

シロイヌナズナ根端分裂組織における
放射パターン形成の分子基盤の解析

宮島 俊介

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科
植物遺伝子機能学講座

平成 21 年 1 月

目次

第 1 章 シロイヌナズナの根において、AGO1 は SHR/SCR 経路と独立して放射パターン形成に機能する	
1-1 序論	3
1-2 結果	6
1-2-1. AGO1 機能欠損は根における基本組織の放射パターンに異常を引き起こす	
1-2-2. AGO1 の機能欠損は SHR/SCR 発現パターンに影響しない	
1-2-3. AGO1 と SHR/SCR との二重機能欠損は、基本組織の特徴の著しい損失を引き起こす	
1-2-4. 胚発生における AGO1 機能欠損は <i>scr</i> 変異と相乗的効果を示さない	
1-3 考察	11
第 2 章 シロイヌナズナの根の放射パターン形成における中心柱と基本組織間の双方向性組織間相互作用	
2-1 序論	14
2-2 結果	16
2-2-1. <i>PHABULOSA</i> 遺伝子の発現制御は正常な放射パターン形成に必須である	
2-2-2. RM において miRNA165/166 によって PHB の発現領域は維管束組織に限定化される	
2-2-3. MIR165A は SCR 依存的に RM の内皮特異的に転写される	
2-2-4. SCR は RM において正常な miR165/166 の蓄積に必須である	
2-2-5. SCR は PHB 発現領域の限定化に機能する	
2-2-6. 内皮特異的に発現する MIR165A は、中心柱における PHB の発現を制御する能力をもちうる	
2-2-7. 内皮で発現する SCR は PHB の発現制御を介して細胞非自律的に中心柱の機能発現に関与する	
2-2-8. 胚発生期及び本葉の発生段階において MIR165A の発現は SCR に依存しない	
2-2-9. PHB 発現制御に対する AGO1 と SCR の効果は異なる	
2-3 考察	23
第 3 章 今後の展望	26
第 4 章 図表	27
第 5 章 材料と方法	52
第 6 章 参考文献	56
第 7 章 謝辞	65

第 1 章 シロイヌナズナの根において、AGO1 は SHR/SCR 経路と独立して放射パターン形成に機能する

1-1 序論

多細胞生物は一定のパターンをもった組織形成を行うことで、固有の形態を構築している。この組織形成の事をパターン形成と呼ぶ。維管束植物に共通するパターン形成として、茎や根などの軸性器官における中央-周辺軸に沿った放射パターン形成が挙げられる。この放射パターンは、表皮、基本組織、維管束組織、という 3 種類の組織系から構成されるが、それら組織系に含まれる細胞層の数や、組織の配置様式などは、植物種、または器官ごとに多様性をもつ (Gifford and Foster 1989)。

シロイヌナズナの根は、非常に単純な組織構成をもち、放射パターン形成研究における有用なモデルケースである。シロイヌナズナの根では、中央部に維管束組織 (vascular tissue : VT) と内鞘 (pericycle : Pe) からなる中心柱 (stele) が存在し、それを取り囲むように、内側から内皮 (endodermis : En) と皮層 (cortex : Co) からなる基本組織 (ground tissue : GT)、表皮 (epidermis : Ep)、側部根冠 (lateral root cap) が放射状に形成される (Fig. 1B)。また、内鞘、内皮、皮層、表皮は、それぞれ 1 層の細胞層から構成されている (Fig.1B)。これら各々の組織は、根端分裂組織 (Root Meristem: RM) 内の「始原細胞」と呼ばれる幹細胞に由来する。また、このような組織パターンの基盤は、胚発生期に構築され、発芽後の RM における継続的な細胞分裂と細胞分化によって維持されている (Fig. 1A, C) (Dolan et al. 1993, Scheres et al. 1994)。

これまでに、シロイヌナズナの放射パターン形成に関わるいくつかの遺伝子やその作用機構が明らかになっている。基本組織は、1 層ずつの内皮と皮層からなる 2 層構造をもつ。基本組織の形成過程においては、1 層の皮層/内皮始原細胞 (cortex/endodermis initial cell : CEI) の娘細胞 (CEI daughter cell : CED) が非対称分裂する事で、皮層と内皮という 2 層の細胞層が産出される (Fig. 1D)。short-root (*shr*) 変異体と scarecrow (*scr*) 変異体では、CED が非対称分裂せず、基本組織が 1 層の細胞層のみで構成される (Scheres et al. 1995)。これまでに、これらの変異体の原因遺伝子である *SHR* と *SCR* の内皮形成 (CED における不等分裂と内皮細胞分化) への作用機構が明らかにされている。*SHR* 遺伝子と *SCR* 遺伝子は、共に植物特有の GRAS 型転写因子をコードしている (Di Laurenzio et al. 1996, Helariutta et al. 2000)。*SHR* 遺伝子は、中心柱で転写・翻訳された後、隣接する基本組織の細胞に移行する (Nakajima et al. 2001)。その後、基本組織に移行した *SHR* は *SCR* と直接相

相互作用し、SHR-SCR 転写因子複合体として SCR 遺伝子を含む様々な遺伝子群の転写制御を行う。この転写制御が CED における非対称分裂と、その後の内皮細胞への分化を誘導する (Levesque et al. 2006, Cui et al. 2007)。

パターン形成においては、動物と植物いずれにおいても、それぞれの組織の特徴を規定する遺伝子が時間・空間的に正確に発現調節されることが不可欠である。低分子 RNA (small RNA : sRNA) が介する遺伝子発現制御は、広く生物界に保存されている。sRNA の一種である microRNA (miRNA) は、内生の 20nt 程度からなる一本鎖 RNA である。miRNA は相補的な塩基配列をもつ標的 mRNA の切断や翻訳抑制などの転写後制御を介して、標的遺伝子の発現を抑制する (Bartel 2004)。シロイヌナズナにおける miRNA 研究の草創期においては、15 ファミリーに分類される 19 種類の miRNA が単離・同定された (Llave et al. 2002, Mette et al. 2002, Park et al. 2002, Reinhart et al. 2002)。近年の網羅的な解析により、数多くの miRNA 候補が単離・同定され、ゲノム配列情報からそれらの標的遺伝子が推定されている (Rajagopalan et al. 2006, Fahlgren et al. 2007)。また、miRNA が介する発現制御を担うタンパク質として ARGONAUTE (AGO) が挙げられる (Hutvagner and Simard 2008)。AGO 様タンパク質は、古細菌、真正細菌、真核生物において広く保存されており、PAZ ドメイン、MID ドメイン、PIWI ドメインといった機能ドメインをもつ。PAZ ドメインは sRNA と直接相互作用する (Lingel et al. 2003, Song et al. 2003, Yan et al. 2003)。また、PIWI ドメインは RNase-H 様の立体構造をとり、数種類の AGO タンパク質については、RNA 切断活性を有する事が生化学的に証明されている (Parker et al. 2004, Song et al. 2004)。シロイヌナズナゲノムには、10 種類の AGO タンパク質がコードされている (Vaucheret 2008)。生化学的な解析から、各々の AGO タンパク質は、sRNA の 5' 端の塩基を指標として、特定の sRNA 分子と選択的に相互作用することが明らかにされている (Mi et al. 2008)。ARGONAUTE1 (AGO1) は、5' 端にウリジン残基をもつ sRNA と特異的に相互作用する。シロイヌナズナの miRNA 分子のほとんどにおいて、5' 端がウリジン残基であることから、AGO1 は miRNA 分子と選択的に相互作用し、その標的 mRNA の切断もしくは翻訳を抑制すると考えられる。ago1 機能欠損体において、miRNA 標的遺伝子群の転写産物が過剰蓄積するという過去の研究結果は、AGO1 が miRNA の機能発現に関与することを支持する (Vaucheret et al. 2004)。また、ago1 機能欠損体は多面的な形態異常を示す (Bohmert et al. 1998, Lynn et al. 1999, Sorin et al. 2005, Yang et al. 2006)。これは、AGO1 の下流因子群、つまり miRNA により制御される遺伝子群が、植物発生の様々な過程で機能しているためである (McConnell et al. 2001, Palatnik et al. 2003, Chen 2004, Laufs et al. 2004, Arazi et al. 2005, Mallory et al. 2005, Millar and Gubler 2005)。興味深

いことに、miRNA 分子種とその標的遺伝子群、及びそれらが関わる発生現象の組合せは、維管束植物において広く保存されていることが示されている (Floyd and Bowman 2004, Willmann and Poethig 2007)。

本論文の第 1 章においては、シロイヌナズナの根の放射パターン形成に対する AGO1 の機能について報告する。*ago1* 機能欠損体においては、RM の基本組織におけるパターン形成に異常が観察された。さらに、SHR/SCR 経路と AGO1 機能を分子遺伝学的に解析した結果から、シロイヌナズナ RM における放射パターン形成において、AGO1 と SHR/SCR 経路が独立して基本組織形成に機能するというモデルを提唱する。

1-2 結果

1-2-1. AGO1 機能欠損は根における基本組織の放射パターンに異常を引き起こす

これまでに、根端放射パターンに異常をもついくつかの変異体が単離されてきた (Scheres et al. 1995)。放射パターン形成に関わる新たな分子機構を明らかにするために、RM での放射パターンに異常をもつ新規変異体の探索を行った。QC を GFP でマークする系統 (*pWOX5::mGFP5ER*) (Sarkar et al. 2007) を EMS (ethyl methanesulfonyl fluoride) で変異原処理し、その M2 世代植物の根を 1 個体ずつ共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal laser-scanning microscope: CLSM) で観察することによりスクリーニングを行った。その結果、単離された *5gf32* 系統では、野生型植物において 2 層の細胞層からなる基本組織が、3 層の細胞層から形成されていた (Fig. 2A, B)。さらに、基本組織の細胞が、野生型植物では同心円状に配置するのに対し (Fig. 2C)、*5gf32* 変異体の 3 層の基本組織においては、細胞は同心円状に配置していなかった (Fig. 2D)。

5gf32 変異体の子葉は棒状で野生型植物のように展開していなかった (Fig. 3A,B)。この表現型は、過去に単離されている *argonaut1 (ago1)* 機能欠損体 (Bohmert et al. 1998) に非常に類似していたため、*5gf32* 変異体における AGO1 コード領域の配列を解析したところ、保存された PIWI ドメインをコードする領域にナンセンス変異を同定した (Fig. 2F)。RT-PCR 解析の結果、*5gf32* 変異体において、AGO1 転写産物は確認されたが (Fig. 2G)、PIWI ドメインは AGO1 の RNA 切断活性に必須であることから (Baumberger and Baulcombe 2005)、*5gf32* 変異体内の AGO1 は機能欠損していると推定される。さらに、AGO1 遺伝子内に T-DNA が挿入した独立した 2 系統 (SALK_035319 と SALK_096625、以後、それぞれ *ago1-101* と *ago1-102* と記載する) を単離した (Fig. 2F)。これら T-DNA 挿入系統において、*ago1-101* 変異体では、AGO1 遺伝子転写産物の蓄積が確認されず、また、*ago1-102* 変異体では著しく低下していた (Fig. 2G)。これら T-DNA 挿入変異体の表現型を確認したところ、*5gf32* 変異体と同様の放射細胞パターン異常が観察された (Fig. 2B, 2D, 5C, 5H、一部未掲載)。これらの結果は、シロイヌナズナの根の基本組織における正常な放射パターン形成に、AGO1 機能が必須であることを意味している。

AGO1 の機能欠損が RM における放射パターン形成に異常を引き起こしたことから、次に、miRNA の産出に関わる因子群の機能欠損が、同様の放射パターン異常を引き起こすかを確認した。*HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1)* は dsRNA 結合タンパク質をコードし、その機能は正常な miRNA 量の蓄積に必須である (Han et al. 2004, Vazquez et al. 2004)。*hyl1-2* 機能欠損型変異体の根

の細胞パターンを観察したところ、*ago1* 変異体と同様に、基本組織における同心円状の細胞配置に異常が確認された (Fig. 2E)。*ago1* 変異体と *hyl1* 変異体において、RM 放射パターンに類似した異常が確認された事は、RM における正常な放射パターン形成に miRNA が介する遺伝子発現制御系が必須であることを示す。

1-2-2. AGO1 の機能欠損は SHR/SCR 発現パターンに影響しない

根の基本組織形成においては、これまで GRAS 型転写因子である SHORT-ROOT (SHR) と SCARECROW (SCR) の機能が明らかにされている。SHR と SCR は直接相互作用することで転写因子複合体として機能し、内皮/皮層始原細胞 (CEI) の娘細胞 (CED) の非対称分裂と内皮細胞の細胞分化を制御する (Di Laurenzio et al. 1996, Helariutta et al. 2000, Heidstra et al. 2004, Sena et al. 2004)。*ago1* 機能欠損体において基本組織パターン形成に異常が観察された事から、*ago1* 機能欠損体内における SHR/SCR の発現様式をそれぞれの GFP 融合タンパク質 (以後、それぞれ SHR-GFP、GFP-SCR と記載する) を用いて解析した (Nakajima et al. 2001, Gallagher et al. 2004)。野生型植物において、SHR-GFP の蛍光は、中心柱内の細胞においては細胞質と核に、また内皮細胞と QC においては核に観察される (Fig. 4A) (Nakajima et al. 2001)。この発現様式は、*ago1-101* 変異体においても同様であった (Fig. 4B)。また、GFP-SCR 蛍光は野生型植物の内皮細胞と QC の核において特異的に観察されるが (Fig. 4C) (Gallagher et al., 2004)、*ago1-101* 変異体においてもその局在は変化していなかった (Fig. 4D)。これら観察結果から、AGO1 の機能欠損は、SHR と SCR の発現に影響しないことを示された。

1-2-3. AGO1 と SHR/SCR との二重機能欠損は、基本組織の特徴の著しい損失を引き起こす

放射パターン形成における AGO1 と SCR との相互関係をより詳細に明らかにするために、*ago1 scr* 二重変異体を作成し、発芽後 4 日目の根端部の細胞パターンを観察した。野生型植物では、基本組織は 1 層ずつの皮層と内皮からなり、縦断面において、それぞれ明確な細胞列として観察される (Fig. 5A)。*scr-3* 変異体の基本組織は 1 層の細胞層から、また *ago1-101* 変異体では三層の細胞層から構成されているが、これら *scr-3* 変異体と *ago1-101* 変異体においても野生型植物と同様に明確な細胞列として認識された (Fig. 5B, C)。それに対し、*ago1 scr-3* 二重変異体では、基本組織に相当する領域の細胞パターンが乱れ、明確な細胞列は確認されなかった (Fig. 5D)。

次に横断面における細胞パターンを観察した。野生型植物においては、楕円状の皮層細胞と長方形の内皮細胞が、それぞれ同心円状に配置することで

基本組織が構成されている (Fig. 5E)。 *scr-3* 変異体と *shr-2* 変異体の基本組織は、内皮細胞の形態をもつ細胞が消失し、皮層細胞様の形態をもつ細胞から構成される (Fig. 5F, G)。また、*ago1-101* 変異体基本組織においては、同心円状配置に異常が観察されるが、皮層細胞様の楕円状細胞が外側に、内皮細胞様の長方形細胞が内側に存在している (Fig. 5H)。これらの結果に対して、*ago1-101 scr-3* 二重変異体においては、基本組織を構成する特徴的な形態をもつ細胞は存在せず、代わりに球形の細胞が層構造をなさずに存在していた (Fig. 5I)。また *ago1-101 shr-2* 二重変異体においても、同様の細胞形態異常が観察された (Fig. 5J)。これらの結果をまとめると、AGO1 機能と SHR/SCR 機能を同時に欠損すると、それぞれの単一変異体では観察されることのない表現型、つまり基本組織に特徴的な形態をもつ細胞の消失という新奇な表現型を引き起こした。

さらに、*ago1-101 scr-3* 二重変異体の根端組織における基本組織の分化状態を明らかにするために、基本組織マーカー遺伝子の発現様式を解析した。*MAGPIE (MGP)* 遺伝子と *NUTCRACKER (NUC)* 遺伝子は、共に C2H2 型 zinc finger タンパク質をコードし、それら転写産物は RM の基本組織と維管束組織の一部において蓄積することが報告されている (Levesque et al. 2006)。また、*MGP* 遺伝子と *NUC* 遺伝子は、SHR-SCR 転写因子複合体によって直接転写誘導される (Cui et al. 2007)。まず、野生型植物、*ago1-101* 変異体、*scr-3* 変異体、及び *ago1-101 scr-3* 二重変異体の根端部から RNA を抽出し、定量的 real time-PCR 法 (qRT-PCR 法) を用いて、*MGP* と *NUC* 転写産物の蓄積を比較した。*ago1-101* 変異体と *scr-3* 変異体における *MGP* と *NUC* の転写産物の蓄積レベルは、野生型と比較して、減少が確認された (Fig. 6A, B)。また、*ago1-101 scr-3* 二重変異体における *MGP*、*NUC* の転写産物の蓄積量は、それぞれの単一変異体よりもさらに低下していた (Fig. 6A, B)。次に、*MGP* プロモーター/レポーター (*pMGP::mGFP5ER*) 系統を作成し、各遺伝子型背景における発現様式を解析した。まず、野生型背景においては、皮層、内皮及び内鞘において、GFP 蛍光が観察された (Fig. 6C)。この結果は、*in situ* hybridization 法による *MGP* の発現解析の結果 (Levesque et al. 2006) とほぼ一致する。*scr-3* 変異、及び *ago1-101* 変異体においては、それぞれの基本組織と内鞘において GFP 蛍光が観察された (Fig. 6D, E)。これらの結果に対して、*ago1-101 scr-3* 二重変異体では、RM 基部側領域においては GFP 蛍光が観察されたものの、RM の頂端領域においては GFP 蛍光が観察されなかった (Fig. 6F)。さらに、内皮特異的発現マーカーである En7 の発現様式を、各遺伝子型において解析した (Fig. 6G) (Heidstra et al. 2004)。*ago1-101* 変異体においては、最も内側の基本組織細胞層で、また、*scr-3* 変異体では、1 層の基本組織細胞層において En7 の発現が確認された (Fig. 6H, I)。これらの結果

に対して、*ago1-101 scr-3* 二重変異体においては、En7 の発現は検出されない (75.8% n = 34) 、もしくはそのレベルが著しく低下していた (Fig. 6J) 。以上の結果をまとめると、*ago1-101 scr-3* 二重変異体においては、野生型植物や単独変異体と比較して、基本組織マーカーの発現が著しく低下していた。*ago1-101 scr-3* 二重変異体における細胞パターンの解析と基本組織マーカーの発現解析の結果は、*shr/scr* 変異と *ago1* 変異は相乗的效果をもち、両者を同時に欠損させると、RM の基本組織の特徴の著しい損失を引き起こす事を示している

1-2-4. 胚発生における AGO1 機能欠損は *scr* 変異と相乗的效果を示さない

胚発生において基本組織の初期構築が行われる (Scheres et al. 1994) 。AGO1 と SCR の二重機能欠損が発芽後の RM のみならず、胚発生における基本組織の構築過程にも異常を引き起こすかを確かめるために、各遺伝子型背景の胚における細胞パターンと基本組織マーカー遺伝子の発現様式を解析した。*ago1-101* 変異体の魚雷型胚を観察したところ、通常、単一細胞層から構成される CEI において (Fig. 7A) 、余剰な並層分裂が観察された (81.3% n = 16) (Fig. 7B、矢印) 。また、基本組織の内層においも、散発的な並層分裂が観察された (Fig. 7B、三角印) 。また、*scr-3* 変異体では、CED における並層分裂が生じず、基本組織は 1 層の細胞層から構成されていた (Fig. 7C) (Wysocka-Diller et al. 2000) 。*ago1-101 scr-3* 二重変異体では、*ago1-101* 変異体で観察された CEI における余剰並層分裂が抑制され、*scr-3* 変異体と同様に基本組織が 1 層細胞層から形成されていた (Fig. 7D) 。次に、各遺伝子型背景の胚において、*pMGP::mGFP5ER* の発現様式を確認した。野生型、*ago1-101* 変異体、*scr-3* 変異体においては、発芽後の RM と同様に、基本組織と内鞘において GFP 蛍光が検出された (Fig. 7E, F, G) 。*ago1-101 scr-3* 二重変異体においても、*scr-3* 変異体様の発現様式が観察された (Fig. 7H) 。以上の細胞パターンとマーカー遺伝子の発現解析の結果は、胚発生における *scr* 変異体背景での AGO1 機能欠損は、RM にみられるような相乗的な効果を引き起こさないことを示す。

本章で得られた結果をまとめる。CLSM を用いた変異体スクリーニングから単離された *5gf32* 変異体では、基本組織が 3 層の細胞層から形成され、同心円状の細胞配置に異常が生じていた。この表現型は AGO1 機能の欠損から引き起こされると結論した。また、内皮細胞層形成に機能する SHR/SCR は、*ago1* 変異体においても正常な発現様式を示した。さらに、*ago1 scr* 変異体における組織形態学的な解析と基本組織マーカー遺伝子の発現解析の結果から、*scr* 変異体背景における AGO1 機能の欠損は、基本組織の特徴の著しい損失を引き起こす事が示された。また、この AGO1 機能欠損の効果は、RM

において顕著であり、胚発生における放射パターン形成過程では観察されなかった。以下において、「RM での放射パターン形成における AGO1 の機能」について考察する。

1-3. 考察

根の放射パターン形成機構について、これまでに **SHR/SCR** による内皮形成の分子機構が詳細に解析されている。中心柱で翻訳された **SHR** タンパク質は、細胞間を移動し、基本組織において **SCR** と複合体を形成する。この転写因子複合体は **CED** の非対称分裂による内皮細胞層の形成と、生じた娘細胞の一方での内皮細胞分化を担う (Helariutta et al. 2000, Nakajima et al. 2001, Heidstra et al. 2004, Cui et al. 2007)。 *shr/scr* 機能欠損体においては、内皮と皮層の 2 層からなる基本組織は形成されないが、1 層の細胞層から成る基本組織自体は形成される (Scheres et al. 1995, Di Laurenzio et al. 1996, Helariutta et al. 2000)。この実験事実は、基本組織自体を形成する分子機構は、**SHR/SCR** とは独立した未知の分子機構によって正に制御されている事を意味する。また、本研究において、*scr* 変異体の 1 層から構成される基本組織においても、**SHR-SCR** 複合体によって直接転写制御されると報告されている **MGP** 遺伝子や、内皮マーカーである **En7** の発現が維持されている事が示された。これらの結果は、基本組織の形成は、**SHR/SCR** の仲介する転写制御系のみには依存していない事を支持する。

本研究では、**CLSM** を用いた変異体スクリーニングから、**AGO1** が **RM** 放射パターン形成の新たな制御因子であることを示した。*agol* 変異体では、基本組織の細胞層数が増加していた。このような表現型は **SHR** タンパク質の局在が内皮よりも外側に拡張した場合に生じる事が知られている (Helariutta et al. 2000, Nakajima et al. 2001, Cui et al. 2007)。しかしながら、*agol* 変異体においても、**SHR** や **SCR** は共に、中心柱に接する基本組織の最内層で蓄積し、その発現領域は拡張していなかった。また、**En7** の発現解析より、*agol* 変異体の最内層の基本組織が内皮として分化していることが示された。これは、*agol* 変異体において **SHR** と **SCR** の発現領域が拡張していないという上記の結果と矛盾しない。さらに、**SHR** と **SCR** を標的とする **sRNA** はこれまでに報告されていない (Gustafson et al. 2005)。これらの結果は、**AGO1** は基本組織形成に機能するが、その作用点としては **SHR/SCR** に対する上流制御ではない、つまり **AGO1** 機能と **SHR/SCR** 機能の独立性を示唆する。

agol scr 及び *agol shr* 二重変異体においては、それぞれの単一変異体では観察されない細胞パターンの異常が観察された。これら二重変異体では、横断片面において、内皮と皮層を構成する特徴的な形態をもつ細胞が消失し、代わりにその領域には球形な細胞が存在していた。それぞれの単一変異体と比べて、*agol scr* 二重変異体では、**MGP**、**NUC** 及び **En7** マーカーの発現が、著しく低下していた。つまり、**SHR/SCR** 経路の欠損と **AGO1** 機能の喪失は

基本組織の特徴を相乗的に消失させることを示している。*ago1* 変異体の地上部の側生器官では、本来 miRNA によって発現が限定化されている遺伝子群が、異所的に発現することで、向背軸分化に異常が生じることが知られており (Kidner and Martienssen 2004)、*ago1* 変異体の RM においても、本来 miRNA 制御によって発現が限定化されている遺伝子群が、異所的または過剰に発現し、基本組織形成に異常をひきおこしたという事が想定される。

まとめると、RM における放射パターン形成に以下のようなモデルをたてることができる (Fig. 8)。RM においては、(1) SHR/SCR 依存的な経路と(2) SHR/SCR とは独立した経路が、基本組織形成を正に制御する。さらに、異所的または過剰に発現することで基本組織形成を抑制し得る miRNA 標的遺伝子(群)が存在し、これは前述の 2 つの経路と拮抗的に作用する。(3)AGO1 はそれら miRNA 標的遺伝子(群)の発現を抑制的に制御することで、結果的に基本組織形成を促進する (Fig. 8)。*ago1* 単一変異体では、miRNA 標的遺伝子の異所的もしくは過剰な発現が引き起こされるが、SHR/SCR 経路によって、優性的に基本組織としての性質が維持される。SHR を表皮で異所的に発現させると内皮細胞の特徴が付加されたという過去の研究結果は、SHR/SCR 機能の優性効果を裏付けるものである (Sena et al. 2004)。AGO1 と SHR/SCR の二重欠損体では、AGO1 制御下の miRNA 標的遺伝子群の作用が、SHR/SCR 経路の欠失により顕在化し、基本組織の特徴が消失したと考えられる。このモデルの正当性を確かめるためには、AGO1 と miRNA を介した発現抑制が基本組織形成に必須な遺伝子群を同定する事が必要である。マイクロアレイ解析から、既知の miRNA 標的遺伝子うち、13 ファミリー属する 43 遺伝子が *ago1* 変異体の根において野生型植物と比べ 1.8 倍以上発現上昇している事を見出している (Table 1)。それらの内、*Class III homeodomain leucine zipper (HD-ZIP III)* 遺伝子については、次章において、その放射パターン形成における発現制御機構を解析した。

AGO1 は胚発生においても発現している事が知られており (Lynn et al. 1999)、また、*ago1* 変異体の胚では余剰な並層分裂が引き起こされていた事から、AGO1 は胚発生での基本組織形成にも機能していると考えられる。しかしながら、RM とは異なり、*ago1 scr* 魚雷型胚においては、基本組織様の細胞列は確認され、*MGP* 遺伝子の発現も維持されていた。胚発生と RM における AGO1 と SCR の二重変異の効果の違いは、現段階では完全に説明する事はできない。1 つの可能性として、胚発生においては、AGO1 経路や SHR/SCR 経路とは独立した経路の (Fig.8 (2)の経路)、基本組織形成に対する寄与が、RM に比べ高いため、*ago1 scr* 二重変異の効果表れにくくなり、結果として基本組織の特徴 (細胞パターンとマーカー遺伝子の発現) が維持された可能性が考えられる。近年、冗長的な機能をもつ 2 つの受容体型キナ

一ゼである *RPK1* と *TOAD2* の二重変異体が、胚発生における基本組織と原表皮の特徴化に機能している事が報告されている (Nodine et al. 2007)。*RPK1/TOAD2*、*SHR/SCR*、*AGO1*、それぞれの遺伝子間の関係を、細胞パターンや下流マーカー遺伝子の発現を指標に明らかにする事で、胚発生における基本組織形成の理解が深まると考えられる。

第2章 シロイヌナズナの根の放射パターン形成における中心柱と基本組織間の双方向性組織間相互作用

2-1 序論

多細胞生物では、様々な組織間相互作用を介した制御機構により、統制のとれた「形作り」を行っている。20世紀初頭の Spemann による眼胞除去手術は、動物の発生における組織間相互作用の存在を示した。現在では、組織間相互作用の分子レベルでの理解が進みつつある。維管束植物においても、その発生過程で、様々な組織間相互作用の存在が示されている。Sussex は、茎頂分裂組織からのシグナルが葉の向背軸決定に機能していることを提唱し (Sussex 1951)、また、根端分裂組織 (root meristem : RM) では、静止中心 (quiescent center : QC) からのシグナルが、隣接する幹細胞の未分化性を維持する事が提唱されてきた (van den Berg et al. 1997)。

前章で述べたように、放射パターン形成は維管束植物の軸性器官に共通するパターン形成である。これまでに、維管束植物のモデルであるシロイヌナズナを用いた研究から、放射パターンの形成過程においても、組織間相互作用を伴う制御機構の存在が示されている。シロイヌナズナの根の中心部には、維管束組織と内鞘からなる中心柱が存在し、それを取り囲むように基本組織がある (Fig. 1A) (Scheres et al. 1994)。基本組織においては、中心柱に接するように正確に1層の内皮が形成される (Fig. 1A) (Scheres et al. 1994)。これまでの研究から、(1) 中心柱から基本組織への SHR タンパク質の細胞間移行と (2) 基本組織内での SHR-SCR 転写因子複合体の形成が、内皮形成 (内皮細胞層の形成とその後の細胞分化) を担う分子機構の端緒であることが示されてきた。(Di Laurenzio et al. 1996, Helariutta et al. 2000, Nakajima et al. 2001, Heidstra et al. 2004, Cui et al. 2007)。

前章で記述したように、miRNA が介する遺伝子発現制御系は、シロイヌナズナを含む様々な陸上植物の発生に機能している (Willmann and Poethig 2007)。シロイヌナズナを含めた様々な維管束植物の研究から、class III homeodomain leucine zipper (HD-ZIP III) タンパク質は、分裂組織形成、側生器官の向背軸形成、茎の維管束の発達などの様々な発生過程に機能している事が明らかにされている (Talbert et al. 1995, McConnell and Barton 1998, Baima et al. 2001, McConnell et al. 2001, Emery et al. 2003, Juarez et al. 2004, Zhong and Ye 2004, Green et al. 2005, Ohashi-Ito et al. 2005, Prigge et al. 2005)。また、HD-ZIP III 遺伝子の転写産物は microRNA165/166 (miR165/166) と相補的な配列を含み、葉などの側生器官の向背軸形成においての miR165/166 による発現制御は、双子葉と単子葉類に共通して重要な役割を果たしている

(Emery et al. 2003, Juarez et al. 2004)。

本章では、シロイヌナズナ RM 放射パターン形成において、miR165/166 を介した新奇な組織間相互作用が機能している事を報告する。シロイヌナズナ RM において、*HD-ZIP III* 遺伝子の 1 つである *PHABULOSA (PHB)* の発現が、miR165/166 機能によって、維管束組織に限定化されている。また、このような miRNA による制御の欠損は、放射パターン形成に異常を引き起こす。さらに、SCR は内皮において *MIR165A* 遺伝子の転写を促進することで、miR165/166 の蓄積を正に制御し、中心柱において細胞非自律的に PHB の発現領域を限定化する。SHR タンパク質の細胞間移行による中心柱から内皮への組織間相互作用と本章の結果を統合し、シロイヌナズナ RM の放射パターン形成における、中心柱と内皮の間の双方向性の組織間相互作用モデルを提唱する。

2-2 結果

2-2-1. PHABULOSA 遺伝子の発現制御は正常な放射パターン形成に必須である

ago1 変異体や *hyl1* 変異体において RM 放射パターン異常が観察された事は、RM での放射パターン形成に miRNA によって発現制御される遺伝子群が存在することを意味する。マイクロアレイを用いた網羅的発現解析から、*ago1* 変異体の根において、miR165/166 の標的である *HD-ZIP III* 遺伝子群の発現上昇が確認された (Table 1)。シロヌナズナゲノムには、5つの *HD-ZIP III* 遺伝子 (*REVOLUTA*、*PHBULOSA*、*PHBOLUTA*、*CORONA*、*ATHB8*) がコードされており、これらの転写産物は mi165/166 と相補的な配列を含む。この相補配列に変異が生じ、miR165/166 との相補性にミスマッチが生じると、miR165/166 による発現抑制に耐性を示すことが、*in vitro* および *in vivo* で示されている (McConnell et al. 2001, Mallory et al. 2004)。5つの *HD-ZIP III* 遺伝子のうち4つの (*REVOLUTA*、*PHBULOSA*、*CORONA*、*ATHB8*) が RM の中心柱組織付近で発現している事が、過去の研究によって示されているが (Baima et al. 1995, Hawker and Bowman 2004, Lee et al. 2006)、それら *HD-ZIP III* 遺伝子の詳細な機能や miRNA による制御は不明である。

まず、miR165/166 による *HD-ZIP III* 遺伝子への発現制御が、正常な RM 放射パターン形成に必須であるかを確認するために、半優性変異体 *phb-1d* の RM 放射パターンを解析した。*phb-1d* の転写産物では、miR165/166 との相補配列領域に 33nt の塩基挿入が生じている事から、その発現は完全に miR165/166 耐性を示すと考えられる (McConnell et al. 2001, Mallory et al. 2004)。*phb-1d* 変異体を、Col-0 に対して 2 度戻し交配し、*phb-1d/+*ヘテロ個体を作出した。この植物の RM の細胞パターンを縦断面から解析したところ、約半数の個体 (55.6% n = 36)において、皮層細胞に余剰な並層分裂が観察された (Fig. 9A, B、三角印)。また、横断切片での観察したところ、QC から基部側に 100 μ m 以内の横断面において、ほとんどの個体で皮層細胞での余剰な並層分裂が観察された (11 個体中 9 個体) (Fig. 9C, D、三角印)。また、この余剰な並層分裂は、全ての皮層細胞で起こるわけではなく、散発的である事が確認された (Fig. 9C, D、三角印)。この結果は、miR165/166 による *PHB* 遺伝子に対する発現制御は、正常な RM 放射パターン形成に必須である事を示す。

SHR タンパク質の皮層細胞への異所的な蓄積が、余剰な並層分裂を引き起こすことが報告されている (Helariutta et al. 2000, Nakajima et al. 2001, Cui et al. 2007)。*phb-1d/+*変異体において、SHR-GFP 融合タンパク質の局在を解析したところ、余剰な並層分裂が観察される *phb-1d/+*変異体のほとんどで、

2層の皮層のうち、内側の細胞層において SHR-GFP の蓄積が観察された (Fig. 9E, F、矢印) (94.3% n = 35)。この結果は、*phb-1d/+*変異体では SHR タンパク質の局在が内皮よりも外層に拡張し、その結果、皮層細胞が多層化した事が強く示唆された。

2-2-2. RM において miRNA165/166 によって PHB の発現領域は維管束組織に限定化される

地上部の側生器官形成において、*PHB* 遺伝子の発現は miR165/166 を介して、器官原器の向軸側に限定化される (McConnell et al. 2001, Emery et al. 2003, Kidner and Martienssen 2004)。また、miR165/166 耐性型 *phb* 変異体アレルにおいては、側生器官原器全体に *PHB* 転写産物が蓄積し、向軸側化した棒状の側生器官が形成される (McConnell et al. 2001)。そこで、RM における *PHB* の発現様式を明らかにするために、*PHB* プロモーターの支配下で GFP 融合型 *PHB* を発現する系統 (*PHB-GFP* 系統) を用いた発現解析をおこなった (材料と方法 参照)。*PHB-GFP* を発現する野生型背景の RM では、内鞘を含まない中心柱、つまり維管束組織でのみ *PHB-GFP* 蛍光が検出された (Fig. 10A)。この結果は、過去に報告された GFP 融合型 *PHB* の発現様式と一致する (Lee et al. 2006)。また、*PHB-GFP* 蛍光は、維管束中央部で最も強く、周辺部にいくに従って減衰していた (Fig. 10A)。次に、RM における miR165/166 による *PHB* 発現制御を解析した。既知の miR165/166 耐性変異を *PHB-GFP* に導入したコンストラクト (*PHBmu-GFP*) を植物体に導入した (Fig. 11B) (Emery et al. 2003, Mallory et al. 2004)。*PHBmu-GFP* 形質転換体の地上部は、*phb-1d/+*変異体と同様に棒状の本葉を形成した (Fig. 12A, B)。また、その RM においては、*phb-1d/+*変異体と同様に、皮層細胞に余剰な並層分裂が確認された (Fig. 12C, D) (T1 世代、独立 21 系統中 14 系統)。この2つの結果は、導入した *PHBmu-GFP* が *phb-1d* アレル様の効果を有している事を示す。そこで、RM における *PHBmu-GFP* の発現様式を解析したところ、内鞘を含む中心柱全体と、中心柱より外層の内皮と QC において強い GFP 蛍光が検出された。また、皮層や表皮/側部根冠の一部においても GFP 蛍光が確認された (Fig. 10B)。また、*PHB-GFP* と異なり、*PHBmu-GFP* では中心柱内において GFP 蛍光強度の勾配はみられず、ほぼ均一な発現強度を示した (Fig. 10A, B)。この *PHBmu-GFP* の発現様式は、報告されている *PHB* プロモーター/レポーター系統の発現様式とほぼ一致する (Lee et al. 2006)。以上の結果は、*PHB* の発現領域が miR165/166 との相補性に依存した転写後制御によって維管束組織に限定化されていることを強く示唆する。

2-2-3. MIR165A は SCR 依存的に RM の内皮特異的に転写される

シロイヌナズナゲノムには、9つの *MIR165/166* 遺伝子が存在し (Xie et al. 2005)、そのうちの4つは RM での発現が示唆されている (Jung and Park 2007)。そのれらの1つである *MIR165A* 遺伝子に対して、プロモーター/レポーター系統 (*pMIR165A::mGFP5ER*) を作成し、その転写領域を解析した。その結果、*pMIR165A::mGFP5ER* 形質転換体の RM において、内皮特異的な GFP 蛍光が検出された (Fig. 13A)。次に、内皮形成に関わる SHR/SCR 経路が *MIR165A* の転写に関与しているかを確かめるために、*scr* 機能欠損体 (*scr-3* 変異体) と、SCR の発現領域が内皮より外層に拡張している *pSCR::SHR* 形質転換体において、*pMIR165A::mGFP5ER* の発現を解析した。その結果、*scr-3* 変異体の RM では *pMIR165A::mGFP5ER* の発現は著しく低下し (Fig. 13A,B)、また、*pSCR::SHR* 形質転換体では、異所的に形成された内皮細胞層においても GFP 蛍光が観察された (Fig. 13C、括弧)。以上の結果から、*MIR165A* は SCR 機能依存的に内皮特異的に転写されることが強く示唆される。

2-2-4. SCR は RM において正常な miR165/166 の蓄積に必須である

次に、成熟型 miR165/166 の蓄積に対する SCR 機能を確認するために、野生型植物、*scr-3* 変異体、*scr-5* 変異体の根端部から RNA を抽出し、Pulsed Reverse Transcription 法 (Tang et al. 2006) を用いて、cDNA を作成した。これを鋳型とし、qRT-PCR 法により成熟型 miR165/166 の蓄積量を比較した (材料と方法 参照)。その結果、*scr-3* 変異体と *scr-5* 変異体において、miR165/166 の蓄積量が共に野生型植物の約 30% にまで減少していた (Fig. 14)。この結果は、SCR 機能が RM における正常な miR165/166 の蓄積に必須である事を示している。

2-2-5. SCR は PHB 発現領域の限定化に機能する

scr 変異体の RM において miR165/166 蓄積量の低下が確認された。このことは、SCR が miR165/166 の蓄積を介して PHB の発現領域を制御している可能性を示唆する。そこで、*scr* 変異体における PHB の発現を PHB-GFP を用いて解析した。野生型背景においては、PHB-GFP の蛍光は内鞘を除く中心柱で観察される (Fig. 10A) のに対し、*scr-3* 変異体では、内鞘においても PHB-GFP の蛍光が検出された (Fig. 10C)。この結果は、中心柱での *PHB* 遺伝子の発現領域の限定化に、SCR 遺伝子が細胞非自律的に機能している事を示す。*scr-3* 変異体における PHB-GFP 蛍光は基本組織では検出されず、野生型背景における PHBmu-GFP の発現とは異なっていた (Fig. 10B, C)。一方で、PHB の発現が周辺部にむかって拡大するという点については、*scr-3* 変異体の PHB-GFP の発現と野生型背景における PHBmu-GFP の発現は共通していた (Fig. 10B, C)。この事は、SCR 機能を欠損する事と miR165/166 耐性を付

加することは、RMにおけるPHBの発現に対して、相似な効果をもたらす事を示唆する。

2-2-6. 内皮特異的に発現するMIR165Aは、中心柱におけるPHBの発現を制御する能力をもちうる

scr 変異体の根においては、成熟型 miR165/166 の蓄積量の減少と、内皮特異的に発現する *MIR165A* 遺伝子の転写レベルの著しい低下が観察された。また、中心柱において miR165/166 の標的である PHB の発現が内鞘細胞にまで拡大していた。これらの結果から、内皮細胞層において SCR 依存的に転写された *MIR165A* が中心柱における PHB の発現を細胞非自律的に制限するという作業仮説が設定できる。そこで、内皮で発現する *MIR165A* が PHB の発現領域の限定化に機能しうるかを確かめるために、miR165/166 耐性型 PHBmu を抑制する変異型 *MIR165A* 遺伝子コンストラクト（以降、*MIR165A-mu* と記載する）を作成した。miR165/166 と PHBmu 転写産物では、二箇所（Fig. 11B、position 2, position 5）において、ミスマッチが生じている。PHBmu では、PHB の抑制に必須であると報告されている position 5 (Fig. 11) (Mallory et al. 2004) において塩基対形成を回復させ、その代わりに PHB 発現抑制への寄与が低い position 8 においてミスマッチを生じさせた (Fig. 11C)。PHBmu-GFP と *MIR165A-mu* の二重形質転換体を作成し、その PHBmu-GFP 発現を確認したところ、野生型背景における PHB-GFP の発現と同様に、中心柱の中央部に限定した GFP 蛍光が観察された (Fig. 10D)。この結果は、内皮で特異的に発現する *MIR165A* 遺伝子が、中心柱での PHB の発現制御に機能する事を示唆している。

2-2-7. 内皮で発現するSCRはPHBの発現制御を介して細胞非自律的に中心柱の機能発現に関与する

scr 変異体においては、維管束組織に発現が限定化されていた PHB が、内鞘にまでその発現が拡大していた (Fig. 10A, C)。この結果から、SCR が PHB の発現制御を介し、中心柱における発生過程に機能している可能性が考えられる。そこで、マイクロアレイを用いた網羅的転写解析を行い、*scr* 機能欠損によって、その発現量が 25%以下に低下する 114 遺伝子を抽出した (Table. 2) (具体的な手法は、材料と方法を参照)。114 遺伝子には、*scr* 変異体で転写産物の蓄積レベルの低下が実証されている遺伝子群 (WOX5, At3g11260.1; CLE4, At2g31081.1; CLE7, At2g31082.1; SCR, At3g54220.1)が含まれていた (Table. 2A-C, 赤字) (Cui et al. 2007, Sarkar et al. 2007) (池田 洋一 修士論文, 2008)。その他の遺伝子として、中心柱において維管束形成に機能する *ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6 (AHP6)* の転写産

物の蓄積量が *scr* 変異によって著しく減少する事を見出した (Table. 2A, 三角印)。そこで、*AHP6* プロモーター/レポーター系統 (*pAHP6::mGFP5ER*) (Mahonen et al. 2006) を用いて、*scr* 機能欠損体における *AHP6* の発現を確かめた。*j23-1* 系統は、*SCR* コード領域にナンセンス変異 (W 142 Stop) が生じていることから、*SCR* 機能が完全に欠損していると考えられる。野性型植物においては、*pAHP6::mGFP5ER* は原生木部とそれに接する内鞘細胞で発現が確認されるのに対し (Fig. 15A) (Bonke et al. 2003)、*j23-1* 系統では、原生木部に接する内鞘細胞では *GFP* 蛍光が検出されず、原生木部細胞において微弱な *GFP* 蛍光が検出された (Fig. 15B)。また、qRT-PCR 解析の結果、*scr-5* 変異体において、野生型と比べ、*AHP6* 転写産物が著しく低下していた (Fig. 15D)。さらに、*phb-1d/+* 変異体においても、*pAHP6::mGFP5ER* の発現レベルが著しく低下していた (Fig. 15C)。また、横断面においては、3 細胞群 (1 つの原生木部細胞と 2 つの内鞘細胞) で *GFP* 蛍光が検出されるのに対し、*phb-1d/+* 変異体では、ほとんどの場合、原生木部細胞もしくは内鞘細胞のうち 1 細胞のみで微弱な *GFP* 蛍光が観察された (65.4%)、もしくは、全く検出できなかった (23.1%) (n = 26) (Fig. 15C)。*scr* 変異体では *PHB* が内鞘細胞で異所的に発現している事を考慮すると、*scr* 変異体と *phb-1d/+* 変異体の内鞘細胞において、共に *AHP6* の発現低下していた事は、*SCR* が *PHB* の発現抑制を介して、細胞非自律的に内鞘細胞における *AHP6* の発現の維持に機能している事を示唆する。

根における内鞘細胞の特徴として、オーキシン処理による並層分裂が挙げられる。更に、*scr* 変異体における内鞘の機能変化をさらに明らかにするために、オーキシン処理による内鞘細胞の分裂誘導を野生型植物と比較した。あらかじめ *NPA* 処理をした植物体を $10\mu\text{M}$ *NAA* で処理し、20 時間後に、基部側分裂組織 (basal meristem : *BM*) における内鞘の並層分裂を観察した。その結果、*scr-3* 変異体では、*BM* における並層分裂が著しく阻害されていた (Fig. 16A, B)。この結果は、*scr* 変異体の内鞘細胞が、*AHP6* の発現異常のみならず、オーキシンに応答した並層分裂にも異常をもつ事を示している。

2-2-8. 胚発生期及び本葉の発生段階において *MIR165A* の発現は *SCR* に依存しない

SHR/SCR 経路は胚発生期においても内皮形成に機能する (Wysocka-Diller et al. 2000)。*MIR165A* の転写誘導が胚発生期においても *SCR* に依存するかを確かめるために、野生型植物、*scr-3* 変異体の胚における *pMIR165A::mGFP5ER* の発現様式を解析した (Fig. 17)。野生型球状胚では原表皮の lower-tire (*lt*) 領域において強い *GFP* 蛍光が確認された (Fig. 17A、括弧 *lt-Pr*)。また、初期心臓型期においては、原表皮の *lt* 領域に加え、子葉予

定領域の背軸側原表皮で弱い GFP 蛍光が観察された (Fig. 17B、矢印)。さらに、魚雷型胚においては、It 領域の原表皮と子葉の背軸側原表皮に加え、基本組織において GFP 蛍光が観察されたが、その発現は内皮限定的ではなく、基本組織全体で同等な強度の GFP 蛍光が検出された (Fig. 17C、GT)。これら発現様式は、*scr-3* 変異体においても、同様であった (Fig. 17D-F)。成熟型 miR165/166 は、発達中の本葉で蓄積していることが報告されている (Kidner and Martienssen 2004, Li et al. 2005)。そこで、発達中の本葉における *MIR165A* の発現と、その発現に対する SCR 機能の依存性を確かめた。野生型背景では、本葉の背軸側表皮で *pMIR165A::mGFP5ER* の強い発現が観察された (Fig. 17G)。また、この発現は、*scr-3* 変異体においても同様であった (Fig. 17H)。これらの結果は、胚発生期と本葉発達過程における *MIR165A* の転写は、RM とは異なり、SCR 機能に依存しないことを示す。

2-2-9. PHB 発現制御に対する AGO1 と SCR の効果は異なる

第 1 章において、RM 放射パターン形成における AGO1 の機能を議論した。そこで、PHB の発現制御に対する AGO1 の機能を解析した。*ago1-101* 変異体では、基本組織、表皮、側部根冠において、異所的な PHB-GFP の発現が確認されたが、この異所的な PHB-GFP 蛍光は、散在的であった (Fig. 10E、三角印)。また、野生型植物と同様に、中心柱においては中心部から周辺部に沿った GFP 蛍光強度の勾配が観察され、内鞘においてははっきりとした GFP 蛍光が検出される *scr* 変異体とは異なっていた (Fig. 10C, E の Pe を比較)。さらに、*ago1-101* 変異体での PHB-GFP 発現様式は、野生型背景における PHBmu-GFP の発現とも明らかに異なっていた (Fig. 10B, E)。*ago1-101 scr-3* 二重変異体においては、RM 全体に PHB-GFP の発現は観察された (Fig. 10F)。この結果は、*ago1-101 scr-3* 二重変異体においては、*ago1* 変異と *scr* 変異の効果相加的に現れることを示唆する。

以上、第 2 章の結果をまとめる。本章では、まず、miR165/166 耐性変異体をもつ *phb-1d* 変異体アリルと PHBmu-GFP 形質転換体の皮層細胞に余剰な並層分裂がみられる事を示した。この結果から、miR165/166 による PHB の発現制御が RM 基本組織のパターン形成に必須であることを示した。

野生型背景において PHB-GFP は維管束組織で特異的に発現していたのに対し、miR165/166 耐性型である PHBmu-GFP は、維管束組織より外層の、内鞘、内皮、皮層においても発現がしていた。この結果は、PHB 発現領域は、miR165/166 の機能によって、維管束組織に限定化されている事を強く示唆する。

さらに、SCR 機能欠損により PHB 発現領域が内鞘細胞層まで拡張するこ

とを見出した。miR165 をコードする *MIR165A* 遺伝子は SCR 機能に依存的に内皮で転写され、*scr* 変異体では成熟型 miR165/166 の蓄積量が減少していた。さらに、PHBmu-GFP と *MIR165A-mu* の二重形質転換体における GFP 蛍光の発現解析から、内皮で発現する *MIR165A* 遺伝子が、中心柱での PHB 発現を制御する可能性を示した。

さらに、*scr* 変異体では中心柱における *AHP6* 遺伝子の発現が著しく低下していた。*scr* 変異体で PHB-GFP の発現領域が拡張する事、また、*phb-1d* 変異体においても *AHP6* 遺伝子の発現レベルが低下することを考慮すると、内皮で発現する SCR は、PHB 発現制御を介して、細胞非自律的に中心柱の発生に機能している事が強く示唆された。

2-3. 考察

シロイヌナズナの根では、中心柱組織の外層に隣接して1層の内皮が形成される。この過程においては、中心柱から内皮へのSHRの細胞間移行が組織間相互作用を担う分子機構であり、これによって1層の内皮形成(内皮細胞層の形成とその後の細胞分化)が正確に行われることが実証されている(Helariutta et al. 2000, Nakajima et al. 2001, Cui et al. 2007)。また、基本組織内で形成されるSHR-SCR転写因子複合体自体が、細胞自律的に内皮細胞層分化を誘導すると考えられている(Heidstra et al. 2004, Sena et al. 2004)。

本研究では、内皮で発現するSCRが中心柱でのPHB発現を維管束部位に限定化するという新たな細胞非自律的制御を見出した。この細胞非自律的なSCRの機能がmiR165/166によって仲介されていることが以下の4つの実験結果から支持される。まず、(1) SCR機能欠損は、PHBの発現領域を中心柱の周辺部にまで拡張させた。この発現パターンは、miR165/166耐性をもつPHBの発現パターンと類似していた。さらに、(2) miR165をコードするMIR165A遺伝子が、SCR機能に依存的に内皮細胞層で転写され、(3) scr機能欠損体では成熟型miR165/166の蓄積量が低下していた。加えて、(4) miR165/166耐性型PHB(PHB_{mu})と、それに対して抑制機能を持つと考えられるMIR165A-muを用いた解析から、RMの内皮で発現するMIR165A遺伝子が、中心柱側におけるPHBの発現を制御することが示唆された。これらの結果から、SCRが、少なくともMIR165A遺伝子を含むMIR165/166遺伝子の転写制御を介して、中心柱でのPHB発現領域を細胞非自律的に限定化するという、「内皮から中心柱」への新奇な組織間相互作用の存在が強く示唆される(Fig. 18)。AHP6の発現解析から、scr機能欠損体での内鞘細胞が正常な細胞特徴を獲得できていないことが示された。phb-1d変異体においてもAHP6遺伝子の発現レベルが低下することを考慮すると、SCRによるAHP6の発現維持は、少なくとも一部はPHBの発現抑制を介することで制御されていると考えられる。

内皮で発現するMIR165A遺伝子が、細胞非自律的に中心柱においてPHBの発現を制御する分子機構は、全く不明である。これまでの研究から、siRNAやtrans acting siRNA(tasi-RNA)に関しては、その細胞非自律的な作用が報告されているが(Dunoyer et al. 2007, Nogueira et al. 2007, Tretter et al. 2008)、miRNAにおいては現在までに報告はない。最も単純なモデルとしては、内皮で産出された成熟型miR165/166が拡散もしくは積極的な輸送を介して中心柱組織に移動する事が考えられる。今後、miR165/166の組織内での可視化や、植物組織の一部でMIR165/166を発現する植物を利用したmiR165/166の機能範囲の詳細な解析が必要である。

scr 変異体では PHB の発現領域は内鞘にとどまっていたが、野生型背景における miR165/166 耐性型 PHB の発現は、さらに外層の内皮/皮層まで拡大していた。また、*scr* 変異体内においても、野生型 30%程度の miR165/166 の蓄積していた。これらの結果から、SCR と独立した経路が miR165/166 の蓄積を促進し、PHB の発現領域の限定化に機能している可能性が考えられる。miR165/166 耐性型 *phb-1d* 変異体や PHBmu-GFP 形質転換体では、皮層細胞に余剰な並層分裂が観察され、皮層における異所的な SHR-GFP の蓄積が検出された。つまり、PHB に対する miR165/166 制御を完全に消失させると、中心柱組織だけでなく、基本組織においても放射パターン形成の異常が引き起こされることを意味している。QC と CEI で発現する C2H2 型 zinc finger タンパク質である JACKDAW (JKD) は、SHR-SCR とのタンパク質相互作用を介して、SHR の機能範囲を内皮に限定化する。また、*jkd* 機能欠損体の、皮層では余剰な並層細胞分裂と異所的な SHR タンパク質の蓄積が生じることが報告されている (Welch et al. 2007)。つまり、miR165/166 耐性型 PHB 植物体 (*phb-1d* 変異体や PHBmu-GFP 形質転換体) と *jkd* 機能欠損体の表現型に類似点が存在する。miR165/166 耐性型 PHB と JKD との相互関係を明らかにすることで、中心柱以外の組織における PHB の発現抑制の生理学的意義が明らかになると考えられる。

地上部の側生器官や胚珠の向背軸形成においても、miR165/166 を介した HD-ZIP III 遺伝子群の発現制御が必須である (McConnell et al. 2001, Sieber et al. 2004)。興味深いことに、胚発生や本葉の発達過程における、MIR165A 遺伝子の発現は、RM と異なり、SCR に依存的していなかった。つまり、各発生現象において、様々な転写調節系が MIR165A 遺伝子の発現制御を介して、HD-ZIP III 遺伝子群の発現領域を限定化していると考えられる。今後、MIR165A 遺伝子の発現を指標とした変異体スクリーニングや、MIR165A プロモーターのシス配列やそれに結合するトランス因子の同定などを通じて、様々な発生現象で機能する HD-ZIP III 遺伝子群の上流制御系が明らかになると考えられる。

第 1 章において、RM での放射パターン形成における AGO1 の機能を記述した。本章において、miR165/166 耐性型 PHB 植物体において、基本組織パターン形成に異常が観察されたことから、PHB 遺伝子は第 1 章で提唱した基本組織形成に異常を引き起こす miRNA 標的遺伝子の 1 つと考えられる。しかしながら、以下の 3 点において、miR165/166 耐性型 *phb* 植物体と *ago1* 変異体の表現型に大きな相違点がある。まず、(1) miR165/166 耐性型 *phb* 植物体では、皮層に並層細胞分裂が観察されたのに対し、*ago1* では、内皮細胞において並層分裂が観察された。また、miR165/166 耐性型 *phb* 植物体では、同心円状細胞パターンは正常であった。また、(2) *phb-1d* 変異体では、SHR の異

所的な蓄積が観察されたが、*ago1* 変異体では、SHR の発現に異常は観察されなかった。さらに、(3) *ago1* 変異体における PHB の発現様式は miR165/166 耐性型 PHB の発現様式と大きく異なっていた。この事は、AGO1 による PHB の発現抑制が miR165/166 を介した直接的な制御 (mRNA の切断や翻訳阻害) のみならず、*HD-ZIP III* 遺伝子を含む他の miRNA 標的遺伝子の発現を介した間接的な機構によっても調節されていることを示唆している。これらの遺伝子間の相互作用関係を明らかにすることで、根の放射パターン形成における複雑なシグナルネットワークを解明することが出来るであろう。

第 3 章 -今後の展望 -

維管束植物に広く存在する放射パターンを理解するために、本研究では、シロイヌナズナの根をモデルケースとし、その放射パターン形成の分子基盤を解明する事を目標とした。本章では、本論文の結果から想定される新たな研究題材について記述する。

これまでに、GRAS 型転写因子 SHR と SCR による内皮形成機構が精力的に研究されてきた。本論文の第 1 章の研究結果は、RM における基本組織形成において、少なくとも 1 つの SHR/SCR と独立する経路が、基本組織形成を正に制御する事を示唆する。しかしながら、SHR/SCR 経路が機能している状態では、たとえそちらの経路に変異を生じさせても、変異体スクリーニングで単離できるほどの顕著な表現型を示さない可能性がある。*shr/scr* 変異体のエンハンサースクリーニングが、新たな基本組織形成の分子機構を解くことに有効な手段だと考えられる。

第 2 章の研究結果から、基本組織と中心柱の間の双方向性の組織間相互作用の存在が明らかになった。非常に興味深いことに、この双方向性の組織間相互作用に機能している遺伝子群 (*SHR*、*SCR*、*MIR165/166*、*PHB*)は、シロイヌナズナのみならず、様々な維管束植物で共通して存在し、シロイヌナズナの場合と同様の発生過程で機能している例も報告されている (Sassa et al. 2001, Tian et al. 2004, Lim et al. 2005, Prigge and Clark 2006, Cui et al. 2007, Axtell and Bowman 2008, Itoh et al. 2008)。本論文で提唱した双方向性の組織間相互作用が、維管束植物の種間でどのくらい保存された分子機構であるか、また、この組織間相互作用の有無がどのような進化発生学的な意味をもたらすのかを明らかにする事は、維管束植物の放射パターンにおける一般性と特殊性を理解するのに非常に有用な糸口となると思われる。

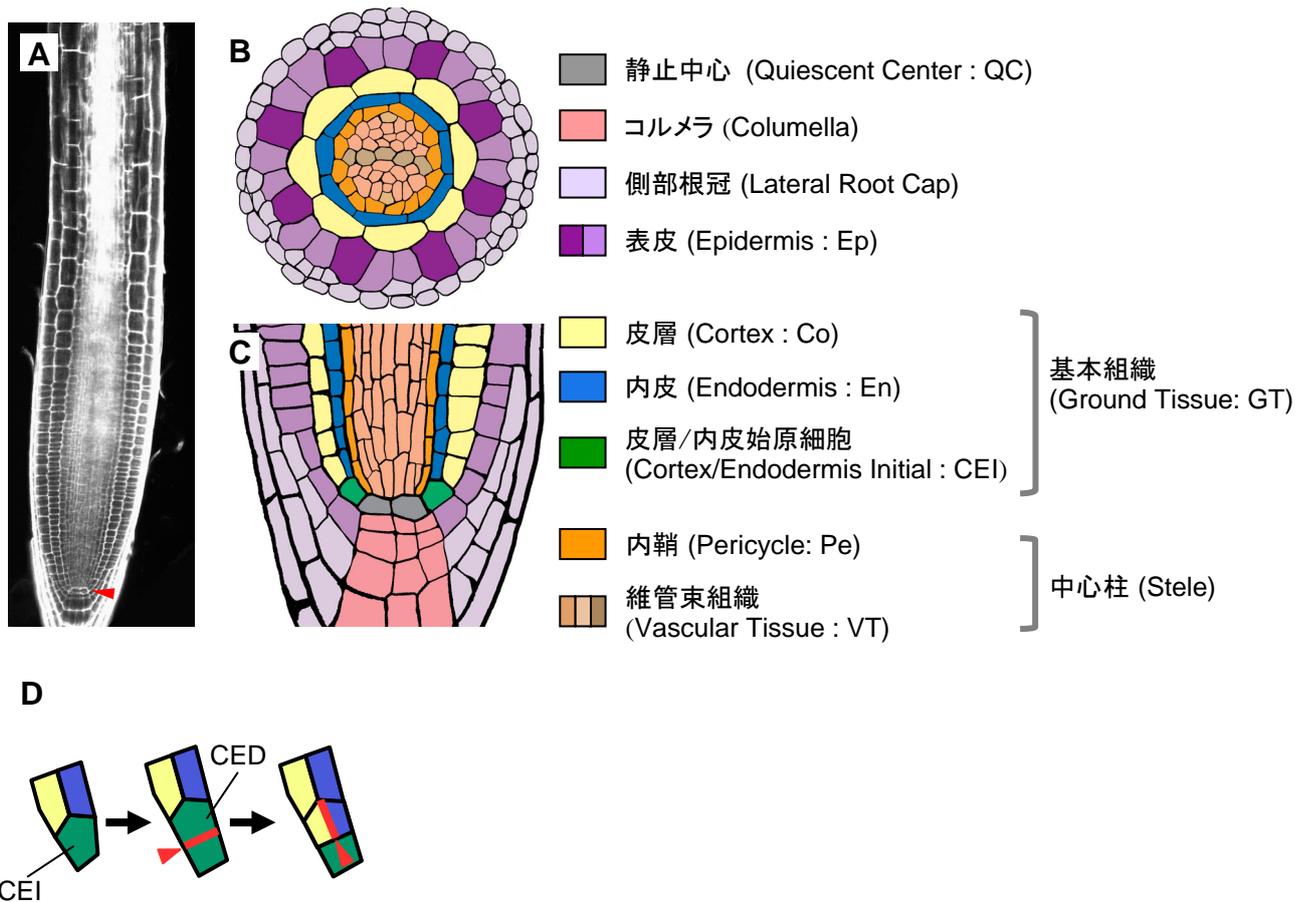


Figure 1. シロイヌナズナの根端分裂組織 (root meristem : RM) の組織構造

(A) シロイヌナズナ根端部の細胞構造。三角印は静止中心 (quiescent center : QC) の位置を示す。
 (B-C) RMの横断面 (B) と縦断面 (C) の組織パターンの模式図。それぞれの組織名と略称を記載した。
 (D) CEIにおける一連の細胞分裂様式の模式図。

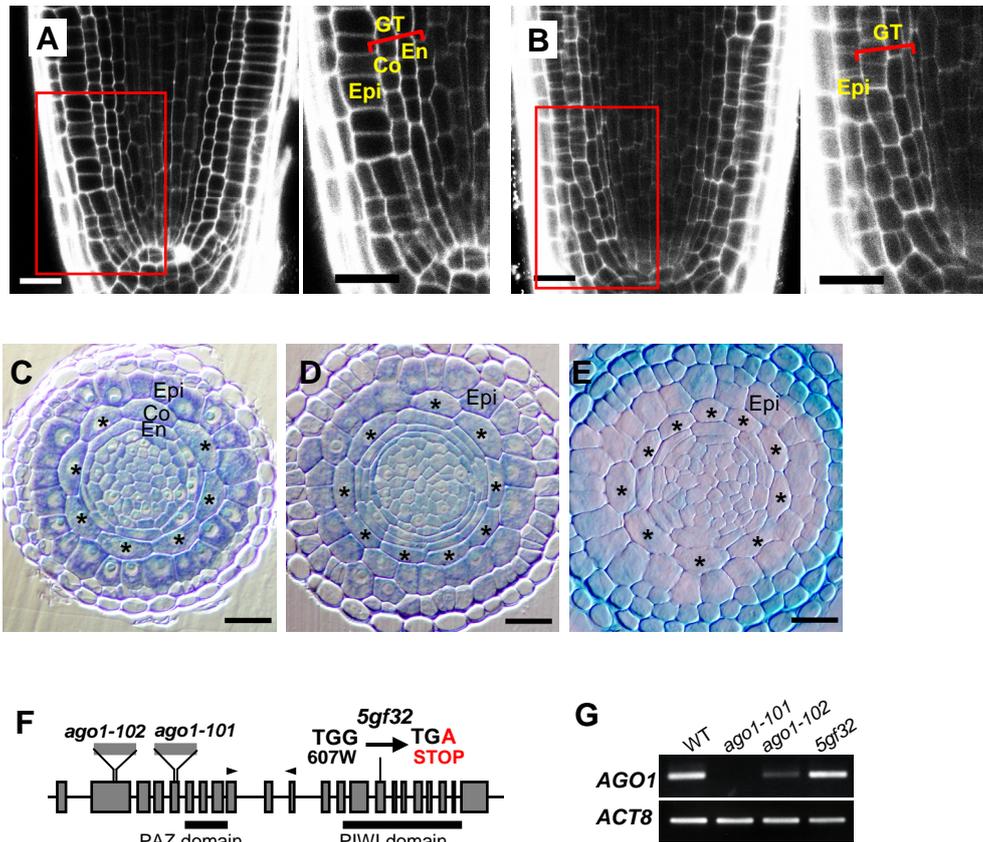


Figure 2. miRNAの介する遺伝子発現制御系はシロイヌナズナRMにおける放射パターン形成に必須である。

(A-B) 発芽4日後の野生型植物 (A) と *5gf32* 変異体 (B) のRMの縦断面の共焦点画像。

(C-E) 発芽4日後の野生型植物 (C) 、 *5gf32* 変異体 (D) 、 *hyll-2* 変異体 (E) のRMの横断切片。星印は皮層細胞を示す。

(F) AGO1遺伝子模式図と、それぞれの系統における変異箇所。下線は保存されたPAZドメインとPIWIドメインをコードしている領域を示す。三角印はAGO1の発現解析に用いたプライマーの設計箇所を示す。

(G) RT-PCR法を用いた各系統におけるAGO1転写産物の蓄積量の解析。ACTIN8 (ACT8) をコントロールとして用いた。

GT, 基本組織; Co, 皮層; En, 内皮; Epi, 表皮, Scale bars, 20 μ m



Figure 3. *5gf32*変異体の地上部は、*ago1*機能欠損体と同様の表現型を示す。

(A-D) 発芽10日後の野生型植物 (A)、*5gf32*変異体 (B)、*ago1-101*変異体 (C)、*ago1-102*変異体 (D)。*5gf32*変異体 *ago1-101*変異体 *ago1-102*変異体は、既知の*ago1*機能欠損体の表現型と類似する (Bohmert et al. 1998)。

Scale bars, 2mm

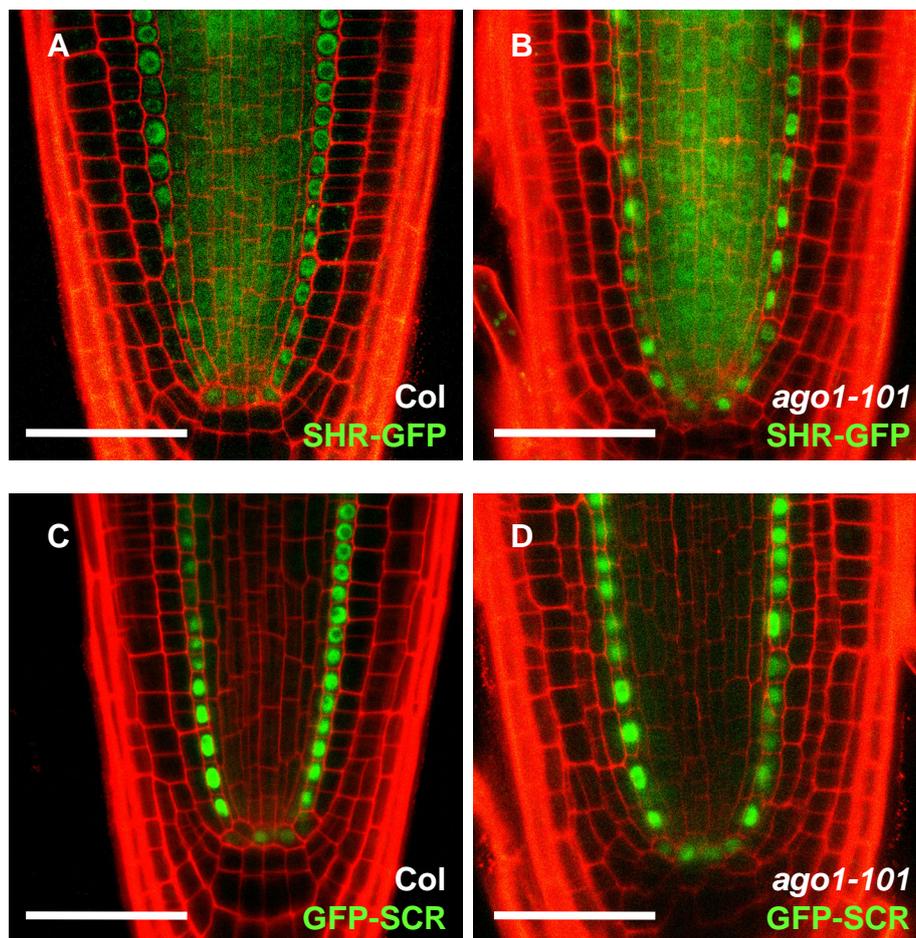


Figure 4. AGO1機能欠損は、SHR/SCRの発現様式を変化させない。

(A-B) 野生型 (A) と *ago1-101* 変異体 (B) における SHR-GFP 融合タンパク質の発現
 (C-D) 野生型 (C) と *ago1-101* 変異体 (D) における GFP-SCR 融合タンパク質の発現

Scale bars, 50 μm

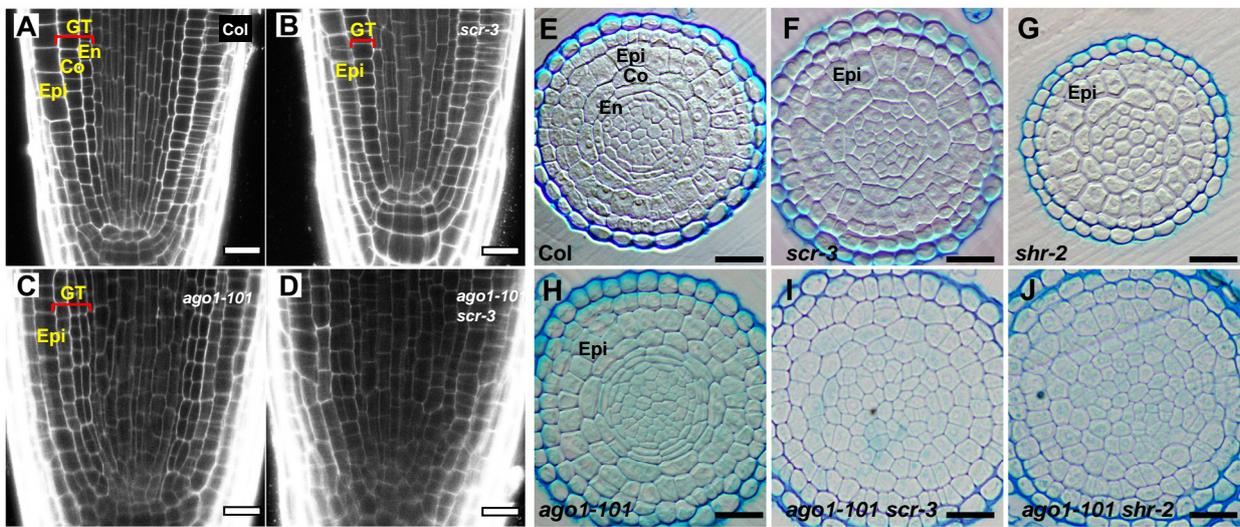


Figure 5. *shr/scr*変異体背景でAGO1機能を欠損すると、新奇な放射パターン異常を引き起こす。

(A-D) 発芽4日後の野生型植物 (A)、*scr-3*変異体 (B)、*ago1-101*変異体 (C)、*ago1-101 scr-3*二重変異体 (D)のRMにおける縦断面の共焦点画像。

(E-J) 発芽4日後の野生型植物 (E)、*scr-3*変異体 (F)、*shr-2*変異体 (G)、*ago1-101*変異体 (H)、*ago1-101 scr-3*二重変異体 (I)、*ago1-101 shr-2*二重変異体 (J)の横断切片。

GT,基本組織; Co,皮層; En,内皮; Epi,表皮, Scale bars, 20 μ m

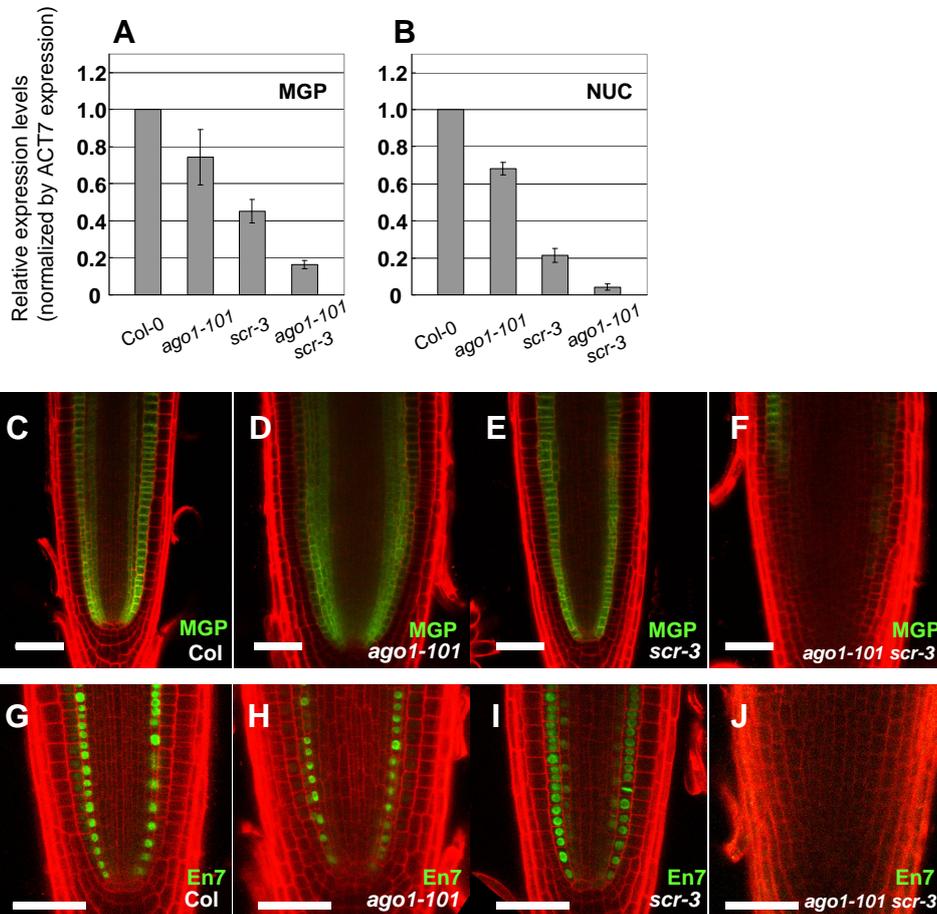


Figure 6. AGO1とSCR機能を同時に欠損すると、基本組織の特徴が著しく損失する。

(A,B) qRT-PCR法を用いたMGP遺伝子 (A) とNUC遺伝子 (B) の転写産物の蓄積量の解析。

(C-F) 野生型植物 (C)、*ago1-101*変異体 (D)、*scr-3*変異体 (E)、*ago1-101 scr-3* 二重変異体 (F) の各遺伝子型背景における *pMGP::mGFP5ER* の発現様式。

(G-J) 野生型植物 (G)、*ago1-101*変異体 (H)、*scr-3*変異体 (I)、*ago1-101 scr-3* 二重変異体 (J) の各遺伝子型背景における *En7*内皮マーカの発現様式。

Scale bars, 50 μ m

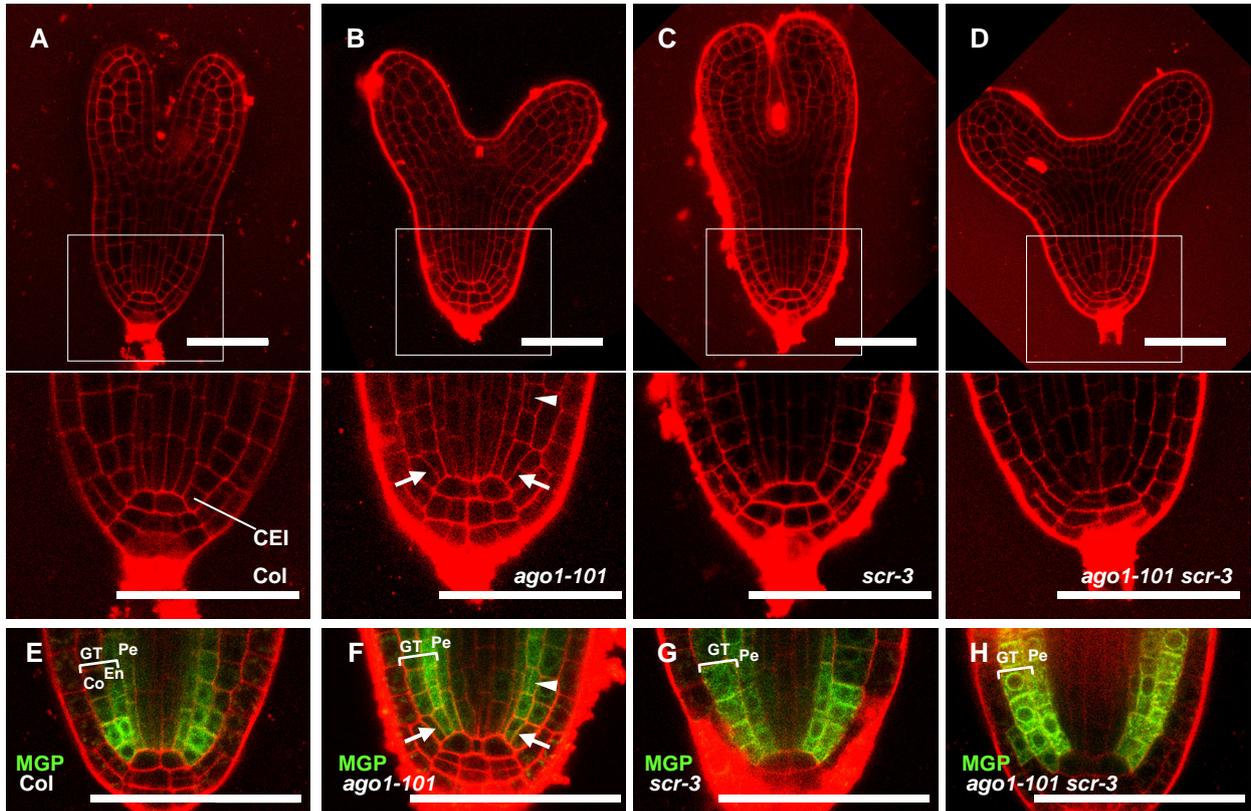


Figure 7. 胚発生期における *scr* 変異体背景での AGO1 機能の欠損は、さらなる基本組織の特徴の消失を引き起こさない。

(A-D) 野生型植物 (A)、*ago1-101* 変異体 (B)、*scr-3* 変異体 (C)、*ago1-101 scr-3* 二重変異体 (D) の魚雷型胚における細胞パターン。

(E-H) 野生型植物 (E)、*ago1-101* 変異体 (F)、*scr-3* 変異体 (G)、*ago1-101 scr-3* 二重変異体 (H) の魚雷型胚における *pMGP::mGFP5ER* の発現。(B,F) における矢印は、CEI で生じた余剰な並層分裂を、また、三角印は基本組織の内層側で起きる散発的な余剰並層分裂を示した。

GT, 基本組織; Co, 皮層; En, 内皮; Pe, 内鞘, CEI, 皮層/内皮始原細胞 Scale bars, 50 μ m

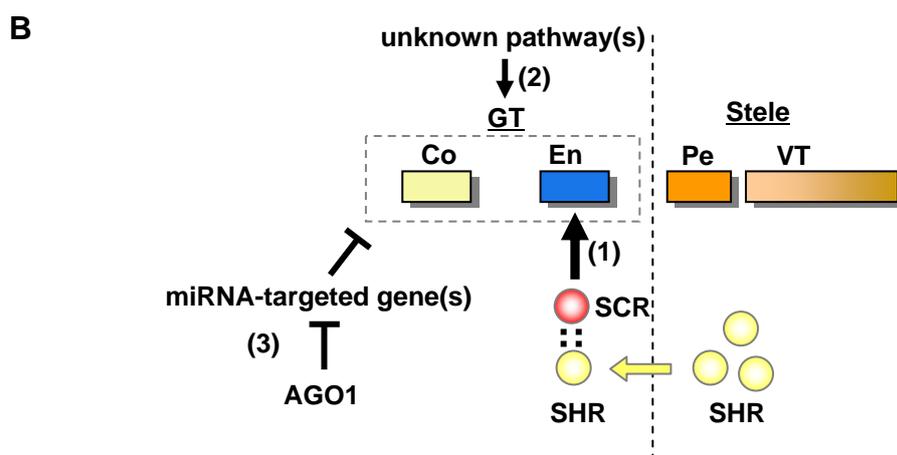
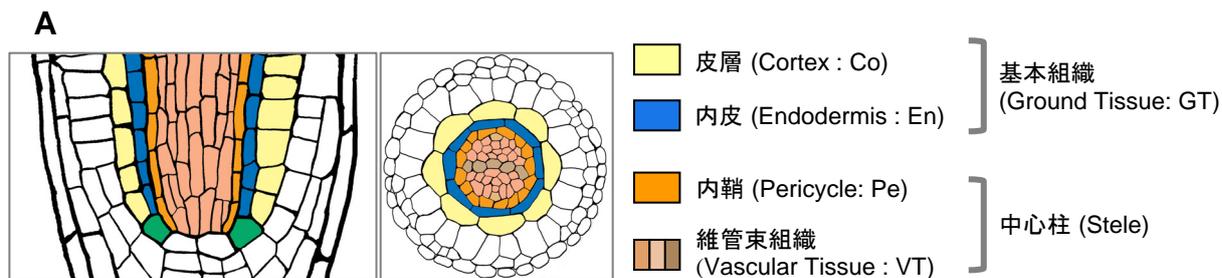


Figure 8. シロイヌナズナRMの基本組織形成における制御系のモデル

(A) シロイヌナズナRMにおける中心柱とそれを取り囲む基本組織の、縦断面と横断面の模式図。それぞれ組織を色分けし、名称と略称を記載した。

(B) シロイヌナズナRMの基本組織 (GT) の形成において想定される3種類の制御経路を記載した。

Gene Name	Description	Fold increase in ago1	miRNA
At2g33810.1	squamosa promoter-binding protein-like (SPL)	57.73965359	miR156a,b,c,d,e,f,g
At1g27370.1	squamosa promoter-binding protein-like (SPL)	17.30281303	miR156a,b,c,d,e,f,g,h:miR157a,b,c,d
At1g53160.1	squamosa promoter-binding protein-like (SPL)	7.987598007	miR156a,b,c,d,e,f,g,h:miR157a,b,c,d
At3g57920.1	squamosa promoter-binding protein-like (SPL)	6.738784317	miR156a,b,c,d,e,f,g,h:miR157a,b,c,d
At2g42200.1	squamosa promoter-binding protein-like (SPL)	6.734592417	miR156a,b,c,d,e,f,g,h:miR157a,b,c,d
At5g43270.1	squamosa promoter-binding protein-like (SPL)	4.788138984	miR156a,b,c,d,e,f,g,h:miR157a,b,c,d
At1g69170.1	squamosa promoter-binding protein-like (SPL)	2.658103429	miR156a,b,c,d,e,f,g,h:miR157a,b,c,d
At1g27360.1	squamosa promoter-binding protein-like (SPL)	1.843874632	miR156a,b,c,d,e,f,g,h:miR157a,b,c,d
At1g64100.1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	3.581709105	miR158a
At1g77850.1	transcriptional factor B3 family protein, ARF17	5.514738352	miR160a,b,c
At1g63150.1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	7.100519727	miR161.1a:miR161.2a
At1g62670.1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	5.377468117	miR161.1a:miR161.2a:miR400a
At1g63130.1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	5.311461874	miR161.1a:miR161.2a:miR400a
At1g63080.1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	3.122041017	miR161.1a:miR161.2a:miR400a
At1g63400.1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	3.085011893	miR161.1a:miR161.2a:miR400a
At1g62930.1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	2.210833087	miR161.1a:miR161.2a:miR400a
At1g63330.1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	2.964267487	miR161.2a:miR400a
At1g62590.1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	2.925990693	miR161.2a:miR400a
At1g66700.1	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase	32.50020527	miR163a
At1g66690.1	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase	2.05835214	miR163a
At3g15170.1	cup-shaped cotyledon1, CUC1	12.94909464	miR164a,b,c
At5g53950.1	cup-shaped cotyledon2, CUC2	10.51222312	miR164a,b,c
At5g0690.1	homeodomain-leucine zipper protein Revoluta (REV)	2.093811515	miR165a,b:miR166a,b,c,d,e,f,g
At1g30490.1	homeobox-leucine zipper transcription factor (HB-9)	2.079496859	miR165a,b:miR166a,b,c,d,e,f,g
At2g34710.1	homeobox-leucine zipper transcription factor (HB-14)	1.907676752	miR165a,b:miR166a,b,c,d,e,f,g
At3g20910.1	CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA)	3.209570202	miR169a,b,c,d,e,f,g
At1g72830.1	CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA)	12.51694748	miR169a,b,c,h,i,j,k,l,m,n
At1g17590.1	CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA)	6.824260393	miR169a,b,c,h,i,j,k,l,m,n
At1g54160.1	CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA)	5.270986917	miR169a,b,c,h,i,j,k,l,m,n
At3g05690.1	CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA)	12.11568013	miR169b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n
At4g18390.1	TCP family transcription factor	27.40908802	miR319a,b,c
At3g15030.1	TCP family transcription factor	23.47887507	miR319a,b,c
At1g30210.1	TCP family transcription factor	15.62241806	miR319a,b,c
At1g53230.1	TCP family transcription factor	3.648844364	miR319a,b,c
At2g31070.1	TCP family transcription factor	2.020046011	miR319a,b,c
At5g10180.1	sulfate transporter	4.372445292	miR395a,b,c,d,e,f
At4g24150.1	AtGRF8 (GROWTH-REGULATING FACTOR 8)	9.682147328	miR396a,b
At2g22840.1	AtGRF1 (GROWTH-REGULATING FACTOR 1)	2.028768106	miR396b
At1g31280.1	ARGONAUTE2	6.440299236	miR403a
At2g02850.1	ARPN (PLANTACYANIN); copper ion binding	1.935220352	miR408a
At3g22700.1	F-box family protein	2.718597169	miR774a:miR859a
At3g57230.1	MADS-box protein (AGL16)	7.083412463	miR824a
At1g52050.1	jacalin lectin family protein	2.395750139	miR846a
At1g52060.1	jacalin lectin family protein	2.03142534	miR846a
At1g52070.1	jacalin lectin family protein	2.014853639	miR846a
At1g60110.1	jacalin lectin family protein	1.955359291	miR846a

Table 1. ago1変異体の根において、発現量が上昇するmiRNA標的遺伝子群。

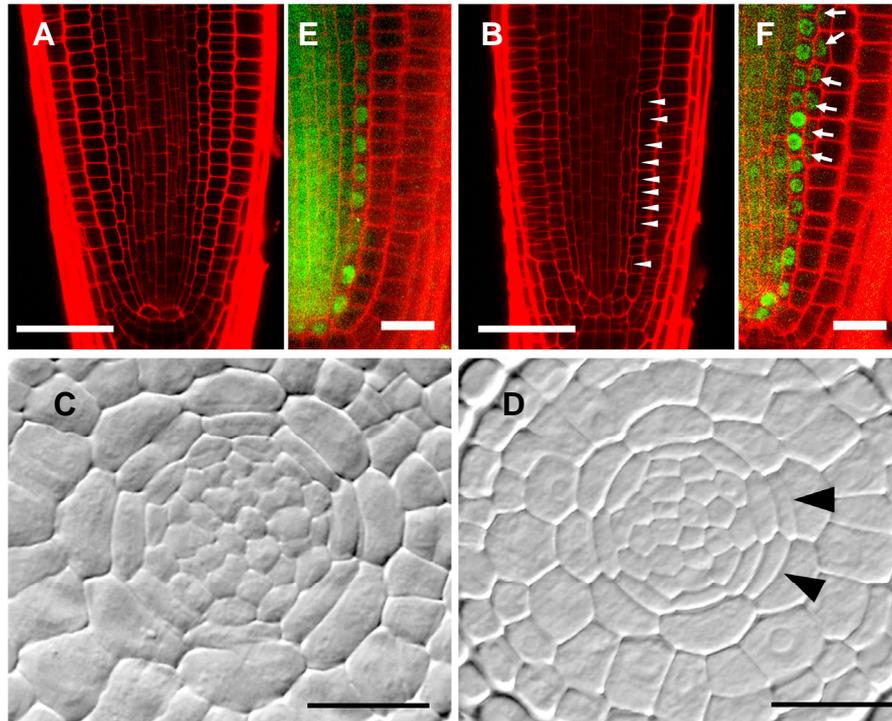


Figure 9. *PHABULOSA* 遺伝子の miR165/166 を介する発現制御は、RM における正常な放射パターン形成に必須である。

(A-D) 野生型植物 (A,C) と、*phb-1d/+* 変異体 (B,D) の RM の細胞パターン。縦断面の共焦点像 (A,B) と、横断面像 (C,D)。三角印は皮層細胞において生じた余剰な並層分裂を示す。

(E,F) 野生型植物 (E) と、*phb-1d/+* 変異体 (F) における SHR-GFP の局在。矢印は、余剰細胞層における異所的な SHR-GFP を示す。

Scale bars, (A,B) 50 μm, (C-F) 20 μm

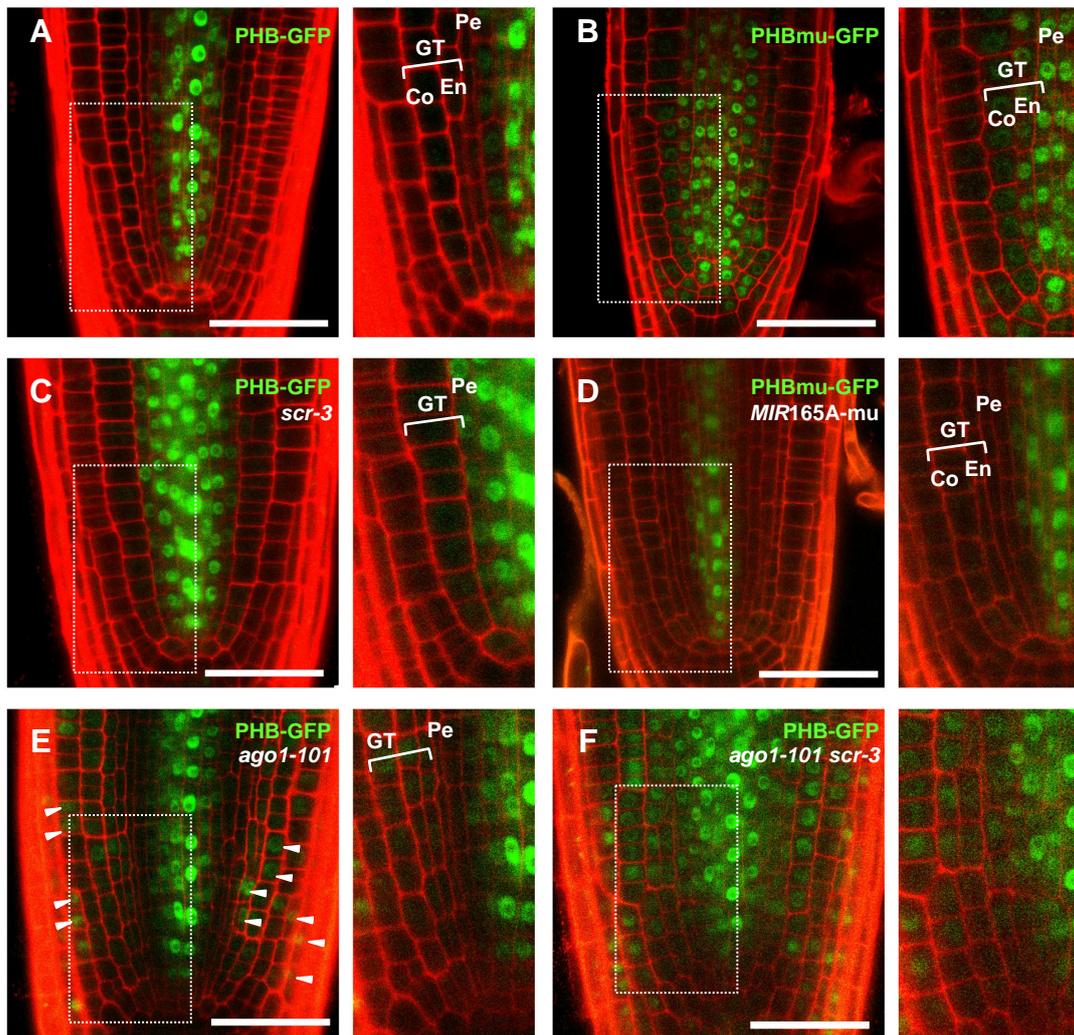


Figure 10. PHB-GFP融合タンパク質を用いた発現解析

(A) 野生型背景におけるPHB-GFPの発現。

(B) miR165/166耐性PHBmu-GFPの発現。

(C) *scr-3*変異体におけるPHB-GFPの発現。

(D) miR165/166耐性PHBmu-GFPとMIR165A-muの二重形質転換体におけるPHBmu-GFPの発現。

(E-F) *ago1-101*変異体 (E)、*ago1-101 scr-3*二重変異体 (F)におけるPHB-GFPの発現様式。(E)の三角印は、散発的に発現する異所的なPHB-GFPの発現を示す。

GT,基本組織; Co,皮層; En,内皮; Pe,内鞘, CEI,皮層/内皮始原細胞 Scale bars, 50 μ m

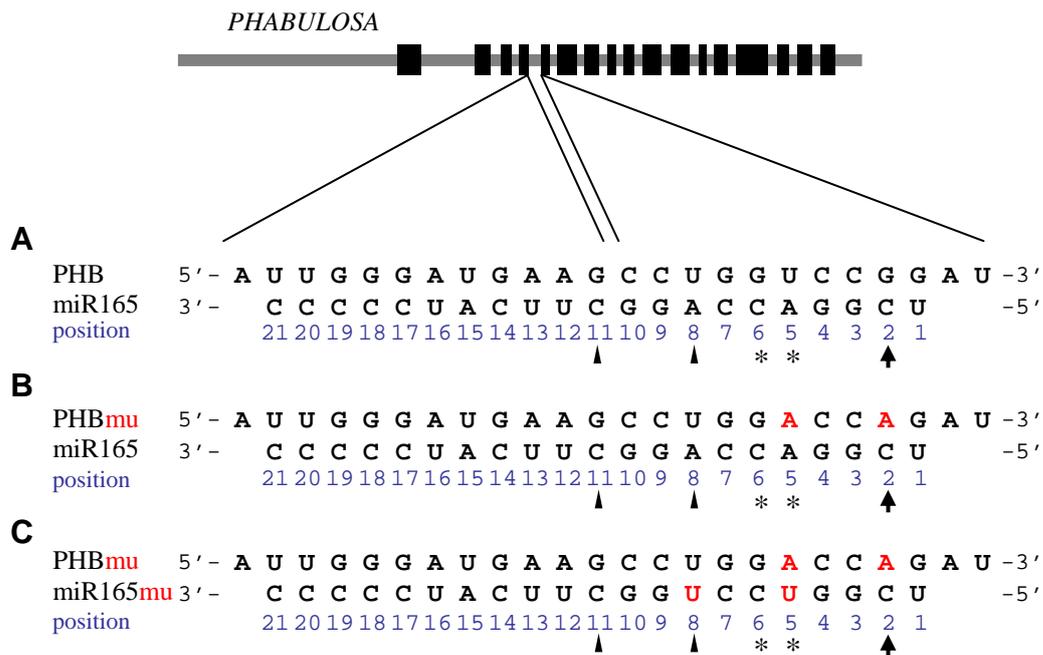


Figure 11. *PHB*遺伝子のmiR165/166相補配列とmiR165配列の概要

*PHB*遺伝子のmiR165相補配列とmiR165の配列を記載した。miR165の5'端からのpositionを、配列の下に青字で示した。

過去の研究から、position 5, 6 (星印) におけるミスマッチが、*in vitro*において、*PHB*転写産物の切断効率の著しい低下を引き起こし、植物体において本葉の向軸化を誘導することが証明されている。また、position 8, 11 (三角印) のミスマッチは、*PHB*転写産物の切断効率の著しい阻害や本葉の向軸化を引き起こさず、さらに、position 2 (矢印) に関しては、*PHB*転写産物の切断効率に全く影響しないことが報告されている (Mallory et al. 2004)。

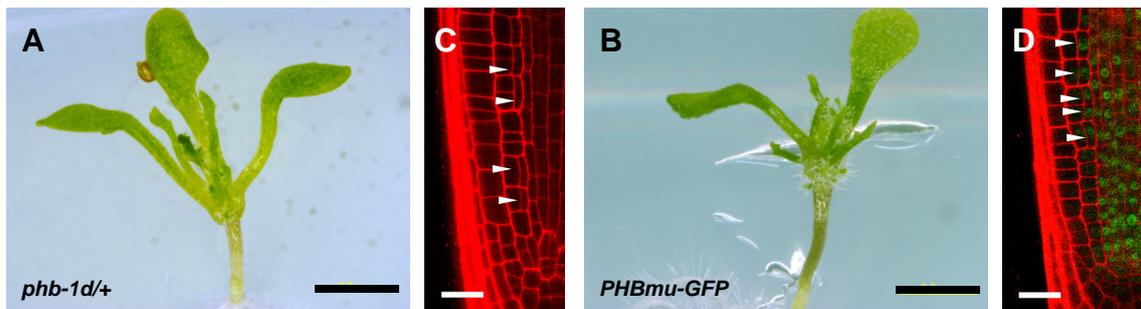


Figure 12. *phb-1d/+*変異体とPHBmu-GFP形質転換体の比較。

(A,B) *phb-1d/+*変異体 (A)、PHBmu-GFP形質転換体 (B)地上部の表現型。ともに棒状の本葉を形成する。

(C,D) *phb-1d/+*変異体 (C)、PHBmu-GFP形質転換体 (D) は共に皮層細胞に余剰な並層分裂が観察される (三角印)。

Scale bars, (A,B) 2mm, (C,D) 20 μ m

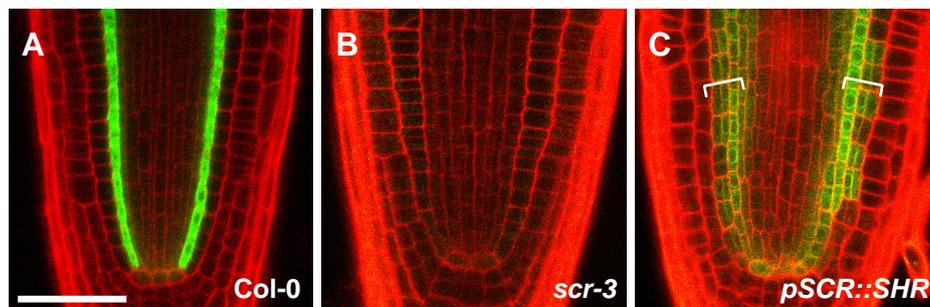


Figure 13. MI165AはSCR依存的に内皮で特異的に転写される。

(A-C) 各遺伝子型背景における*pMIR165A::mGFP5ER*の発現様式。野生型植物(A)、*scr-3*変異体(B)、*pSCR::SHR*形質転換体(C)。(C)における括弧は拡張した内皮細胞層をしめす。

Scale bars, 50 μ m

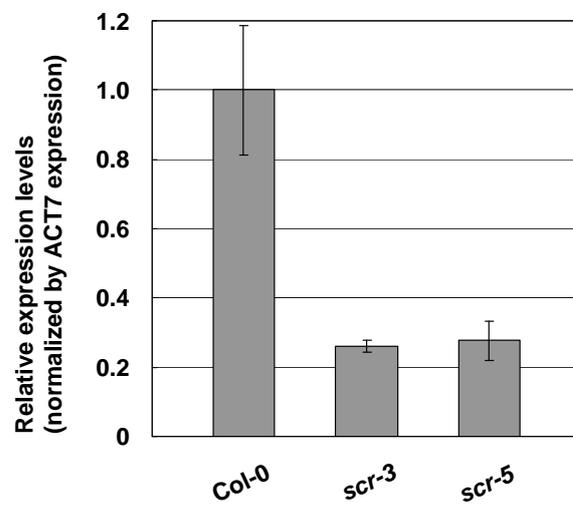


Figure 14. *scr*機能欠損体の根では、成熟型miR165/166の蓄積量が著しく低下する。
根端部約1cm程度からRNAを抽出し、*scr*機能欠損成熟型miR165/166の蓄積量を定量した。

locus	description	scr/Col	scr ago / ago
At5g45200.1	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative domain signature TIR-NBS-LRR exists, suggestive of a disease resistance protein. [At5g45200.1]	0.001724907	0.036431345
At4g16270.1	peroxidase 40 (PER40) (P40) identical to SPI023474 Peroxidase 40 precursor (EC 1.11.1.7) (Atherox P40) (Arabidopsis thaliana) [At4g16270.1]	0.002836303	0.005031539
At5g45210.1	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative domain signature TIR-NBS-LRR exists, suggestive of a disease resistance protein. [At5g45210.1]	0.00623014	0.009695457
At1g20180.1	subtilisin family protein similar to subtilisin-type protease precursor GI:14150446 from (Glycine max) [At1g20180.1]	0.009278503	0.03549191
At1g49570.1	peroxidase, putative identical to peroxidase ATP5a [Arabidopsis thaliana] [G11546702]embI[CA467341]; similar to peroxidase SWISS-PROT:P80679 from [Armoracia rusticana] [At1g49570.1]	0.012203644	0.00365802
At2g38600.1	acid phosphatase class B family protein similar to acid phosphatase [Glycine max] GI:3341443; contains Pfam profile PF03767: HAD superfamily (subfamily IIB) phosphatase [At2g38600.1]	0.012723253	0.22878729
At4g16447.1	expressed protein [At4g16447.1]	0.013336498	0.018950098
At3g01280.1	aldose 1-epimerase family protein similar to non-cell-autonomous protein pathway2, plasmodesmal receptor [Nicotiana tabacum] GI:15824567; contains Pfam profile PF01263: A	0.013449716	0.027188226
At4g11290.1	peroxidase, putative identical to peroxidase ATP19a [Arabidopsis thaliana] [G11546692]embI[CA467337] [At4g11290.1]	0.016059267	0.004682738
At4g08290.1	nodulin MN21 family protein similar to MN21_G1:2598575 (root nodule development) from [Medicago truncatula] [At4g08290.1]	0.016071137	0.028188879
At4g39770.1	trehalase-6-phosphate phosphatase, putative similar to trehalose-6-phosphate phosphatase (ATTPB) [Arabidopsis thaliana] GI:2944180; contains Pfam profile PF02358: Trehal	0.018292433	0.093040047
At5g43540.1	zinc finger (C2H2 type) family protein contains Pfam domain, PF00096: Zinc finger, C2H2 type [At5g43540.1]	0.020220567	0.0086071
At5g47500.1	pectinesterase family protein contains Pfam profile: PF01095 pectinesterase [At5g47500.1]	0.020513994	0.023690876
BE845339	AD1080777 AD.A. thaliana (Col-0 gll) subtracted library enriched for salt-induced transcripts, 10-14 day seedlings 4h 160mM NaCl stress Arabidopsis thaliana cDNA clone AD10E	0.022321787	0.028141909
At4g08300.1	nodulin MN21 family protein similar to MN21_G1:2598575 (root nodule development) from [Medicago truncatula] [At4g08300.1]	0.023693472	0.052885882
At5g15290.1	integral membrane family protein contains TIGRFAM TIGR01569; plant integral membrane protein TIGR01569; contains Pfam PF04535; Domain of unknown function (DUF588) c	0.027525386	0.072083273
At5g43180.1	expressed protein contains Pfam profile PF04854: Protein of unknown function, DUF599 [At5g43180.1]	0.032243289	0.158880562
At5g51750.1	subtilase family protein similar to subtilisin-like protease GI:3687307 from [Lycopersicon esculentum] [At5g51750.1]	0.036484873	0.016714511
At2g18800.1	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative [xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative similar to xyloglucan endotransglycosylase TCH4 G	0.040172653	0.025298005
At5g65790.1	myb family transcription factor (MYB68) identical to putative transcription factor (MYB68) GI:3941493 from [Arabidopsis thaliana]; contains Pfam profile: PF00249 myb-like DNA-bind	0.046559672	0.066183346
BU917486	JKHR10G05 Size-selected small cDNAs of Arabidopsis thaliana Arabidopsis thaliana cDNA clone JKHR10G05, mRNA sequence [BU917486]	0.0468422	0.238723337
At2g14900.1	gibberellin-regulated family protein similar to SPIP46890 Gibberellin-regulated protein 4 precursor (Arabidopsis thaliana) GASA4; contains Pfam profile PF02704: Gibberellin regu	0.048720668	0.210031463
At5g01740.1	expressed protein wound-inducible protein wun1 protein - Solanum tuberosum, PIR.JQ0398 [At5g01740.1]	0.049228294	0.205650433
At1g11080.1	serine carboxypeptidase S10 family protein similar to Serine carboxypeptidase II chains A and B (SP-P08819) (EC 3.4.16.6) [Triticum aestivum (wheat)] [At1g11080.1]	0.049335055	0.048082417
At3g03190.1	glutathione S-transferase, putative identical to glutathione S-transferase GB:AA09584 from [Arabidopsis thaliana] [At3g03190.1]	0.051822538	0.244598297
At1g14180.1	integral membrane family protein location of EST_168K9XP_3; gb At4651045; contains TIGRFAM TIGR01569; plant integral membrane protein TIGR01569; contains Pfam PF0453	0.053697978	0.03374499
At2g39510.1	nodulin MN21 family protein similar to MN21_G1:2598575 (root nodule development) from [Medicago truncatula] [At2g39510.1]	0.054028532	0.034216445
At1g30220.1	sugar transporter family protein similar to SPIQ96GE2 Proton myo-inositol co-transporter (Hmit) [Homo sapiens]; contains Pfam profile PF00083: major facilitator superfamily prot	0.054912748	0.22573716
At2g31082.1	Clavata3 / ESR-Related 7 (CLE7) [At2g31082.1]	0.055157017	0.159221132
At3g26610.1	polygalacturonase, putative similar to polygalacturonase (Pg1) GI:5669846; (Pg2) GI:5669848 [Glycine max]; contains PF00295: Glycosyl hydrolases family 28	0.056833321	0.019946054
At1g80100.1	phosphotransfer family protein similar to histidine-containing phosphotransfer protein [Catharanthus roseus] GI:13774348, ATHP3 [Arabidopsis thaliana] GI:4156245 [At1g80100.1]	0.05685816	0.111788432
At1g65900.1	expressed protein [At1g65900.1]	0.057083017	0.164556862
At1g05280.1	peroxidase 3 (PER3) (P3) / rare cold-inducible protein (RCIA) (PRC) identical to SPIQ23044 Peroxidase 3 precursor (EC 1.11.1.7) (Atherox P3) (Rare cold-inducible protein) (RCI	0.058710446	0.058880171
At3g49690.1	myb family transcription factor contains Pfam profile: myb DNA binding domain PF00249 [At3g49690.1]	0.058822145	0.088597812

Table. 2A scr変異によって、発現量の減少する遺伝子群

locus	description	scr/Col	scr ago / ago
At4g28790.1	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein contains Pfam domain, PF00010: Helix-loop-helix DNA-binding domain [A4g28790.1]	0.059553712	0.161304683
At5g14940.1	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein contains Pfam profile: PF00954 POT family [A5g14940.1]	0.060459251	0.133439986
At4g13770.1	cytochrome P-450 family protein [A4g13770.1]	0.062162249	0.106055012
At4g39675.1	expressed protein [A4g39675.1]	0.069781972	0.157296348
At4g30450.1	glycine-rich protein [A4g30450.1]	0.070117198	0.187878403
CHR1_0015299	Unknown	0.070203935	0.095810283
At5g19730.1	pectinesterase family protein contains Pfam profile: PF01095 pectinesterase [A5g19730.1]	0.071647584	0.174801649
At2g15590.1	expressed protein [A2g15590.1]	0.071943571	0.0390001743
At5g10580.1	expressed protein contains Pfam profile PF04654: Protein of unknown function, DUF599 [A5g10580.1]	0.079325031	0.039740899
At5g19650.1	ovate protein, putative 84% similar to ovate protein (G1:23429649) [Lycopersicon esculentum]; contains TIGRFAM TIGR01568 [uncharacterized plant-specific domain TIGR01568]	0.079861786	0.053131224
At1g20530.1	hypothetical protein [A1g20530.1]	0.082223296	0.09861896
At4g20210.1	terpene synthase/cyclase family protein (+)-delta-cadinene synthase isozyme XC14, Gossypium arboreum, PIR2.S68366 [A4g20210.1]	0.083801595	0.025518707
At5g14090.1	hypothetical protein [A5g14090.1]	0.08446088	0.069820339
At2g41480.1	peroxidase, putative similar to peroxidase [Spinacia oleracea] g11781334[emb]CAA71494 [A2g41480.1]	0.084980212	0.194962667
TC251626	Q39337 (Q39337) Glycine-rich_protein_(Aa1-291) precursor, partial (86%) [TC251626]	0.085406476	0.062934424
At3g14260.1	expressed protein contains Pfam profile PF04525: Protein of unknown function (DUF567); expression supported by MPSS [A3g14260.1]	0.085937117	0.158178407
At4g28530.1	no apical meristem (NAM) family protein contains Pfam PF02365: No apical meristem (NAM) domain; No apical meristem gene (NAM), required for pattern formation in embryos and stelar K+ outward rectifier (SKOR); potassium channel protein identical to SKOR [Arabidopsis thaliana] g1381067[emb]CAA11280; member of the 1 pore, 6 transmembrane (1P/6T) class of potassium channels [Arabidopsis thaliana] [A4g28530.1]	0.085949289	0.115131123
At3g02850.1	stelar K+ outward rectifier (SKOR); potassium channel protein identical to SKOR [Arabidopsis thaliana] g1381067[emb]CAA11280; member of the 1 pore, 6 transmembrane (1P/6T) class of potassium channels [Arabidopsis thaliana] [A3g02850.1]	0.088636606	0.243531114
At1g78090.1	trehalose-6-phosphate phosphatase (TPPB) identical to trehalose-6-phosphate phosphatase (ATTPPB) G1:2944180 [Arabidopsis thaliana] [A1g78090.1]	0.089818972	0.10884775
At1g16390.1	organic cation transporter-related low similarity to Organic cation/carnitine transporter 2 (Solute carrier family 22, member 5) (High-affinity sodium-dependent carnitine cotransporter) [Arabidopsis thaliana] [A1g16390.1]	0.090927291	0.02742167
At5g51810.1	gibberellin 20-oxidase, putative similar to gibberellin 20-oxidase G1:1109695; G1:9791186 [A5g51810.1]	0.093290047	0.210086577
At3g02020.1	aspartate kinase, lysine-sensitive, putative similar to aspartate kinase g1:2257743 [Arabidopsis thaliana] [A3g02020.1]	0.094686297	0.147771863
At5g26930.1	zinc finger (GATA type) family protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana [A5g26930.1]	0.095450475	0.138646568
At4g00910.1	expressed protein contains Pfam profile PF01027: Uncharacterized protein family UPF0005 [A4g00910.1]	0.097152155	0.083683044
At3g26780.1	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein similar to sex determination protein tasselseed 2 SP-P50160 from [Zea mays] [A3g26780.1]	0.09722902	0.166884402
At3g02040.1	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein similarity to SPIP53078 SSM1 protein (Saccharomyces cerevisiae); contains InterPro accession IPR005834: Haloacid dehalo-oxidase, putative identical to class III peroxidase ATP32 [Arabidopsis thaliana] g117530547[g]p[AA]40837; identical to cDNA class III peroxidase ATP32 G1:17530546 [A4g33420.1]	0.098398908	0.173345058
At4g33420.1	peroxidase, putative identical to class III peroxidase ATP32 [Arabidopsis thaliana] g117530547[g]p[AA]40837; identical to cDNA class III peroxidase ATP32 G1:17530546 [A4g33420.1]	0.0987104	0.224888754
At4g04810.1	methionine sulfoxide reductase domain-containing protein / SelR domain-containing protein low similarity to pillin-like transcription factor [Homo sapiens] G1:5059062, SPIP14930 [Homo sapiens] [A4g04810.1]	0.099338008	0.196987801
At3g19710.1	branched-chain amino acid aminotransferase, putative / branched-chain amino acid transaminase, putative [ECAT4] similar to branched-chain amino acid transaminase 6 [Arabidopsis thaliana] [A3g19710.1]	0.100145461	0.153495062
At1g64780.1	ammonium transporter 1, member 2 (AMT1.2) nearly identical to SPIQ8ZP J8 Ammonium transporter 1, member 2 (AMMT1.2) [Arabidopsis thaliana] [A1g64780.1]	0.102061492	0.217180011
A2g31081.1	Clavata3 / JESR-Related-4 (CLE4) CLAVATA3/JESR-Related 4 (CLE4) [A2g31081.1]	0.105637705	0.070721743
CHR4_000404	Unknown	0.107964769	0.205089043
At5g15830.1	bZIP transcription factor family protein similar to common plant regulatory factor 7 G1:9650828 from [Petroselinum crispum]; contains Pfam profile: PF00170 bZIP transcription factor domain [Arabidopsis thaliana] [A5g15830.1]	0.109425302	0.153145057
At4g08570.1	heavy-metal-associated domain-containing protein / copper chaperone (CCH)-related low similarity to copper homeostasis factor [G1:3168840][PMD:9701579]; similar to farnesyl transferase [Arabidopsis thaliana] [A4g08570.1]	0.110352852	0.224120243
At4g01970.1	galactinol-raffinose galactosyltransferase, putative similar to galactinol-raffinose galactosyltransferase G1:6634701 from [Vigna angularis] [A4g01970.1]	0.116924681	0.19396733

Table. 2B scr変異によって、発現量の減少する遺伝子群

locus	description	sci:Col	sci:ajo / ajo
A3g32980.1	peroxidase 32 (PER32), (PRX32) identical to SP1G9LHB9 Peroxidase 32 precursor (EC.1.11.1.7) (ApherP32) (PRXR3) (ATP16a) (Arabidopsis thaliana) [A3g32980.1]	0.121516836	0.164403165
A2g32100.1	ovate protein-related contains TIGRFAM TIGR01568 - uncharacterized plant-specific domain TIGR01568 [A2g32100.1]	0.1216251	0.215159891
A3g23730.1	xyloglucanxyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative similar to xyloglucan endotransglycosylase-related	0.127031147	0.202813279
A3g11280.1	homeobox-leucine zipper transcription factor family protein similar to wuschel protein (G1:22087128) (Arabidopsis thaliana); supporting cDNA G1:24953994(gb)AY15081.2.1 [A3g11280.1]	0.129340536	0.224285765
A4g17970.1	expressed protein contains Pfam profile PF01027: Uncharacterized protein family UPF0005 [A4g17970.1]	0.130183291	0.059605386
A2g22000.1	expressed protein [A2g22000.1]	0.132388505	0.052671585
A3g53820.1	zinc finger (C2H2 type) family protein contains Pfam profile: PF00096 zinc_finger_C2H2 type [A3g53820.1]	0.133407732	0.154127872
CHR5:007891.3	Unknown	0.13770391	0.230471444
A1g18100.1	mother of FT and TF1 protein (MFT) identical to SPI9QXFK7 MOTHER of FT and TF1 protein (Arabidopsis thaliana); contains Pfam profile PF01161: Phosphatidylethanolamine-bind	0.145105891	0.191055644
A3g48740.1	nodulin MN3 family protein similar to MN3_G1:1619602 (root nodule development) from [Medicago truncatula] [A3g48740.1]	0.145266962	0.096061261
A4g11320.1	cysteine proteinase, putative contains similarity to cysteine proteinase RD21A (thiol protease) G1:435619, SP-P43297 form [Arabidopsis thaliana] [A4g11320.1]	0.147255402	0.182086477
CHR2:0191833	Unknown	0.148142963	0.195170145
A2g22980.1	serine carboxypeptidase S10 family protein similar to serine carboxypeptidase_1 precursor (SP_P37890) from [Oryza sativa] [A2g22980.1]	0.148502358	0.063920944
A5g23810.1	amino acid transporter family protein similar to amino acid carrier (Ricinus communis) G1:3293031; contains Pfam profile PF01490: Transmembrane amino acid transporter prote	0.152963486	0.099122505
A3g20015.1	asparyl protease family protein contains Pfam domain, PF00026: eukaryotic asparyl protease [A3g20015.1]	0.153270384	0.22011644
A5g60060.1	F-box family protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana , similar to SKP1 interacting partner 2 (SKIP2) TIGR_Ath1.AF5g67250 [A5g60060.1]	0.156656705	0.149162175
A4g03060.1	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative (AOP2), nearly identical to G1:16118891; contains Pfam profile PF03171: 2OG-Fe(II) oxygenase superfamily domain. The gene seq	0.15799666	0.219049124
A4g04990.1	expressed protein contains Pfam domain PF05553: Cotton fiber expressed protein [A4g04990.1]	0.159434634	0.195225001
A5g19800.1	sulfate transporter, putative similar to sulfate transporter [Arabidopsis thaliana] G1:2285885; contains Pfam profiles PF00916: Sulfate transporter family, PF01740: STAS domain, s	0.164062971	0.161954362
A3g46130.1	myb family transcription factor (MYB48) contains Pfam profile: PF00249 myb-like DNA-binding domain [A3g46130.1]	0.164747108	0.178339991
A4g36060.1	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein contains Pfam profile: PF00010 helix-loop-helix DNA-binding domain [A4g36060.1]	0.165630838	0.240682909
A3g08660.1	phototropic-responsive protein, putative contains similarity to root phototropism RPT2 [Arabidopsis thaliana] g1:6959488(gb)AAFC33112, a signal transducer of phototropic response	0.166775072	0.158916899
A2g33830.1	dormancyauxin associated protein contains Pfam profile: PF05564 dormancyauxin associated protein [A2g33830.1]	0.166971441	0.060530626
A1g27660.1	ethylene-responsive protein-related contains similarity to ethylene-inducible ER33 protein [Lycopersicon esculentum] g1:5669656(gb)AD46413 [A1g27660.1]	0.167906756	0.22429848
A1g44800.1	nodulin MN21 family protein similar to MN21 [Medicago truncatula] G1:2593575; contains Pfam profile PF00892: Integral membrane protein [A1g44800.1]	0.170992629	0.242725607
A5g33660.1	plant defensin-fusion protein, putative (PDF2.5) plant defensin protein family member, personal communication, Bart Thomma (Bart.Thomma@agr.kuleuven.ac.be) [A5g33660.1]	0.171244777	0.140462579
A2g28780.1	expressed protein [A2g28780.1]	0.17200967	0.228965392
A5g52790.1	CBS domain-containing protein-related contains Pfam profile PF01595: Domain of unknown function, weak hit to PF00571: CBS domain [A5g52790.1]	0.172570497	0.085011939
A3g11930.1	universal stress protein (USP) family protein similar to ER6 protein GB:AD46412.G1:5669654 from [Lycopersicon esculentum]; contains Pfam profile PF00582: universal stress p	0.172575485	0.179818451
A3g06390.1	integral membrane family protein similar to hypothetical protein GB:CAB10339 [Arabidopsis thaliana]; contains TIGRFAM TIGR01569 : plant integral membrane protein TIGR01569	0.177075764	0.238153482
A3g14415.1	(S)-2-hydroxy-acid oxidase, peroxisomal, putative / glycolate oxidase, putative / short chain alpha-hydroxy acid oxidase, putative similar to (S)-2-hydroxy-acid oxidase, peroxisomal (C	0.177568598	0.178174453
A2g01770.1	integral membrane family protein contains integral membrane protein domain, Pfam:PF01988 [A2g01770.1]	0.186117243	0.062228199
A3g54220.1	scarcebox transcription factor, putative nearly identical to SCARECROW (Arabidopsis thaliana) G1:1497987 [A3g54220.1]	0.194466378	0.126007558
A5g13170.1	nodulin MN3 family protein similar to MN3_G1:1619602 (root nodule development) from [Medicago truncatula]; identical to cDNA senescence-associated protein (SAG29) mRNA, B	0.195113987	0.079422103
A5g05770.1	homeobox-leucine zipper transcription factor family protein similar to PRESSED FLOWER (SP:1907768) (Arabidopsis thaliana) [A5g05770.1]	0.201612144	0.048137972
A1g22990.1	heavy-metal-associated domain-containing protein / copper chaperone (CCH)-related low similarity to copper homeostasis factor (G1:3168840)[PMID:3701579]; strong similarity to	0.206036077	0.112824265
A2g28120.1	nodulin family protein similar to nodulin-like protein [Arabidopsis thaliana] G1:3329388, nodulin-specific protein N170 [Lotus japonicus] G1:3329386 [A2g28120.1]	0.206358281	0.215700703
A1g02460.1	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein similar to polygalacturonase P61_G1:5669846, P62_G1:5669848 from (Glycine max); contains P	0.207058843	0.156226338
A1g70250.1	receptor serine/threonine kinase, putative similar to receptor serine/threonine kinase PR5K_g1123568(gb)AAC49208 [A1g70250.1]	0.214415309	0.124546814
A4g15330.1	cytochrome P-450 family protein [A4g15330.1]	0.223228642	0.236477163
A2g34000.1	zinc finger protein-related contains weak hit to Pfam profile: PF00097 zinc_finger_C3HC4 type (RING finger) [A2g34000.1]	0.230007645	0.243483136
A3g10020.1	expressed protein [A3g10020.1]	0.237495908	0.212479339
BF663908	BF667568 RAFL21 Arabidopsis thaliana cDNA clone RAFL21-23-M14_3; mRNA sequence [BF667568]	0.239648722	0.046703664
A2g23180.1	cytochrome P-450, putative [A2g23180.1]	0.242388933	0.219803099
A5g03570.1	iron-responsive transporter-related similar to iron-regulated transporter REG1 [Mus musculus] G1:7264727 [A5g03570.1]	0.249035592	0.244284487

Table. 2C scr変異によって、発現量の減少する遺伝子群

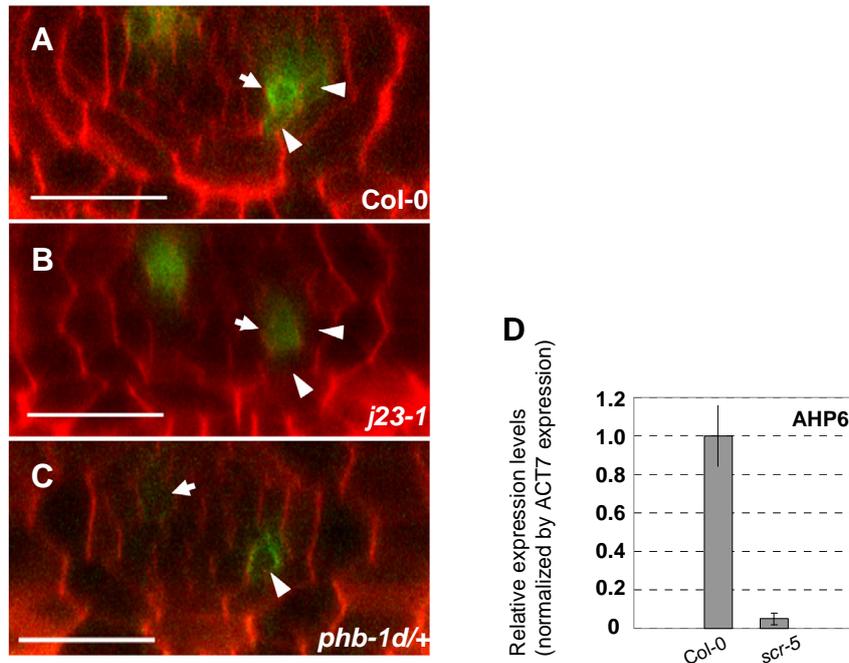


Figure 15. SCRはPHBの発現制御を介して、細胞非自律的に中心柱の発生過程に機能する。

(A-C) 野生型植物 (A)、*scr*機能欠損体である*j23-1*系統 (B)、*phb1d/+*変異体 (C)におけるpAHP6::mGFP5ERの発現様式。矢印は原生木部細胞を、また三角印は原生木部に接する内鞘細胞を示してゐる。

(D) qRT-PCR法を用いたAHP6転写産物の蓄積量の解析。

Scale bars, 20 μ m

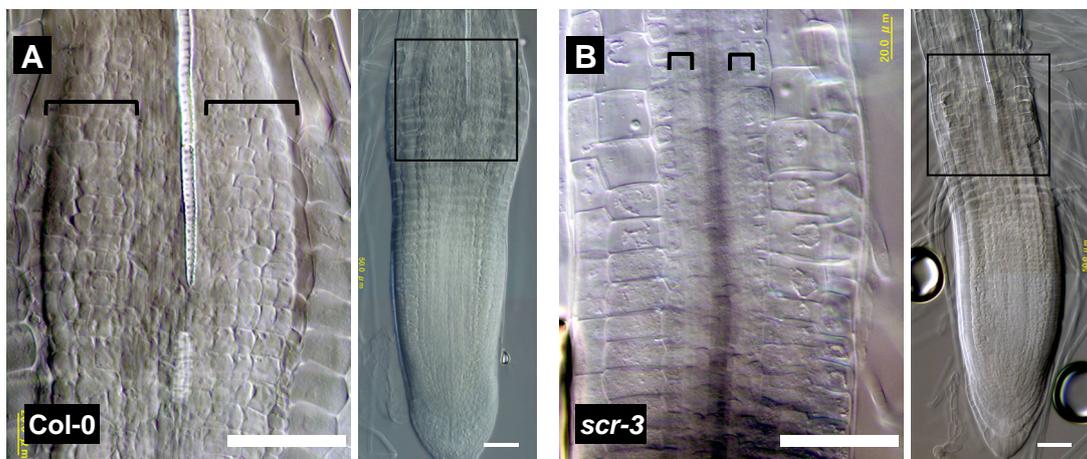


Figure 16. *scr*変異体では、基部分裂組織における内鞘細胞のオーキシン誘導性の並層分裂が阻害されている

(A,B) オーキシン処理した野生型植物 (A)、*scr-3*変異体(B)。野生型植物では、基部分裂組織 (四角で示した)の内鞘細胞の並層分裂し多層化しているが (A、括弧)、*scr-3*変異体では、著しく分裂が阻害されている (B、括弧)。

Scale bars, 50 μ m

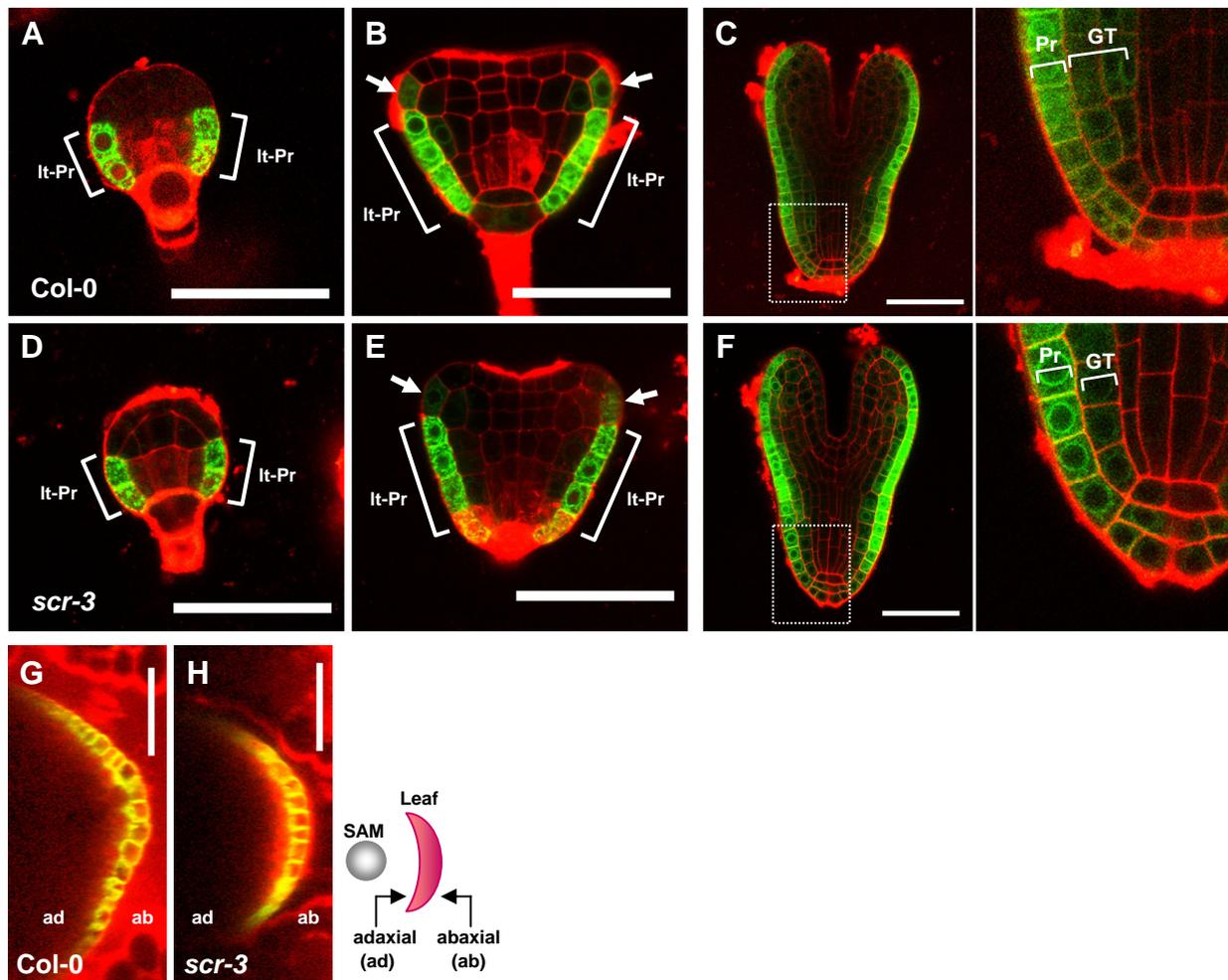


Figure 17. 初期胚発生及び本葉発達段階でのMIR165Aの発現はSCR機能に依存しない

(A-F) 初期胚発生におけるpMIR165A::mGFP5ERの発現。野生型植物 (A-C)、*scr-3*変異体 (D-F)の、胞胚期(A, D)、初期心臓型胚期 (B, E)、魚雷型胚期 (C, F)。B,Eの矢印は、子葉予定領域の背軸側原表皮における発現を示す。

(G,H) 本葉の発達段階でのpMIR165A::mGFP5ERの発現様式。CLSMを用いて、焦点面の異なる連続画像を立体構築することで作成した。右側に本葉と茎頂分裂組織 (SAM) の位置関係を模式的に示す。野生型植物 (G)、*scr-3*変異体 (H)。野生型植物体、*scr-3*変異体ともに背軸側の一層の細胞層で、強いGFP蛍光が検出された。

GT,基本組織; Lt-Pr, lower-tire領域の原表皮; Pr,原表皮; SAM, 茎頂分裂組織; ad, 向軸側; ab, 背軸側

Scale bars, 50 μ m

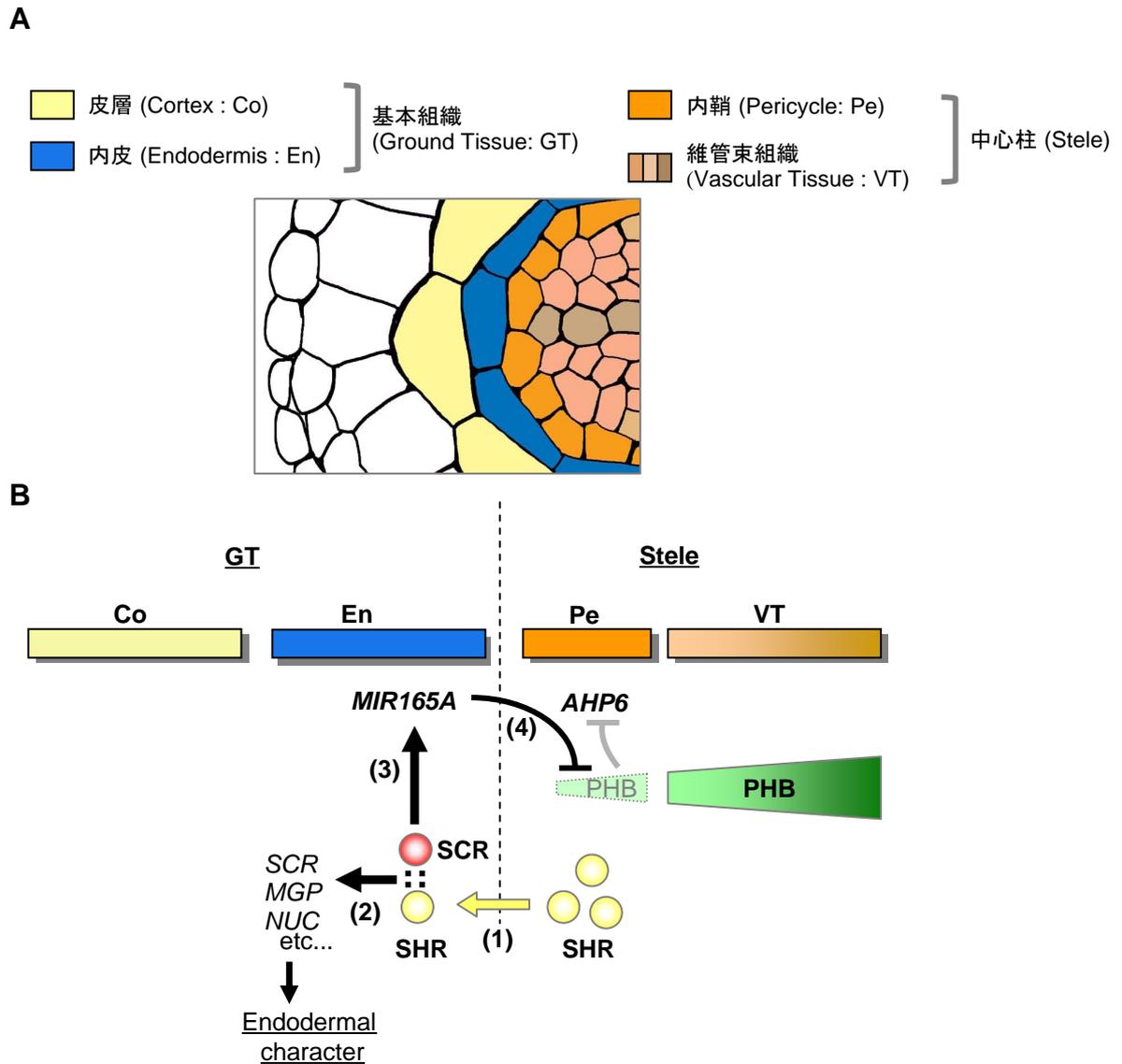


Figure 18. シロイヌナズナRMにおける、中心柱と基本組織間に存在する双方向性の組織間相互作用のモデル。

(A) シロイヌナズナRMにおける中心柱とそれを囲む基本組織の、横断面の模式図。それぞれ組織を色分けし、名称と略称を記載した。

(B) 中心柱と基本組織間での双方向性の組織間相互作用の模式図。中心柱で産出されたSHRタンパク質は、細胞間移行により内皮細胞に蓄積する(1)。SHRとSCRは複合体転写因子として機能し、下流遺伝子群の転写制御を解して、内皮形成を促進し(2)、同時に、*MIR165A*を含む*MIR165/166*遺伝子群の転写を、直接もしくは間接的に誘導する(3)。内皮で発現した*MIR165A*は、細胞非自発的に中心柱でのPHBの発現を制御する(4)。

Name	Mutation type	ABRC stock name	Background	Reference
<i>ago-101</i>	T-DNA	SALK_035319	Col-0	本論文
<i>ago-102</i>	T-DNA	SALK_096625	Col-0	本論文
<i>hyl1-2</i>	T-DNA	CS859864	Col-0	Vazquez et al. 2004
<i>scr-3</i>	point mutation	CS3997	Col-0	Helariutta et al. 2000
<i>scr-5</i>	point mutation		Col-0	Paquette et al. 2005
<i>shr-2</i>	deletion	CS2972	Col-0	Helariutta et al. 2000
<i>phb-1d</i>	point mutation	CS3761	Ler	McConnell et al. 1998

Line name	Background	Selection marker
<i>pMGP::mGFP5ER</i>	Col-0	Hygromicine
<i>pMIR165A::mGFP5ER</i>	Col-0	Hygromicine
<i>PHB-GFP</i>	Col-0	Glufosinate, BASTA
<i>PHBmu-GFP</i>	Col-0	Glufosinate, BASTA
<i>pMIR165A-mu</i>	Col-0	Hygromicine

Table3. 本研究で用いたシロイヌナズナ変異体および形質転換系統

Primer name	Sequence
AGO1f	ATTGTTGAAGGCCAGCGGTA
AGO1r	TCCATTGACCAACTTGTGGC
ACT8f	ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA-
ACT8r	TCCGAGTTTGAAGAGGCTAC
MGPf	TCCAGAAGCTGAGGTCATAG
MGP r	TGGACTGCATATCTCTTGGC
NUCf	aaatctcctggaaatcctga
NUCr	cctttgccacatacctcaca
ACT7f	cgctgcttctcgaatcttct
ACT7r	ccattccagtccattgtca
AHP6-qRT-Rv2	ATATCTGACTCCTGCAGCT
AHP6-qRT-Fw2	TTGAGAGGACTGGAGGTAGT
miR165UPL primer	gttggctctggtgcaggggtccgaggtattcgcaccagagccaacggggga
miR165/166-Fw for UPL-RT	tcgcttcggaccaggttca
UPL-RT Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT
Xba-PHB-(-)3570	acTCTAGAcgttttagactctagtc
Kpn-PHB-(+)5015R	acGGTACCagctagctcattcatctatct
PHB (+)miR1445 F	CCTGGaCCaGATTCTATTGGCA
PHB (+)miR1444 R	ctacaccagcaatgaagg
HpaI-PHB Cter F	gttaacTGAagaataataagaaataagaag
PHB (+)4443 R	AACGAACGACCAATTCACGAACA
miR165a(+)-722R	ggccacgtcattttctatcc
miR165a (-)-3927	gtatcctagcgaagtagattcg
miR165a(+)-93mu	GAGAGTATCCTCGGtCCtGGCTT
miR165a(+)-70R	TATGATCACTTGAATCATTAAC
miR165a ProEND	tcaactgaaatagcttaaccctc
miR165a (-)-3927	gtatcctagcgaagtagattcg
MGP ProEND R	gtcttcttcttgacaaaagttttg
MGP (-)-3790	gtggaaaatggttggaaagc

Table 4. 本研究の発現解析で用いたプライマーとその配列

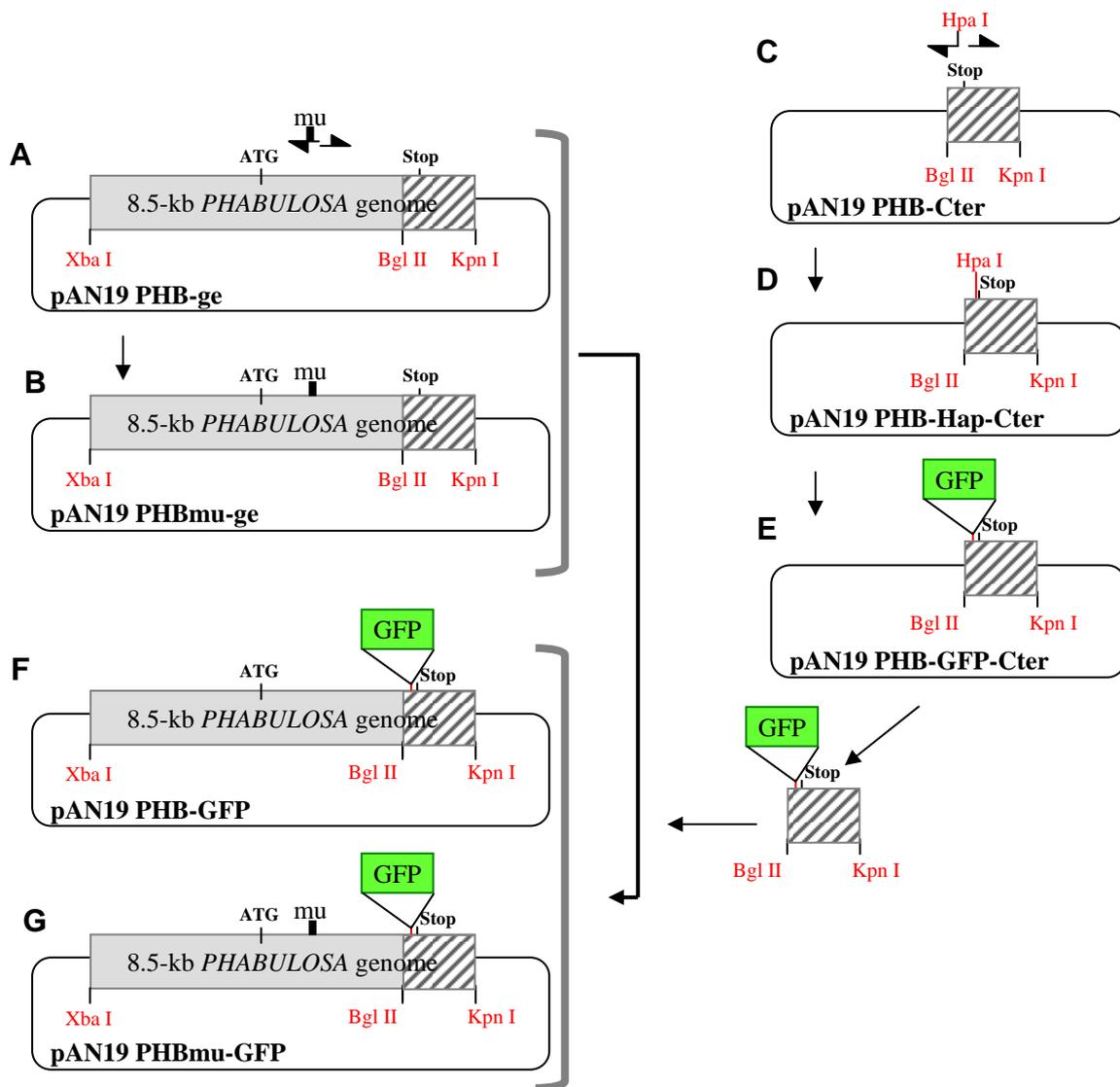


Figure. 19 PHB-GFPベクターの作成

- (A) pAN19 PHB-geベクター。矢印はプライマー(PHB-(+)miR144F、PHB(+)-miR1443R)を示す。
- (B) pAN19 PHB-mu-geベクター。
- (C) pAN19 PHB-Cterベクター。矢印はプライマー(Hpa-PHB-CterF、PHB-(+)4443R)を示す。
- (D) pAN19 PHB-Hpa-Cterベクター。
- (E) pAN19 PHB-GFP-Cterベクター。
- (F) pAN19 PHB-GFPベクター。
- (G) pAN19 PHBmu-GFPベクター。

第 5 章 -材料と方法-

5-1. シロイヌナズナ変異体株、形質転換系統、及びそれら生育条件

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の Columbia-0 (Col-0) 系統を野生型として用いた。5gf32 変異体は Col-0 に対して 2 度戻し交配を行った。また、本研究で用いたシロイヌナズナ変異体は、Table. 3 に示した。また、*ago1-101* 変異体、*ago1-102* 変異体においては、それぞれ開始コドンの 1.261-bp、及び 597-bp 下流に T-DNA が挿入していた。*ago1-101* 変異体、*ago1-102* 変異体、*hyl1-2* 変異体、及び *phb-1d* 変異体については、Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から取得した。*SHR-GFP* 系統、*GFP-SCR* 系統、及び *En7* 系統に関しては、以下の論文に記述してある (Nakajima et al. 2001, Gallagher et al. 2004, Heidstra et al. 2004)。また、*pMGP::mGFP5ER* 系統、*pMIR165A::mGFP5ER* 系統、*PHB-GFP* 系統、及び *PHBmu-GFP* 系統は本研究で作成した。

シロイヌナズナ種子は 20% 次亜塩素酸及び 2% TritonX-100 の溶液で滅菌処理し、4°C の暗所に 3 日間放置し、春日処理を行った。その後、1% ショ糖 (w/v) と 1% Agar (w/v) を含む 0.5×Arabidopsis nutrient solution (Haughn and Somerville 1986) の寒天培地に播種し、23°C の長日条件下で (16 時間/8 時間) 下で培地を垂直に立て発芽させ、アッセイを行った。また、交配や種子の回収のため、発芽後 2-3 週間程度で、鉢にうつし、*phb-1d/+* 変異体以外は 23°C の長日条件下で、また、*phb-1d/+* 変異体は、17°C の長日条件下で生育させた。

5-2. RT-PCR 及び qRT-PCR 法を用いた発現解析

AGO1 転写産物に対する発現解析では、発芽後 10 日の植物体全体から、RNAeasy Plant minikit (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて total RNA を抽出した。逆転写反応は、300ng total-RNA を鋳型として、Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) と oligo-dT primer を用いて逆転写反応を行い、一本鎖 cDNA を作成した。それを鋳型として、[96°C, 30sec; 50°C, 30sec; 72°C, 1min] の PCR プログラムを 32cycle 行った。使用したプライマーセットは Table. 4 に示した (*AGO1*, *AGO1f-AGO1r*; *ACT8*, *ACT8f-ACT8r*)。

MGP、*NUC* 及び *AHP6* 転写産物に対する qRT-PCR 法による発現解析では、発芽後 4 日目の植物体の根端 1cm から total RNA を抽出し、上記と同様の方法で逆転写を行った。qRT-PCR 反応では、SYBER Premix Ex Taq (Takara bio co, Shiga, Japan) を用いて反応液を調整し、LightCycler system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて [95°C, 10sec; 60°C, 10sec; 72°C, 10sec] の PCR プログラムで行った。用いたプライマーセットは Table. 4 に示した。(MGP,

MGPf - MGPr; NUC, NUCf - NUCr; AHP6, AHP6-qRT-FW2 - AHP6-qRT-Rv2; ACT7, ACT7f - ACT7)。

成熟型 miR165/166 の蓄積量の解析では、発芽後 4 日目の植物体の根端 1cm から total RNA を抽出し、200ng total RNA を鋳型に、Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) と、逆転写プライマーとして oligo-dT primer と miR165UPL primer を用いて、pulsed reverse transcription (pulsed-RT) 法による逆転写反応を行い、一本鎖 cDNA を作成した (Tang et al. 2006) (Table. 4)。成熟型 miR165/166 に対するプライマーセットとして miR165/166-Fw と UPL-RT-Rev (Table. 4) を使い、上記と同様の方法で qRT-PCR 反応をおこなった。

5-3. コンストラクションと形質転換体の作成

pMGP::mGFP5ER の作成においては、Table. 4 に示した MGP(-)3790 と MGPproEND をプライマーとし、MGP 遺伝子 5' 上流配列 3,790-bp (pMGP とする) を増幅させ、それを、改変型 pUC19 (pAN19) にクローニングし、その後、mGFP5EF コーディング配列と NOS Terminator の配列を結合させた (pMGP::mGFP5ER)。この配列を、ハイグロマイシン耐性遺伝子をもつ改変型 pBIN19 バイナリーベクター (pBIN40) に挿入した。また、pMIR165A::mGFP5ER の作成においては、Table. 4 に示す miR165a(-)3927 と miR165aPorEND をプライマーとし、MIR165A 遺伝子 5' 上流配列 3,9270-bp (pMIR165A とする) を増幅させた後、pMGP::mGFP5ER と同様に pBIN40 に挿入した。

PHB-GFP の作成では、Table. 4 に示した Xba-PHB(-)3570 と Kpn-PHB-(+)5015R をプライマーとし、8.5-kb PHB ゲノム断片を増幅し、pAN19 に挿入した (Fig. 19A, pAN19 PHB-ge)。次に、pAN19 PHB-ge を鋳型として、Table. 1 に示した PHB-(+)miR1445F と PHB-(+)miR1444R のプライマーセットを用いて、PCR 反応を行い、セルフライゲーションさせることで、miR165/166 耐性型 PHB ゲノムを作成した (Fig. 19B, pAN19 PHBmu-ge)。また、PHB ゲノム断片の C 端部位を Bgl II と Kpn I の制限酵素サイトを使い、別途 pAN19 にクローニングした (Fig. 19C, pAN19 PHB-Cter)。pAN19 PHB-Cter を鋳型に Table. 4 に示した Hpa-PHB-CterF と PHB-(+)4443R のプライマーセットを用いて PCR 反応とセルフライゲーションを行い、PHB 遺伝子の Stop コドンの直前に Hpa I 制限酵素サイトを導入した。(Fig. 19D pAN19 PHB-Hpa-Cter)。pAN19 PHB-Hpa-Cter を Hpa I で処理し、3×Gly-GFP(S65T) (Morita et al. 2002) のコーディング配列を挿入した (Fig. 19E, pAN19 PHB-GFP-Cter)。Bgl II 及び Kpn I を用いて、PHB-GFP-Cter 断片と pAN19 PHB-ge 及び pAN19 PHBmu-ge の C 末部位を置換し、pAN19 PHB-GFP 及び

pAN19 PHBmu-GFP を作成した (Fig. 19F, G)。その後、PHB-GFP 及び PHBmu-GFP 断片を、BASTA 耐性遺伝子をもつ改変型 pBIN19 バイナリーベクター (pBIN30) に導入した。

MIR165A-mu の作成には、Table. 4 に示した miR165a(-)3927 と miR165a(+)-722R のプライマーセットを用いて MIR165A プロモーターと miR165A をコードする領域を含む 4.6-kb *MIR165A* ゲノム断片を増幅し、pAN19 ベクターに導入した (pAN19 MIR165A-ge)。その後 pAN19 MIR165A-ge を鋳型にして、Table. 4 に示した miR165a(+)-93mu と miR165a(+)-70R のプライマーセットを用いて PCR 反応を行い、セルフライゲーションさせることで変異を導入し、MIR165A ゲノム断片 (MIR165A-mu) を作成した。その後、この MIR165A-mu を pBIN40 に導入した。植物体への形質転換は、*Agrobacterium tumefaciens* MP90 株を用いて、floral dip 法により行った。また、*PHBmu-GFP/MIR165A-mu* 二重形質転換体の作出には、PHBmu-GFP をもつバイナリーベクター (pBIN30-PHBmu-GFP) と MIR165A-mu ベクター (pBIN40-MIR165A-mu) を作成し、それぞれ *Agrobacterium tumefaciens* MP90 株に形質転換した。これらの 2 種類の *Agrobacterium tumefaciens* 系統を、野生型植物体 (Col-0) に、floral dip 法を用いて、同時に形質転換し、T1 世代において、これら導入遺伝子を共に有する二重形質転換体を選抜した。

5-4. 顕微鏡観察

CLSM 観察は C1-ECLIPSE E600 confocal laser-scanning microscope (Nikon, Tokyo, Japan) を使用した。試料は 10 μ M propidium iodide で染色し、細胞構造を可視化した。また、胚の観察には、7% (w/v) glucose を染色溶液に加えた。根の横断切片は、(Furutani et al. 2000) を参考にサンプルを調整した後、Astra Blue 0.25% (w/v) 染色液を用いてプレパラートを作成した。その後、微分干渉顕微鏡 ECLIPSE E1000 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

5-5. マイクロアレイ解析

野生型植物、*ago1-101* 変異体、*scr-3* 変異体および *ago1-101 scr-3* 二重変異体の根端 1cm 程度の組織をサンプリングし、上記の発現解析と同様の方法で RNA を抽出した。その後、44K Arabidopsis 3 microarray (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を使用し、それぞれの変異体と野生型との間で、2色法を用いて発現解析を行った。*scr* 変異によって発現が低下する遺伝子群の同定には、野生型植物と *scr-3* 変異体を比較し、*scr-3* 変異体において発現量が 25% 以下に低下している遺伝子群を抽出した。さらに、*ago1-101* 変異体と *ago1-101 scr-3* 二重変異体の発現量を、野生型植物の発現量を基準とするこ

とで比較し、*ago1-101 scr-3* 変異体において、発現量が 25%以下に低下する遺伝子群を抽出した。この 2 つの遺伝子群の両方に含まれる遺伝子群を *scr* 変異によって発現が低下する遺伝子群とした (Table. 2)。

5-6. オーキシシン処理

野生型植物と *scr-3* 変異体を、10 μ M NPA を含む培地に播種し、発芽後 3 日目の段階で、10 μ M NAA を含む培地に移し替えて 20 時間処理した。サンプルは胞水クロラル溶液 [胞水クロラル, 8g; グリセロール, 1ml; DW, 1ml] を用いて脱色し、微分干渉顕微鏡を用いて観察した。

5-7. 変異体背景におけるマーカー系統を用いた発現解析

ago1-101 変異体背景、*scr-3* 変異体背景、及び *ago1-101 scr-3* 二重変異体背景での、*pMGP::mGFP5ER*、*En7*、*PHB-GFP*、及び *pMIR165A::mGFP5ER* の発現解析は、各変異体とマーカー系統を交配し、F3 世代ホモ系統を用いて解析を行った。*pSCR::SHR* 形質転換体背景での解析では、*pMIR165A::mGFP5ER* 系統と *pSCR::SHR* 系統を交配し、F1 世代のヘテロ個体を用いて解析した。*phb-1d* 変異体背景でのマーカー発現解析は、マーカー系統と *phb-1d/+* 変異体を交配した F1 世代において *phb-1d* 変異をもつヘテロ個体を用いた。

第 6 章 参考文献

- Arazi, T., Talmor-Neiman, M., Stav, R., Riese, M., Huijser, P. and Baulcombe, D. C.** (2005). Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *Plant J* **43**: 837-848.
- Axtell, M. J. and Bowman, J. L.** (2008). Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends Plant Sci* **13**: 343-349.
- Baima, S., Nobili, F., Sessa, G., Lucchetti, S., Ruberti, I. and Morelli, G.** (1995). The expression of the Athb-8 homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**: 4171-4182.
- Baima, S., Possenti, M., Matteucci, A., Wisman, E., Altamura, M. M., Ruberti, I. and Morelli, G.** (2001). The *Arabidopsis* ATHB-8 HD-Zip Protein Acts as a Differentiation-Promoting Transcription Factor of the Vascular Meristems. *Plant Physiology* **126**.
- Bartel, D. P.** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297.
- Baumberger, N. and Baulcombe, D. C.** (2005). *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. UAS* **102**: 11928-11933.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. and Benning, C.** (1998). AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J* **17**: 170-180.
- Bonke, M., Thitamadee, S., Mahonen, A. P., Hauser, M.-T. and Helariutta, Y.** (2003). APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 181-186.
- Chen, X.** (2004). A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* Flower Development. *Science* **303**: 2022-2025.
- Cui, H., Levesque, M. P., Vernoux, T., Jung, J. W., Paquette, A. J., Gallagher, K. L., Wang, J. Y., Blilou, I., Scheres, B. and Benfey, P. N.** (2007). An

Evolutionarily Conserved Mechanism Delimiting SHR Movement Defines a Single Layer of Endodermis in Plants. *Science* **316**: 421-425.

Di Lorenzo, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A. and Benfey, P. N. (1996). The SCARECROW Gene Regulates an Asymmetric Cell Division That Is Essential for Generating the Radial Organization of the Arabidopsis Root. *Cell* **86**: 423-433.

Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. and Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**: 71-84.

Dunoyer, P., Himber, C., Ruiz-Ferrer, V., Alioua, A. and Voinnet, O. (2007). Intra- and intercellular RNA interference in Arabidopsis thaliana requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nat Genet* **39**: 848-856.

Emery, J. F., Floyd, S. K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N. P., Izhaki, A., Baum, S. F. and Bowman, J. L. (2003). Radial Patterning of Arabidopsis Shoots by Class III HD-ZIP and KANADI Genes. *Current Biology* **13**: 1768-1774.

Fahlgren, N., Howell, M. D., Kasschau, K. D., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Cumbie, J. S., Givan, S. A., Law, T. F., Grant, S. R., Dangl, J. L. et al. (2007). High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE* **2**: e219.

Floyd, S. K. and Bowman, J. L. (2004). Gene regulation: Ancient microRNA target sequences in plants. *Nature* **428**: 485-486.

Furutani, I., Watanabe, Y., Prieto, R., Masukawa, M., Suzuki, K., Naoi, K., Thitamadee, S., Shikanai, T. and Hashimoto, T. (2000). The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in Arabidopsis thaliana. *Development* **127**: 4443-4453.

Gallagher, K. L., Paquette, A. J., Nakajima, K. and Benfey, P. N. (2004). Mechanisms regulating SHORT-ROOT intercellular movement. *Curr Biol* **14**: 1847-1851.

Gifford, E. M. and Foster, A. S. (1989). Morphology and evolution of vascular plants. New York: W.H. Freeman.

Green, K. A., Prigge, M. J., Katzman, R. B. and Clark, S. E. (2005). CORONA, a Member of the Class III Homeodomain Leucine Zipper Gene Family in Arabidopsis, Regulates Stem Cell Specification and Organogenesis. *Plant Cell* **17**: 691-704.

Gustafson, A. M., Allen, E., Givan, S., Smith, D., Carrington, J. C. and Kasschau, K. D. (2005). ASRP: the Arabidopsis Small RNA Project Database. *Nucleic Acids Res* **33**: D637-640.

Han, M.-H., Goud, S., Song, L. and Fedoroff, N. (2004). The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 1093-1098.

Haughn, G. W. and Somerville, C. (1986). Sulfonyleurea-resistant mutants of Arabidopsis thaliana. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 430-434.

Hawker, N. P. and Bowman, J. L. (2004). Roles for Class III HD-Zip and KANADI Genes in Arabidopsis Root Development. *Plant Physiol.* **135**: 2261-2270.

Heidstra, R., Welch, D. and Scheres, B. (2004). Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect Arabidopsis SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Dev.* **18**: 1964-1969.

Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.-T. and Benfey, P. N. (2000). The SHORT-ROOT Gene Controls Radial Patterning of the Arabidopsis Root through Radial Signaling. *Cell* **101**: 555-567.

Hutvagner, G. and Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 22-32.

Itoh, J., Hibara, K., Sato, Y. and Nagato, Y. (2008). Developmental role and auxin responsiveness of Class III homeodomain leucine zipper gene family members in rice. *Plant Physiol* **147**: 1960-1975.

Juarez, M. T., Kui, J. S., Thomas, J., Heller, B. A. and Timmermans, M. C. (2004). microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature* **428**: 84-88.

- Jung, J.-H. and Park, C.-M.** (2007). MIR166 / 165 genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in Arabidopsis. *Planta* **225**: 1327-1338.
- Kidner, C. A. and Martienssen, R. A.** (2004). Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* **428**: 81-84.
- Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H. and Traas, J.** (2004). MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* **131**: 4311-4322.
- Lee, J. Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Mace, D., Ohler, U. and Benfey, P. N.** (2006). Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in Arabidopsis roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6055-6060.
- Levesque, M. P., Vernoux, T., Busch, W., Cui, H., Wang, J. Y., Blilou, I., Hassan, H., Nakajima, K., Matsumoto, N., Lohmann, J. U. et al.** (2006). Whole-Genome Analysis of the SHORT-ROOT Developmental Pathway in Arabidopsis. *PLoS Biol* **4**: e143 EP -.
- Li, H., Xu, L., Wang, H., Yuan, Z., Cao, X., Yang, Z., Zhang, D., Xu, Y. and Huang, H.** (2005). The Putative RNA-Dependent RNA Polymerase RDR6 Acts Synergistically with ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 to Repress BREVIPEDICELLUS and MicroRNA165/166 in Arabidopsis Leaf Development. *The Plant Cell* **17**.
- Lim, J., Jung, J. W., Lim, C. E., Lee, M. H., Kim, B. J., Kim, M., Bruce, W. B. and Benfey, P. N.** (2005). Conservation and diversification of SCARECROW in maize. *Plant Mol Biol* **59**: 619-630.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. and Sattler, M.** (2003). Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* **426**: 465-469.
- Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A. and Carrington, J. C.** (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* **14**: 1605-1619.
- Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P. and Barton, M. K.** (1999). The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in

Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development* **126**: 469-481.

Mahonen, A. P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K. M., Kinoshita, K., Tormakangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T. and Helariutta, Y. (2006). Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**: 94-98.

Mallory, A. C., Bartel, D. P. and Bartel, B. (2005). MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *The Plant Cell* **17**: 1360-1375.

Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Jones-Rhoades, M. W., Tang, G., Zamore, P. D., Barton, M. K. and Bartel, D. P. (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO Journal* **23**: 3356-3364.

McConnell, J. and Barton, M. (1998). Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis. *Development* **125**: 2935-2942.

McConnell, J. R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J. and Barton, M. K. (2001). Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* **411**: 709-713.

Mette, M. F., van der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A. J. (2002). Short RNAs can identify new candidate transposable element families in Arabidopsis. *Plant Physiol* **130**: 6-9.

Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C. et al. (2008). Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell* **133**: 116-127.

Millar, A. A. and Gubler, F. (2005). The Arabidopsis GAMYB-Like Genes, MYB33 and MYB65, Are MicroRNA-Regulated Genes That Redundantly Facilitate Anther Development. *Plant Cell* **17**: 705-721.

Morita, M. T., Kato, T., Nagafusa, K., Saito, C., Ueda, T., Nakano, A. and Tasaka, M. (2002). Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 47-56.

- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T. and Benfey, P. N.** (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413**: 307-311.
- Nodine, M. D., Yadegari, R. and Tax, F. E.** (2007). RPK1 and TOAD2 Are Two Receptor-like Kinases Redundantly Required for Arabidopsis Embryonic Pattern Formation. *Developmental Cell* **12**: 943-956.
- Nogueira, F. T. S., Madi, S., Chitwood, D. H., Juarez, M. T. and Timmermans, M. C. P.** (2007). Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes Dev.* **21**: 750-755.
- Ohashi-Ito, K., Kubo, M., Demura, T. and Fukuda, H.** (2005). Class III Homeodomain Leucine-Zipper Proteins Regulate Xylem Cell Differentiation. *Plant Cell Physiol.*: pci180.
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C. and Weigel, D.** (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**: 257-263.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X.** (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol* **12**: 1484-1495.
- Parker, J. S., Roe, S. M. and Barford, D.** (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *Embo J* **23**: 4727-4737.
- Prigge, M. J. and Clark, S. E.** (2006). Evolution of the class III HD-Zip gene family in land plants. *Evolution & Development* **8**: 350-361.
- Prigge, M. J., Otsuga, D., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Drews, G. N. and Clark, S. E.** (2005). Class III Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family Members Have Overlapping, Antagonistic, and Distinct Roles in Arabidopsis Development. *The Plant Cell* **17**: 617-626.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J. and Bartel, D. P.** (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* **20**: 3407-3425.

- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B. and Bartel, D. P.** (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* **16**: 1616-1626.
- Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R. and Laux, T.** (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**: 811-814.
- Sassa, N., Matsushita, Y., Nakamura, T. and Nyunoya, H.** (2001). The molecular characterization and in situ expression pattern of pea SCARECROW gene. *Plant Cell Physiol* **42**: 385-394.
- Scheres, B., Wolkenfelt, W., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C. and Weisbeek, P.** (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* **120**: 2475-2487.
- Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M. T., Janmaat, K., Weisbeek, P. and Benfey, P. N.** (1995). Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **121**: 53-62.
- Sena, G., Jung, J. W. and Benfey, P. N.** (2004). A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development* **131**: 2817-2826.
- Sieber, P., Gheyselinck, J., Gross-Hardt, R., Laux, T., Grossniklaus, U. and Schneitz, K.** (2004). Pattern formation during early ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Biol* **273**: 321-334.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J. and Joshua-Tor, L.** (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**: 1434-1437.
- Song, J. J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneiderman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., Hannon, G. J. and Joshua-Tor, L.** (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* **10**: 1026-1032.
- Sorin, C., Bussell, J. D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G. et al.** (2005). Auxin

and Light Control of Adventitious Rooting in Arabidopsis Require ARGONAUTE1. *Plant Cell* **17**: 1343-1359.

Sussex, I. M. (1951). Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves. *Nature* **167**: 651-652.

Talbert, P. B., Adler, H. T., Parks, D. W. and Comai, L. (1995). The REVOLUTA gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of Arabidopsis thaliana. *Development* **121**: 2723-2735.

Tang, F., Hajkova, P., Barton, S. C., Lao, K. and Surani, M. A. (2006). MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **34**: e9.

Tian, C., Wan, P., Sun, S., Li, J. and Chen, M. (2004). Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **54**: 519-532.

Tretter, E. M., Alvarez, J. P., Eshed, Y. and Bowman, J. L. (2008). Activity range of Arabidopsis small RNAs derived from different biogenesis pathways. *Plant Physiol* **147**: 58-62.

van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P. and Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* **390**: 287-289.

Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci* **13**: 350-358.

Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P. and Bartel, D. P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev.* **18**: 1187-1197.

Vazquez, F., Gascioli, V., Crete, P. and Vaucheret, H. (2004). The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr Biol* **14**: 346-351.

Welch, D., Hassan, H., Blilou, I., Immink, R., Heidstra, R. and Scheres, B. (2007). Arabidopsis JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting

SHORT-ROOT action. *Genes Dev.* **21**: 2196-2204.

Willmann, M. R. and Poethig, R. S. (2007). Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol* **10**: 503-511.

Wysocka-Diller, J., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J. and Benfey, P. (2000). Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* **127**: 595-603.

Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A. and Carrington, J. C. (2005). Expression of Arabidopsis MIRNA Genes. *Plant Physiology* **138**.

Yan, K. S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L. and Zhou, M. M. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* **426**: 468-474.

Yang, L., Huang, W., Wang, H., Cai, R., Xu, Y. and Huang, H. (2006). Characterizations of a Hypomorphic Argonaute1 Mutant Reveal Novel AGO1 Functions in Arabidopsis Lateral Organ Development. *Plant Molecular Biology* **61**: 63-78.

Zhong, R. and Ye, Z.-H. (2004). amphivasal vascular bundle 1, a Gain-of-Function Mutation of the IFL1/REV Gene, Is Associated with Alterations in the Polarity of Leaves, Stems and Carpels. *Plant Cell Physiol.* **45**: 369-385.

第7章 謝辞

本研究につきましては、様々な方々の多大なる協力とご助言をいただきました。

本研究において行ったマイクロアレイ解析に関しましては、基礎生物学研究所の西村幹夫先生、林誠先生、深澤美津江氏のご協力頂きました。深く感謝いたします。

また、本研究で用いた *SHR-GFP* 系統、*GFP-SCR* 系統に関しましては、Duke 大学の Philip Benfey 博士、また、*En7* 系統に関しましては Utrecht 大学の Ben Scheres 博士に、*AHP6* マーカー系統と *j23-1* 系統に関しては Helsinki 大学の Yka Helariutta 博士に分与して頂きました。ご協力に感謝いたします。

本研究の全般にわたって多大なるご助言と熱心なご指導をしてくださった植物遺伝子機能学講座の中島敬二先生に深く感謝いたします。

また、5年間暖かい目で見守って頂き、研究に対する鋭いご助言だけでなく、ご自身の過去の体験談などお話ししてくださいました橋本隆先生に深く感謝いたします。

また、加藤壮英先生には本研究に対するご助言をだけでなく、決して教科書には書いてない過去の経験に基づく研究活動における数々の興味深い事項を教えてくださいました。本当に深く感謝いたします。

西田真子氏、吉村美香氏には長い間実験のサポートをして頂きました。深く感謝いたします。

また、山下聡美氏のご尽力のおかげで、日々の研究室生活を快適に過ごすことが出来ました。本当に感謝いたします。

加えて、植物遺伝子機能学講座のその他のスタッフの方、先輩方、同輩や後輩の方々には、研究活動内外を問わず、本当にお世話になりました。皆様のおかげで、現在の私が形づくられています。深く感謝いたします。

最後になりましたが、27年間、暖かく見守ってくれた、宮島厚介、裕子夫妻に、深く感謝いたします。

