

學位審查報告書

(ふりがな)	とよくら こういち
氏 名	豊倉 浩一
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 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)	
シロイヌナズナを用いた葉の向背軸に沿った極性の形成機構の解析	
論 文 調 査 委 員	(主査) 鹿内 利治 教授 西村いくこ 教授 長谷あきら 教授

理 学 研 究 科

京都大学	博士（理学）	氏名	豊倉 浩一
論文題目	シロイヌナズナを用いた葉の向背軸に沿った極性の形成機構の解析		
(論文内容の要旨)			
植物の地上部の側生器官における向背軸のパターン形成は葉の発生において重要であり、表皮細胞、葉肉細胞、維管束の向背軸方向の細胞分化だけでなく、側生器官の正常な伸長にも必要である。多くの転写制御因子や低分子 RNA が背軸側、もしくは向軸側特異的に発現し、それぞれの領域の細胞分化を促進している。しかしながら、これらの制御因子がどのように領域特異的に発現するかについては知見が乏しい。 申請者は、背軸側で特異的に GFP を発現する <i>FILpro:GFP</i> の発現パターンが変化する <i>enlarged fil expression domain1 (enf1)</i> 変異体の解析を行った。<i>enf1</i> 変異体では、<i>FILpro:GFP</i> の発現領域が拡大している葉原基と減少している葉原基が混在していた。このことから、<i>ENF1</i> 遺伝子は向背軸パターンの安定性維持に関わる因子であると考えられる。<i>ENF1</i> 遺伝子はガンマアミノ酪酸 (GABA) シヤントを形成するコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素をコードしていた。GABA シヤントを形成する別の酵素である GABA アミノ基転移酵素をコードする <i>GABAT1</i> 遺伝子の変異体は、発生のごく初期の葉原基において <i>FILpro:GFP</i> の発現パターンが拡大していた。<i>gabat1 enf1</i> 二重突然変異体の葉は、野生型様の形態および <i>FILpro:GFP</i> の発現パターンを示したことから、<i>gabat1</i> 変異は <i>enf1</i> 変異体の表現型を抑圧することが示された。これらのことから GABA シヤントにおいて、<i>ENF1</i> と <i>GABAT1</i> との代謝の中間に位置するコハク酸セミアルデヒド (SSA) の量あるいは分布が <i>enf1</i> 変異体の表現型異常の原因であると考えられた。そこで、野生型の茎頂部にラノリンに混ぜた SSA を投与したところ、本来の背軸側に向軸側様の組織の形成が見られた。<i>GABAT1</i> 遺伝子あるいは <i>ENF1</i> 遺伝子を含むゲノム領域と蛍光タンパク質の遺伝子を融合させた形質転換体の発現解析により、茎頂分裂組織において <i>GABAT1</i> は中央部で発現するのに対して、<i>ENF1</i> はほとんど発現していなかった。このことは SSA が茎頂部で合成された後、移動してコハク酸に代謝されることを示唆している。植物において SSA はこれまで検出されていなかったが、キャピラリー電気泳動・マススペクトロメトリ (CE-MS) を使うことで内生の SSA の検出に成功した。以上のことから、茎頂分裂組織で合成される SSA が葉原基の向背軸極性の形成を誘導することが示唆された。 GABA シヤントによる向背軸形成の仕組みに迫るため、<i>enf1</i> 変異体の抑圧変異体を 30 ライン単離し解析した。<i>enf1</i> 変異体の抑圧変異体の一つである 16E1F7 は <i>ENF2</i> 遺伝子のスプライシングのアクセプターサイトに変異を持ち、<i>enf2-1</i> 変異も <i>enf1</i> 変異体の表現型を抑圧したことから、<i>enf2</i> 変異体のアレルであると結論した。<i>ENF2</i> タンパク質はプラスチド局在の PERIPLASMIC BINDING PROTEIN ドメインを持つタンパク質であった。別の <i>enf1</i> 抑圧変異体の 16E1H2 の原因遺伝子は、新たに開発した次世代シーケンサーとマッピングを組み合わせた手法により同定した。16E1H2 の原因遺伝子はグルタミン酸 1-セミアルデヒドアミノ基転移酵素 (GSA) をコードする <i>GSA2</i> 遺伝子であった。GSA はプラスチドで働くテトラピロール合成経路の酵素である。同経路の別の酵素をコードする <i>HEMA1</i> 遺伝子の変異も <i>enf1</i> 変異体の表現型を抑圧した。このことから、テトラピロール合成経路を含むプラスチドの機能と GABA 代謝経路との関係性が示唆された。 さらに、向軸側で発現する <i>35S:miYFP-W</i> ラインの解析も行った。<i>35S:miYFP-W</i> は miR165 が働く細胞で発現抑制を受けるマーカーラインであり、その発現抑制では翻訳抑制は主たる経路でないことが示唆された。さらに、<i>MIR165A</i> のプロモーター GFP ラインの解析から、miR165 は葉原基の背軸側の 1 細胞層で発現し、細胞非自律的に背軸側の将来葉肉細胞となる細胞での発現抑制を行うことが示された。miR165 による発現抑制は胚発生や茎においても観察されたことから、miR165 は地上部の発生の様々な場面において細胞非自律的な発現抑制によるパターン形成を行うことが示された。特に球状胚期における子葉の原基のすぐ下の将来胚軸になる領域の表皮細胞での発現は、将来胚軸となる細胞によって子葉の向背軸パターン形成をもたらしている可能性を示唆している。			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

植物の葉の向背軸がいかに関与されるかは、充分理解されていない。葉原基が茎頂部から分泌される何らかの物質の勾配を認識しているという古典的なモデルが提唱されているが、その分子の実体は全く分かっていない。豊倉は、背軸側で特異的に GFP を発現する *FILpro:GFP* の発現パターンが変化するシロイヌナズナ *enlarged fil expression domain1 (enf1)* 変異体の解析等を行い、以下にまとめる結果を得た。

- 1) *enf1* は、*FILpro:GFP* の発現領域が不安定化する変異体であり、ガンマアミノ酪酸 (GABA) シヤントを形成するコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素をコードする遺伝子に異常を持つ。本酵素の上流の酵素反応に異常を示す *gabat1* 変異体は、*enf1* の表現型を抑圧することから、両酵素に挟まれる SSA の濃度あるいは分布が、向背軸決定に関与することが示唆された。この仮説は、SSA の投与実験、*ENF1* と *GABAT1* の発現解析、さらには内性の SSA の検出により支持された。
- 2) 16E1H2 は *enf1* 変異体の抑圧変異体として単離され、グルタミン酸 1 - セミアルデヒドアミノ基転移酵素 (GSA) をコードする *GSA2* 遺伝子に異常を示した。GSA はプラスチドで働くテトラピロール合成経路の酵素であるが、同経路で機能する *HEMA1* 遺伝子の変異も *enf1* 変異体の表現型を抑圧した。このことから、テトラピロール合成経路を含むプラスチドの機能と GABA 代謝経路との関連性が示唆された。
- 3) 向軸側で発現する *35S::miYFP-W* ラインの解析から、miR165 は葉原基の背軸側の 1 細胞層で発現し、細胞非自律的に背軸側の将来葉肉細胞となる細胞での発現抑制を行うことを示した。

以上の結果は、古典的モデルで想定されていた茎頂部から分泌されるモルフォゲン様物質として、GABA シヤント経路の代謝産物である SSA あるいはその代謝産物がある候補であることを示唆するものである。これは未解明であった向背軸決定のメカニズムについて全く新しい概念を産み出すものである。したがって本研究は、今後の研究の端緒となる極めて重要な成果をあげている。

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。また平成 23 年 10 月 12 日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。