

学位審査報告書

(ふりがな)	なかた みゆき
氏 名	中田 未友希
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)	
葉の初期発生を制御する分子機構の解析	
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	中田 未友希
論文題目	葉の初期発生を制御する分子機構の解析		
(論文内容の要旨)			
被子植物の葉の大きな特徴は薄くて広い形と表裏の二面性を持つことである。これら2つの特徴は葉の発生初期に、向背軸に沿った極性に従って、横方向への成長と表側(向軸側)・裏側(背軸側)および表裏を隔てる周縁部の細胞分化が誘導されることで確立されることが明らかとなっている。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ことがわかっている。横方向への成長と周縁部の細胞分化に関しては、向背極性に従って確立された向背の境界で誘導されるとする仮説が提唱されており、広く支持されてきた。しかしながら、その実体はほとんど明らかにされていなかった。 申請者は、ホメオボックス転写因子をコードする <i>WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN (WOX)</i> である <i>PRESSED FLOWER (PRS)</i> / <i>WOX3</i> と <i>WOX1</i> が、葉原基において葉身の間2層の葉肉細胞と周縁部の細胞で発現することを見だし、この領域を「中間領域」と呼ぶことを提唱した。この中間領域は、向軸側、背軸側とは遺伝子発現レベルで異なる性質を有し、<i>PRS</i> と <i>WOX1</i> の機能を介して、葉の横方向への成長と周縁部の細胞分化の両方において重要な働きを果たすことを明らかにした。<i>PRS</i> と <i>WOX1</i> の両遺伝子を欠く二重変異体は、細胞分裂活性の低下により、葉の横方向への伸展が阻害される。<i>PRS</i> と <i>WOX1</i> の発現場所、時期は一部異なる。また <i>FIL</i> プロモーターにより <i>WOX1</i> を背軸側で異所的に発現させると、葉の切れ込みが入ると同時に、背軸側に突起やひだ状構造、トランペット構造が観察された。これらの構造は周縁部に特徴的な組織の形成を伴っていた。しかし <i>FILpro::PRS</i> ではこのような表現型は観察されず、両遺伝子の機能の違いが示唆された。 葉の向背パターンが異常な変異株群で <i>PRS</i> と <i>WOX1</i> の発現領域を調べたところ、<i>kan1 kan2</i> 二重変異体において、両遺伝子の発現上昇が確認された。野生株においては、<i>PRS</i> と <i>WOX1</i> の発現は中間領域に限定されるが、<i>kan1 kan2</i> 二重変異体では背軸側に広がっており、托葉や周縁部に特徴的な細長い細胞が観察された。この表現型は、<i>FIL</i> プロモーターによる <i>WOX1</i> の背軸側での異所的発現によるものと酷似した。<i>prs wox1 kan1 kan2</i> 四重変異体では、葉は <i>kan1 kan2</i> と比べてさらに細くなるが、背軸側での表現型は見られなくなった。また <i>KAN1</i> の一過的高発現により、<i>PRS</i> と <i>WOX1</i> の発現量の低下が認められた。これらのことから、背軸側制御遺伝子である <i>KAN</i> により <i>PRS</i> と <i>WOX1</i> の発現が抑制されること、両遺伝子の発現の中間領域への限定が向背極性に依存して起こることが明らかになった。これらの結果から、表皮あるいは表皮下細胞で <i>PRS</i> と <i>WOX1</i> が発現すると外側方向への成長が促され、野生株ではこの機能により葉の横方向への伸展が起こっている可能性が示唆された。 さらに各種マーカーラインの利用により、<i>PRS</i> と <i>WOX1</i> が <i>KLU</i> 遺伝子のプロモーターを介した周縁部特異的な遺伝子の発現に必要であることを示した。また周縁部マーカーE1439 および中間領域のマーカーKE1895 を用いた解析から、<i>PRS</i> と <i>WOX1</i> は、周縁部や中間領域の特徴を特定の細胞に限定する働きを持つことが明らかになった。また <i>DR5::GUS</i> の解析から、両遺伝子が周縁部でのオーキシンマキシマの形成に関与していることを示した。この点については、さらに <i>WOX1</i> の異所的発現、またオーキシン極性輸送の阻害剤 NPA の効果からも支持された。 以上の結果から、<i>PRS</i> と <i>WOX1</i> は中間領域で機能し、様々な経路を介して葉身の成長と周縁部の分化を促していると考えられる。また、<i>PRS</i> と <i>WOX1</i> の発現は向背パターンに依存して中間領域に限定される。これまで、葉の横方向への伸展と周縁部の分化は向背の境界で誘導されると考えられてきたが、実際には向軸側、背軸側両領域の間に、これら領域とは異なる領域「中間領域」が存在し、同領域が向背パターンに依存して限定され、中心的な役割を果たすことがはじめて明らかになった。			

(続紙 2)

(論文内容の要旨のつづき)

さらに申請者は、中間領域で機能する *PRS* と *WOX1* が向背パターンの形成にも寄与していることを明らかにした。*prs wox1* 二重変異体の葉周縁部では特徴的な細胞が欠失するのみならず、広い範囲で向背両方に特徴的な組織が共存しているような表現型が見られた。向背両方の性質の共存は、両領域に特異的な遺伝子が共発現していることから確認された。さらに、*prs wox1* 二重変異は向軸側制御遺伝子 *AS2* または *REV* の変異による背軸側化と、背軸側制御遺伝子 *FIL/YAB* または *KAN* の変異による向軸側化の両方を顕著に昂進することも示した。これらから、中間領域に特異的に機能する *PRS* と *WOX1* は、向背パターンによってその発現部位を限定されているのみならず、向背パターンの形成にも重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの結果から、申請者は葉の初期発生に関して、これまでの向背 2 領域を基盤とした既存のモデルを大幅に改定し、向・背・中間の 3 領域を基盤としたモデルをはじめて提唱した。

(論文審査の結果の要旨)

植物の葉の向背軸の決定と横方向への伸展を制御する分子メカニズムは、充分理解されていない。中田は、*WOX* 転写因子をコードする *PRS* と *WOX1* について、変異体解析、異所的発現を様々な向背軸パターンの異常な変異株の背景、あるいは様々なマーカーラインで解析する広範な遺伝学的を行ない、以下にまとめる結果を得た。

- 1) *PRS* と *WOX1* は、葉原基において葉身の間 2 層の葉肉細胞と周縁部の細胞で発現し、中間領域と呼ばれる領域を形成する。発現領域、時期、さらには二重変異体の表現型から、両遺伝子の機能は重複するが一部異なることが明らかになった。また両遺伝子は、葉の横方向への伸長と周縁部での特異的な細胞の分化、向背軸に沿った細胞の分化に必須である。
- 2) 背軸側制御遺伝子である *KANADI* は、*PRS* と *WOX1* 遺伝子の発現を抑制することで両遺伝子の発現を中間層に限定している。これまで向軸側と背軸側の境界として認識されていた領域に中間領域という異なる機能をもつ細胞群が存在することが明らかになった。
- 3) *PRS* と *WOX1* の発現は向背軸パターンによる制御を受けるが、逆に中間領域が向背パターンの形成にも寄与していることを明らかにした。このことから、向・背・中間の 3 領域間の複雑なクロストークにより葉の発生が制御されていることを明らかにした。

以上の結果は、これまで向軸、背軸の二つの性質で議論されてきた葉の発生パターンに中間領域による制御という新しい概念を産み出すものである。中間領域は、向背パターンの決定、葉の横方向への伸展と周縁部での特異的な細胞分化、さらには向背軸の形成に必要であることが明確に示されている。これは未解明であった向背軸決定のメカニズムの理解に大きく貢献する新知見であり、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 24 年 4 月 10 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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降