

## 論文内容の要旨

申請者氏名 宮島 俊介

本研究では、シロイヌナズナの根における放射パターン形成の分子基盤を明らかにすることを目的に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて根端部における細胞パターンを指標に変異体スクリーニングを行った。野生型植物の基本組織は内皮と皮層の二層の細胞層から成るのに対し、単離された *5gf32* 変異体の基本組織は三層の細胞層から形成され、細胞の同心円状配置にも異常を示した。*5gf32* 変異体の原因遺伝子は、microRNA (miRNA) 依存的な遺伝子発現制御系で機能する *ARGONAUTE1 (AGO1)* と同定した。これまでに、植物特有の GRAS 型転写因子である *SHORT-ROOT (SHR)* と *SCARECROW (SCR)* が、中心柱から基本組織へ情報伝達を介して基本組織における内皮細胞層の形成を制御していることが明らかになっている。そこで *AGO1* と *SHR/SCR* の遺伝学的関係を確かめた。発現解析や二重変異体の表現型から *AGO1* は *SHR/SCR* 経路とは独立して基本組織形成を正に制御している事が示唆された。

*AGO1* は miRNA と相互作用し、その相補的配列をもつ標的 mRNA の切断や翻訳阻害をする事で、標的遺伝子の発現を抑制する。野生型植物と *ago1* 機能欠損体についてマイクロアレイ解析を行った結果、既知の miRNA 標的遺伝子のうち約 50 遺伝子が *ago1* 変異体において 2 倍以上の発現上昇を示した。そこで、miR165/166 の標的である *Class III HD-ZIP* 遺伝子に注目し解析を行った。*Class III HD-ZIP* 遺伝子は、シロイヌナズナのゲノム上に 5 遺伝子コードされており、4 遺伝子は RM の中心部で発現する事が報告されている。その 1 つである *PHABULOSA (PHB)* に対して GFP 融合タンパク質を用いた発現解析を行った結果、PHB-GFP は維管束組織に限定的に発現していた。これに対して、miR165/166 耐性型 PHB (*PHBmu*) は中心柱全体と基本組織に GFP シグナルが観察された。この結果は、*PHB* 発現領域が miR165/166 による転写後制御によって維管束組織へと限定されている事を示唆する。

次に、根で発現する事が報告されている *MIR165A* プロモーターの転写活性を調べたところ、内皮細胞層で特異的な転写活性をもつ事が示された。さらに、*MIR165A* 遺伝子に点変異を導入することで、*PHBmu* 転写産物に対して相補的な miRNA を産出する *MIR165A·mu* コンストラクトを作成し、PHBmu-GFP と *MIR165A·mu* を共発現する植物体 (*PHBmu-GFP/MIR165A·mu*) を作成した。この植物体では、PHB-GFP と同様に維管束組織に限定された GFP 発現パターンが観察された。この結果から、内皮で特異的に発現した *miR165A* が細胞非自律的に中心柱内の PHB の発現領域を限定化することが示された。また、*SCR* が *MIR165A* の転写を介する事で miR165/166 の蓄積を正に制御し、細胞非自律的に中心柱内において *PHB* 遺伝子の発現領域の維管束組織へ限定化するというモデルが示された。

本研究により、miRNA を介した細胞非自律的な制御が根の外側から内側への細胞間情報伝達を担い、これが根の放射パターン形成において重要な機能を果たすことが示された。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 宮島 俊介

本研究では、シロイヌナズナの根における放射パターン形成の分子基盤を明らかにすることを目的に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて根端部における細胞パターンを指標に変異体スクリーニングを行った。野生型植物の基本組織は内皮と皮層の二層の細胞層から成るのに対し、単離された *5gf32* 変異体の基本組織は三層の細胞層から形成され、細胞の同心円状配置にも異常を示した。*5gf32* 変異体の原因遺伝子は、microRNA (miRNA) 依存的な遺伝子発現制御系で機能する *ARGONAUTE1 (AGO1)* と同定した。これまでに、植物特有の GRAS 型転写因子である *SHORT-ROOT (SHR)* と *SCARECROW (SCR)* が、中心柱から基本組織へ情報伝達を介して基本組織における内皮細胞層の形成を制御していることが明らかになっている。そこで *AGO1* と *SHR/SCR* の遺伝学的関係を確かめた。発現解析や二重変異体の表現型から *AGO1* は *SHR/SCR* 経路とは独立して基本組織形成を正に制御している事が示唆された。

*AGO1* は miRNA と相互作用し、その相補的配列をもつ標的 mRNA の切断や翻訳阻害をする事で、標的遺伝子の発現を抑制する。野生型植物と *ago1* 機能欠損体についてマイクロアレイ解析を行った結果、既知の miRNA 標的遺伝子のうち約 50 遺伝子が *ago1* 変異体において 2 倍以上の発現上昇を示した。そこで、miR165/166 の標的である *Class III HD-ZIP* 遺伝子に注目し解析を行った。*Class III HD-ZIP* 遺伝子は、シロイヌナズナのゲノム上に 5 遺伝子コードされており、4 遺伝子は RM の中心部で発現する事が報告されている。その 1 つである *PHABULOSA (PHB)* に対して GFP 融合タンパク質を用いた発現解析を行った結果、PHB-GFP は維管束組織に限定的に発現していた。これに対して、miR165/166 耐性型 PHB (*PHBmu*) は中心柱全体と基本組織に GFP シグナルが観察された。この結果は、*PHB* 発現領域が miR165/166 による転写後制御によって維管束組織へと限定されている事を示唆する。

次に、根で発現する事が報告されている *MIR165A* プロモーターの転写活性を調べたところ、内皮細胞層で特異的な転写活性をもつ事が示された。さらに、*MIR165A* 遺伝子に点変異を導入することで、*PHBmu* 転写産物に対して相補的な miRNA を産出する *MIR165A·mu* コンストラクトを作成し、*PHBmu*-GFP と *MIR165A·mu* を共発現する植物体 (*PHBmu*-GFP/*MIR165A·mu*) を作成した。この植物体では、PHB-GFP と同様に維管束組織に限定された GFP 発現パターンが観察された。この結果から、内皮で特異的に発現した *miR165A* が細胞非自律的に中心柱内の PHB の発現領域を限定化することが示された。また、*SCR* が *MIR165A* の転写を介する事で miR165/166 の蓄積を正に制御し、細胞非自律的に中心柱内において *PHB* 遺伝子の発現領域の維管束組織へ限定化するというモデルが示された。

以上のように、本論文は根の放射パターン形成における細胞間情報伝達の新たな分子機構を明らかにしたものであり、学術上、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。