異体の分子遺伝学的、生理学的研究)

学位論文内容の要旨

植物は分裂組織で各器官を形成した後、器官を構成する細胞が伸長することにより、それらの器官を成長させる。個々の植物の全体の形は、この器官形成後の細胞伸長によってほぼ決定され、また、光や重力などの外部刺激に反応する屈性も、各器官の細胞の偏差的伸長成長によって起こる。すなわち、これらの器官の成長の程度や極性を調節することは、植物が本来持っている形態を形成すると同時に、外部刺激に応じて環境に適応し、生存していくためにも重要な意義を持つ。

胚軸や花茎などの伸長調節には、植物ホルモンであるジベレリンやブラシノステロイドが大きな役割を果たしていると考えられる。両ホルモンの生合成に必須な酵素を一つでも欠損した突然変異体は顕著な矮性を示し、その表現型は欠失したホルモンを添加することにより復帰する。このことから、これらのホルモンが茎的器官の伸長を促していることが分かる。しかし、これらのホルモンがどのようなシグナル伝達経路を経て器官の伸長を促進するのか、今のところ、多くのことは分かっていない。

一方、光や重力などに反応して器官の伸長方向を変化させる屈性には、オーキシンが関与していることが 1930 年代から示唆されている。植物が刺激を受けるとオーキシンが器官の横軸方向で偏差的に分布し、これにより細胞が偏差的に伸長し、その結果屈曲が起こると考えられている。現在までにオーキシンの生合成欠損変異体は得られていないが、オーキシンの極性移動に関わる因子、オーキシンを細胞内外へ輸送する因子、またはオーキシンのシグナル伝達経路の下流にあると考えられる転写因子やそれに相互作用する因子などの遺伝子に突然変異が起きることにより、屈光性や屈地性に異常が起きることが知られている。また、偏差成長の一種である上偏成長にはエチレンが関与していることも知られている。

今までに伸長や偏差成長に関する多くの分子遺伝学的解析が行われてきたが、未だ解明されていない謎は数多く存在する。そこで本研究では、エンハンサーを含む DNA 断片をシロイヌナズナのゲノムに挿入し、付近の遺伝子を構成的に過剰発現することで異常を誘発するアクティベーション・タギング系統から、器官の成長制御に異常のある突然変異体を単離、解析し、今までに得られた知見とは異なる観点から、これらの成長制御の機構を

探ることを目的とした。

暗所で育てた芽生えの胚軸の伸長とフック形成の様子に異常のあるものを約 10,000 系統からスクリーニングした結果、1 系統の優性突然変異体、*cdg1-D* を単離した。*cdg1-D* 変異体は矮性で稔性が低く、葉は著しい上偏成長の結果、下側に丸まった形態を示した。ホモ接合体ではこの形態異常はさらに強かった。*cdg1-D* 変異体の胚軸や花茎、葉柄、果実などの器官では、螺旋状、またはねじれた伸長がみられた。これらの組織の縦・横断切片を観察した結果、変異体では一定方向への屈曲を引き起こすような細胞列の規則的な偏差的伸長は観察されなかったものの、どの器官でも表皮および内皮細胞の異常な肥大や形態異常がみられた。このことから、*cdg1-D* 変異体では、種々の器官で異常な細胞の伸長あるいは膨張の結果、ねじれや上偏成長などの構成的な偏差成長が起きていると考えられる。また、*cdg1-D* 変異体の胚軸の長さは暗所では野生型と変わらないのに対して、白色光下では野生型より著しく長くなった。顕微鏡的観察により、このときの *cdg1-D* の胚軸の細胞は明らかに野生型の細胞より長いことが分かった。このことから、*cdg1-D* 変異体では光による細胞の伸長調節にも異常があると考えられる。

cdg1-D の葉の上偏成長はオーキシン、ジベレリン、ブラシノステロイドなどのホルモン処理によっても復帰しなかった。エチレンの合成阻害剤である AVG や AgNO₃ は僅かに上偏成長を弛める効果があったが、一方、野生型の植物をエチレンの前駆体である ACC で処理しても *cdg1-D* で見られるような顕著な葉の上偏成長は起こらなかった。このことから *cdg1-D* で見られる葉の上偏成長はホルモン以外の因子に制御される系が、特定の遺伝子の過剰発現により構成的に活性化していることが予測された。また、明所で育てた *cdg1-D* の胚軸のホルモン応答を調べたところ、ジベレリンによって著しい伸長促進が相加的に起きることが分かった。この効果はジベレリン・シグナル伝達の抑制因子と考えられる *SPINDLY (SPY)* の機能欠損突然変異体でもみられており、このことから *cdg1-D* では *SPY* の下流に位置する活性化因子が過剰発現している可能性が示唆された。ただし、*spy* 突然変異体は恒常的にジベレリン処理した場合と同様の形態をとり、花茎が野生型より徒長するのに対し *cdg1-D* は矮性であること、*spy* 突然変異体では葉の上偏成長などの偏差成長がみられないこと、また、*cdg1-D* ではジベレリン処理による花芽形成の促進が起こらないことなど、*spy* と *cdg1-D* では胚軸以外の器官では全く異なった表現型を持つ。このことから、*cdg1-D* でみられる多面的な異常は単一の経路の異常に起因するのではなく、複数の独立した経路に異常があることも示唆された。

cdg1-D に導入された T-DNA は 3 番染色体に位置し、エンハンサー近傍には、受容体様タンパク質・キナーゼのサブファミリーであるが、受容体ドメインと膜貫通ドメインを持たない細胞質局在型のタンパク質キナーゼ群である RLCKVII サブファミリーに属する遺伝子が存在した。ノーザン解析の結果、この遺伝子の mRNA は野生型では検出されず、*cdg1-D* 変異体のみで蓄積していることが分かった。この遺伝子の野生型での発現は、ノーザン解析では全く検出できなかったが、定量的 RT-PCR によって、根、葉、花茎、花などのほとんど全ての器官と暗所芽生えで発現していることが分かった。従って、この遺伝子はごく低レベルに植物体全体で発現しているものと考えられる。また、この遺伝子の cDNA を野生型で過剰発現させると、葉の上偏成長、明所での胚軸の徒長など、*cdg1-D* で見られた異常が生じた。

これらの結果から、RLCKVII サブファミリーに属するタンパク質キナーゼをコードする *CDG1* 遺伝子が過剰に発現すると、発生後の器官の伸長制御に異常を起し、種々の

器官で偏差成長を促進し、光による成長制御が阻害されることが分かった。RLCKVII サブファミリーはシロイヌナズナで 40 種以上のメンバーを持つが、それらの生理的な機能はほとんど分かっていない。*cdg1-D* 突然変異体が分化後の器官の成長調節に異常を持ちながら、その多面的な異常は複数の経路の異常に依ると予想されることから、このサブファミリーに属するいくつかのメンバーが器官の成長調節に関わっていることが予想される。今後は *CDG1* をはじめ、これらの因子について遺伝学的、分子生物学的な研究を深めることにより、植物の形態形成、環境応答についてさらなる知見を深めることができると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 興太朗
副 査 教 授 田 中 歩
副 査 助教授 奥 山 英登志
副 査 助教授 山 崎 健 一

学位論文題名

Molecular genetic and physiological studies
on a semidominant mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
that displays constitutive differential growth in various organs

(シロイヌナズナの種々の器官で構成的に偏差成長を示す
半優性突然変異体の分子遺伝学的, 生理学的研究)

植物は分裂組織で各器官を形成した後、器官を構成する細胞が伸長することにより、それらの器官が成長し、植物全体の形をほぼ決定する。また、光や重力などの外部刺激に反応する屈性も各器官の細胞の偏差的伸長成長により起こる。著者は、これらの器官分化後の成長制御機構を分子レベルで探ることを目的として、分子遺伝学的、生理学的研究をおこなった。シロイヌナズナの全ゲノム構造が明らかになって、多くの重複した遺伝子が存在することがわかった。これら遺伝子の機能も解析可能な方法として、著者はシロイヌナズナに 35S エンハンサーを含む T-DNA を導入したアクティベーション・タギング法を用い、器官の成長制御に異常のある突然変異体を単離し、その表現型と原因遺伝子の関係を研究した。

約 10,000 系統のアクティベーション・タギング系統をスクリーニングして得た *cdgl-D* は半優性突然変異で、器官の分化はほぼ正常だが、矮性で稔性が低く、葉は著しい上偏成長の結果、下側に丸まった形態を示した。同変異体の胚軸や花茎、葉柄、果実などでは、螺旋状、またはねじれた伸長がみられた。また、*cdgl-D* の胚軸は白色光下で野生型より長くなった。このことから、*cdgl-D* は種々の器官で構成的な偏差成長を示し、光による細胞の伸長調節にも異常を生じた突然変異体であると考えられた。顕微鏡観察の結果、表皮や皮層の細胞の肥大成長が均等におこらず、野生型より小さくなるものや大きくなるものが不均一に生じ、その結果偏差成長が生ずると考えられた。また、維管束組織の発達が不十分である特徴もあった。

これら成長異常は植物ホルモンの作用を介して起こっている可能性があるので、著者は種々の植物ホルモンの成長調節効果と *cdgl-D* 変異の作用を比較した。その結果、白色光下で観察される *cdgl-D* の胚軸の伸長促進は、ジベレリンの効果と相加的だった。また、ブラシノステロイドは同変異体と同様な胚軸の伸長促進作用を示すと同時に、葉の偏差成長も促進した。*cdgl-D* の表現型に対するエチレンの関与も一部示唆された。以上の結果から、*cdgl-D* 変異はブラシノ

ステロイドやジベレリンの信号伝達系に干渉して、これらの異常な表現型が生じている可能性が示唆された。また、オーキシンやサイトカイニンは *cdgl-D* の表現型と関係がないと判断された。

cdgl-D に導入された T-DNA のエンハンサー近傍には、細胞質局在型の Ser/Thr タンパク質キナーゼ群である RLCKVII サブファミリーに属する遺伝子が存在した。ノーザン解析の結果、この遺伝子の mRNA レベルは、*cdgl-D* ホモ接合体では野生型より 100 倍以上多かった。*cdgl-D* ヘテロ接合体の表現型異常は、ホモ接合体の異常より軽減されているが、mRNA レベルも表現型の異常の程度に比例していた。一方、野生型では、同遺伝子は調べたすべての器官で発現しているものの、その mRNA レベルは非常に低かった。同遺伝子の mRNA には、キナーゼの ORF の上流に短い ORF が 2 個存在していた。このような ORF の存在は、下流の ORF の翻訳効率を著しく低下させることが知られているので、野生型における低い転写レベルとも合わせて、*CDGI* 遺伝子の発現は、野生型では非常に抑制されていることが示唆された。同遺伝子の cDNA を 35S プロモーターを用いて野生型で過剰発現させると、葉の上偏成長、明所での胚軸の徒長など、*cdgl-D* で見られた異常が生じるようになることから、*cdgl-D* 変異の原因遺伝子が *CDGI* であることが証明された。

以上の結果から、RLCKVII サブファミリーに属するタンパク質キナーゼをコードする *CDGI* 遺伝子が過剰に発現すると、発生後の器官の成長制御に異常を起し、種々の器官で偏差成長を促進し、光による成長制御が阻害されることが分かった。RLCKVII サブファミリーに属するタンパク質キナーゼは、シロイヌナズナには 43 個存在するが、その機能は *PBS1* (Swiderski & Innes, 2001) を除いてほとんど分かっていない。*CDGI* は、このサブファミリーの中では比較的孤立した遺伝子だが、著者は本研究で初めて細胞の肥大成長を制御する因子である可能性を示唆することができた。*CDGI* の機能をさらに追求することによって、高等植物の成長制御機構を細胞レベルで明らかにすることが可能になると期待できる。

以上のとおり、著者は細胞質局在型のタンパク質キナーゼによる成長制御機構について新知見を得たものであり、植物の分化後の器官形成の理解に貢献するところ大なるものがある。

よって、著者は博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。