

所属 (主指導教官)	分化・形態形成学講座 (横田 明穂 教授)		
氏名	兵頭 秀貴	提出	平成12年1月6日
題目	シロイヌナズナの花序茎頂で高発現する エンド型キシログルカン転移酵素遺伝子の機能解析		
要旨	<p>シロイヌナズナの花序茎頂の機能を探る目的で、ステージ5までの花を含む組織において発現する遺伝子が、ほぼ一定の割合で含まれるように構築された均一化cDNAライブラリーから、シロイヌナズナの花序茎頂に高発現して植物の形態に直接に深く関わっている遺伝子種を網羅的に単離を試みた。花序由来のcDNA、栄養生長期由来の均一化cDNAをプローブとしたディファレンシャルハイブリダイゼーションを行った。2次スクリーニングで、得られた13のクローンについてシロイヌナズナのロゼット葉、茎生葉、茎、花、花序の外側（ステージ7から12の花）、花序の内側（ステージ6以前の花と茎頂）の組織由来の全RNAに対してノーザンハイブリダイゼーションを行い、組織特異的発現を確認した。選抜したクロンの塩基配列より相同性検索を行った結果、核酸、タンパク質合成にかかわるCTPシンターゼや翻訳伸長因子、リボソームタンパク質をコードする遺伝子と相同性を示すクローン、細胞間シグナル伝達に関わる遺伝子として、レセプターキナーゼと推定されるタンパクをコードしている<i>ERECTA</i>遺伝子と相同性を示すクローン、細胞壁の伸長、発達に関わる細胞膜の水チャンネルであるアクアポリン、細胞壁の構造タンパク質であるグリシンリッチタンパク質、そしてエンド型キシログルカン転移酵素遺伝子、<i>EXGT</i>と相同性を示すクローンなどであった。強く発現している遺伝子は茎頂分裂組織の機能や、細胞壁の形成にとっても深く関わっているものであった。また、報告されている遺伝子と相同性を示さない全く新規なクローンが1つ選抜された。また、同じものを重複して取ることなく効率的に候補クローンが単離された。13クローンのうち10クローンについてはシロイヌナズナで報告のある遺伝子と相同性を示し、2クローンがシロイヌナズナでは初めてのもの、残る1クローンは全くの新規なものであった。2000年にシロイヌナズナの全ゲノム配列が解読され、さらにシロイヌナズナのESTの登録配列数は2000年12月の時点で11万2千5百に達している。この数は重複したものも含まれているが、シロイヌナズナの総遺伝子のかなりの部分を含む。それにもかかわらず今回均一化cDNAライブラリーを使用したディファレンシャルスクリーニングによってシロイヌナズナでは報告されていない遺伝子や未知な遺伝子が単離された。このことは高発現な遺伝子であっても、まだシロイヌナズナの中には単離されていないものが存在していることを示している。</p>		

EXGTは細胞壁の主要構成成分である多糖のキシログルカンの切断、繋ぎ換えをする酵素として近年注目を浴びている酵素である。花序茎頂部分の細胞は新しい細胞が次々に生まれているので細胞壁が薄く、固さも丈夫ではない。これを一次細胞壁と呼ぶが、この一次細胞壁のセルロース微繊維間を架橋しているキシログルカンを切断することによって一次細胞壁の構造が緩み細胞拡大が起こると考えられている。このエンド型キシログルカン転位酵素遺伝子 (EXGT) と相同性を示した候補クローンの花序茎頂に高発現という特徴と植物の分化、特に植物体の最終的な形態に深く関わる細胞壁の構築酵素という点に注目し、全長cDNA及びゲノムクローンの単離と発現部位、発現時期の解析を行った。この遺伝子は、XRP (xyloglucan raterated protein) の新規なメンバーであることから、EXGT-A6 遺伝子と命名した。EXGT-A6は花序茎頂部分の細胞壁代謝に深く関わるものと予想された。

シロイヌナズナのcDNAライブラリーからEXGT-A6の全長cDNAを単離した。EXGT-A6はN糖付加を受けると予想される部位を有し、N末端に疎水性アミノ酸に富むシグナル配列と予想される部分を持っていた。また、活性部位と予想される配列が他のEXGTと異なっていた。XRPは活性部位と予想される共通なアミノ酸配列としてDEID(F/I)EFLGNを含むが、EXGT-A6タンパク質は、これに相当する部分はNEFDFEFLGNであった。またEXGT活性検出の報告のあるXRPのメンバーとのアミノ酸配列の相同性は約30%-50%であった。

EXGT-A6は生殖生長期において花芽茎頂で発現するが、分化の場である茎頂で細胞の拡大・伸長に関わるこの遺伝子がどのように関わるのか興味深い。そこで、EXGT-A6の発現様式を時間及び空間的に解析した。EXGT-A6の経時的なノーザン分析を行ったところ、EXGT-A6は栄養生長期は茎頂部にのみ転写産物の蓄積が観察され、その後生殖生長期に移行すると急激に発現量が増加した。また、EXGT-A6は根及び根端部には転写産物の蓄積が観察されなかった。

EXGT-A6は花序茎頂部に加えて生殖生長期移行後の急激な細胞拡大による花茎の伸長にも働く遺伝子であることが新たに明らかとなった。このことはウエスタン分析によるタンパク質の分布においても一致した。

また、花茎の細胞伸長欠損を示す*acl*変異株においてEXGT-A6転写産物の蓄積は、茎において著しく減少しており、細胞伸長の欠損とEXGT-A6の発現量の低下に強い相関が見られ、EXGT-A6が花茎伸長に重要な役割を持つことが予想された。花序茎頂が花芽になる結果として、花茎の伸長が早期に停止してしまう*tfl*変異株においても同様の結果が得られた。また、暗所で生育させたシロイヌナズナの黄化植物体における胚軸の伸長にはEXGT-A6は関与していなかった。

今までにシロイヌナズナの他のEXGT遺伝子についてその転写産物の蓄積部位の解析がなされているが、EXGT-A6の様に細胞分裂、細胞伸長活性の高い部分に特異的に発現する遺伝子は単離されておらず、花茎における細胞の伸長及び花序茎頂部における分化、形態形成に密接かつ重要な働きを持つ最初のEXGTであることが示唆された。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 兵頭 秀貴

本論文では、植物の茎頂における細胞増殖と細胞拡大の理解を目指し、植物の細胞伸長に重要な機能をもつ細胞壁再編成に関わるエンド型キシログルカン転移酵素の発現解析を行った。まず、第1章において、シロイヌナズナの花序茎頂分裂組織機能を発現遺伝子から把握するために、花序茎頂で特異的に発現している遺伝子種がどのようなものであるのかを系統的に調べた。すなわち、花発生ステージ5までの花を含む組織において発現する遺伝子が、ほぼ一定の割合で含まれるように構築されたシロイヌナズナの花序茎頂由来均一化cDNAライブラリーから、植物の形態に直接に深く関わっている花序茎頂に高発現する遺伝子種を、ディファレンシャルスクリーニングにより同定した。その結果、高発現している遺伝子は茎頂分裂組織の発達や、細胞壁の発達や伸長にとっても深く関わっているものである事が明らかとなり、花序茎頂の機能に直接的に関わる遺伝子の理解が進んだ。そして、表題の研究へ発展することになった。

第2章においては、これらの遺伝子の中で最も花序茎頂特異的で高発現であった、エンド型キシログルカン転位酵素遺伝子 (EXGT) と相同性を示した候補クローンの、花序茎頂に高発現という特徴と植物の分化、特に植物体の最終的な形態に深く関わる細胞壁の構築酵素という点に注目し、全長cDNA及びゲノムクローンの単離と発現部位、発現時期の解析を行った。この遺伝子は、シロイヌナズナのEXGTの新規なメンバーであることから、EXGT-A6 遺伝子と命名した。EXGT-A6の発現様式を時間及び空間的に解析した所、EXGT-A6は栄養生長期は茎頂部にのみ転写産物の蓄積が観察され、生殖生長期に植物が移行すると花序茎頂部と花茎の伸長部に発現していることが新たに明らかになった。このことはウエスタン分析によるタンパク質の分布においても一致した。また、EXGT-A6は根及び根端部には転写産物の蓄積が観察されなかった。花茎の細胞伸長欠損を示す変異株の解析において、細胞伸長の欠損とEXGT-A6の発現量の低下に強い相関が見られ、EXGT-A6が花茎伸長に重要な役割を持つことが予想された。また、黄化植物体の解析よりEXGT-A6は細胞分裂を伴わない茎の伸長には関わっていない事が示唆された。

今までにシロイヌナズナの他のEXGT遺伝子についてその転写産物の蓄積部位の解析がなされているが、EXGT-A6の様に細胞分裂、細胞伸長活性の高い部分に特異的に発現する遺伝子は単離されておらず、花茎における細胞の伸長及び花序茎頂部における分化、形態形成に密接かつ重要な働きを持つ最初の報告のEXGTであり、今後の酵素活性の研究による細胞伸長研究の貢献が期待される。

以上のように、本論文は植物の茎頂における細胞伸長を細胞壁の再編成という観点で分子レベルで研究したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、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。