

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所 属 (主指導教官)	分化・形態形成学講座 (横田 明穂 教授)		
氏 名	金本 浩介	提 出	平成 14 年 1 月 8 日
題 目	シロイヌナズナ花序茎頂で発現する 受容体型キナーゼ遺伝子の機能解析		

要旨

我々が生活している環境を見渡すと様々な形態をした植物がそこにはある。葉や花の形、色はもちろんのこと、それら葉や花のつきかた（葉序、花序型）なども種によって異なる。植物は、一般に葉や茎からなる地上部と地下器官の根から構成されている。高等植物に見られる多様な形態は、主にその茎頂と根端に存在する分裂組織と呼ばれる細胞群の働きによるものである。分裂組織は、植物の一生を通じて新しい器官の形成を続けると同時に、未分化な細胞の維持も行っている植物特有の組織である。しかし、この分裂組織がどのような機構で器官形成をし、未分化細胞の維持を行っているのかは、よくわかっていない。本研究では、このような分裂組織の機能がどのような機構により行われているのかを明らかにすることを目的とした。

そこでこの論文では、分裂組織の分子レベルでの機能解析を目指した研究を行うに当たって次の2点に留意した。先ずひとつ目として器官形成が活発に行われている花序茎頂組織で発現している遺伝子に注目し、花序茎頂で機能する遺伝子の単離を試みた。ふたつ目として多数の細胞から構成される器官の形成には、細胞間シグナル伝達が、深く関与していると予想した。これら2点に基づいてシロイヌナズナから分裂組織の機能に関与していると考えられる遺伝子の単離を試みた。解析遺伝子の選抜過程では、花序茎頂で発現する遺伝子クローンの中から細胞間シグナル伝達に関与すると予想される受容体型キナーゼ遺伝子と高い相同性を示したクローンを解析対象に選んだ。単離したクローンのcDNA塩基配列から予測したアミノ酸配列より、得られた遺伝子クローンは、ロイシンリッチリピートを受容体ドメインに有した新規な遺伝子であることがわかった。受容体型キナーゼは、細胞外から細胞内への情報伝達の入口となる鍵遺伝子である。最近、明らかになったシロイヌナズナのゲノムプロジェクトからも多数の受容体型キナーゼ遺伝子がゲノムにコードされていることが報告されており高等植物が、細胞間シグナル伝達をさまざまな生理作用において利用していることが窺える。

得られた遺伝子クローンのGUSレポーター遺伝子によるプロモーター解析からは、花序茎頂組織以外に根端組織でも発現していることがわかった。そこでこの新規遺伝子の構造的特徴と発現特異性から *Inflorescence and Root apices receptor-like Kinase (IRK)* と命名した。プロモーター解析の結果から *IRK* 遺伝子の発現を示すGUS活性は、主根や側根の根端で強く見られたほか、茎頂組織、がく、心皮、花糸、未熟種子でも発現が観察された。さらに子葉やロゼット葉の維管束組織でも弱い発現が認められたが、茎と茎生葉では、発現は見られなかった。competitive RT-PCRによる解析からは、根端組織では恒常的な発現を示すのに対し、茎頂組織では、栄養生長期から生殖生長期に進むにつれて発現量が増加する傾向を示すことが判った。このことから地上部においては花の形成などの生殖生長に関与することが、また地下部においては細胞分裂が盛んな根端で発現することが明かとなった。*IRK* の細胞内局在は、*IRK* とGFPとの融合タンパク質のタマネギ表皮細胞での局在から細胞膜に *IRK* が局在していることが示された。*IRK* のキナーゼドメインとGSTとの融合タンパク質では *in vitro* で自己リン酸化活性を示した。これらの特徴から *IRK* は、受容体型キナーゼとして植物体において機能的な遺伝子であることが予想された。

IRK の植物体における機能を明らかにする目的で *IRK* のキナーゼドメインをCaMV 35Sプロモーター制御下で過剰発現させた植物体の作成とT-DNAタグラインからの *IRK* 遺伝子破壊株のスクリーニングをおこなった。しかし、これらの形質転換植物や遺伝子破壊株は、長日条件下において、形態的な変化や花成時期のずれは示されなかった。また、浸透圧ストレスや塩ストレスを与えた場合の形態的な変化やオーキシン処理による根器官の生理応答についてもこれまでのところ野生株との有意な違いは観察されていない。そこでこれらの変異株において遺伝子発現にどのような変化が生じているのかを野生株と比較することにより *IRK* 遺伝子の機能予測を試みた。遺伝子発現の変化を検出する方法としては多数の遺伝子の発現の変化を解析できるマイクロアレイを用いた。根器官由来のRNAを用いた解析から遺伝子破壊株ではGST遺伝子の発現増加がみられた。一方、キナーゼドメインの過剰発現株では、リボソームタンパク質や *SEN(senescence)*5などの遺伝子の発現上昇がみられ、*IRK* を介したシグナル伝達経路の下流に位置するとみられる候補遺伝子が得られてきた。以上これまでに得られた発現解析およびマイクロアレイなどの結果を併せて *IRK* を介したシグナル伝達が植物体においてどのような機能に関わっているのかを論議する。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 金 本 浩 介

高等植物の器官形成の機構を理解することは、生物学的な意義に加え、花芽形成の誘導などの農学的な応用へと結びつく有用な研究である。高等植物の器官形成や分裂組織の維持は茎頂組織において行われるが、近年の研究から細胞間コミュニケーションが茎頂組織の機能に重要な役割を果たしていることが示されてきた。しかし、これらの細胞間コミュニケーションの実体はまだ明らかにされておらず、これからの研究が必要な分野である。申請者の論文は、茎頂組織の細胞間コミュニケーションの意義を明らかにするために逆遺伝学的アプローチを取り入れた先駆的な研究であり、これから益々重要になる分野での遺伝子機能解析の具体例となると評価できる。

初めに申請者は、ディファレンシャルスクリーニングにより得られたシロイヌナズナの花序茎頂で発現する遺伝子の中から細胞間コミュニケーションに重要な機能を担うと予想される受容体がキナーゼ遺伝子と相同性を示した*IRK*を解析候補として選んだ。*IRK*は、ロイシンリッチリピートを受容体ドメインにもつ新規な受容体型キナーゼ遺伝子をコードし、その細胞膜局在性、自己リン酸化活性から*IRK*が受容体型キナーゼとして機能的な遺伝子である重要な知見が得られた。また、*IRK*のプロモーターの発現特異性と競合的 RT-PCRによる*IRK*の詳細な発現解析から*IRK*は茎頂組織、根端組織、花器官、未熟種子において発現が観察され*IRK*が器官形成や細胞分裂に機能する可能性を示した点は重要な結果である。続いて*IRK*を介したシグナル伝達が活性化または抑制された形質転換体の解析を精力的に進めた。方法論的にも先駆的分野であり、今後のアプローチの参考になる実験系ではあったが、残念ながら*IRK*の機能解明につながる有意な表現型の違いは認められなかった。しかし、マイクロアレイにより*IRK*に関する形質転換体と野生株との遺伝子発現の違いについて解析を行ったところ*IRK*の下流で機能すると予想される遺伝子の存在が認められ、今後*IRK*の植物体における機能を明らかにする上で有用な知見が得られ、今後の研究の発展の基礎的データとなることが期待された。

以上のように、本研究は茎頂組織における細胞間コミュニケーションの重要性に着目して解析を行ったもので*IRK*が機能的な受容体型キナーゼであり、その機能が器官形成や細胞分化に関与する可能性を示すことが出来たことは特に評価できる。*IRK*についての知見は今後、受容体型キナーゼを介する高等植物の細胞間コミュニケーションの全貌を理解していく上で学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。