

氏 名	おお はし よう へい 大 橋 洋 平
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2531 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	シロイヌナズナの本メオボックス遺伝子 GL2/ATHB-10 の機能解析

論文調査委員	(主 査) 教 授 岡 穆 宏 教 授 上 村 匡 教 授 宮 田 隆
--------	--

### 論 文 内 容 の 要 旨

GL2 はシロイヌナズナの本メオボックス遺伝子で、HD-Zip ファミリーに属する転写因子をコードする。この遺伝子の欠損 (gl2) は、葉の表面の毛状組織トライコームの形態異常、根表面の根毛の異所的発生、種子表面の多糖体層の欠失、などを引き起こすことから、GL2 遺伝子産物は植物の表層細胞の分化・形態形成に関与する転写因子と考えられてきた。本論文では主に逆遺伝学的な手法と形質転換植物を用いて、GL2 の細胞分化・形態形成における役割の詳細およびその分子の基盤についての解析を行った。

カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターを用いて GL2 を異所的に過剰発現させると植物の成長に対し毒性を示すとともに GL2 本来の機能を阻害した。一方、GL2 自身のプロモーターを用いて、GL2 の発現を本来の発現場所および時期で、量的にのみ変化させると、GL2 の発現量の増加に伴ってトライコーム発生頻度が増加した。GL2 の発現量が減少していると考えられる gl2/+ヘテロ接合体では、トライコーム発生頻度が野性型株に較べて有為に減少した。これらの事実は、GL2 がトライコーム発生の開始段階において量的な正の制御因子として働くことを示している。さらに、GL2 の発現が上昇した植物体では、野性型株では希にしか観察されない隣接するトライコームの発生が多数見られた。この現象の統計的解析から、GL2 の発現量の増加が隣接するトライコームの発生を妨げる機構に影響を及ぼすと結論され、GL2 がトライコームの発生場所の制御に関わっていることを示唆した。

つぎに転写因子 GL2 を改変することにより、その分子機能を積極的に変化させる実験を行った。GL2 の N 末端領域をヘルペスシンプレックスウイルスの転写因子 VP16 由来の転写活性化ドメインに置き換えた改変転写因子をコードする遺伝子を作成し、GL2 自身のプロモーターを用いて形質転換植物体内で発現させると、根において、GL2 の発現が見られる細胞列、すなわち本来根毛形成が見られない細胞列からも根毛が発生した (gl2 突然変異体と同様の根毛形成パターン)。また、胚軸や葉柄においても、GL2 を発現する表層細胞列において根毛様の組織が生じた。GL2 が根毛形成に関して負の制御因子として働いていることを考えあわせると、この結果は本来 GL2 が根毛形成において転写抑制因子として働いていることを示している。

この改変転写因子をグルココルチコイド誘導性プロモーターを用いて誘導的に発現させると、葉の表層細胞から根毛様の組織が発生した。この発現誘導系を用いて GL2 の標的遺伝子の探索を行い、新奇のフォスフォリパーゼ D 遺伝子 (PLD) を同定した。GL2 の DNA 結合ドメインを含む組換えタンパク質が、この PLD 遺伝子の翻訳開始点上流約 400 塩基対の配列に特異的に結合することを細胞外結合実験で示した。これらの結果は、GL2 が PLD 遺伝子を直接転写制御していることを示している。つぎに、PLD の根毛形成における役割を知るために、GFP との融合タンパク質を用いて、PLD の根毛における細胞内局在性を調べた。その結果、PLD-GFP 融合タンパク質は細胞膜、特に根毛の先端の細胞膜、および小胞状組織に局在することかわかった。さらに、グルココルチコイド誘導性プロモーターを用いて、PLD 遺伝子の誘導的過剰発現実験を行った結果、伸長過程の根毛において異常な分枝が起こることが観察され、PLD が根毛における先端伸長を促進

する因子として働いていることを示唆した。

以上のように、申請論文はシロイヌナズナの GL2 遺伝子がトライコームおよび根毛の発生における細胞運命の決定に深く関与しており、特に根の表層細胞においては、細胞形態形成に関わる遺伝子の転写を直接抑制することにより、根毛形成を負に制御していることを明らかにしたものである。

なお、主論文の基礎となる論文 1 編は申請論文の研究成果の一部を共著者とともに公表したものである。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、シロイヌナズナの高オボックス遺伝子 GL2 の機能に関する詳細な研究を、分子生物学的な観点から、主に逆遺伝学的手法を用いて行ったものである。GL2 遺伝子は最初、シロイヌナズナの葉の表面上の毛様組織であるトライコームの細胞形態形成に異常をきたす突然変異体 (gl2) の原因遺伝子として同定された。以来、主に遺伝学的な研究から、GL2 はトライコーム発生においてはその細胞形態形成を正に制御し、根毛形成に関しては根毛形成細胞への分化の運命決定において負の制御因子として働いていることが明らかにされてきた。しかし、GL2 による細胞分化制御の内容やその分子基盤は不明のままであった。また、GL2 に関しては、他の植物転写因子遺伝子の機能解析で行われているような逆遺伝学的解析がこれまで報告されていなかった。

本研究では、まず植物における逆遺伝学の常套手段であるカリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターを用いた異所的過剰発現実験が行われたが、GL2 遺伝子の機能に関する知見を得ることはできなかった。申請者は 35S プロモーターによる遺伝子発現の異所性が GL2 遺伝子の機能解析を困難にしていると考え、GL2 遺伝子自身のプロモーターを用い、GL2 の発現を本来の発現場所および時期で、その量的な増加のみを引き起こさせるという着想に至った。このような GL2 プロモーターを用いた逆遺伝学的解析から、GL2 がトライコーム発生の開始過程の制御に関与するという結論を導き出した。これまで、GL2 はトライコームの細胞形態形成段階のみに関与するとされていたので、この発見には大きな意義がある。つまり、GL2 は根毛形成のみならず、トライコーム形成においても同様に、細胞運命の決定に関わる因子であることが判明したのである。また、GL2 の発現量がトライコーム発生の開始を促す量的なパラメーターであるという新しい考え方を提唱している。これは、トライコーム発生位置の制御機構を理解するうえで非常に有用な概念を与えるものである。

つぎに、より積極的な逆遺伝学的手法として、GL2 転写因子の分子機能を改変する実験が行われた。その結果、構造的な転写活性化能を有する改変 GL2 を発現させた細胞では、根毛または根毛様組織の形成が誘導された。GL2 が根毛形成に関して負の制御因子として働いていることを考えあわせると、この結果は、本来 GL2 が根毛非形成細胞において転写抑制因子として働いていることを示している。さらに、この改変転写因子を誘導的に発現させる系を用いて、GL2 の標的遺伝子を同定することに成功した。この遺伝子はフォスホリパーゼ D (PLD) をコードしており、根毛形成細胞で発現し、根毛非形成細胞では GL2 により発現が抑制されているものと考えられる。この PLD 遺伝子は、その機能の逆遺伝学的解析の結果から、根毛細胞の先端伸長の制御に深く関わるものと推測された。

本申請論文は、GL2 がトライコームおよび根毛の形態形成の両方において、細胞運命の決定と細胞形態形成の開始との間を橋渡しする重要な転写制御因子であることを明らかにするとともに、植物の細胞形態形成の初期段階において脂質代謝シグナルが重要な役割を果たすことを初めて示したもので、植物細胞の分化制御機構の研究において大きな進展をもたらすもので高く評価される。よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。