

シロイヌナズナの側根形成開始に関与する *RLF* 遺伝子
および *PUCHI* 遺伝子の解析

池山 芳史

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 形質発現植物学講座

(田坂 昌生 教授)

平成21年5月24日提出

目次

I. 序論

図表 1

II. 材料と方法

II-1. 植物材料と生育条件

II-2. GUS 染色

II-3. 表現型観察

II-4. RNA 抽出とリアルタイム定量的 RT-PCR

II-5. コンストラクション

II-6. 植物への形質転換

II-7. PEG 法による培養細胞への一過的発現用プラスミド導入

III. 結果と考察

第一部 新奇側根形成変異体 *rlf* の解析

結果

III-1-1. *rlf-1* 変異は側根イニシエーションにおける初期の細胞分裂を抑制する

III-1-2. *rlf-1* 変異は主根伸長、側根形成におけるオーキシン感受性に影響しない

III-1-3. 側根のイニシエーションに関与する遺伝子 *LBD16/ASL18* および *LBD29/ASL16* のオーキシンの誘導される発現は *rlf-1* 変異に影響を受けない

III-1-4. *RLF* 遺伝子は cytochrome b_5 -like heme/steroid binding domain を持つ新奇のタンパク質をコードする

III-1-5. *RLF* 遺伝子の発現パターンおよび *RLF* タンパク質の細胞内局在

III-1-6. *RLF* 遺伝子は *ARF7/19* に制御されるオーキシンシグナリングとは独立に側根形成に関与する

考察

III-1-7. *RLF* は側根形成に必要な新奇の細胞質性タンパク質で、*ARF7/19* に制御されるオーキシンシグナリングとは独立にはたらく

図表 2

第二部 側根形成最初期に關与する *PUCHI* 遺伝子の解析

結果

III-2-1. *puchi-1* 変異体は野生型より多くの側根を形成する

III-2-2. *PUCHI* 遺伝子は側根原基形成直前から内鞘細胞層で発現する

III-2-3. *PUCHI* 遺伝子は側根原基の形成開始を抑制する

III-2-4. DR5::GFP、*pCycB1;1::CycB1;1(NT)-GFP* を用いた側根予定部位の解析

III-2-5. 側根形成開始に異常を示す他の変異体における *PUCHI* の働き

考察

III-2-6. *PUCHI* は ARF7/19 の下流で発現し、側根形成の最初期過程を抑制する

図表 3

IV. 総合考察

V. 参考文献

VI. 謝辞

I. 序論

陸上性の高等植物は、地下に形成する根系によって地上部を支持するとともに生育に必要な水分や栄養分の吸収を行っている。一般に根系は発芽後に伸長する主根と、主根の内部組織から形成される側根、地上部シュートから形成される不定根などから構成される。なかでも側根は根系の大部分を占める器官であり、発達した根系の構築において側根形成は重要な形態形成といえる。根端分裂組織は静止中心(QC)と呼ばれる4個の細胞と、その周囲にある数種類の始原細胞を中心とし、これらの始原細胞が分裂して生み出された細胞群が次々と分裂・伸長・分化することにより各組織が形成される(Jiang *et al.*, 2005)。この発達過程から、シロイヌナズナの主根は長軸の横断面において同心円状の放射パターンを形成し、成熟した根では外側から表皮、皮層、内皮、内鞘の細胞層が位置し、その内側に木部や師部を含む維管束組織が形成される(図 1-1)。

根は、さかんに細胞分裂を行う根端部の分裂領域と、それより基部側で分裂を終えた細胞が伸長成長を行う伸長領域、さらにそれより基部側で伸長成長を終えた細胞が各種の性質を持った細胞群に分化する分化領域の、3つの成長段階に区分でき、それぞれの領域は明確に分かれている(Dolan *et al.*, 1993; Stephen 1998)。これらのうち、側根形成の開始が誘導されるのは分化領域の根端よりの限られた部位であり、側根形成の開始は求頂的に起こることが示されてきている(Dubrovsky *et al.*, 2006)。モデル植物のシロイヌナズナでは、側根形成のイニシエーションは原生木部に接した内鞘細胞層において、求頂的に発生する(Casimiro *et al.*, 2001; Beeckman *et al.*, 2001; Dubrovsky *et al.*, 2006; reviewed by Péret *et al.*, 2009)。側根原基が細胞分裂を経て根端組織と根端分裂組織を形成する過程は詳細に観察されている(Malamy and Benfey, 1997; reviewed by Péret *et al.*, 2009)。まず、内鞘細胞に垂層分裂が起こって8個から10個の短い細胞群が形成されることにより、側根形成が開始する(ステージ I)。次に、これらの細胞群の一部が並層分裂を2回繰り返して、2層の外層と2層の内層を形成する(ステージ II-IV)。そして、分裂した細胞層はそれぞれ規則的な分裂を繰り返して細胞数を増やし(ステージ V)、その後、表皮と根冠、皮層と内皮、内鞘、維管束系の始原細胞や静止中心を分化させ、主根の分裂組織と同様の構造となる(ステージ VI-VII)。そして主に各層の細胞伸長の活性化により、側根原基が伸長し主根の表皮細胞を突き破る(図 1-2)。これらの発生段階は、内鞘細胞の垂層分裂によって開始する一連の細胞分裂とパターンニングを形態的にとらえた分類だが、一方で近年では細胞分裂に先立って側根形成の位置情報を制御するとともに内鞘細胞に対して側根形成の開始を誘導する過程が存在すると考えられており、

いくつかの知見が報告されている。

多くの古典的な研究の結果、植物ホルモンであるオーキシンが側根のイニシエーションや側根原基の形成に関与していることが示されている (Woodward and Bartel, 2005; Fukaki *et al.*, 2007)。外性オーキシンによる側根形成の促進とオーキシン輸送阻害剤による側根形成の抑制が知られている (Laskowski *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1998; Casimiro *et al.*, 2001)。シロイヌナズナでの遺伝学的な研究により、オーキシンの生合成、輸送、シグナリングに関与する遺伝子の変異体が側根形成に異常を持つことが示されている (Fukaki *et al.*, 2007; Fukaki and Tasaka, 2009; Péret *et al.*, 2009)。例として、オーキシンの過剰供給が起こっているとされる *sur1/alf1/rty* 変異体は野生型より多くの側根を形成したり、オーキシン輸送能に異常を持つとされる *aux1*、*axr4* 変異体や *pin* 遺伝子の多重変異体では側根数が減少や側根原基の形態異常などが見られる (Hobbie and Estelle, 1998; Bhalerao *et al.*, 2002; Marchant *et al.*, 2002; Benková *et al.*, 2003) ことから、オーキシンの生合成や輸送が側根形成に重要であることが示されている。それに加えて、オーキシンシグナル伝達に関与する変異体として、*arf7arf19* 二重変異体が側根をほとんど形成せず、*AXR5/IAA1*、*SHY2/IAA3*、*SLR/IAA14*、*CRANE/IAA18*、*MSG2/IAA19*、*IAA28* のような *Aux/IAA* 遺伝子の機能獲得型変異体においても側根数の減少が見られる (Tian and Reed, 1999; Fukaki *et al.*, 2002; Rogg *et al.*, 2001; Tatematsu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Uehara *et al.*, 2008)。*aux/iaa* 機能獲得型変異体の中でも、*slr-1/iaa14* 変異体は側根を完全に欠失する (Fukaki *et al.*, 2002)。*ARF7* と *ARF19*、*IAA14* は内鞘細胞層を含む中心柱とともに発現しており、また酵母ツーハイブリッドシステムにより、*IAA14* は *ARF7* および *ARF19* の両方と分子的に相互作用することから、*IAA14* は *ARF7*、*ARF19* の活性を抑制することで側根形成を負に制御していることが示唆されている。最近、*ARF7*、*ARF19* はオーキシンに応答した *LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN16/ASYMMETRIC LEAVES 2-LIKE18 (LBD16/ASL18)* 遺伝子と *LBD29/ASL16* 遺伝子の発現活性を通して側根形成のイニシエーションを制御していることが証明された (Okushima *et al.*, 2007)。加えて、個別の側根形成イニシエーションが局所的な高いオーキシン濃度によって引き起こされる一方 (Dubrovsky *et al.*, 2008)、特定の内鞘細胞にオーキシン局在を形成する過程について、オーキシンの極性輸送システムとオーキシン応答の正のフィードバック経路をもとにしたモデルが提唱されている (Laskowski *et al.*, 2008)。また、地上部で合成され維管束を經由して根端部で循環するオーキシンの流れが側根の分布に関与しているとする示唆やモデルも示されてきている (De Smet *et al.*, 2007; Lucas *et al.*, 2007; Ditengou *et al.*, 2008)。しかし、局所的なオーキシン応答

から形態的な細胞分裂によって定義づけられる側根形成の開始に至る分子的なメカニズムについてはほとんどわかっていない。それに加えて、オーキシンの局在が側根形成の開始に対して必要十分であるとされているが、この考え方は実験的には局所的に十分な、しばしば過剰なオーキシン応答がなされた場合の知見を元にしており、オーキシン応答と側根形成との相関について十分な検討がなされているとは言いがたい。

これまでに、オーキシン経路が側根形成に関与していることが示されているが、一方でシロイヌナズナにおいてオーキシン経路とは独立に側根形成に関与すると考えられる遺伝子がいくつか報告されている。*ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION4(ALF4)* は側根イニシエーションにおける細胞分裂に関与する核局在タンパク質をコードしており (DiDonate *et al.*, 2004)、また E3 ユビキチンリガーゼをコードしている *XBAT32* (Nodzon *et al.*, 2004) や、Armadillo/ β -catenin like タンパク質をコードする *ARABIDILLO-1/-2* 遺伝子 (Coates *et al.*, 2006) も、側根形成を促進していることが示されている。しかし、いずれのタンパク質もすでに知られているオーキシンの制御される側根形成過程とどのような関係があるのかは分かっていない。

本研究では、側根数が減少する新奇のシロイヌナズナ *rlf* 変異体について詳細に解析し、*RLF* 遺伝子が cytochrome b_5 -like heme/steroid binding domain をもつ細胞質局在型のタンパク質をコードし、*ARF7/19* の制御するオーキシニングナル経路とは独立にシロイヌナズナの側根形成を正に制御することを明らかにした。また、側根形成のイニシエーションを抑制すると考えられる *PUCHI* 遺伝子の解析から、これまで側根形成開始に必要な十分と考えられていた局所的なオーキシン応答の下流で側根形成の可否が決定されていることが示唆された。

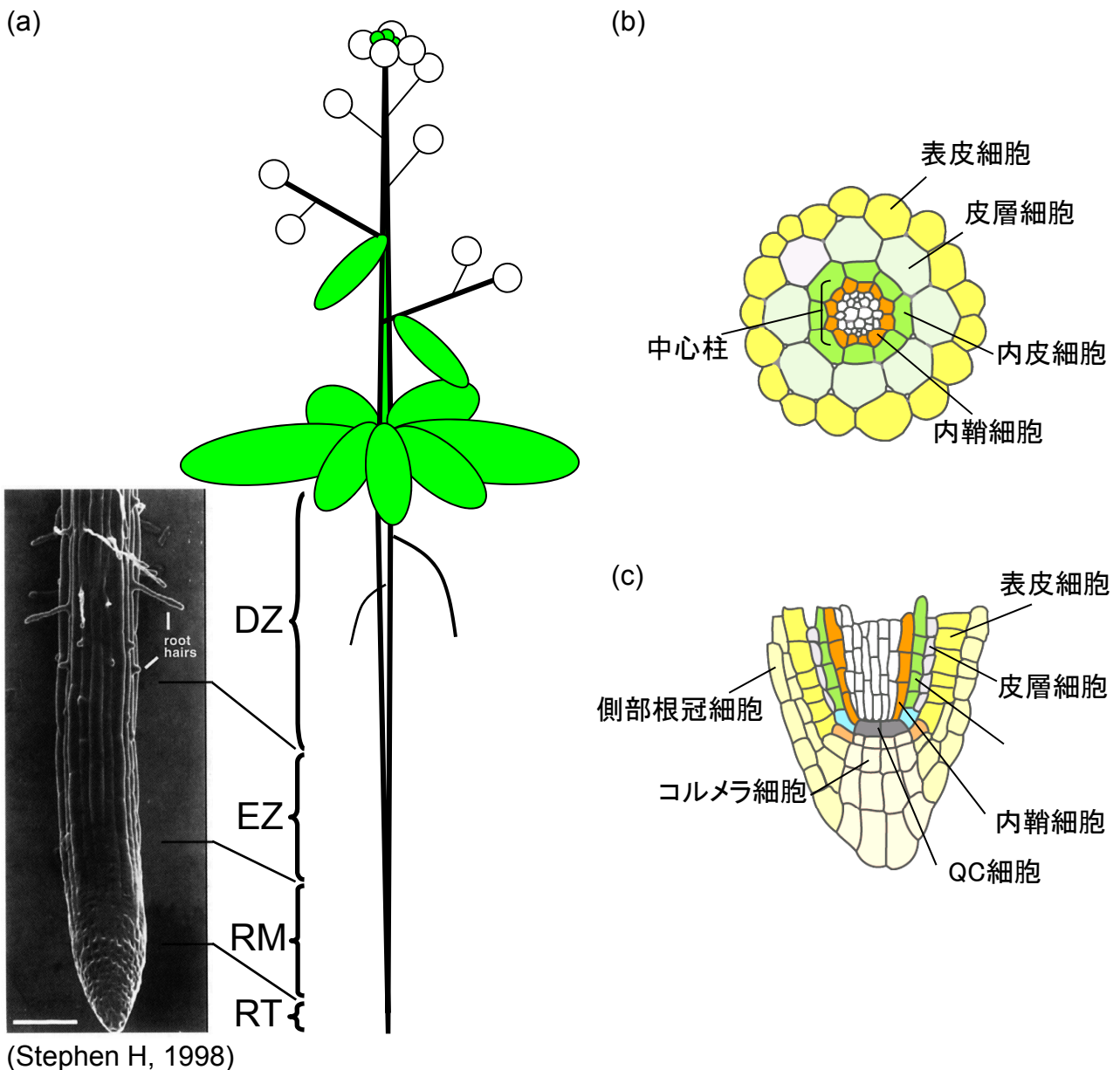


図. 1-1 シロイヌナズナの根系

(a)成長したシロイヌナズナ植物体の模式図。根系は1本の長い主根と、主根組織から形成される側根からなる。根を保護する根冠(RT)、新たな細胞を生み出す根端分裂組織(RM)、細胞伸長により主根長を増大させる伸長領域(EZ)、根毛形成など各種の細胞への分化が起こる分化領域(DZ)に分けられ、側根形成は分化領域で起こる。

(b)根の横断面の模式図。規則的な層構造が形成される。

(c)根端分裂組織の模式図。QC細胞を中心に各層ごとの幹細胞が配置される。

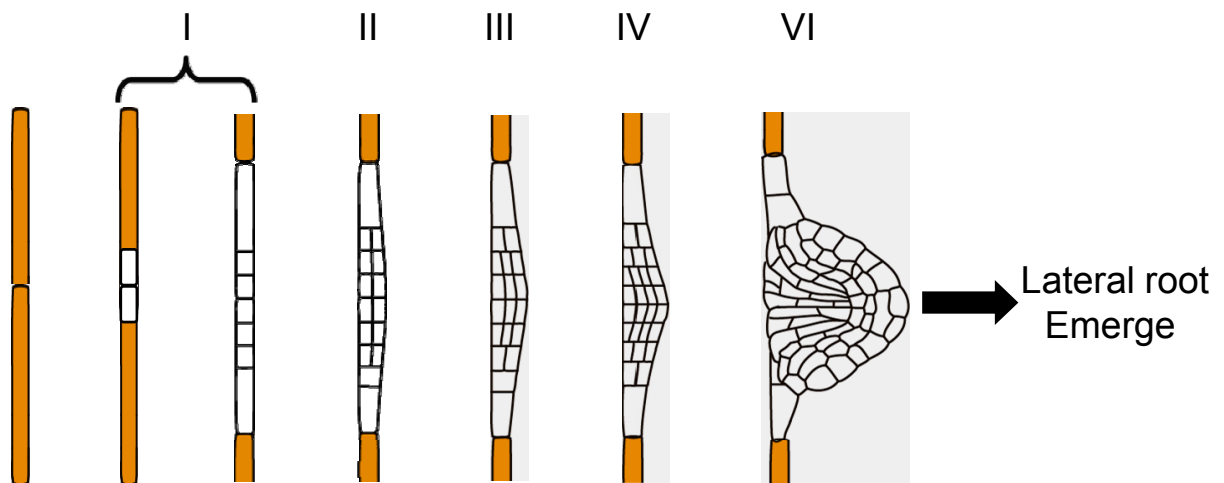


図. 1-2 シロイヌナズナの側根の発生

Malamyらによってステージ分けされた側根の発生初期段階。

主根の内鞘細胞が垂層分裂する事で側根の発生は始まる(ステージI)。その後、並層分裂が繰り返し起こり、(stage II~IV)、stage IVでは四層の細胞層を持つ側根原基が形成される。その後側根原基は分裂や伸長を繰り返し、主根の根端分裂組織と同様な構造を形成する(stage VI)。さらにその後、細胞分裂と細胞伸長によって、主根表皮から突出する。

II. 材料と方法

II-1. 植物材料と生育条件

本研究全体を通して、シロイヌナズナのColumbia系統を野生型として用いた。*rlf-1*変異体はエチルメタンスルホン酸(EMS)によって変異源処理されたM2種子群(LEHLE SEEDより入手)から単離された。また、*rlf-2*変異体(GABI_773E12)はGABI-kat collection(Rosso *et al.*; 2003)のT-DNA挿入変異体をNottingham Arabidopsis Stock Centre(NASC)より入手した。*pCycB1;1::CycB1;1(NT)-GUS*レポーター植物と*pCycB1;1::CycB1;1(NT)-GFP*レポーター植物はPeter Doerner博士(University of Edinburgh, Edinburgh, UK)より、*DR5::GUS*レポーター植物はTom Guilfoyle博士(University of Missouri, Missouri, MO, USA)より、*DR5rev::GFP*レポーター植物はJiri Friml博士(Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Universität Tübingen Germany)より、QC25、QC46、QC184レポーター植物はBen Scheres博士(Utrecht University, The Netherlands)よりそれぞれ分与して頂いた。*arf7-1*変異体と*nph4-1*変異体、*arf19-1*変異体は奥島博士らによって報告されたもの(Okushima *et al.*; 2005, 2007)を、*slr-1*変異体は深城博士らによって報告されたもの(Fukaki *et al.* 2002)を、*puchi-1*変異体は廣田博士らによって報告されたもの(Hirota *et al.* 2007)をそれぞれ使用した。種子は5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に室温で20分間浸して滅菌した後、0.5%ゲランガムを含むムラシゲスクーグ培地プレート上に播種した。発芽を同調させるために、4°C、暗黒下に2日間静置したのち、23°C、連続白色光の培養機に移して発芽、生育させた。芽生え後の植物体にオーキシン処理を施す際にはジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した薬剤を1/1000量添加した培地上で生育させた。側根数の計数と主根長の測定は、解剖顕微鏡による観察と、写真撮影後ImageJ(National Institute of Health; NIH)を用いて行った。

II-2. GUS 染色

サンプルを90%アセトン溶液に浸し、氷上で15分間おいた後、X-Gluc solution(0.5M Na₂HPO₄, 0.5M NaH₂PO₄, 1mM K₃Fe(CN)₆, 1mM K₄Fe(CN)₆, 100mM X-Gluc 200 μL)に浸し、デシケーターで10分間脱気処理を行った。その後、37°Cで約2時間染色し、70%エタノール溶液で洗浄した後、エタノール酢酸溶液(エタノール:酢酸 / 6:1)に浸して37°Cで1時間脱色処理した。クロロフィル等の色素が十分に除去された後、70%エタノールで再度洗浄して透明化液(抱水クロラール 8g, グリセロール 1ml, 蒸留水 2ml)に封入して観察した。なお、主根及び側根組織を観察する場合は、染色前のアセトン処理及び染色後

のエタノール酢酸溶液による脱色処理を省略した。

II-3. 表現型観察

主根長の測定は培養プレート上の植物を写真に撮り、画像解析ソフト ImageJ(National Institutes of Health; NIH)および NeuronJ Plug-In(Meijering et al., 2004)を用いて行った。また、側根原基の観察は透明化処理した根で行い、微分干渉顕微鏡(ECLIPSE E800 Nikon)を用いた。側根原基数は内鞘細胞の垂層分裂が確認できる段階(ステージ 1)から側根組織が主根表皮を突き破るまで(ステージ 7)を側根原基として計数した。根における GUS 染色観察は透明化処理したのち微分干渉顕微鏡を用いて行った。また、顕微鏡下の写真撮影には冷却 CCD カメラ VB-6010(KEYENCE)を用いた。蛍光シグナルの観察は、組織レベルでの観察には実体蛍光顕微鏡 LEICA M216FA、細胞レベルでの詳細な観察には共焦点レーザー蛍光顕微鏡(OLYMPUS FLUOVIEW FV1000)を用いて行った。共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて植物体の細胞パターンを観察する場合は蛍光染色試薬 PI(Propidium iodide)で細胞壁を染色して行った。

II-4. RNA抽出とリアルタイム定量的RT-PCR

TotalRNAの抽出にはRNeasy kit(QIAGEN K.K.)を用いて行った。1 μ gのTotalRNAに対してDNaseI(Invitrogen)処理後、Super Script Reverse TranscriptaseII Kit(Invitrogen)を用いてcDNAを合成した。リアルタイム定量PCRにはSYBR Premix Ex Taq(TaKaRa)とLight Cycler QuickSystem330(Roche)を用いた。mRNA相対量比較のためのリファレンス遺伝子として、 β -TUBLIN4(*At5g4340*)を使用した。各遺伝子の検出に使用したプライマーの配列を以下に示す。

RLF-F: 5'-CGAACACATCCCGATCTTG-3';

RLF-R: 5'-TCCATTGGAATAAGCCTCTTG-3';

ARF7-F: 5'-AGAAAATCTTTCCTGCTCTGGAT-3';

ARF7-R: 5'-TGTCTGAAAGTCCATGTGTTGTC-3';

ARF19-F: 5'-TCCAAGTTCCAACGAAGGAG-3';

ARF19-R: 5'-AAACTAAAGGCCCTGCACAA-3';

LBD16-F: 5'-TGACCCTGTTTATGTGTC-3';

LBD16-R: 5'-TGATTGCAAGAAAGCCACCT-3';

LBD29-F: 5'-GCTAGGCTTCAAGATCCCATC-3';

LBD29-R: 5'-TGTGCTGCTTGTTGCTTTAGA-3';

β -*TUBLIN4-F*: 5'-GAGGGAGCCATTGACAACATCTT-3';

β -*TUBLIN4-R*: 5'-GCGAACAGTTCACAGCTATGTTCA-3'

II-5. コンストラクション

発芽 3 日目の Col 植物体から Total RNA を抽出して cDNA 合成し、以下のプライマーを用いて *RLF* 遺伝子のコード領域を増幅した。

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGATACTAGTAGAGATG
ATG-3'

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGGGTTCTTGCTTCTTCACTTT
G -3'

そこから得られた 0.7kbp の PCR 産物を、プライマー配列に組み込んでおいた attB1、attB2 配列を使って、Gateway Technology(Invitrogen)の BP recombination reaction によって pDONR221 に導入し、シーケンスを確認した。

RLF promoter::RLF-GFP (pRLF::RLF-GFP) コンストラクトを作成するため、*RLF* 遺伝子の開始コドンの 5'領域 804bp を、以下のプライマーを用いて増幅した。

5'-GGCAAGCTTGTCTGACTGACAAGAGAGGACAATTTGG-3'

5'-GGCTCTAGAGTCGACCTTGAGCTTAATCTGCACGCA-3'

そこから得られた PCR 産物を、プライマー配列に組み込んでおいた *HindIII* 認識部位と *XbaI* 認識部位を用いて pBluescript II SK(+)(Stratagene)に導入し、シーケンスを確認した。その後、クローニングした pRLF 配列を、*HindIII* 認識部位と *XbaI* 認識部位を用いて GWB-GFP(C)ベクター(Okushima et al., 2007: 中川博士(Shimane University, Japan)より分与して頂いた GWB ベクターを改変して作成)に導入した。その後、pDONR221 に組み込んだ *RLF* コード配列を、LR recombination reaction(Invitrogen)によって GWB-GFP(C)ベクターの *pRLF* 配列と *GFP* 配列の間に導入した。

At5g09680/RLF を含むゲノム領域(*gRLF*)は、野生型 Col のゲノム DNA を鋳型にして、以下のプライマーを用いて増幅した。

5'-GGCAAGCTTGTCTGACTGACAAGAGAGGACAATTTG-3'

5'-GGCGTCGACATCTGAAACTCGGGCTCACAG-3'

そこから得られた約 2.2kbp の PCR 産物を、プライマーに組み込んでおいた *SalI* 認識部位を用いて pBluescriptII SK(+)に導入し、シーケンスを確認した。その後、*SalI* 認識部位を用いて *gRLF* 配列を pBI300 バイナリーベクター(pBI101 を改変して作成)に導入した。pBI300 バイナリーベクターは加藤博士(Nara Inst. of Sci. and Tech., Japan)より分与して頂いた。

RLF プロモーターで GUS 遺伝子を発現するレポーターコンストラクト (*pRLF::GUS*)の作成のため、pBluescript II SK(+)に導入した *pRLF* 配列を、

*Hind*III-*Xba*I 認識部位を用いて、pBI101 バイナリーベクターの GUS 遺伝子上流に導入した。

PUCHI の発現を反映するレポーターを作製するため、*puchi-1* の表現型を完全に相補した *GFP-PUCHI* コンストラクト(Hirota *et al.*; 2007; Karim *et al.* 2009) の *GFP-PUCHI* コード配列の代わりに YFP および mRFP をコードする配列をそれぞれ導入して *pPUCHI::YFP:tPUCHI* と *pPUCHI::mRFP:tPUCHI* を作成した。

II-6. 植物への形質転換

作成したコンストラクトをヒートショック法によりアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, MP90 株)に導入し、Floral dip 法(Clough and Bent *et al.* 1998)によって植物体に形質転換した。Floral dip 法を施した植物から得られた T1 種子を薬剤含有培地に蒔き、薬剤耐性を示す個体を選抜した。選抜用薬剤として pBI300、pBI101、pBIN50 ベクターを形質転換した場合には 35 μ M カナマイシン、pGWB-GFP(C)ベクターを形質転換した場合には 25 μ M ハイグロマイシン、pBIN30 ベクターを形質転換した場合には 10mg/L グルホシネートをそれぞれ使用した。薬剤耐性を示す個体を土に植え替え生育し、T2 種子を回収した。導入遺伝子のコピー数を確認するため、得られた T2 種子を薬剤含有培地に播種し、3:1 で薬剤耐性を示す系統をその後の解析に用いた。

II-7. PEG 法による培養細胞への一過的発現用プラスミド導入

培養 7 日目のシロイヌナズナ培養細胞(T-87)約 3g を 25ml の酵素液(0.4M Mannitol, 5mM EGTA, 250mg セルラーゼ Y-C, 12-6mg ペクトリアーゼ Y23)に懸濁後、30°C、50rpm の条件下で 2 時間振盪培養した。その後、300G で 10 分間遠心し、プロトプラストを回収した。25ml の溶液 A(0.4M mannitol, 70mM CaCl₂·6mM MES[pH5.7])に懸濁し、300G で 10 分間遠心しプロトプラストを回収する操作を 2 回繰り返した後、プロトプラストを 2ml の Mg 溶液(0.4M mannitol, 15mM MgCl₂·6mM MES[pH5.7])に懸濁した。100 μ l のプロトプラスト懸濁液に、プラスミド 10 μ g と Salmon sperm DNA(10 μ g/ μ l)を 2 μ l 加え、400 μ l の DNA 導入溶液(0.4M mannitol, 0.1M Ca(NO₃)₂, 40% PEG6000)とともに緩やかに攪拌した。氷上に 20 分間静置後、10ml の希釈溶液(0.4M mannitol, 125mM CaCl₂·6mM KCl, 5mM glucose, 1.5mM MES[pH5.7])に懸濁し、300G で 10 分間遠心し、回収したプロトプラストに終濃度 0.4M になるよう mannitol を加えた MS 培地 2-6ml を加え、23°C の暗所で緩やかに振盪しながら 12-15 時間培養し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡(OLYMPUS FLUOVIEW FV1000)を用いて観察した。

III. 結果と考察

第一部

新奇側根形成変異体 *rlf* の解析

結果

rlf-1 変異は側根イニシエーションにおける初期の細胞分裂を抑制する

rlf-1 変異体は、野生型の Col 系統に対してエチルメタンスルホン酸 (EMS) によって変異源処理された M2 種子群から単離された(図 2-1)。遺伝学的解析の結果、*rlf* 変異体の表現型は 5 番染色体上の単一劣性変異が原因であり、この領域ではこれまでにシロイヌナズナの側根形成に関与する変異は報告されておらず、*RLF* は側根形成に必要な新奇遺伝子であると考えられた。*rlf-1* 変異体の芽生えを観察すると、主根長は野生型と比べてやや短く (図 2-2a)、側根密度が半分程度に減少していた (図 2-2b)。本研究では、最も主根根端に近い位置で主根表皮より突出した側根から、最も主根根端から遠い位置の突出側根までの領域に対し、主根長 1cm あたりの突出側根数を側根密度として計測した。それに加えて、主根表皮から突出する以前の側根原基の数についても、発芽 9 日目の *rlf-1* 変異体は野生型と比べて半分程度に減少していた(図 2-3a)。また、それら側根原基を発達段階ごとに分けて野生型と比較した結果、各ステージに含まれる側根原基の割合は *rlf-1* 変異体と野生型で顕著な差は見られなかった(図 2-3b)。側根形成が開始する際の細胞分裂について解析するため、細胞周期の G2/M 期チェックポイントマーカーである *pCyclinB1;1::CyclinB1;1(NT)-GUS* (CycB-GUS)を用いて、 β -Glucuronidase(GUS)活性をもつ側根のイニシエーションを検出し、解析した(Doerner *et al.*, 1996; Colón-Carmona *et al.*, 1999; Fukaki *et al.*, 2002; Fukaki *et al.*, 2006)。野生型の側根形成では、CycB-GUS 活性は垂層分裂を開始した内鞘細胞層の数個の隣接する細胞で最初に観察され、その後 CycB-GUS 活性は側根原基に含まれる分裂中の細胞において観察される(図 2-4a)。そのため、内鞘細胞の垂層分裂を伴わず CycB-GUS 活性のみが観察される部位は側根のイニシエーション直前の細胞であると考えられるが、興味深い事に、発芽 9 日目の *rlf-1* 変異体の主根には、このような CycB-GUS 活性のみを示す部位が野生型よりも多数観察され(図 2-4b)、その一方で側根原基数は減少していた(図 2-4c)。そして、このような側根形成直前と思われる部位と側根原基とを合わせた 1 個体あたりの数は、野生型と *rlf-1* 変異体との間で差は見られなかった。これらの観察結果から *rlf-1* 変異体では細胞分裂中の側根原基が減る一方で、側根形成における最初の細胞分裂直前の細胞が多くなっている

ることが示された。このことから、*rlf-1* 変異によって側根形成の開始にあたる内鞘細胞の垂層分裂が抑制されていることが考えられる。また、*rlf-1* 変異体において、このような細胞分裂を伴わずに CycB-GUS 活性を示す内鞘細胞群は、主根根端から離れた領域ではあまり観察されず、よりの領域において多く観察されたことから、細胞分裂抑制時の *CyclinB1* の転写活性化は一過性であり、細胞分裂が抑制されたのちに *CyclinB1* の転写量は再び基底状態に戻ると考えられる。

rlf-1 変異体の主根伸長速度は野生型の約 80% に低下していたことから (図 2-2a)、その原因として細胞伸長の低下もしくは細胞分裂活性の低下が考えられる。その可能性を検討するため、細胞伸長が終了しているとされる分化領域の皮層細胞において、主根伸長軸方向の細胞長を測定した。その結果、野生型と *rlf-1* 変異体はほぼ等しい値を示した (図 2-5)。このことは *rlf* 変異体において根端分裂組織の細胞分裂活性が低下している事を示唆している。しかしながら、野生型と *rlf-1* 変異体の根端における CycB-GUS 活性に顕著な差は見られなかった (図 2-6)。また、根端分裂組織における幹細胞の形成、維持に異常がないかを調べるため、静止中心 (quiescent center: QC) マーカーである QC25、QC46、QC184 を用いて観察を行った。その結果、GUS 活性によって示される QC アイデンティティを持つ細胞、およびルゴール染色によって示されるアミロプラストを含む分化したコルメラ細胞のパターニングなどは、野生型と *rlf-1* 変異体との間で明確な違いは見られなかったことから (図 2-7)、*rlf-1* 変異は根端分裂組織の形成、維持に直接的な影響はしないと考えられる。

rlf 変異体は側根形成の阻害に加えて、葉の矮小化、葉柄の短縮、シュート伸長の減少など、地上部にも多面的な表現型を示す (図 2-8)。また、子葉においても葉身長の短縮が見られたが (図 2-9a)、それぞれの葉肉細胞を観察したところ、野生型と比べ細胞のサイズに大きな差は見られなかった (図 2-9c, d)。そこで、葉身長を計測した葉の長軸方向に並ぶ葉肉細胞の個数を計測したところ *rlf* 変異体では細胞数が減少していた (図 2-9b)。このことから、器官サイズの減少は個々の細胞の矮小化ではなく細胞数の減少が原因であることが示唆された。これらの観察結果は、RLF タンパク質が地上部の形態形成も含めた様々な器官の成長に関与している事を示している。

***rlf-1* 変異は主根伸長、側根形成におけるオーキシン感受性に影響しない**

側根形成には植物ホルモンであるオーキシンが重要であり、外性オーキシンによって濃度依存的に主根伸長が阻害され側根形成が促進されることが知られている(Casimiro et al. 2001)。*rlf-1*変異体では側根数が減少していたことから、*rlf-1*変異は内生オーキシンの生合成や輸送あるいはシグナル伝達を阻害することによって側根形成を阻害している可能性が考えられる。そこで、*rlf-1*変異体の根におけるオーキシン応答能を調べるため、外性オーキシンとしてIAA、NAA、2,4-Dのそれぞれを投与して影響を調べた。発芽後5日目の野生型、*rlf-1*変異体それぞれを各種濃度の外性オーキシンを配合した培地上に移し替えて2日間生育させ、主根伸長および側根密度を計測した。その結果、*rlf-1*変異体の主根伸長は添加した外性オーキシンの濃度依存的に阻害され、Mock処理群に対する伸長阻害の比率は野生型とほぼ同様の傾向を示した(図2-10)。これらの結果は、*rlf-1*変異は根の伸長におけるオーキシン応答に影響を与えないことを示している。それに加えて、オーキシン応答レポーターであるDR5::GUS(Ulmasov et al., 1997; Benková et al., 2003)は、根端部において野生型と*rlf-1*変異体で同様の発現パターンを示した(図2-11)。このことは野生型の根端部においてオーキシン応答の局在を形成しているオーキシンの輸送メカニズムやシグナル応答経路が*rlf-1*変異体の根においても同様に機能していることを示している。しかしながら、*rlf-1*変異体に外性オーキシンを投与した場合の側根密度は濃度依存的に増加したものの、同濃度の外性オーキシンを処理した場合の野生型よりも常に減少していた(図2-12)。これらのことは、*rlf-1*変異体では外性オーキシンの有無に関わらず、側根形成能が低下していることを示している。今回実験した全ての外性オーキシンの種類、濃度において、常に*rlf-1*変異体の側根密度は野生型よりも減少していたにも関わらず、濃度依存的なオーキシン誘導性の側根形成増加が見られた。このことは、*rlf-1*変異体の側根形成におけるオーキシン応答能が低下していないことを示唆している。

側根のイニシエーションに関与する遺伝子 *LBD16/ASL18* および *LBD29/ASL16* のオーキシンに誘導される発現は *rlf-1* 変異に影響を受けない。既になされた研究により、オーキシンは ARF7 と ARF19、さらにそれらによってオーキシン存在下で発現上昇される *LBD16/ASL18* 遺伝子と *LBD29/ASL16* 遺伝子の働きをとおして側根のイニシエーションを制御していることが明らかにされている(Okushima et al., 2007)。そこで、RLF と ARF7/19 によって制御されるオーキシンスグナリングとの関係を明らかにするために、*rlf-1* 変異が *ARF7*、*ARF19* とオーキシンに誘導される *LBD16/ASL18* と

LBD29/ASL16 の発現上昇に影響を与えるかどうかを調べた。リアルタイム RT-PCR による発現量解析の結果、*rlf-1* 変異体の根において、*ARF7* および *ARF19* の mRNA 量は野生型との間に差は見られなかった(図 2-13)。また、オーキシン処理に応答した *LBD16/ASL18* と *LBD29/ASL16* の mRNA 量の増加にも差は見られなかった(図 2-14)。さらに、*LBD16/ASL18* と *LBD29/ASL16* の組織特異的な発現パターンを *pLBD16::GUS* と *pLBD29::GUS* を用いて調べた。これらのレポーターは野生型において、側根のイニシエーション部位と側根原基でおもに発現し、(図 2-15, Okushima *et al.*, 2007)外性オーキシン処理によって、側根原基とその外側の領域で発現が促進される(図 2-15)。*rlf-1* 変異体において、*pLBD16::GUS* と *pLBD29::GUS* は野生型の場合と同様の発現パターンが観察され、外性オーキシン処理による影響も同様に表れた。これらの結果から、RLF タンパク質はオーキシンに誘導される、*ARF7/19* のターゲット遺伝子 *LBD16/ASL18* と *LBD29/ASL16* の発現制御に必要ではないことが明らかになった。

RLF 遺伝子は cytochrome b₅-like heme/steroid binding domain を持つ新奇のタンパク質をコードする

本研究室の深城らによって行われたマップベースクローニングにより、*rlf-1* 変異が第 5 番染色体上の約 74kb の BAC 領域(F17I14)に存在することが示唆されており、シーケンスによりこの領域内の遺伝子 *At5g09680* 上に 1 塩基の欠失変異が確認された。この変異により *At5g09680* タンパク質にフレームシフトが生じ、17 アミノ酸の変異と終止コドンの出現による翻訳停止が起こると考えられる(図 2-16a)。また、*rlf-1* に加えて、*At5g09680* 遺伝子のコード領域に T-DNA が挿入した系統株 GABI_773E12(The Nottingham Arabidopsis Stock Centre[NASC]より入手)について解析したところ、T-DNA 挿入をホモに持つ個体は *rlf-1* 変異体と酷似した表現型を示した(図 2-1a)。交配によるアレリズムテストの結果、*rlf-1* 変異と GABI_773E12 の T-DNA 挿入をそれぞれヘテロに持つ F1 個体(n=7)が *rlf-1* と同様の表現型を示した。以上の結果から、*rlf-1* 変異体の原因遺伝子が *At5g09680* であることが遺伝学的に示された。また、これにより GABI_773E12 を *rlf-2* 変異体と命名した。*At5g09680* のゲノム断片を含むコンストラクトおよび自身のプロモーター制御下で、3'側に GFP 遺伝子が融合した CDS 配列を発現するコンストラクト(*pAt5g09680::At5g09680-GFP*)を *rlf-1* 変異体に形質転換して、相補性試験を行った。その結果、得られた形質転換体において側根形成数が野生型と同程度に回復し、*rlf-1* 変異体の表現型を相

補した(図 2-17)。この結果も、前述のアレリズムテストの結果を支持した。また、*pAt5g09680::At5g09680-GFP*が *rlf-1*変異体の表現型を回復したことから、C 末端 GFP 融合タンパク質が植物体内において機能的であること、およびその発現に用いた 804bp のプロモーター配列が野生型の側根形成における *RLR50* 遺伝子の機能発現に十分であることが示された。*RLF/At5g09680* 遺伝子は cytochrome b₅-like heme/steroid binding domain をもつ 211 アミノ酸からなるタンパク質をコードしている(図 2-16b)。このドメインは動物を含む多くの生物種のヘムタンパク質で共通して保存されており、シロイヌナズナのゲノム上には 15 種類の cytochrome b₅-like heme/steroid binding domain をもつタンパク質がコードされている。その内訳は、6 つのシトクロム b₅ ファミリータンパク質 (At1g26340, At1g60660, At2g32720, At2g46650, At5g48810, and At5g53560) (Maggio *et al.*, 2007)、4 つの膜局在型プロゲステロン結合タンパク質 (At2g24940 [MAPR2], At3g48890 [MAPR3], At4g14965 [MAPR4], and At5g52240 [MAPR5]) (Yang *et al.*, 2005)、2 つの Δ⁸-スフィンゴイド塩基不飽和化酵素 (At3g61580 [SLD1] and At2g46210) (Sperling *et al.*, 1998)、2 つの硝酸還元酵素 (At1g77760 [NR1] and At1g37130 [NR2]) (Cheng *et al.*, 1988; Wilkinson and Crawford, 1991)、そして *RLF*(At5g09680)である。これらの中に *RLF* と同様の構造を持つタンパク質はなく、相同性検索の結果シロイヌナズナのゲノムにおいて単一遺伝子であることが分かった。また、その他の生物種では *RLF* に似たタンパク質がイネ (*Oriza sativa*, Os07g0232200, 相同性 79 % [87-202 a.a.]), トウモロコシ (*Zea mays*, NP_001140357, 相同性 76 % [84-202 a.a.]), ブドウ (*Vitis vinifera*, 相同性 78 % [8-205 a.a.]), ポプラ (*Populus tirhocarpa*, XP002298420, 相同性 57 % [6-202 a.a.]), ヒメツリガネゴケ (XP_001778606, 相同性 72 % [95-202 a.a.]), クラミドモナス (XP_001693518, 相同性 63 % [84-201 a.a.]) のデータベースにおいてそれぞれ見つかった。このように、*RLF* 遺伝子は双子葉類、単子葉類、コケ類、緑藻類など多くの植物種において高度に保存されていた。

***RLF* 遺伝子の発現パターンおよび *RLF* タンパク質の細胞内局在**

rlf 変異体は根だけでなく葉やシュートなど多くの組織で表現型を示す。そこで各器官での *RLF* 遺伝子の発現パターンを調べるために、リアルタイム RT-PCR を行った。その結果、*RLF* 遺伝子は根、葉、茎、花など多くの組織で強く発現していた(図 2-18a)。また、*rlf-1* 変異体と *rlf-2* 変異体の発芽後 10 日目の根において、*RLF*mRNA の存在量を調べたところ、*rlf-1* 変異体においては野生型と比べて *RLF*mRNA 量が低下していた(図 2-18b)。これは、おそらくはナンセンス変異依存 mRNA 分解機構(NMD)の働きによるものと考えられ、mRNA の

欠失から *rlf-1* 変異体は遺伝子機能を欠失した変異体であると考えられる。その一方、*rlf-2* 変異体の根においては *RLF*mRNA の存在量が野生型よりも増加していた。リアルタイム RT-PCR に用いたプライマーは *rlf-2* の T-DNA 挿入位置よりも 5'上流の領域を増幅する配列であるため、*rlf-2* 変異体内では T-DNA 挿入により異常な転写が起こっていると考えられる。しかしながら、*rlf-2* 変異体が劣性の遺伝様式を示し、*rlf-1* 変異体と全く同じ表現型を示すことから、*rlf-2* 変異体も遺伝子機能の欠失した変異体であると考えられる。

次に、組織特異的な発現パターンを調べるために、相補性試験に用いた 804bp のプロモーター配列によって GUS 遺伝子を発現する植物体(*pRLF::GUS*)の観察を行ったところ、根の維管束および根端部を中心に強い GUS 活性が見られた(図 2-19a)。また、形成途中の側根原基においても強く発現していたほか(図 2-19e)、地上部ではロゼット葉や雄しべの花糸、雌しべの基部および先端部で発現が見られた(図 2-19b-d)。今回、独立した 4 つの *pRLF::GUS* 形質転換系統を観察したが、その全てで根、地上部ともに同様の GUS 活性パターンが観察された。これらの結果から、*RLF* は植物体のほぼ全ての器官において発現して機能していると考えられ、*rlf* 変異体の多面的な表現型からもそのことが示唆される。

RLF タンパク質はアミノ酸配列から予想される局在シグナルなどをもたず、機能的にも未知である。そこで、*RLF* タンパク質の機能する細胞内局在を明らかにするために、*rlf-1* 変異体の表現型を相補した機能的な GFP 融合タンパク質の細胞内局在を解析した。共焦点傾向顕微鏡を用いた観察の結果、根の表皮細胞において細胞質に GFP 蛍光が観察された(図 2-20a)。それに加えて、シロイヌナズナの培養細胞を用いた一過的発現解析でも植物体と同様に、細胞質において GFP 蛍光が観察された(図 2-20b-d)。これらの観察結果から、*RLF* タンパク質は細胞質に存在して機能していることが示唆された。

***RLF* 遺伝子は ARF7/19 に制御されるオーキシシンシグナリングとは独立に側根形成に関与する**

ARF7 と ARF19 は側根形成において不可欠とされる転写因子であり、下流の転写因子 *LBD16/ASL18* と *LBD29/ASL16* の活性を介して側根形成を制御している。しかしながら、*rlf-1* 変異はオーキシシンに応答した *LBD16/ASL18* と *LBD29/ASL16* の発現上昇に影響しない(図 2-14, 図 2-15)。それに加えて、転写因子である ARF7/19 および *LBD16/29* が核に局在する(Okushima *et al.*, 2007)のとは異なり、*RLF* タンパク質は細胞質に局在する(図 2-20)ことから、側根形

成における RLF タンパク質の機能は ARF7/19 に制御されるオーキシニンシグナリングとは独立であることが強く示唆される。そこで、さらなる証拠を得るため、*RLF* と *ARF7/19* との遺伝学的関係を調べた。交配により *arf7-1 rlf-1* 二重変異体と *arf19 rlf-1* 二重変異体を作成し、*arf7*、*arf19*、*rlf-1* 単一変異体と野生型のそれぞれと比較した。発芽後 12 日目の芽生えにおいて比較したところ、*arf7-1* 変異体は、既になされた研究で詳細に報告されているように、野生型と比較して側根数が減少していた(図 2-21, Okushima *et al.*, 2005)が、*rlf-1arf7-1* 二重変異体はそれぞれの単一変異体と比べて、さらに側根数が減少していたことから(図 2-21)、これらの変異の影響は相加的であるといえる。このことから、*ARF7* が存在しない状態での側根形成にも、*RLF* は必要である事が示唆された。さらに、*arf19-1* 単一変異体は野生型と比べてほんの少し側根数が低下するが、*rlf-1arf19* 二重変異体は顕著に側根形成が減少する。これらの観察結果は *RLF* が *ARF7/19* の制御するオーキシニン応答経路とは独立に側根形成に貢献していると言う仮説を強く支持する。

考察

***RLF* は側根形成に必要な新奇の細胞質性タンパク質で、*ARF7/19* に制御されるオーキシニンシグナリングとは独立にはたらく**

本研究では *rlf-1* 変異がシロイヌナズナの側根形成において、側根原基のイニシエーション頻度を低下させることで側根数を減少させていることを明らかにした。*rlf-1* 変異は外性オーキシニンの処理によって誘導される根の伸長阻害や、*pLBD16::GUS* や *pLBD29::GUS*、*DR5::GUS* によって示されるオーキシニン応答遺伝子群の発現に影響せず、また *rlf-1* 変異体ではオーキシニン処理実験に用いた全てのオーキシニン種および濃度において、オーキシニンに応答した側根形成を示したものの、野生型と比べて常に側根形成は阻害されていた。これらの結果から、*rlf-1* 変異はオーキシニンの生合成、輸送およびシグナル伝達に対して直接には影響しないが、側根形成のイニシエーションを特異的に減少させていることが示唆された。*rlf-1* 変異体内で、側根原基となる以前の一層の内鞘細胞において *CycB-GUS* レポーターを発現する細胞の頻度が増加していたことは、細胞分裂以前の側根イニシエーション予定部位において、*RLF* が内鞘細胞の分裂活性に関与している可能性を示唆している。遺伝子から予想される *RLF* タンパク質と既知の細胞周期制御因子との関連は全く知られていないが、*RLF* タンパク質のもつ cytochrome b₅-like heme/steroid binding domain は酸化還元反応において電子の輸送体であるシトクロム b₅ や硝酸還元酵素などのタンパク質におい

て広く保存されている。しかしながら、**RLF** タンパク質は特有の構造を持つタンパク質であり、酵素活性の予想されるはっきりとしたドメインを持たない。**cytochrome b₅-like heme/steroid binding domain** をもつ **RLF** タンパク質の分子機能は未知であるが、このドメインは **Cytochrome b₅** といったヘムタンパク質や脂肪酸不飽和化酵素、**NADPH** 脱水素酵素あるいは硝酸還元化酵素などにおいて保存されており、酸化還元反応における電子伝達に関与すると考えられている。このことに加えて、**RLF** タンパク質は他に酵素活性ドメインなどを持たないことから、なんらかの酵素反応そのものではなく、その過程の制御に関わっている可能性が考えられる。あるいは、**RLF** が細胞質に広く存在するタンパク質であることから、細胞内の酸化還元状態に影響を与えている可能性も考えられる。一般に、細胞内の酸化還元状態は様々な反応過程の活性に影響を与える。植物においても細胞分裂や細胞伸長過程において、細胞の酸化還元状態が変化することが知られている(Joo *et al.*, 2001; Sanchez-Fernandez *et al.*, 1997; Schopfer 2001)。またコムギでは、根端分裂組織を維持するために必要な静止中心において、細胞内が周囲の細胞と比べて酸化状態にあることが示されている(Jiang *et al.*, 2003)。これらのことから、細胞のアイデンティティを維持、または変化させるために酸化還元状態に関与することが示唆されている。また、シロイヌナズナにおいて、細胞の酸化還元状態に関与するグルタチオン還元化酵素の変異体において、側根形成がやや減少することが報告されている(Henmi *et al.*, 2005)。以上のことから推測すると、**RLF** タンパク質はヘムタンパク質としてなんらかの酸化還元反応に関与し、細胞内の酸化還元状態を変化させることで側根形成や他の器官成長などの形態形成過程に関与しているのかもしれない。また、分裂組織あるいはそれ以外の組織の細胞での **RLF** の発現解析の結果から、**RLF** が細胞内の恒常的な機能に関与しており、それが側根のイニシエーションや地上部での器官成長の両方に対して二次的な影響を及ぼしている可能性も考えられる。

今回、側根形成のイニシエーションに重要な **LBD16/ASL18** 遺伝子と **LBD29/ASL16** 遺伝子のオーキシンに応答した発現が、**rfl-1** 変異に影響を受けていないことを明らかにした。この結果は **RLF** が **LBD16/ASL18** 遺伝子と **LBD29/ASL16** 遺伝子の発現に関与していないことを示しており、**RLF-GFP** 融合タンパク質が細胞質に局在したことは、**RLF** が **ARF-Aux/IAA** による転写制御に対して直接的な機能を持っていないことを強く示唆する。さらに、**rfl-1** 変異体と **arf7arf19** 変異体との遺伝学的解析から、**rfl-1** 変異と **arf7arf19** 変異の側根形成抑制効果は相加的であることが示された。したがって、**RLF** は **ARF7/19** に制御されるオーキシンシグナル過程とは独立に、側根形成を促進す

る機能をもつと言える。では、**RLF** は側根形成において、**LBD16/ASL18** および **LBD29/ASL16** のさらに下流の過程に関与するのだろうか。それについては、たとえば *arf7 arf19* 二重変異体背景で **LBD16** を過剰発現させることで側根形成をある程度回復させた植物体(Okushima *et al.*, 2007)において、側根形成の回復に **RLF** が必要であるかを調べることで明らかにできるだろう。

シロイヌナズナにおいて、**RLF** 遺伝子は単一コピー遺伝子であり、他の植物種では、双子葉類の木本種であるポプラ、単子葉類のイネやトウモロコシ、コケ類のヒメツリガネゴケ、緑藻類のクラミドモナスなど多くの植物において **RLF** 遺伝子と相同性の高い遺伝子が広く保存されている。**RLF** タンパク質の種間で保存された機能の解明には、これら **RLF** 様遺伝子群の機能解析が重要であると考えられる。また、cytochrome b₅-like heme/steroid binding domain をもつ細胞質局在タンパク質が側根形成や器官成長において果たす役割、また **RLF** の働く過程が、どのようにオーキシンに制御される側根形成過程と関わるのかを解明するためには、**RLF** タンパク質の細胞単位での詳細な分子機能の解析が必要である。

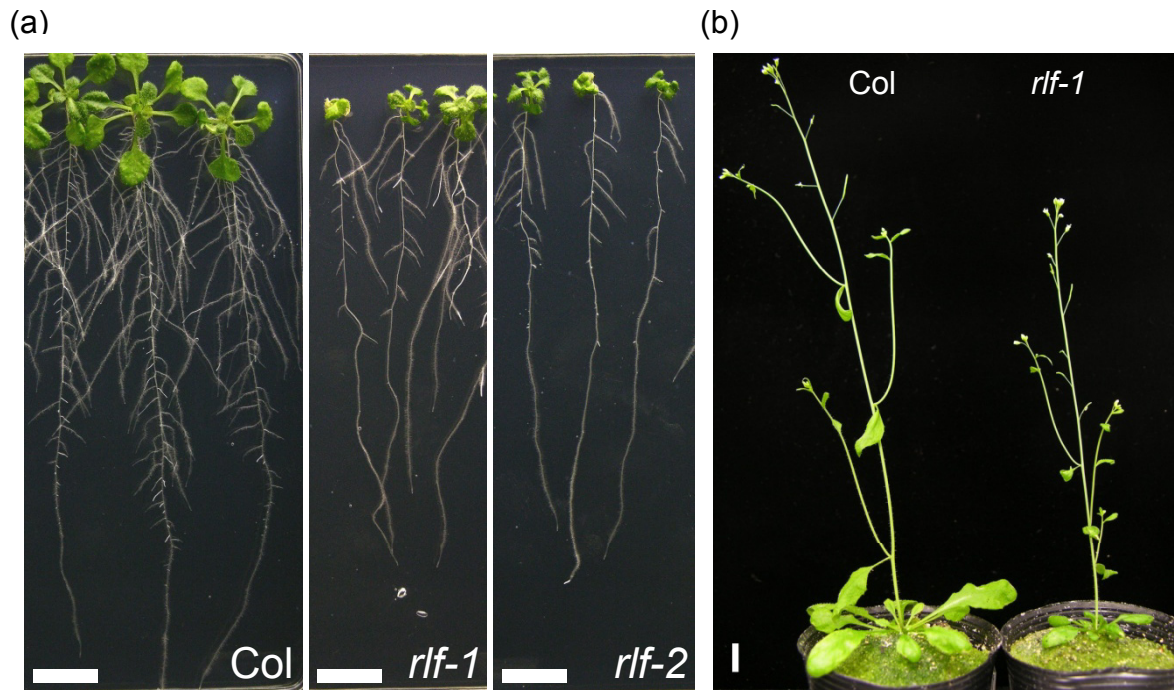


図. 2-1 *rlf*変異体の外観
(a); 発芽後18日目の植物体.
(b); 発芽後30日目の植物体.
スケールバーは1cm.

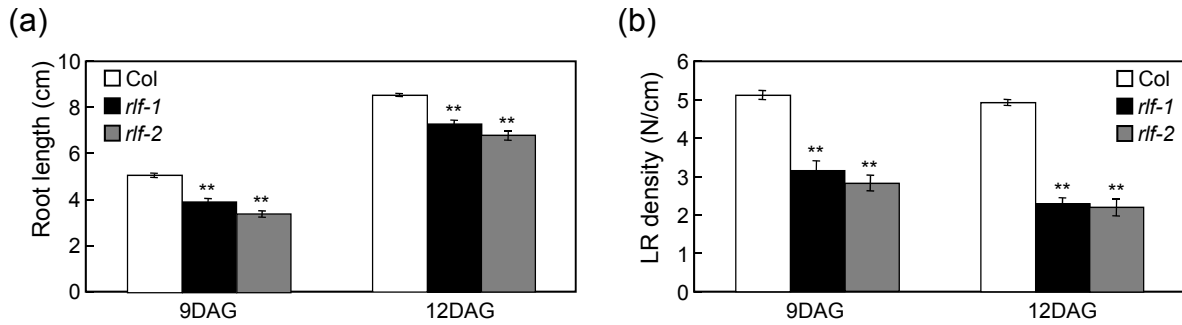


図. 2-2 *rlf*変異体の主根伸長と側根形成

(a)発芽後9日目、12日目の主根長。

(b)発芽後9日目、12日目の側根密度.側根密度は(主根表皮から突出した側根数 / 側根形成領域長[最も根端よりで観察された側根から基部までの距離])で算出。

エラーバーはSE(n > 31)。

それぞれ、同条件のColとの間でt検定を行った。**P<0.01。

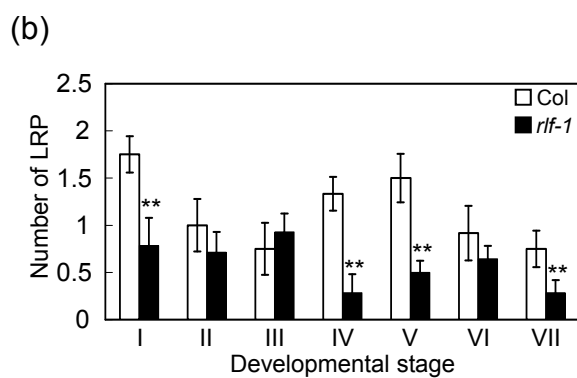
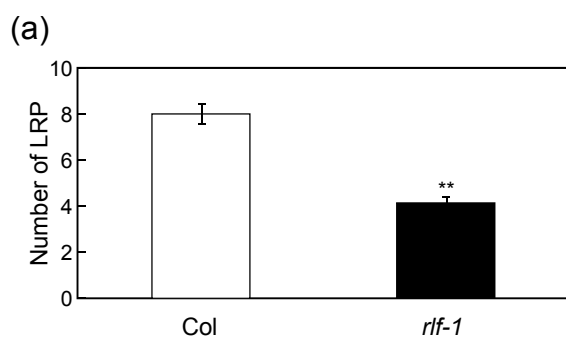


図. 2-3 *rlf*変異体の側根形成過程

(a); 発芽後9日目の側根原基数. Colとの間でt検定を行った. ** $P < 0.01$.

(b); 側根原基形成の発達段階ごとの側根原基数. 発芽後9日目.

エラーバーはSE. $N > 20$.

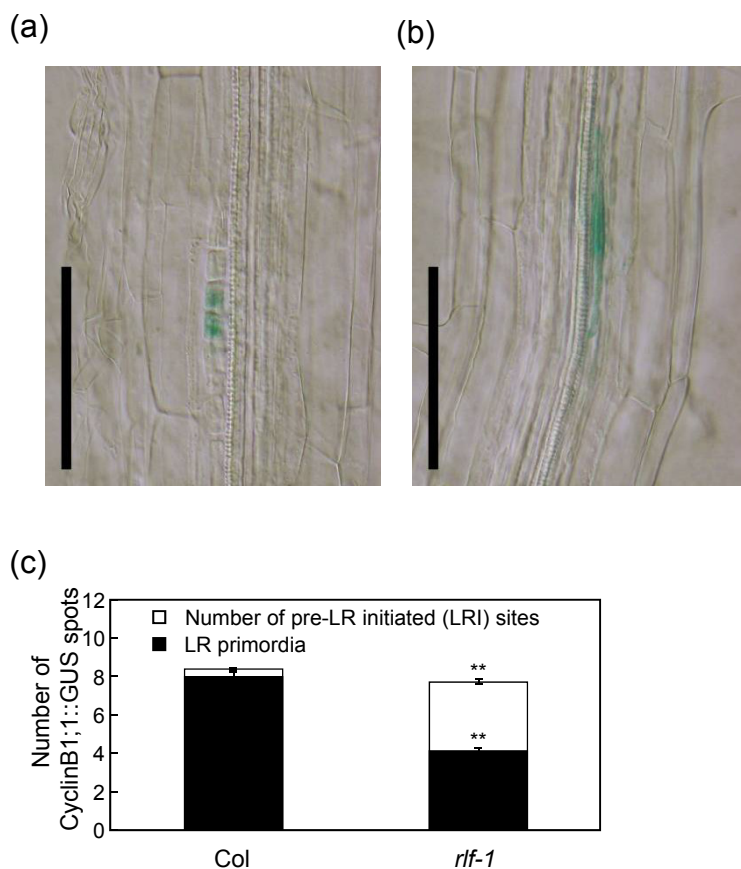


図. 2-4 CycB-GUSを用いたプレインシエーション部位の解析

(a,b)内鞘細胞層で観察されたCycB-GUS活性を示す細胞. (a)野生型のステージ1の側根原基. (b)*rlf-1*変異体で多く見られる、側根始源細胞の分裂以前でCycB-GUS活性を示すプレインシエーション部位.

スケールバーは100 μ m.

(c)発芽後9日目の側根原基数(黒棒)および、プレインシエーション部位数(白棒)の比較.

エラーバーはSE. N>20.

側根原基数、プレインシエーション部位それぞれについて、Colとの間でt検定を行った. **P<0.01.

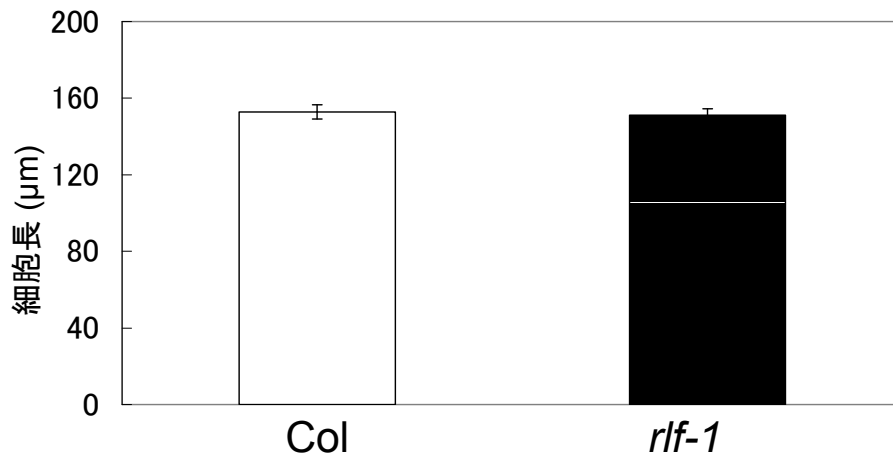
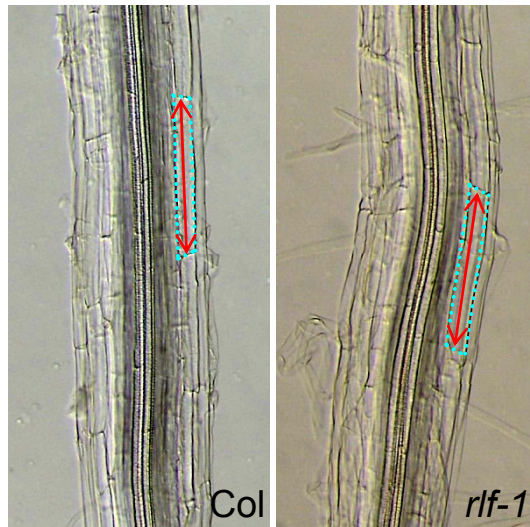


図. 2-5 細胞サイズの比較

発芽後6日目の主根において、細胞伸長が終了した分化領域の皮層細胞の求頂軸方向の細胞長を測定し、比較した。

1個体あたり20個の細胞について測定し、平均化した。エラーバーはSE. N=5.

t検定により、有意差は認められなかった。

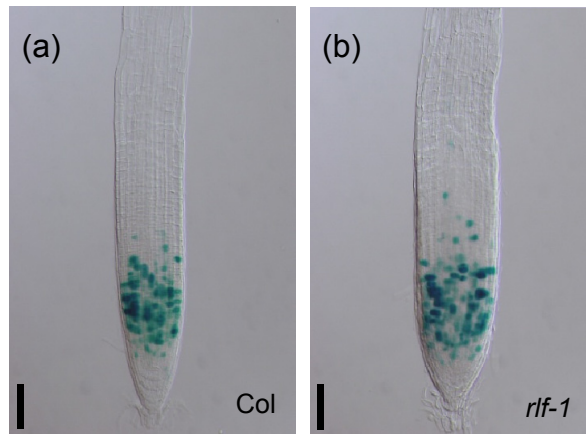


図. 2-6 根端分裂組織の分裂活性
発芽後5日目の主根の根端分裂組織における、細胞分裂マーカー
CycB-GUS活性の比較. (a)Col. (b)*rlf-1*変異体. Colと*rlf-1*変異体との
間に顕著な違いは見られない.
スケールバーは100 μ m.

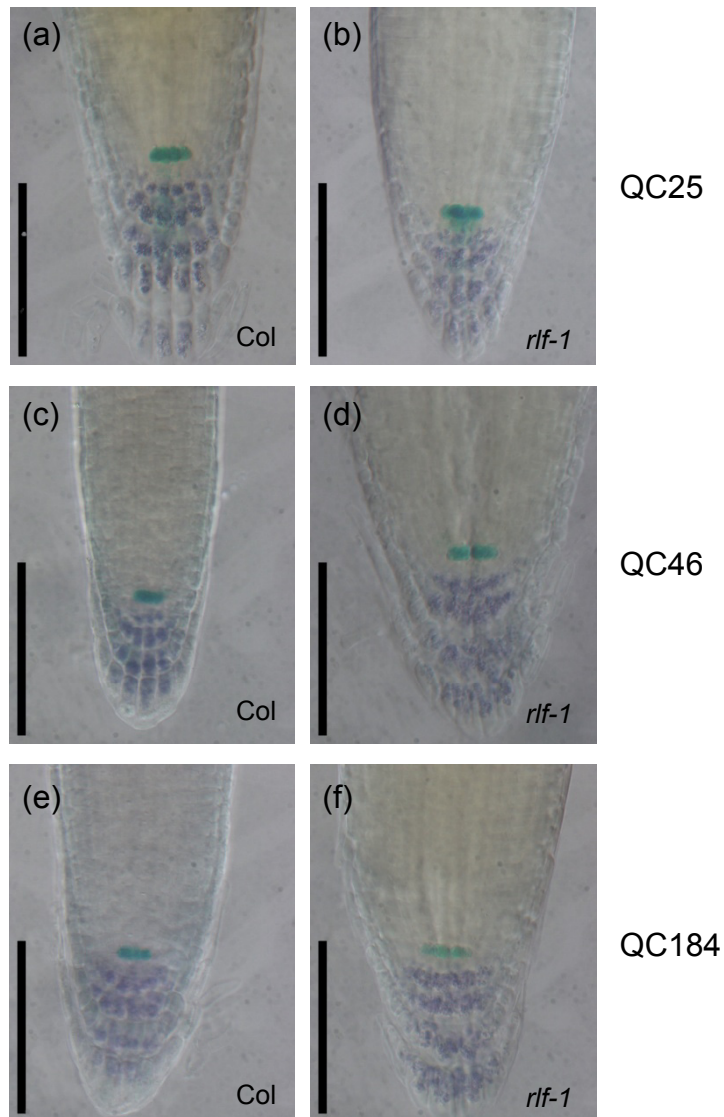


図. 2-7 静止中心(QC)活性と根端分裂組織の細胞パターン
 発芽後5日目の主根の根端分裂組織における、QCマーカの発現とアミロプラスト染色パターン. (a,b)QC25マーカの染色パターン. (c,d)QC46マーカの染色パターン. (e,f)QC184マーカの染色パターン. QCマーカの発現、染色されたアミロプラストによって示されるコルメラ細胞の分化パターンは、Colと*rlf-1*変異体との間に顕著な違いは見られない.
 スケールバーは100 μ m.

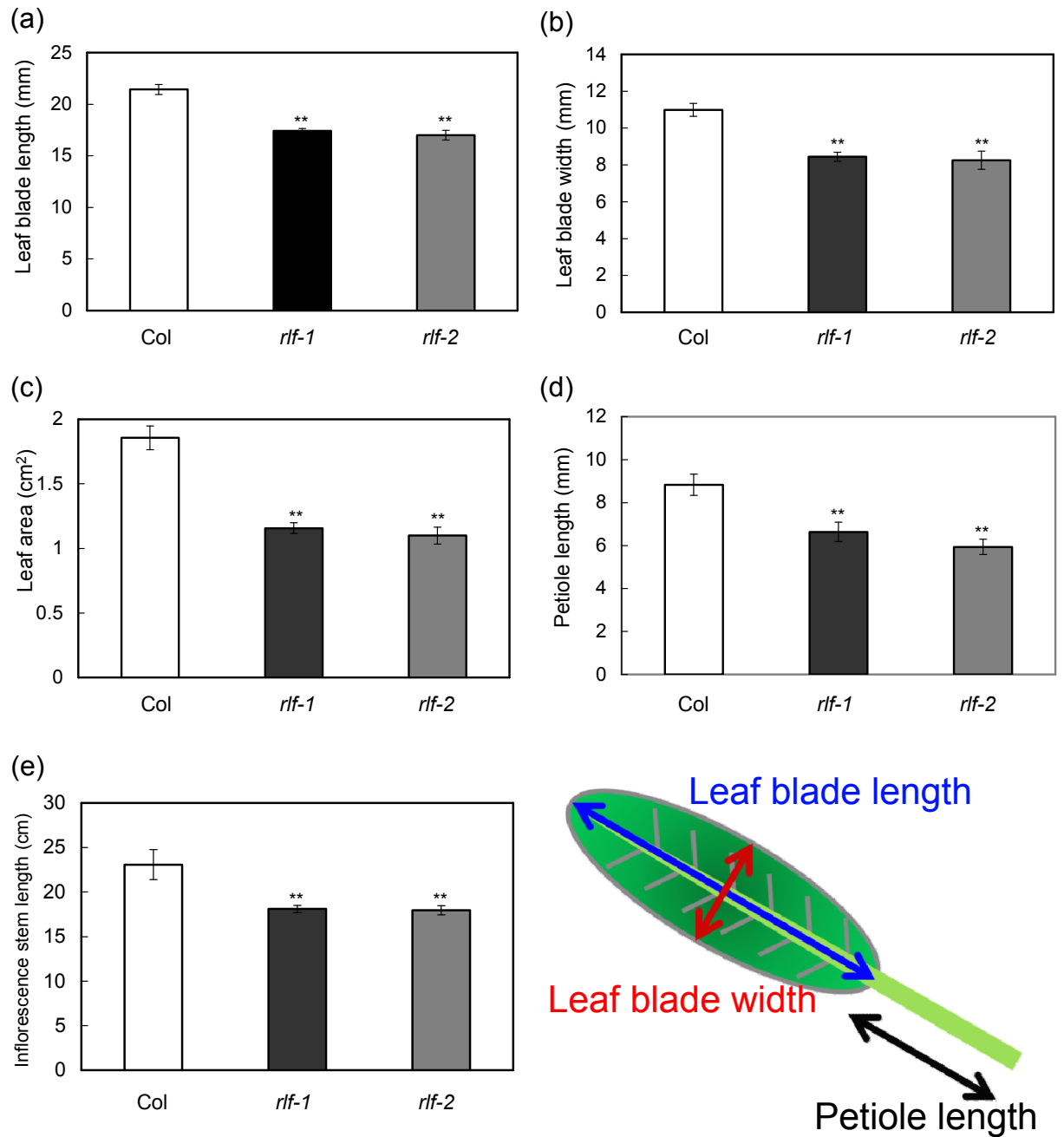


図. 2-8 地上部組織の成長抑制

*rlf*変異体は地上部の組織でも全般的に成長が抑制されている。

発芽後36日目の植物体の各部位を測定した。

(a-d)ロゼット葉第6葉のサイズ。(a)葉身の長さ。(b)葉身の最大幅。

(c)(a)と(b)の値から楕円近似で算出した葉身の面積。(d)葉柄の長さ。

(e)主茎の長さ。

エラーバーはSE(n = 10)。**P<0.01(Student t-test)。

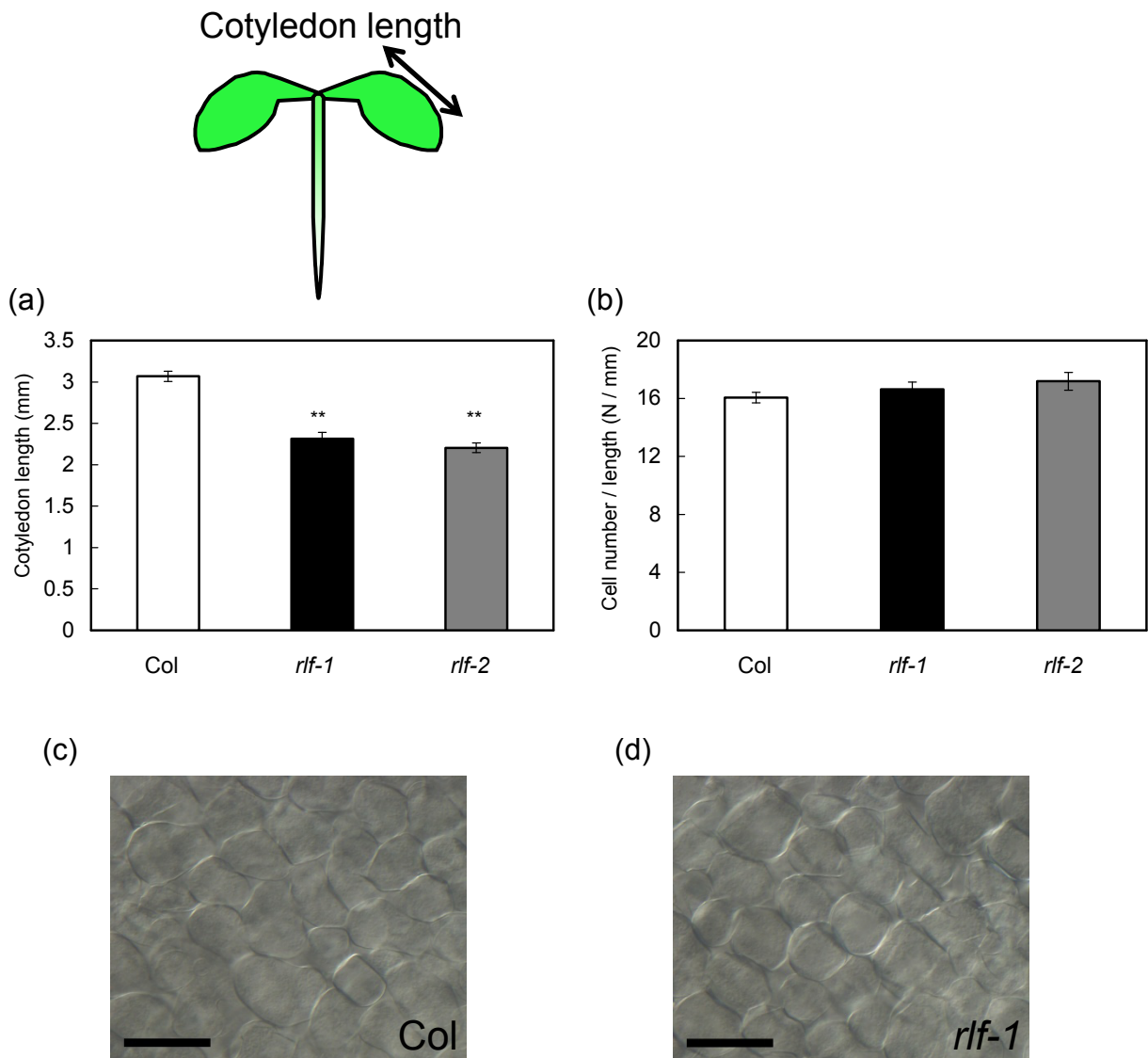


図. 2-9 子葉の成長抑制と細胞サイズ

発芽後31日目の子葉を測定した。

(a)子葉の葉身長。*rif*変異体では野生型と比べて減少している。

(b)(a)で測定した長さ部分の葉肉細胞の数を測定し、葉身長1mmあたりの値を比較した。*rif*変異体では長さが減少したぶんだけ細胞数が減少しており、1mmあたりの細胞数に差は見られなかった。

エラーバーはSE($n = 10$)。** $P < 0.01$ (Student *t*-test)。

(c)Colの子葉葉肉細胞。

(d)*rif-1*変異体の子葉葉肉細胞。

スケールバーは100 μ m。

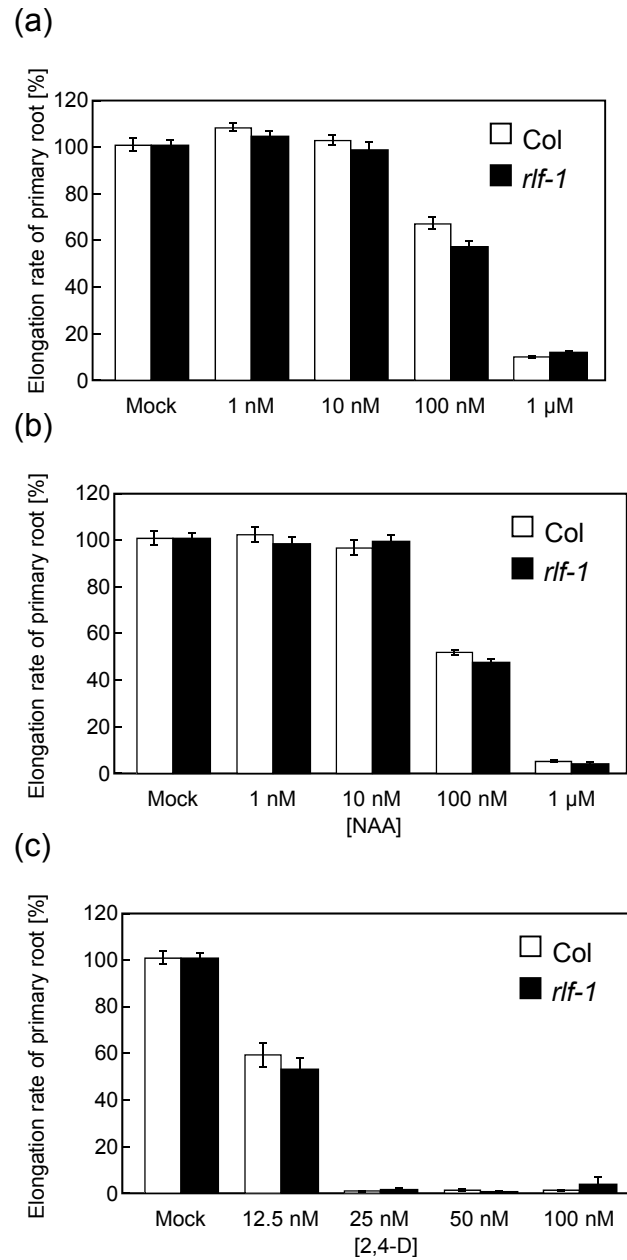


図. 2-10 外性オーキシン処理による主根伸長阻害
 発芽後5日目の芽生えをオーキシン含有培地に移植し、その後2日間の主根伸長量を比較した。各Mock処理群の伸長量を100%とし、主根伸長阻害の程度を表している。

(a)外性IAAによる主根伸長阻害。

(b)外性NAAによる主根伸長阻害。

(c)外性2,4-Dによる主根伸長阻害。

エラーバーはSE(n = 28)。



図. 2-11 主根根端におけるオーキシン局在の形成
発芽後5日目の主根の根端分裂組織における、オーキシン応答マーカーDR5::GUS活性の比較。
(a)Col. (b)*rlf-1*変異体。
Colと*rlf-1*変異体との間に顕著な違いは見られない。
スケールバーは50 μ m.

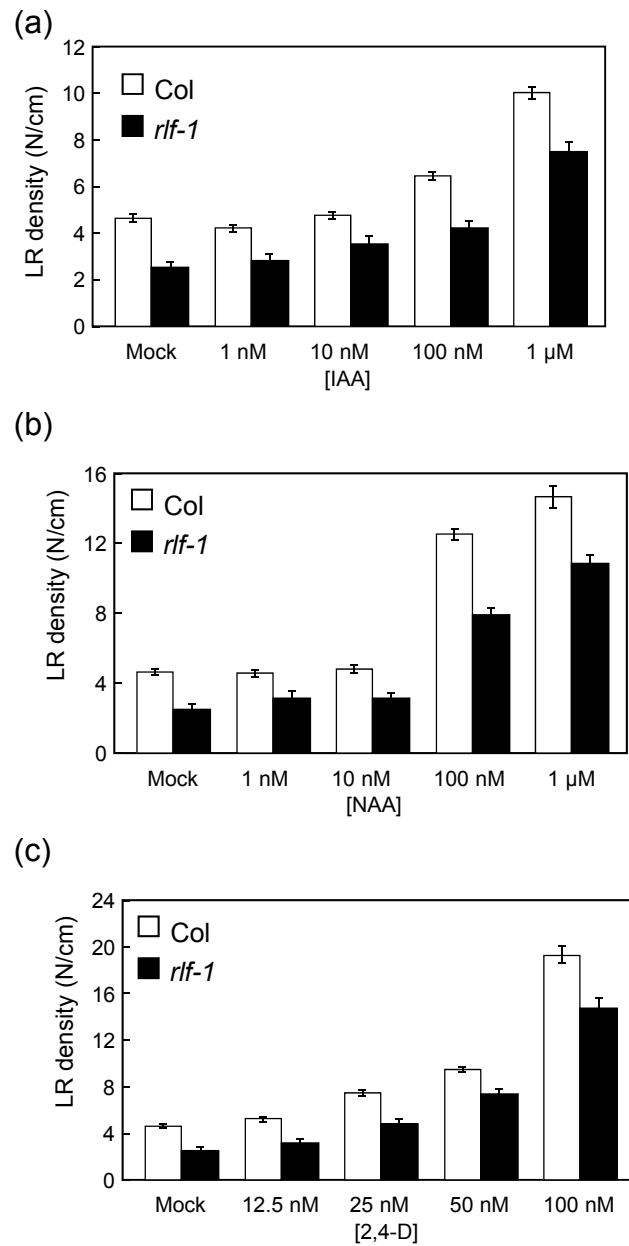


図. 2-12 外性オーキシン処理による主根伸長阻害
 発芽後5日目の芽生えをオーキシン含有培地に移植し、その2日後の側根密度を比較した。

- (a)外性IAA処理後の側根密度。
 - (b)外性NAA処理後の側根密度。
 - (c)外性2,4-D処理後の側根密度。
- エラーバーはSE(n = 28)。

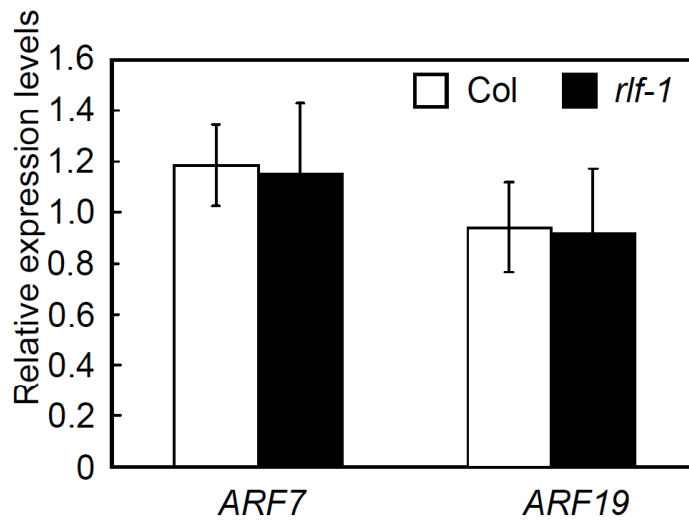


図. 2-13 ARF7とARF19の発現量比較

側根形成において不可欠な転写因子であるARF7とARF19の根における発現量を、野生型と*rlf-1*変異体で比較した。どちらの因子も、*rlf-1*変異体内で正常に発現していた。

エラーバーはSD(n = 3)。

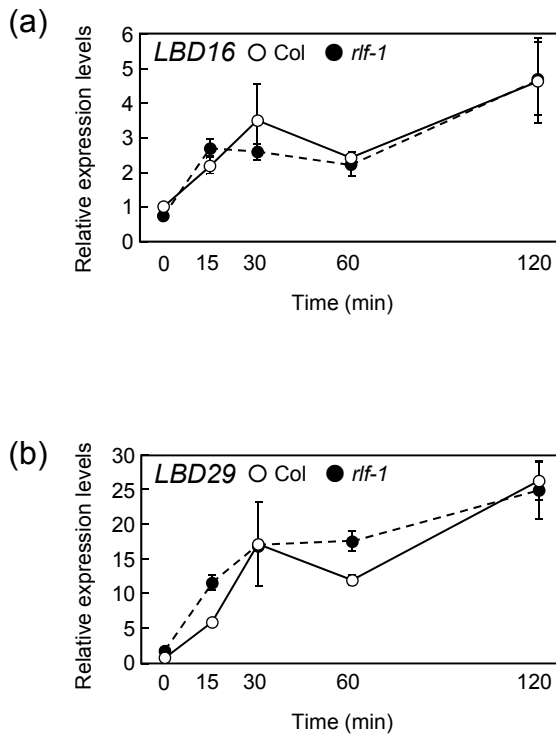


図. 2-14 LBD16とLBD29の発現量比較

ARF7とARF19の働きによって直接的に発現が誘導されるLBD16とLBD29の、外性オーキシン処理した根での発現量の変化を、野生型と*rlf-1*変異体で比較した。横軸は1 μ MのNAAを処理してからの時間を、縦軸は野生型の処理前の発現量を1とした相対発現量をあらわす。

(a)LBD16の発現量変化。

(b)LBD29の発現量変化。

どちらの因子も、*rlf-1*変異体内で正常に発現が誘導されていた。

エラーバーはSD(n = 3)。

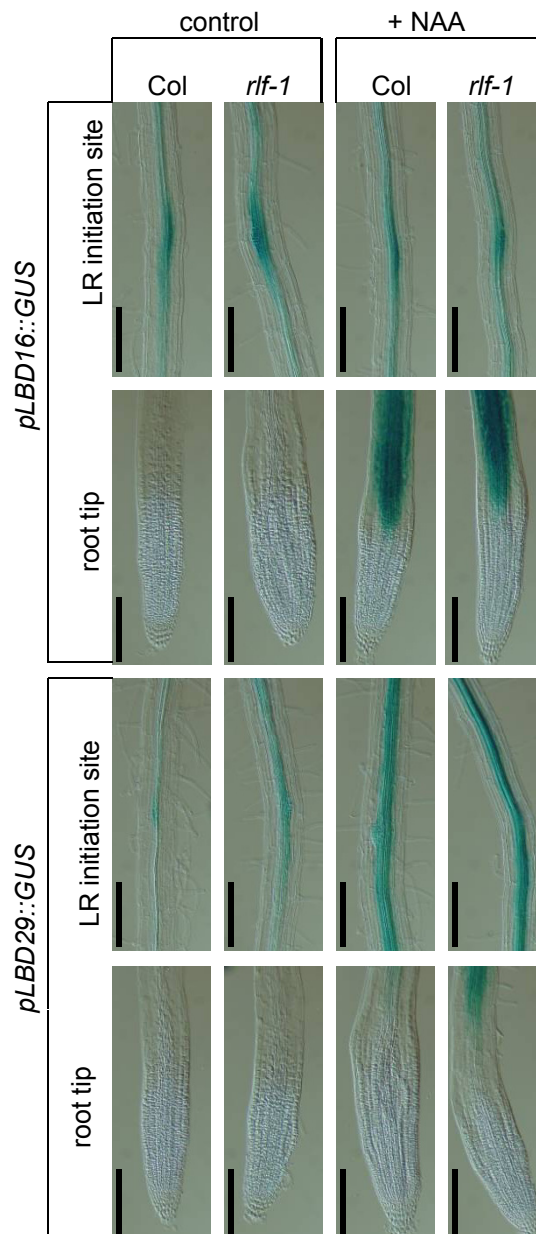


図. 2-15 *LBD16*、*LBD29*レポーターの発現パターン

pLBD16::GUS、*pLBD29::GUS*の発芽後6日目の根を1 μ MのNAAで処理した後、GUS染色してそれぞれの組織特異的な発現変化を観察した。

NAA処理によって、*LBD16*は主に根端付近、*LBD29*は側根が形成される分化領域のともに維管束を中心に発現が増加していた。

*rlf-1*変異体においても、野生型と同様に発現が増加していた。

スケールバーは100 μ m。

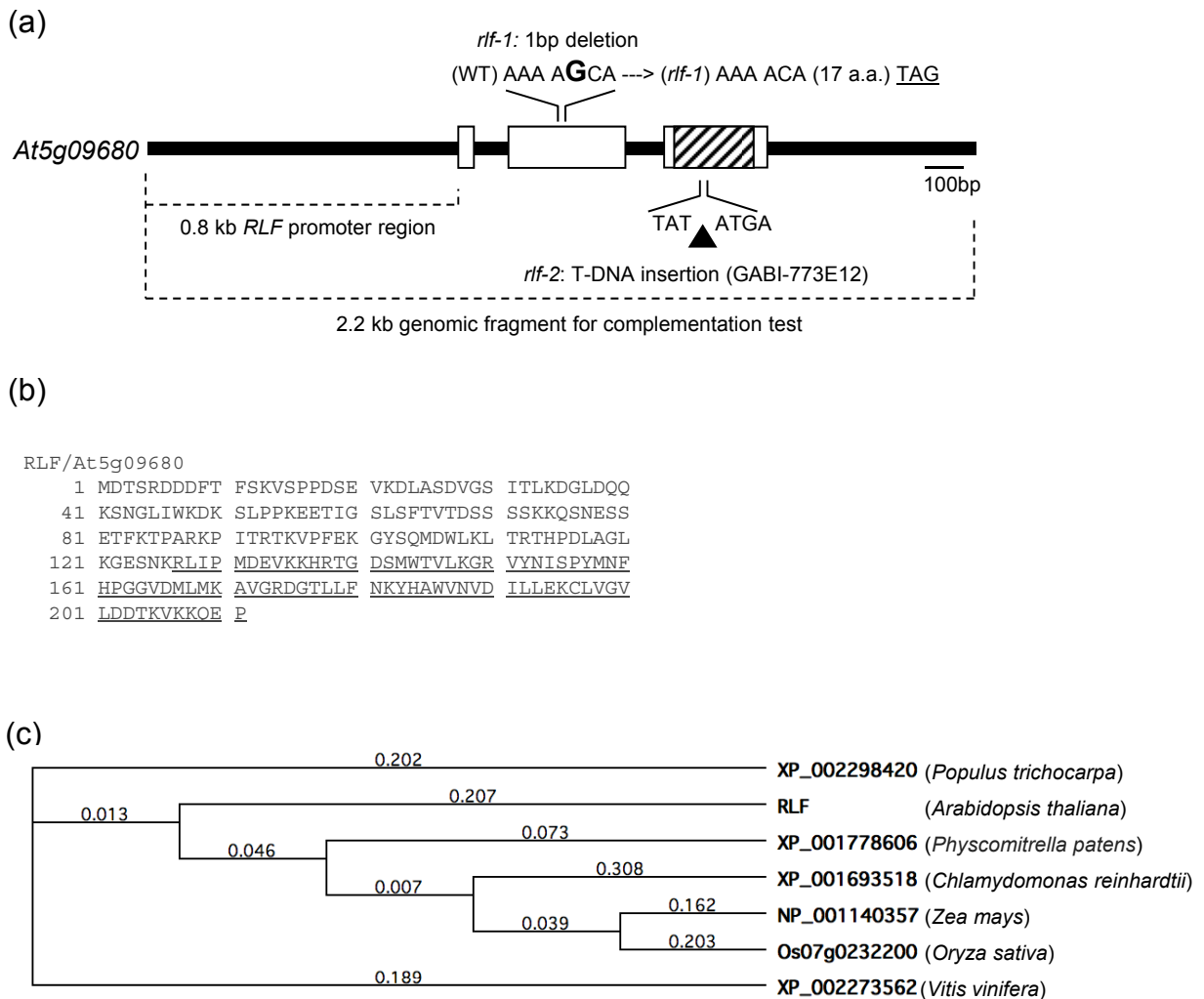


図. 2-16 RLF遺伝子の構造

(a)相補性実験に用いた約2.2kbpのゲノム断片内の構造を示す。*rlf-1*変異は白樺で示したエキソンのうち、第2エキソン内のグアニン1塩基欠損で、フレームシフトにより17個の異常なアミノ酸形成後に終止コドンが出現して翻訳が終了すると予想される。*rlf-2*変異体は第3エキソン内にT-DNA挿入を持つ。塩基配列から予想されるcytochrome b₅-like heme/steroid binding domainを斜線で示す。

(b)予想されるRLFタンパク質のアミノ酸配列。下線部はcytochrome b₅-like heme/steroid binding domain。

(c)他種のゲノムに保存されているRLFホモログとRLFの、予想アミノ酸配列を元にした系統樹。RLF遺伝子は植物界において幅広く保存されている。

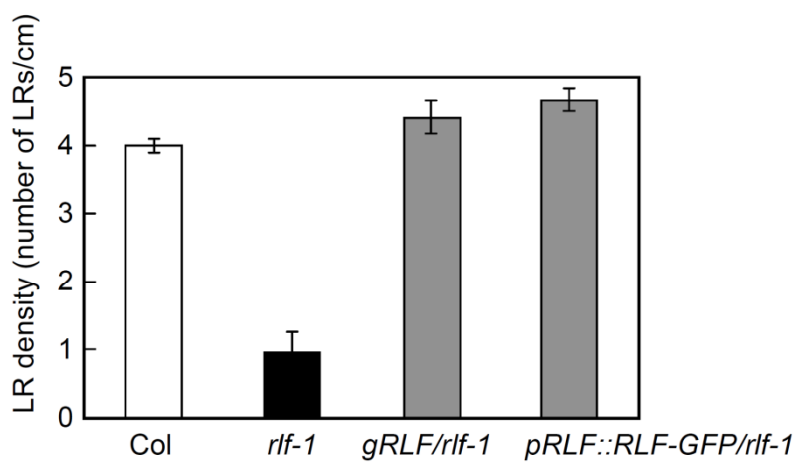


図. 2-17 相補性実験

*RLF*遺伝子を含むゲノム断片および、*RLF*遺伝子の上流804bpのプロモーター配列の下流に*RLF*のコード配列、さらに融合タンパク質としてGFPを連結した配列を合成した遺伝子断片を*rlf-1*変異体に導入し、側根密度の表現型を観察した。

発芽後10日目の側根密度は、各遺伝子断片を導入した系統において野生型並みに回復していた。

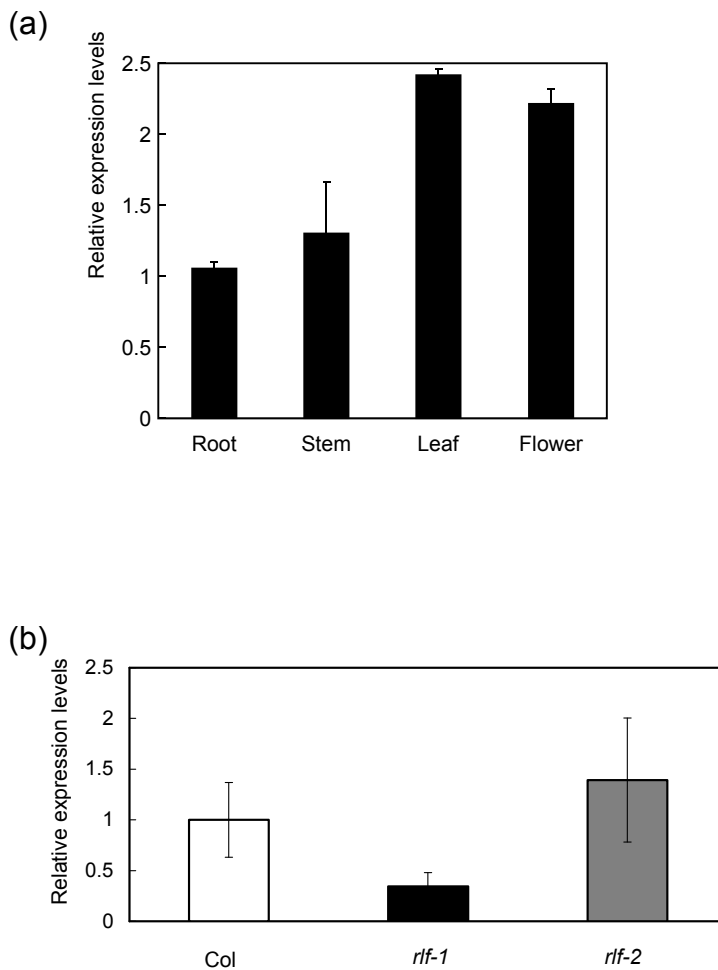


図. 2-18 *RLF*遺伝子の発現量解析

*RLF*遺伝子の発現量をリアルタイムRT-PCRを用いて解析した。

(a)根および地上部の各器官での*RLF*遺伝子の発現量。*RLF*遺伝子は解析した全ての器官において発現しており、特に花や葉において強く発現していた。

(b)*rif*変異体の根における*RLF*mRNAの発現量を野生型と比較した。*rif-1*変異体では、変異によってmRNA量が低下していたが、*rif-1*変異体と同様の表現型を示す*rif-2*変異体ではmRNA量の低下は見られなかった。根は発芽後10日目の植物体から、その他の器官は発芽後21日目の植物体からサンプリングした。

エラーバーはSD(n = 3)。発現量の内部標準として、 β -*TUBULIN4*の発現量で標準化を行った。

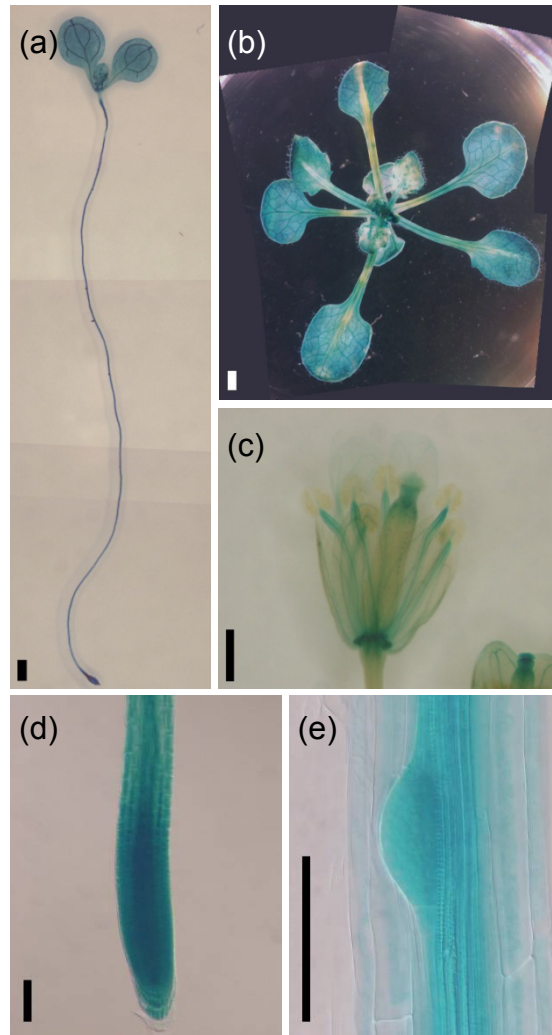


図. 2-19 組織特異的な*RLF*遺伝子の発現

*rif-1*変異体の表現型を相補したプロモーター配列を用いた*pRLF::GUS*の発現パターン。

*pRLF::GUS*は植物体のほぼ全身で発現していた。

(a)発芽後5日目の植物体の全身。根端と子葉の維管束でより強い発現が観察された。

(b)ロゼット葉での発現。葉身部分で強く、一部の葉柄と主脈付近では発現が見られない部分も観察された。

◎花組織での発現。雌しべの頂端付近と基部、雄しべの花糸で発現が見られた。

(d)根端の拡大図。広く発現しているが、根端分裂組織付近でより強い発現が見られた。

(e)側根原基の拡大図。維管束と側根原基でより強い発現が見られた。スケールバーは(a-c)が1mm、(d, e)が100μm。

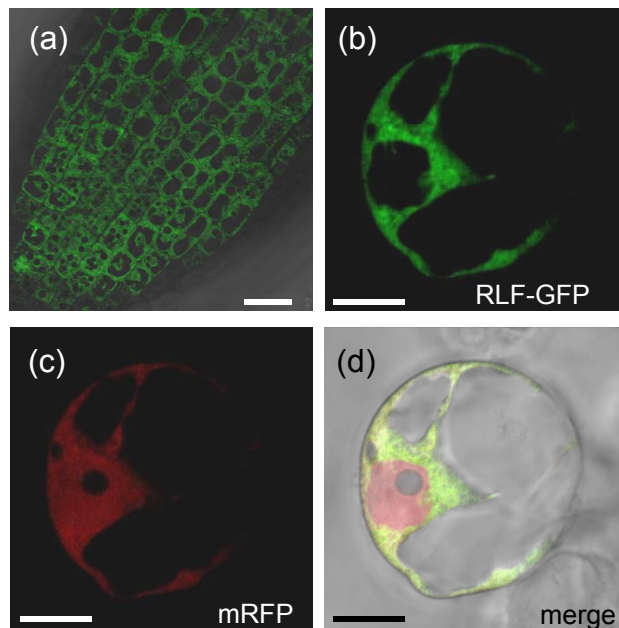


図. 2-20 RLF-GFP融合タンパク質の細胞内局在

*rif-1*変異体の表現型を相補した機能的なRLF-GFP融合タンパク質を発現する系統を用いて、RLF-GFP融合タンパク質の細胞内局在を観察した。

(a) *pRLF::RLF-GFP*を導入した植物体の根端付近の表皮細胞。

(b-d) *35S::RLF-GFP*と*35S::mRFP*を導入したT-87培養細胞。(b)

RLF-GFPの局在パターン。(c)mRFPの局在パターン。局在シグナルが付加されていないため、細胞質と核質に局在する。(d)(b),(c)と微分干渉による透過光像の合成。

植物体の表皮、培養細胞のどちらでも、RLF-GFPタンパク質は細胞質に局在していた。

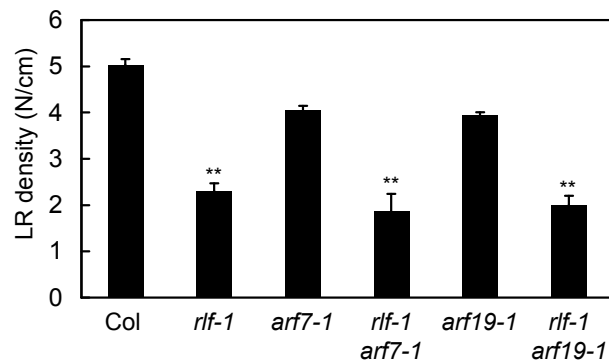


図. 2-21 *rlf-1*とその他の側根形成変異体との遺伝学的解析
*arf7-1*変異体、*arf19-1*変異体と*rlf-1*変異体を掛け合わせ、それぞれの側根密度を野生型、*rlf-1*変異体とあわせて比較した。
arf7-1、*arf19-1*において、*rlf-1*変異が加わる事でさらに側根密度が減少した。
エラーバーはSE(n = 25)。**P<0.01(Student *t*-test; Col vs *rlf-1*、*arf7-1* vs *rlf-1arf7-1*、*arf19-1* vs *rlf-1arf19-1*)。

第二部

側根形成最初期に関与する *PUCHI* 遺伝子の解析

結果

puchi-1 変異体は野生型より多くの側根を形成する

最近、花器官と根で異常な形態形成を示す *puchi-1* 変異体が廣田らによって報告された(Hirota *et al.*, 2007)。この変異体は花器官の基部に葉のアイデンティティを示す、野生型では本来形成されない器官が形成されるほか、根においては側根原基の形成過程において側根原基の基部で過剰な細胞分裂が起こっており、その結果、異常な形態の側根原基を形成することが報告されている。

そのほか根に注目すると、*puchi-1* 変異体は側根の形態が異常になるだけでなく、野生型と比べて側根数が若干増加する(図 3-1)。このことから、*puchi-1* 変異体では側根のイニシエーション頻度が増加している可能性が考えられる。そこで、*puchi-1* 変異体における側根数の増加がイニシエーション頻度の増加によるものであるかどうかを明らかにするため、野生型と *puchi-1* それぞれの側根間距離を計測し、サイズクラスに分けたヒストグラムを作成して比較した(図 3-2)。その結果、野生型と *puchi-1* 変異体のどちらも平均値付近のクラスが最も多い山型の分布を形成しており、*puchi-1* 変異体においては、非常に小さなクラスのピークが見られたが、その出現頻度はわずかであり、野生型と比べて平均的に側根間の距離が減少している事が明らかとなった。このことは *puchi-1* 変異体における側根数増加の原因が、側根形成頻度の上昇、すなわち側根形成開始部位の増加によるものである事を示唆する。

PUCHI 遺伝子は側根原基形成直前から内鞘細胞層で発現する

PUCHI 遺伝子は側根原基において強く発現し、側根原基の形成過程に関与する事がすでに報告されているが、それに加えて *puchi-1* 変異体が側根原基形成の開始においても表現型を示した事から、*PUCHI* 遺伝子は側根形成のきわめて初期の過程においても何らかの機能を果たしている事が考えられる。そこで、*PUCHI* 遺伝子の側根形成開始時における発現パターンを解析するため、*PUCHI* 遺伝子のコード領域の上流約 3.8kbp をプロモーター配列、コード領域の下流約 1.8kbp をターミネーター領域として、それらの間に核局在シグナルを付加した蛍光タンパク質 YFP および mRFP をコードする配列を挿入した遺伝子断片を作成し、野生型および *puchi-1* 変異体に導入して観察を行った。その結果、*pPUCHI::NLS-YFP:tPUCHI(pPUCHI::YFP)* を野生型に導入した植物体では、側根原基において非常に強いシグナルが観察されたほか、側根を形成

する以前のステージにあると思われる根端に比較的近い領域の内鞘細胞層においてスポット的にシグナルが見られ、主根の伸長とともに根端付近で連続的に新たなシグナルスポットが新生する様子が観察された(図 3-3)。また、この新たに発生したシグナルスポットに対し共焦点顕微鏡を用いて精細な観察を行ったところ、蛍光シグナル以外には周辺の細胞との形態的な違いは認められなかった。この観察は独立に確認した新生スポット 11 ヶ所について行い、その全てで側根原基形成を含めた形態的变化はなかった。また、これらの発現パターンは独立に形質転換した 4 系統の植物体において同様の結果が得られた。このことから、*PUCHI* 遺伝子が側根原基の形成が開始するよりも以前から、内鞘細胞においてスポット的に発現している事が明らかとなった。次に、新生したシグナルスポットについて、その後の推移を経時的に連続観察した。*pPUCHI::YFP* のシグナルは側根原基において強く見られるため、新生したシグナルスポットはその後側根原基となる事が予想された。しかしながら、細胞分裂を開始して側根原基としてシグナル強度を維持するスポットが観察される一方で、側根原基を形成せず、シグナルが消失してしまうスポットも数多く観察された(図 3-4)。

***PUCHI* 遺伝子は側根原基の形成開始を抑制する**

pPUCHI::YFP シグナルによって検出される側根形成予想部位のふるまいを詳細に解析するため、6 時間ごとの経時観察を行い、新生したシグナルスポットのその後の運命や同一主根上に存在する他のシグナルスポットとの時空間的な関係を調べた。その結果、スポットの新生はほぼ求頂的に起こっており、主根の伸長にそって根端付近に新たなスポットが連続的に形成されていた(図 3-5)。次に、同様の解析を *pPUCHI::YFP* を *puchi-1* 変異体に導入した植物体に対して行った。その結果、主根伸長にそって求頂的にシグナルスポットが新生するパターンは野生型と同様であったが、野生型と比べると側根原基を形成せずにシグナルが消失するスポットが若干少なかった。観察した全シグナルスポットのうち、その後の側根形成が確認できたものの割合を側根形成確率として比較すると、野生型では 59.7%(52/87)なのに対し、*puchi-1* 変異体では 68.2%(58/85)であった。また消失したシグナルスポットについては、シグナルが観察できていた期間が野生型の場合よりも長くなっていた(図 3-5、図 3-6)。側根形成の開始に対する *puchi-1* 変異の影響をさらに詳細に解析するため、経時観察で得られたシグナルスポットの時空間情報をもとに、シグナルスポット間の相互作用を調べた。側根を形成したシグナルスポットが新生した時点でグラフの原点におき、そこから前後 2mm 以内での他のシグナルスポットのふるまいを散布図

に表して比較したところ、野生型では側根を形成するスポットの周囲には新たな側根形成があまり見られなかった。特に、中心点とした側根形成スポットが発生した直後には新たなシグナルスポットの発生が見られなかった(図 3-7)。また、野生型では側根形成スポットの近傍で発生したシグナルスポットの多くは側根を形成せず消失していた。それに対し、*puchi-1* 変異体では側根を形成するスポットの周囲でも新たなスポットが新生し、その中には側根を形成するものも見られた。これらのことから、*PUCHI* は側根原基の周辺に新たな側根予定部位が発生するのを抑制する、あるいは発生したシグナルスポットの側根原基への発達を抑制していることが示唆される。また、側根を形成しないシグナルスポットが消失するまでにかかる時間が *puchi-1* 変異体において増加していたことから、*PUCHI* 遺伝子はその下流において自身の発現に抑制的に働く機構を持っているのかもしれない。

***DR5::GFP*、*pCyclinB1:1;GFP*を用いた側根予定部位の解析**

側根形成には植物ホルモンのオーキシンが重要な役割を果たす事が知られており、根に対して外性オーキシンを局所的に添加すると、その部位から側根が形成されることや(Casimiro *et al.* 2001)、オーキシン応答マーカである *DR5* の活性が側根形成以前から部位特異的に見られることが知られている。また、*PUCHI* 遺伝子はそのプロモーター領域に 3ヶ所、ターミネーター領域に 1ヶ所、Auxin Response Element(ARE)と呼ばれるオーキシンによって発現誘導される遺伝子に共通の配列をもっており、オーキシンに誘導されて発現が上昇することがすでに報告されている(Hirota *et al.*, 2007)。これらのことから、オーキシン応答を反映する *DR5rev::GFP* マーカーのシグナルは、側根形成におけるシグナルカスケードにおいて *pPUCHI::YFP* のシグナルの上流、もしくはほぼ同等に位置すると考えられる。そこで、*DR5rev::GFP* のシグナルを用いて、側根予定領域の観察を行ったところ、*pPUCHI::YFP* と同様に局所的に強いシグナルが観察されたスポットにおいて、その後側根形成が開始するようすが観察された。そこで、*pPUCHI::YFP* の場合と同様に、新生したスポットの側根形成確率を調べたところ、野生型では 56.5%(43/76)、*puchi-1* 変異体では 67.4%(60/89)であり、*pPUCHI::YFP* を用いた場合と非常に良く似た値を示した(図 3-8)。また、*pPUCHI::NLS-mRFP:tPUCHI(pPUCHI::mRFP)* と *DR5rev::GFP* をゲノム中に同時に持つ系統を用いて両方のシグナルの同時観察を行ったところ、側根原基や側根原基形成前のスポットなどにおいて、両者のシグナルは常に同時に観察された(図 3-9)。これらのことから、側根形成のシグナルカスケードにおいて、*PUCHI* 遺伝子はオーキシン応答と非常に近い位

置にあると考えられる。また、現在までのところ、特定の内鞘細胞が垂層分裂を行うことが側根形成の開始と考えられているため、細胞分裂の開始を反映する *pCyclinB1;1::GFP(CycB-GFP)* を側根形成開始、もしくは開始直前のマーカーとして使用した。*CycB-GFP* を発現している側根原基形成直前と思われる部位について側根形成確率を調べると、野生型 87.5%(35/40)、*puchi-1* 変異体 85.7%(36/42)であった(図 3-8)。これらのことから、*CycB-GFP* を発現した部位の多くが側根原基を形成することが示唆され、また、側根形成開始において PUCHI が関与している過程は *CycB-GFP* の発現に至るよりも前の段階である可能性が考えられる。

側根形成開始に異常を示す他の変異体における PUCHI の働き

これまでに、側根形成に異常を示す変異体は数多く報告されており、なかでもよく知られているのがオーキシシグナル伝達に関与する転写因子 ARF7 ARF19 の機能欠失二重変異体(Okushima *et al.*, 2005)と、それらの働きを優性的に抑制する *slr-1* 変異体である(Fukaki *et al.*, 2002)。これらの変異体では側根が全く形成されず、側根原基の形成も見られない。そこで、それぞれの変異体背景での *pPUCHI::YFP* の発現パターンを観察した。その結果、*nph4-1(arf7* 変異体の 1 アリル)*arf19-1* 二重変異体と *slr* 変異体のどちらも、側根予定部位のようなスポット的な発現は見られず、逆に分化した全ての内鞘細胞において均一に発現していた(図 3-10)。これらのことから、少なくとも *pPUCHI::YFP* がスポット的なシグナルを示すには ARF7 および ARF19 の正常な働きが必要であり、*PUCHI* 遺伝子のスポット的な発現が ARF7、ARF19 によるオーキシシグナルの間接的な下流に位置することが示唆された。さらに、*rlf-1* 変異体における *pPUCHI::YFP* の発現パターンを調べた。その結果、*rlf-1* 変異体において野生型で見られるようなシグナルスポットが観察された。しかしながら、予備的な観察の結果、*rlf-1* 変異体内では側根原基を形成しない *pPUCHI::YFP* シグナルスポットが多く観察され、側根形成確率は 30%(6/20)であった。*rlf-1* 変異体は、第一部で詳述したように、ARF7/19 によるオーキシシグナルとは独立に側根形成に関与しており、*rlf-1* 変異体内では側根形成におけるオーキシシグナル応答は正常であるものの、側根原基形成が細胞分裂の直前で阻害されていることが示唆されているが、*pPUCHI::YFP* の観察結果もそれを支持する。

考察

III-2-6. PUCHI は ARF7/19 の下流で発現し、側根形成の最初期過程を抑制する

PUCHI 遺伝子は側根形成においてオーキシンによって特異的に発現量が増加する遺伝子である。オーキシン応答マーカー *DR5::GFP* と *pPUCHI::mRFP* の蛍光シグナルはほぼ同じ場所とタイミングで観察されたことから、側根形成における局所的なオーキシン応答カスケードにおいて *PUCHI* 遺伝子はオーキシン応答遺伝子群とほぼ同じ挙動を示すと考えられる。側根形成におけるオーキシン応答では、*ARF7/19* による転写制御が重要である事が知られている。これらの遺伝子が欠失し、側根が形成されない *nph4-1arf19-1* 二重変異体において *pPUCHI::YFP* の発現は、野生型で見られるようなスポット状の発現を示さなかった。また、*ARF7/19* の活性を恒常的に抑制する機能獲得型変異体の *slr-1* においても *nph4-1arf19-1* 二重変異体と同様に、*pPUCHI::YFP* のスポット状の発現パターンは見られなかった。これらのことから、*PUCHI* 遺伝子は側根形成において *ARF7/19* の下流で発現上昇して機能していることが示唆された。

puchi-1 変異体が野生型よりも多数の側根を形成する事から、*PUCHI* 遺伝子は側根形成の最初期において抑制的な働きを持っていることが示唆される。さらに *pPUCHI::YFP* の発現パターンの経時観察から、*pPUCHI::YFP* の初期発現スポットのうち、その後側根原基に分化したものの割合が *puchi-1* 変異体において野生型よりも増加していた。このことから、*PUCHI* はオーキシン局在によって作られた局所的なオーキシン応答スポットにおいて、側根原基への分化をある程度抑制している事が示唆された。また、ごく近傍の発現スポット同士の間を調べた結果から、野生型で見られた側根形成スポット直後でのスポット新生の抑制が *puchi-1* 変異体においては見られなかった。このことは局所的なオーキシン応答スポット間での抑制的な相互作用に *PUCHI* が関与している可能性を示唆している。*CycB-GFP* の発現パターンを調べた結果から、野生型と *puchi-1* 変異体とともに *CycB-GFP* の発現スポットのほとんどが側根原基に分化した。このことから、局所的オーキシン応答スポットにおいて、*PUCHI* が関係する側根原基への分化の可否は *CycB-GFP* の発現以前に決定されていることが示唆された。

本研究から示唆される *PUCHI* の機能は大きく分けて 3 つある(図 3-12)。1 つは *ARF7/19* によるオーキシン応答の下流で発現し、オーキシン応答によって促進される側根原基の形成を *PUCHI* や *DR5* の発現スポットのうち一部が founder cell に分化して垂層分裂する以前の段階で抑制されるが、その抑制に弱く関わっている。2 つめには側根原基のごく近傍において、局所的なオーキ

シン応答の発生を抑制する。最後に、側根を形成しないスポットについてそのシグナルを速やかに消失させる。このとき、いくつかの疑問が残る。1 つめの機能については、**founder cell** の分裂以前から側根原基の形成過程までを通して *PUCHI* の発現は一貫して見られるにも関わらず、側根原基に分化する場合とそうでない場合が観察されることである。このことについて、2 つのことが考えられる。1 つは側根形成を促進する因子が *PUCHI* と同時に発現し、拮抗的に働いているためだという仮説である。**ARF7/19** によるオーキシン応答の下流で発現する因子には、*PUCHI* の他にも **LBD16/29** に代表される側根形成を正に制御する因子が多く含まれている。それら促進因子と *PUCHI* による抑制効果のバランスによって側根原基への分化が決定されており、*PUCHI* の発現が続いていても他の因子による促進効果が十分に強い場合に側根原基への分化が引き起こされることが考えられる。また、もう 1 つの仮説として、*PUCHI* が側根原基への分化を抑制できる場合が限定されている可能性が考えられる。既になされた研究により、*PUCHI* は側根原基の形成過程において過剰な細胞分裂を抑制している事が示されているが、この場合でも *PUCHI* は野生型の側根原基において広く発現しているにもかかわらず、正常な細胞分裂については抑制していない。これと同様に、側根 **founder cell** の垂層分裂においても、何かしらの要因によって *PUCHI* に抑制される場合とそうでない場合が決定されているのかもしれない。最近の研究によって **ARF7/19** の下流および **LBD16/29** のさらに下流で側根形成において働く因子について詳細な研究がすすめられてきており、それらと *PUCHI* との関係について解析する事で、*PUCHI* の示す側根形成抑制効果の詳細が明らかになると考えられる。

また 2 つめの機能については、*PUCHI* の働きによってスポットの新生が抑制されていると考えられる部位では *PUCHI* の発現が見られない。これは *pPUCHI::YFP* の発現パターンだけでなく、表現型を完全に相補した *pPUCHI::GFP-PUCHI:tPUCHI* 配列を導入した植物体(Hirota *et al.*, 2007)でも同様であった。このことから、*PUCHI* はこの抑制過程に直接は関与していないことが示唆される。すなわち、*PUCHI* による何らかのシグナルが発現部位を中心として少なくとも 10 細胞程度の距離にまたがる遠距離シグナルとして、一定の範囲の細胞を制御していることが考えられる。これは、*PUCHI* が地上部において発現が見られない場所で葉様器官の形成を抑制している事実と一致する(Karim *et al.*, 2009)。このことから、*PUCHI* の下流因子は根においても非細胞自立的な制御に関与する事が示唆される。

また予想される *PUCHI* の機能すべてについて言える事であるが、*PUCHI* の抑制作用によって *PUCHI* 自身の発現も消失すると考えられる。*DR5* を用い

た観察でも同様の結果が得られている事から、**PUCHI** の機能は自身の上流であるオーキシン応答に作用するネガティブフィードバック機構の一部である可能性が考えられる。オーキシン応答の転写カスケードにおけるネガティブフィードバック機構についてはよくわかっておらず、転写因子である **PUCHI** の標的遺伝子に対する今後の解析によって、地上部も含めた統合的な **PUCHI** の分子機能が明らかにできると考えられる。

また、側根数が減少する変異体として *nph4-1arf19-1*、*slr-1*、*rlf-1* のそれぞれにおいて *pPUCHI::YFP* の発現パターンを調べた結果から、*nph4-1arf19-1* と *slr-1* では局所的なシグナルスポットが形成されなかったのに対し、*rlf-1* では野生型と同様にシグナルスポットが形成されていたが、側根原基の形成数は著しく少なかった。このことは、**ARF7/19** および **IAA14(SLR)** がオーキシン応答に必要で **PUCHI** 発現の上流に位置すると考えられるのに対し、**RLF** はオーキシン応答とは独立に側根形成の開始を促進しているという考え方を強く支持する。

発芽後9日目の側根数

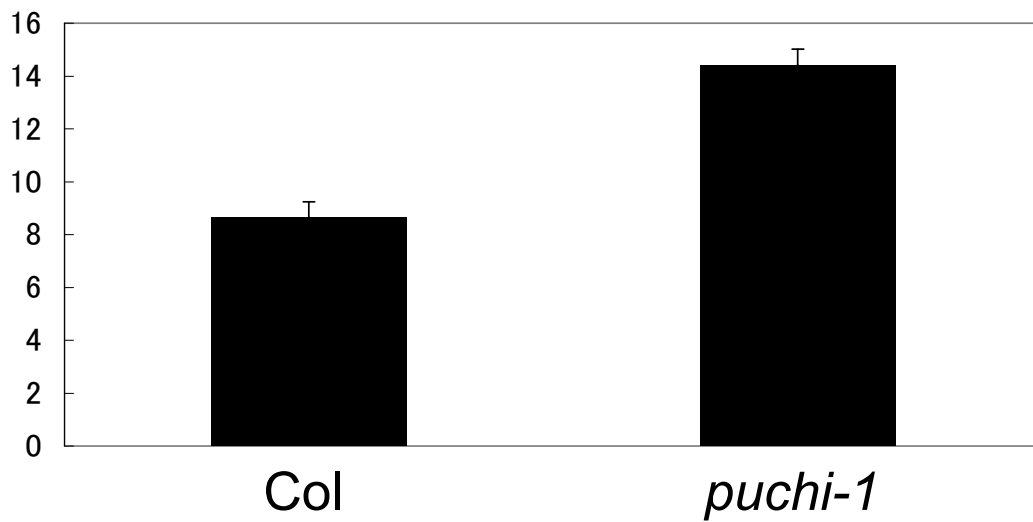


図.3-1 Colと*puchi-1*変異体の側根数
発芽後9日目の側根数を比較した。
エラーバーはSE(n = 12).

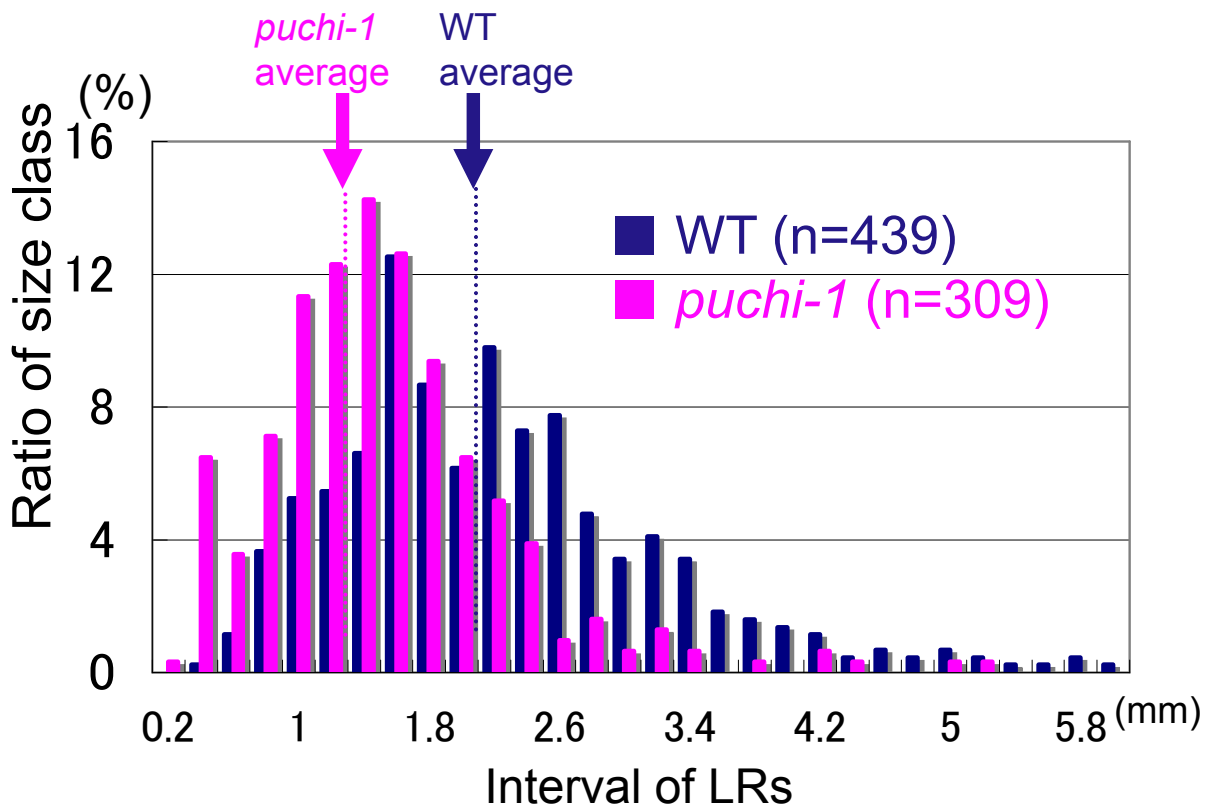


図. 3-2 側根間距離

野生型、*puchi-1*変異体の側根間の距離を計測し、0.2mmのサイズクラスごとに分けてヒストグラムとして比較した。

野生型、*puchi-1*変異体ともに平均値付近が最も多く、なだらかに分布するが、*puchi-1*変異体では平均値およびピークのサイズクラスが側根間距離の短い方にシフトしていた。

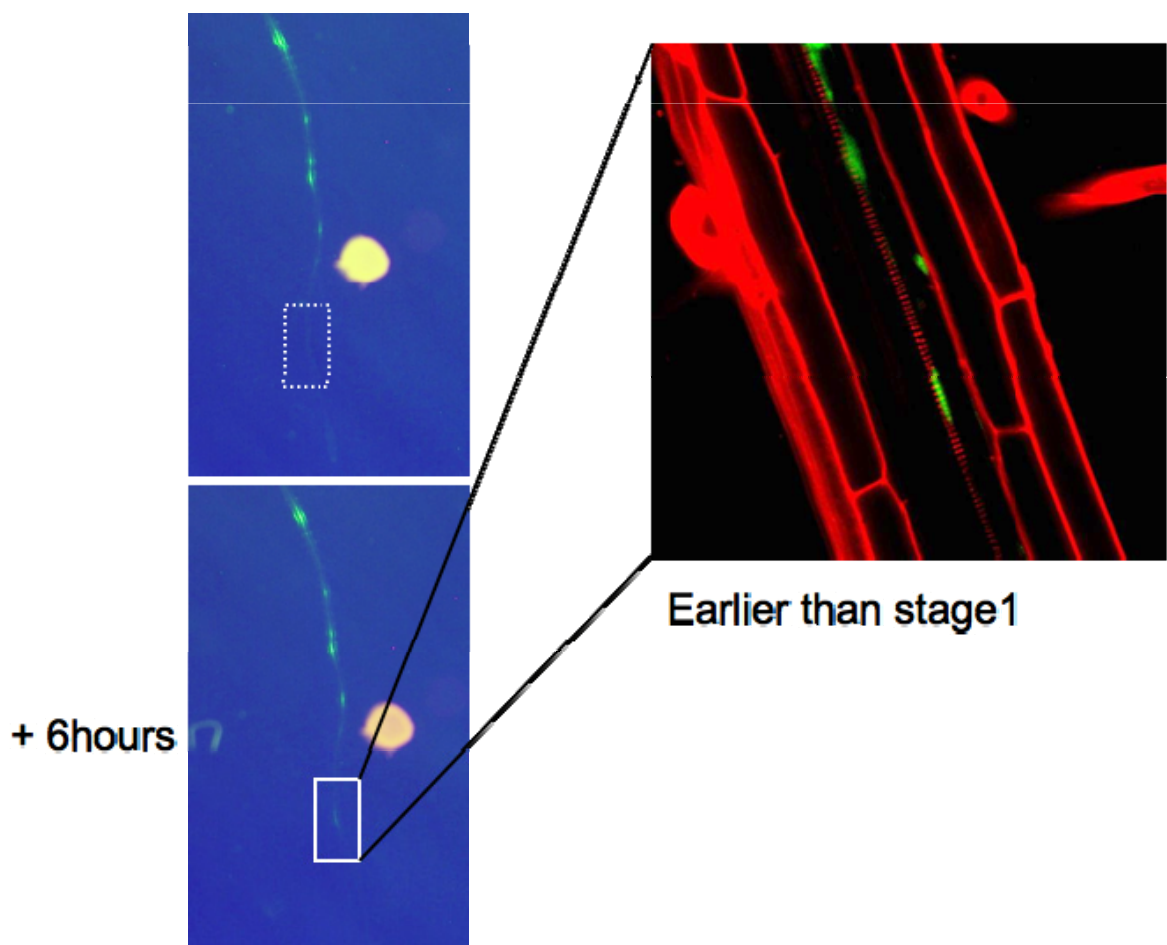


図. 3-3 *pPUCHI::NLS-YFP:tPUCHI*の発現パターン

野生型に導入した*pPUCHI::NLS-YFP:tPUCHI*の発現を蛍光顕微鏡で観察した。左図は実体蛍光顕微鏡による観察。側根原基で強く見られるシグナルスポットが、根端付近で新たに発生する様子が経時観察によって確認できる。右図は新たに発生したシグナルスポットを共焦点蛍光顕微鏡で詳細に観察したもの。YFPシグナルが側根原基の最初期から観察される。

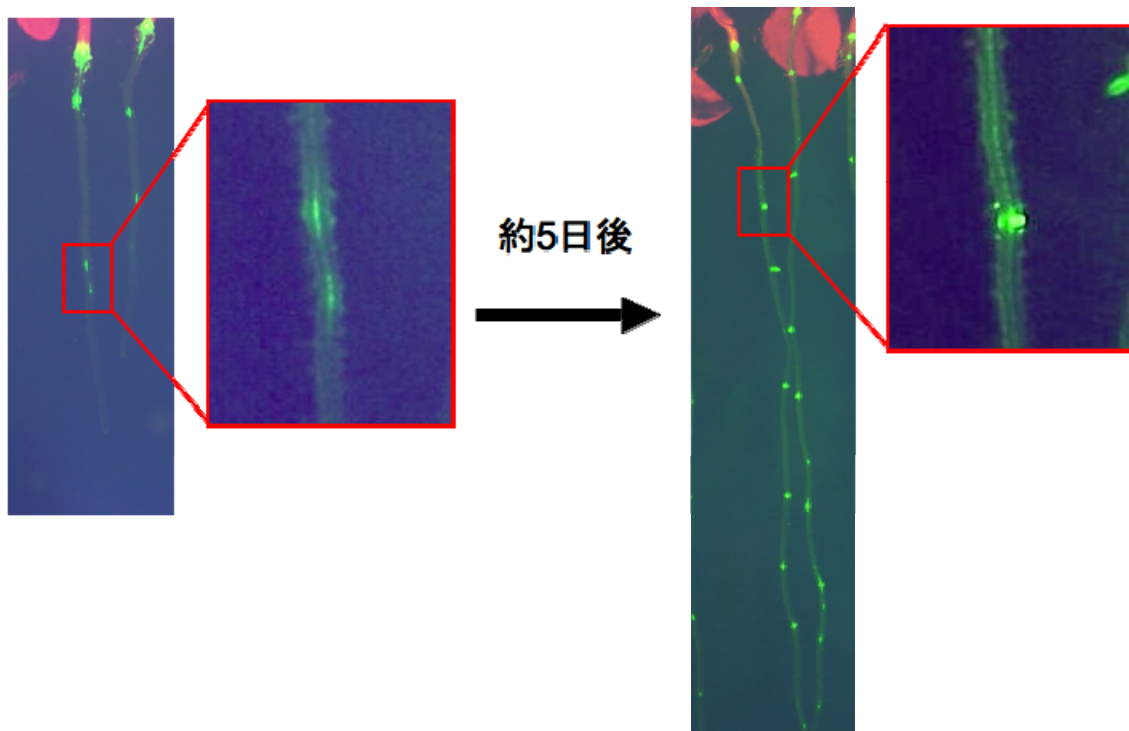


図. 3-4 *pPUCHI::NLS-YFP:tPUCHI*を用いた側根予定部位の観察
野生型に導入した*pPUCHI::NLS-YFP:tPUCHI*の発現を観察したところ、左に示した2ヶ所の再初期シグナルスポットを発見した。その後経時観察を行うと、片方は側根原基を形成したが、残りは側根原基を形成せず、シグナルが消失していた。

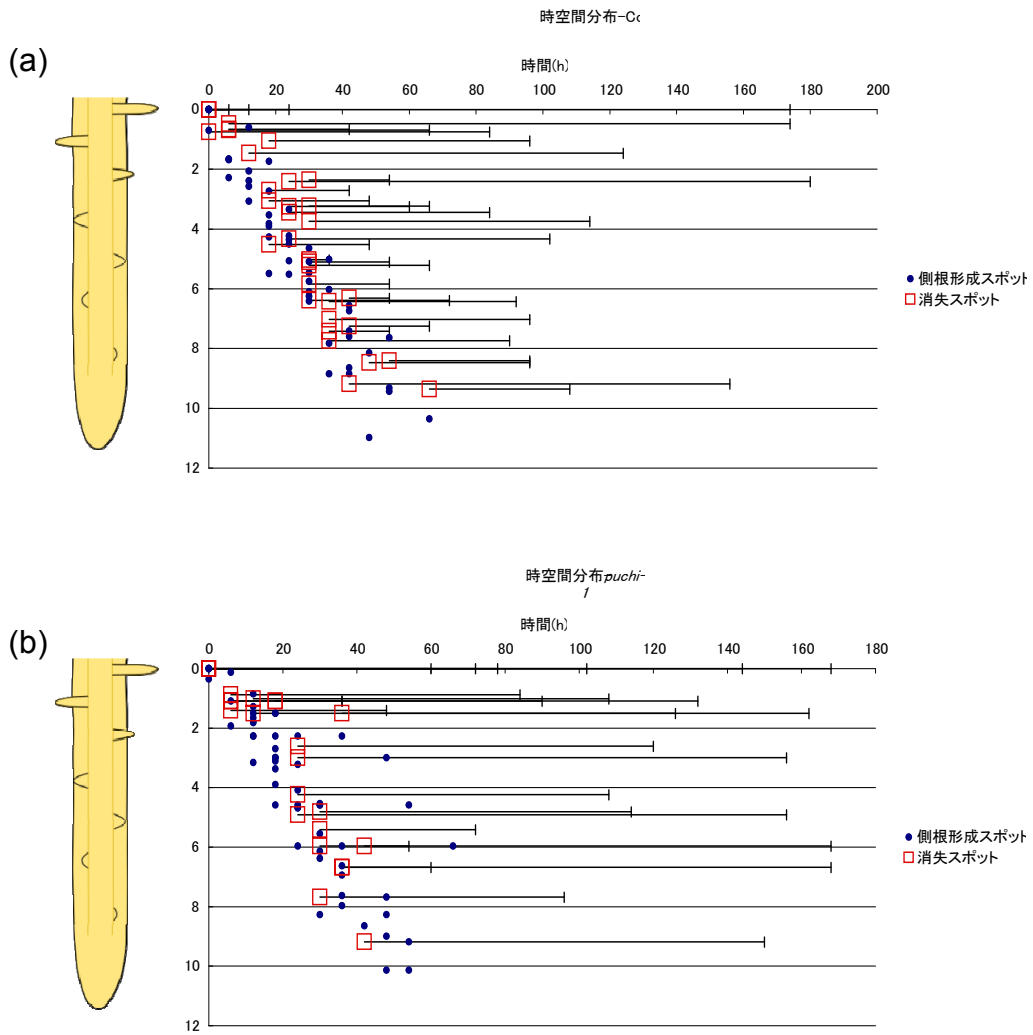


図. 3-5 *pPUCHI::NLS-YFP:tPUCHI*発現スポットの時空間分布
 Col、*puchi-1*変異体それぞれを6時間おきに観察し、新たに発生した発現スポットを記録して経過観察を行った。
 観察を始めて最初に記録したスポットを原点におき、その後に発生したスポットの時空間分布を示す。また、側根を形成せずシグナルが消失したスポットについては、シグナルが持続した時間を示した。
 (n = 15)

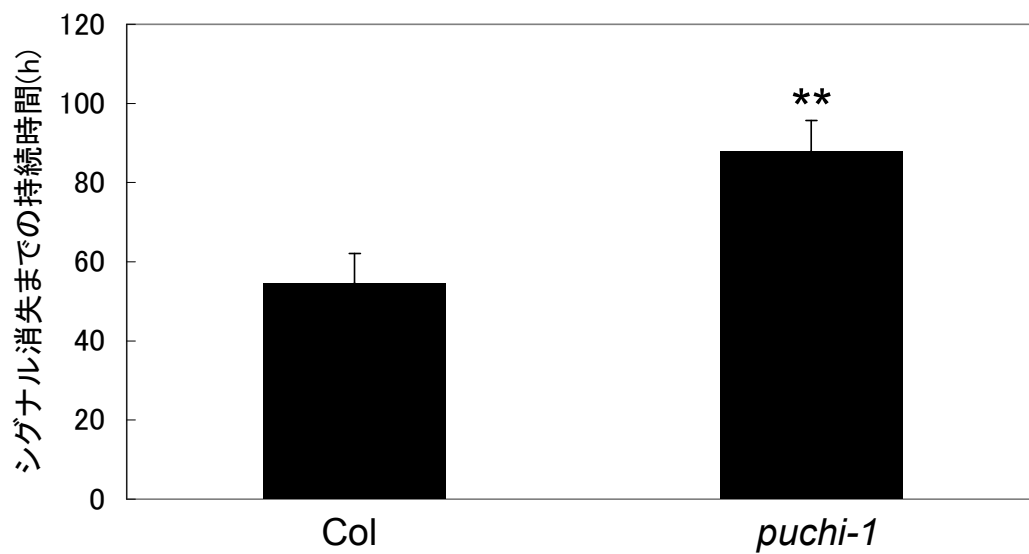


図. 3-6 側根を形成しなかったスポットのシグナル持続時間
*pPUCHI*シグナルが見られたものの、その後側根を形成せずにシグナルが消失したスポットについて、シグナルの平均持続時間を比較した。
*puchi-1*変異体において、野生型よりも有意にシグナルが消えにくくなっていた。
 エラーバーはSE(n > 27)。**P<0.01(Student *t*-test)。

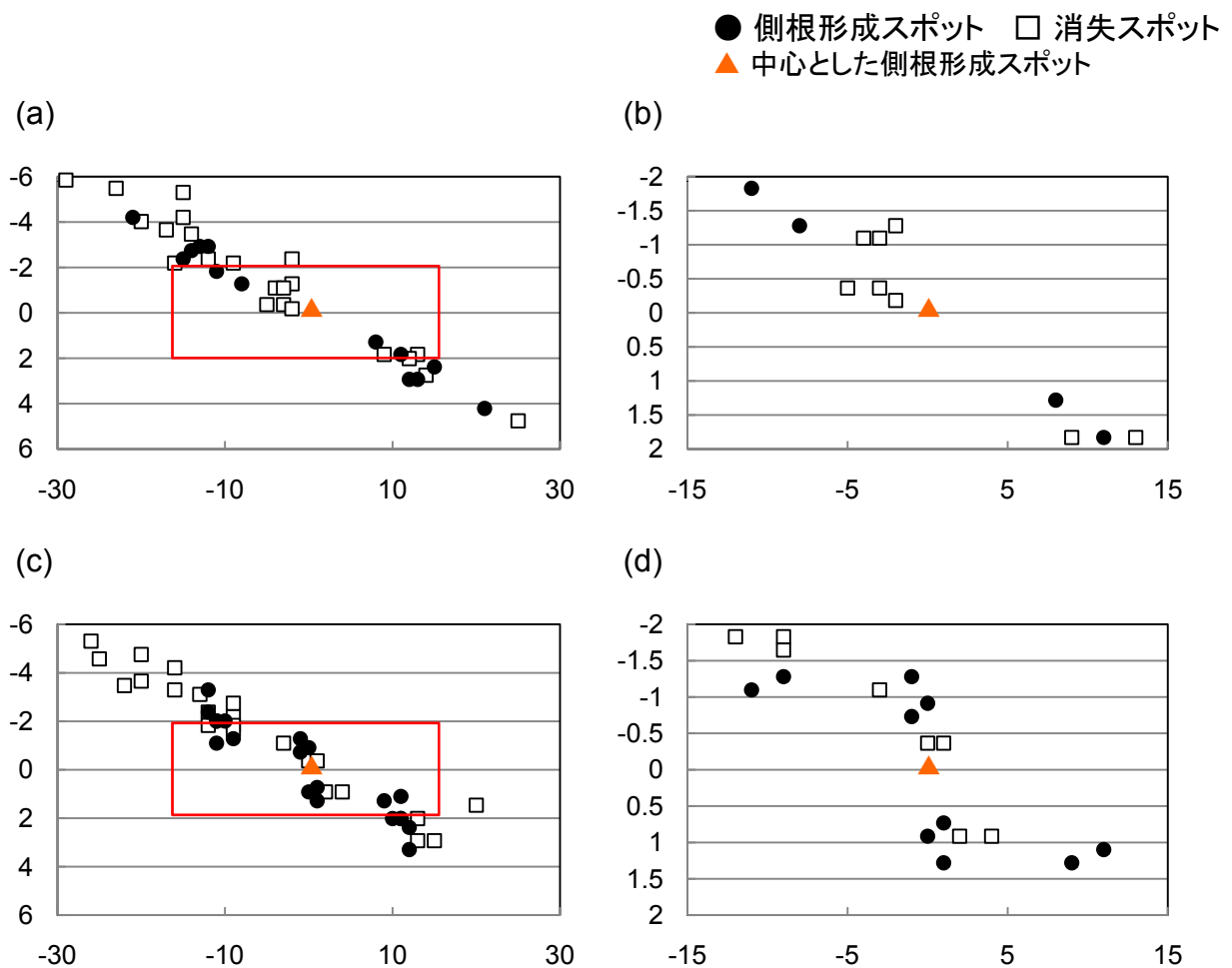


図. 3-7 側根形成点と新規スポット形成との時空間的關係

Col、*puchi-1*変異体それぞれを1時間おきに観察し、新たに発生したシグナルスポットを記録して経過観察を行った。そして、マーカが発現スポットのうち、その後側根を形成した点を中心とした他のスポットの発生位置・時間とその運命を散布図で示した。それぞれ5個体の観察から得られたデータを全て集積して示した。

(a)Col。側根形成点の直後にはシグナルスポットが少なく、側根形成点も少ない。総消失スポット数=13、総側根形成スポット数=10。(b)(a)図のうち、ごく近傍の範囲を拡大して示した。

(c)*puchi-1*。野生型と比べ側根形成点の直後にも多くのシグナルスポットが現れ、側根形成点も多く見られる。総消失スポット数=13、総側根形成スポット数=11。(d)(c)図のうち、ごく近傍の範囲を拡大して示した。

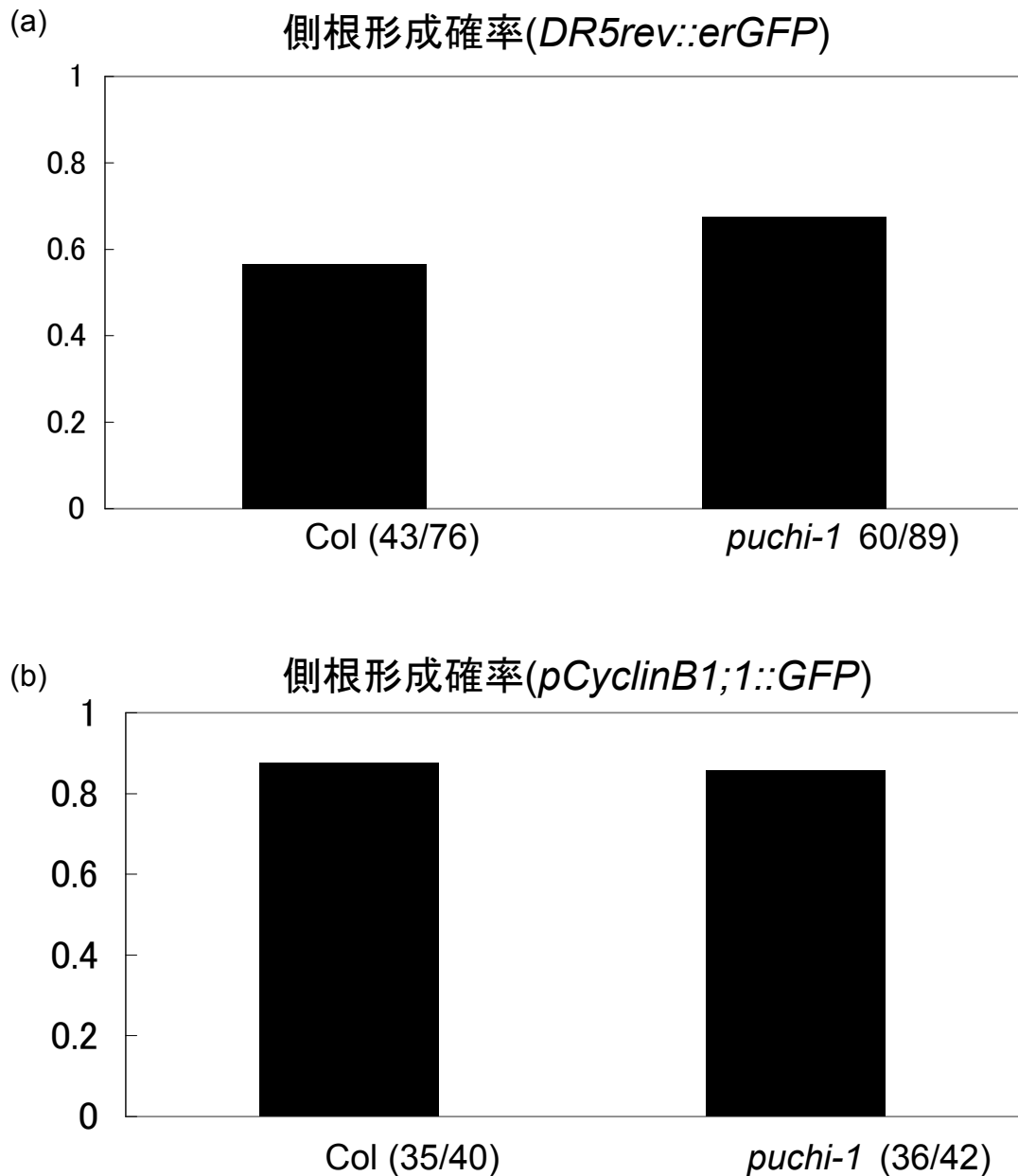


図. 3-8 *PUCHI*以外のマーカーによる側根形成確率

側根形成において*PUCHI*の上流に位置すると考えられるオーキシン応答のレポーターである*DR5rev::GFP*と、側根形成開始での細胞分裂直前で発現すると考えられる*pCyclinB1;1::GFP*を用いて側根原基形成直前と思われる部位を観察し、(観察の結果、側根を形成したスポット数 / 総スポット数)で側根形成確率を算出した。

(a) *DR5rev::GFP*を発現したシグナルスポットの側根形成確率。

(b) *pCyclinB1;1::GFP*を発現したシグナルスポットの側根形成確率。

*Puchi-1*変異体において、*DR5rev::GFP*シグナルスポットの側根形成確率は増加していたが、*pCyclinB1;1::GFP*シグナルスポットでは変化していなかった。

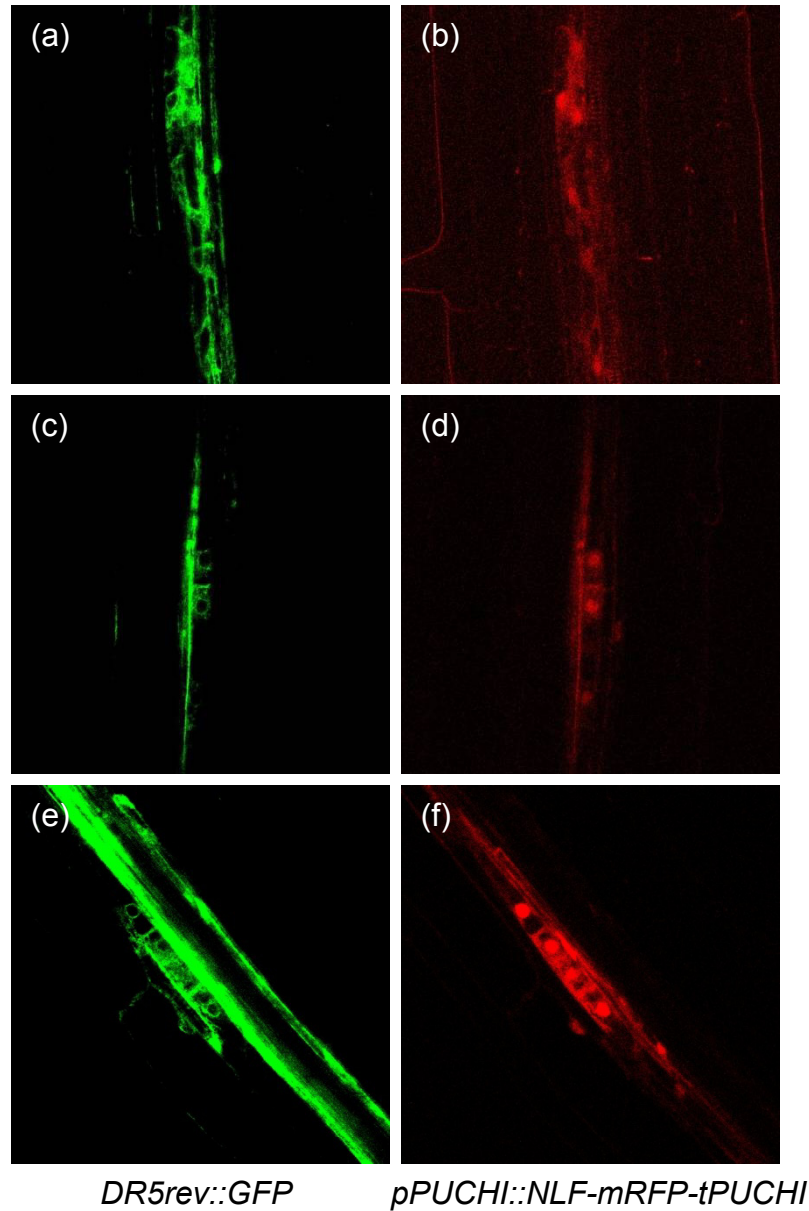
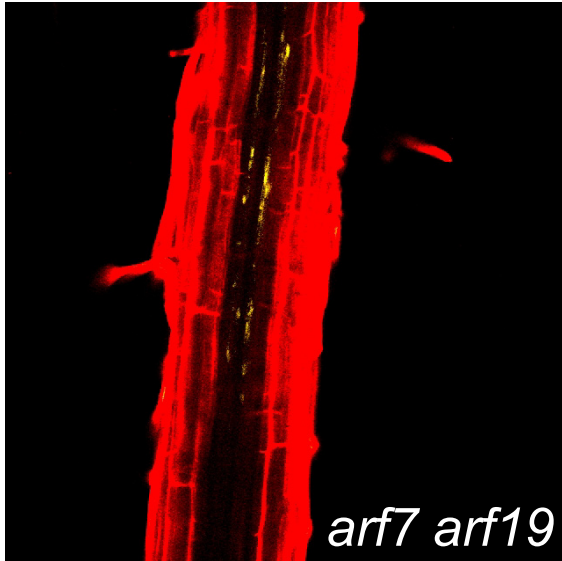


図. 3-9 *DR5rev::GFP*と*PUCHI*マーカーの同時観察
*DR5rev::GFP*と*pPUCHI::NLS-mRFP:tPUCHI*を同時に発現する野生型植物において、両方のマーカーによって検出されるシグナルスポットの位置はほぼ一致していた。
 (a,b) 細胞分裂以前 (c,d) 内鞘細胞の不等分裂開始 (e,f) stage1の側根原基

(a)



(b)

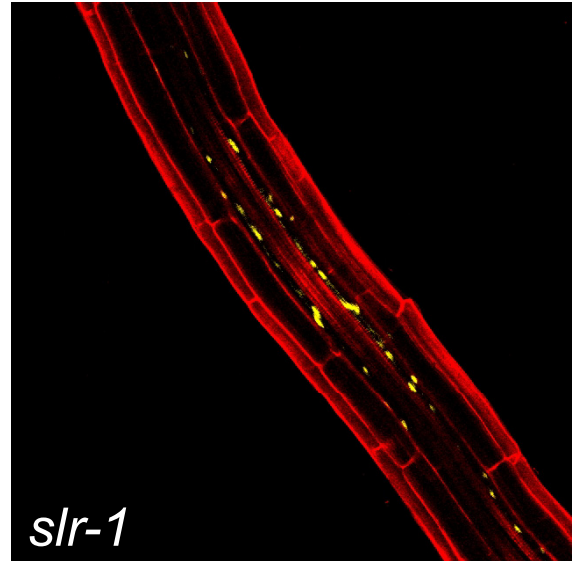


図. 3-10 オーキシン非感受性変異体でのpPUCHIの発現パターン
オーキシンシグナルに重要な遺伝子の変異体であり、ともに側根を形成しない事が知られているarf7 arf19二重変異体とslr-1変異体におけるpPUCHI::NLS-YFP:tPUCHIの発現パターンを観察した。
(a)arf7 arf19二重変異体背景での発現パターン。
(b)slr-1変異体背景での発現パターン。
ともに、野生型のような局所的なシグナルスポットは見られなかった。

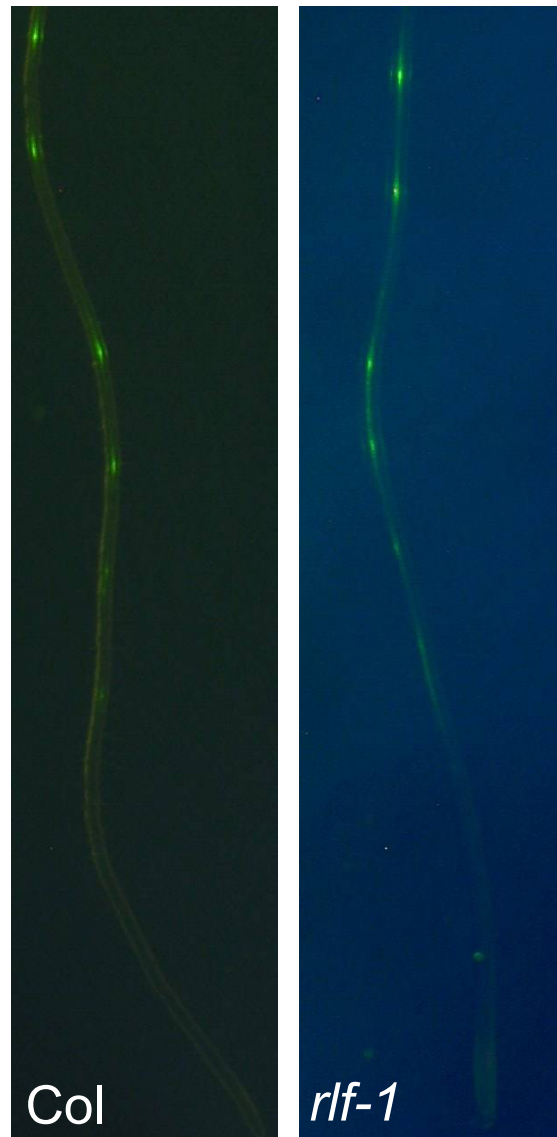


図. 3-11 *rlf-1*変異体内での*pPUCHI*発現パターン

オーキシンシグナルとは独立に側根形成のイニシエーション頻度が低下していると考えられる*rlf-1*変異体における*pPUCHI::NLS-YFP:tPUCHI*の発現パターン。

側根形成頻度の低下に反して、*rlf-1*変異体においても野生型とよく似た根端部付近の新たなシグナルスポットの分布が見られた。

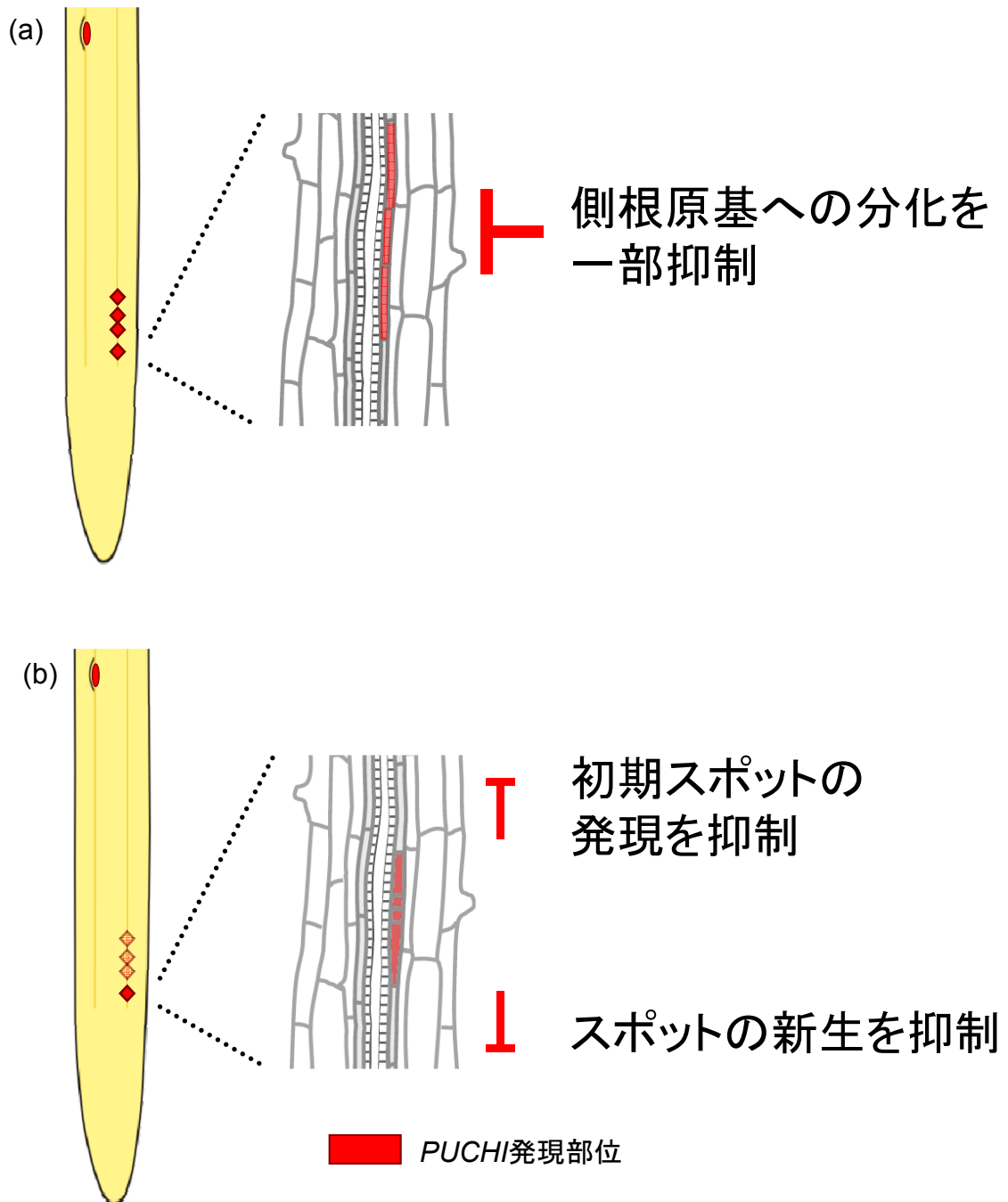


図. 3-12 PUCHIの関与する側根形成初期過程
予想されるPUCHIの機能。

(a) 主根伸長にともなって、根端付近で求頂的にクラスター状のシグナルスポットが形成される。このとき、スポットの側根原基への分化を一部抑制する。

(b) 特定の部位で側根原基への分化が始まると、それ以降のスポットの新生を抑制する。また同一クラスター内の分化前スポットの発現を消失させる。

IV. 総合考察

本研究の結果から、側根形成の開始に関与する新奇遺伝子 *RLF* が単離された。この遺伝子は葉、茎、花、根など植物体の様々な組織で広く発現し、細胞質に局在して細胞増殖を正に制御することが明らかになった。特に側根形成においては *ARF7/19* 依存的なオーキシン応答経路には直接的に関与せず、内鞘細胞の分裂直前に作用する事で側根形成を正に制御していることが示唆された。

PUCHI 遺伝子の解析からは、これまで必要十分と思われていた根における局所的なオーキシン応答と側根形成との関係について、実際には局所的なオーキシン応答のみでは側根形成には十分ではなく、オーキシン応答以降の過程で側根形成の可否が決定されていることが示唆された。さらに、*PUCHI* 遺伝子はその決定過程において抑制的に働いていることが示唆された。

側根は局所的にオーキシン濃度が高くなった場所で特異的に形成される事が知られている。高濃度の外性オーキシンの添加によって側根形成が誘導されるほか(Casimiro *et al.* 2001)、原生木部に接した内鞘細胞層の特異的な 1 細胞に高濃度のオーキシンが蓄積する事で、その細胞から側根原基が誘導されることが示されている(Dubrovsky *et al.*, 2008)。それらのことから、側根形成の開始には局所的なオーキシン応答が必要十分な条件であると考えられ、主根伸長にともなう側根の分布をオーキシンの局在形成から説明するモデルが提唱されている(Lucas *et al.*, 2007; Laskowski *et al.*, 2008)。しかし、本研究で行った各種発現マーカーの観察結果から、局所的なオーキシン応答が引き起こされた部位のいくらかは側根原基には分化しないことが明らかになった。

本研究から明らかになった野生型での側根形成過程は以下のようなものであると考えられる(図 4-1)。まず、主根の伸長にともなって根端付近で連続的に、*ARF7/19* 依存的な局所的オーキシン応答スポットが形成される。この際、ある程度の数のオーキシン応答スポットがクラスターを形成し、そのうちのいくつかのスポットでは *PUCHI* による抑制を受けるが、オーキシン応答が継続したスポットにおいて側根原基への分化が進行する。細胞周期因子の活性が上昇し、内鞘細胞が分裂期へと移行すると、 G_2 期から M 期の移行あるいは M 期の初期において、*RLF* 依存的なオーキシン経路とは独立な機構によって細胞分裂が促進され、側根原基の形成が開始する。側根原基への分化が起こった直後は *PUCHI* の働きによって一定の領域でスポット新生が抑制され、主根の伸長によって新たに形成された部位で次のオーキシン応答クラスターが形成され、その中からまた次の側根原基が形成される。

本研究によって、これまでに全く明らかにされていなかった側根形成の再初

期過程において、局所的オーキシン応答の形成から側根 founder cell の垂層分裂までに、PUCHI の関与する側根原基への分化の決定と、RLF の関与するオーキシン経路と独立な側根 founder cell の分裂促進という新たな段階を導入する事ができた。これは、これまでオーキシンなどの正の制御因子に関する知見が主だった側根形成過程について、より精密な制御がなされている可能性を提唱できると考えられる。特に、器官形成の開始を促進と抑制の両面から制御することは、環境の変化に対応して柔軟に形態を変化させる際に重要であると考えられ、植物の形態形成を理解する上で新たな視点が得られたと言える。しかしながら、RLF の分子機能は全くの未知であり、細胞分裂を促進する機構を解明するには相互作用因子の探索や、側根形成以外の多面的な表現型のさらなる解析が必要である。また、PUCHI についても転写活性化因子であることは示されているが、その標的遺伝子は明らかになっていない。PUCHI の示す抑制効果は、PUCHI 自身の発現領域を超えて作用していることから、下流因子の同定は必要不可欠であろう。さらに、本研究で観察された側根形成過程の抑制を受けた細胞がどのような状態にあるのか、現在は全く不明である。オーキシン刺激は細胞周期の G₁/S 期を進行させるとされており、CyclinB1 の活性上昇は G₂/M 期チェックポイントの通過を反映すると考えられる。いったんそれらの状態を経た細胞が、どのような過程で活性が低下させられ、またどのような状態で維持されているのかは、一細胞単位の細胞周期制御と器官形成を結び付ける重要な研究課題である。これらについてさらなる解析を進めることで、植物の形態形成を制御する分子機構が解明されていくと期待される。

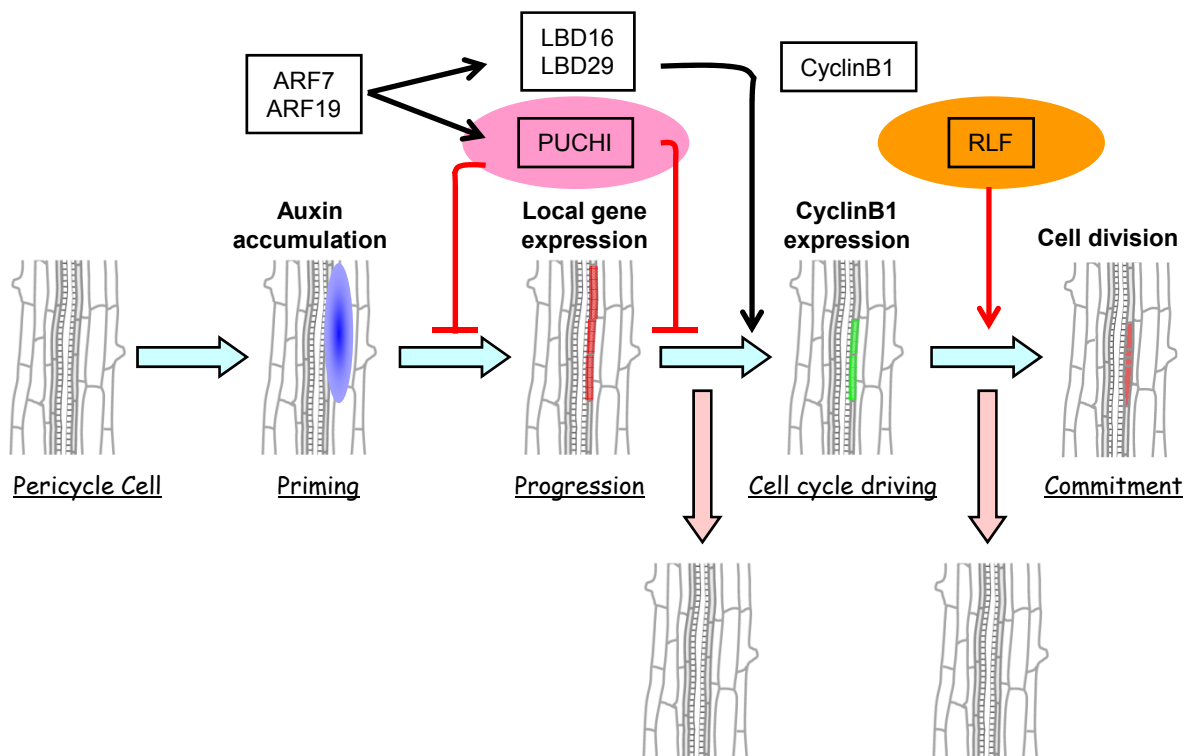


図. 4-1 本研究の結果から推測される側根形成初期過程

側根形成は成熟した内鞘細胞に局所的なオーキシンの濃度勾配が生じ、それによってオーキシン応答性転写因子ARF7,ARF19の下流でLBD16,LBD29のような側根形成開始を正に制御する因子と、PUCHIのような側根形成を負に制御する因子がともに発現する。その後、いくつかの部位でオーキシン応答が継続し、RLFのような正の分裂制御因子の働きにより細胞分裂が誘導され、側根形成が開始される。このとき、負の制御因子であるPUCHIの働きや、正の制御因子であるRLFの欠失によって、これらのステップが停止すると、オーキシン応答やCyclinB1の発現も低下し、Primingが起こらなかった他の内鞘細胞と区別のできない状態となる。

V. 参考文献

- Barlow, P.W., Volkmann, D. and Baluska, F.** (2004). Polarity in roots. In *Polarity in Plants* (Lindsey, K., ed). Oxford: Blackwell Publishing, pp.192-241.
- Beeckman, T., Burssens, S., and Inzé, D.** (2001). The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *J Exp Bot* **52**, 403-411.
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., and Friml, J.** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., and Bennett, M.** (2001). Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell* **13**, 843-852.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**, 735-743.
- Coates, J.C., Laplaze, L., and Haseloff, J.** (2006). Armadillo-related proteins promote lateral root development in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1621-1626.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., and Doerner, P.** (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* **20**, 503-508.
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frei Dit Frey, N., Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inzé, D., Bennett, M.J., and Beeckman, T.** (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development* **134**, 681-690.
- DiDonato, R.J., Arbuckle, E., Buker, S., Sheets, J., Tobar, J., Totong, R., Grisafi,**

- P., Fink, G.R., and Celenza, J.L.** (2004). Arabidopsis ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *Plant J* **37**, 340-353.
- Ditengou, F.A., Teale, W.D., Kochersperger, P., Flittner, K.A., Kneuper, I., van der Graaff, E., Nziengui, H., Pinosa, F., Li, X., Nitschke, R., Laux, T., and Palme, K.** (2008). Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105 no.48**, 18818-18823.
- Doerner, P., Jørgensen, J.E., You, R., Steppuhn, J., and Lamb, C.** (1996). Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**, 520-523.
- 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.
- Dubrovsky, J.G., Gambetta, G.A., Hernández-Barrera, A., Shishkova, S., and González, I.** (2006). Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*: Developmental Window, Spatial Patterning, Density and Predictability. *Ann Bot (Lond)* **97**, 903-915.
- Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M.G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J., and Benková, E.** (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105 no.25**, 8790-8794.
- Fukaki, H., and Tasaka, M.** (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol* **69**, 437-449.
- Fukaki, H., Taniguchi, N., and Tasaka, M.** (2006). PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant J* **48**, 380-389.
- Fukaki, H., Okushima, Y., and Tasaka, M.** (2007). Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int Rev Cytol* **256**, 111-137.

- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., and Tasaka, M.** (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *Plant J* **29**, 153-168.
- Hirota, A., Kato, T., Fukaki, H., Aida, M., and Tasaka, M.** (2007). The auxin-regulated AP2/EREBP gene PUCHI is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 2156-2168.
- Jiang, K., and Feldman, L.J.** (2005). Regulation of root apical meristem development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 485-509.
- Karim, M.R., Hirota, A., Kwiatkowska, D., Tasaka, M., and Aida, M.** (2009). A role for Arabidopsis PUCHI in floral meristem identity and bract suppression. *Plant Cell* **21**, 1360-1372.
- Laskowski, M., Grieneisen, V.A., Hofhuis, H., Hove, C.A., Hogeweg, P., Marée, A.F., and Scheres, B.** (2008). Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biol* **6**, e307.
- Laskowski, M.J., Williams, M.E., Nusbaum, H.C., and Sussex, I.M.** (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* **121**, 3303-3310.
- Lucas, M., Guédon, Y., Jay-Allemand, C., Godin, C., and Laplaze, L.** (2008). An auxin transport-based model of root branching in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE* **3**, e3673.
- Malamy, J.E., and Benfey, P.N.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development* **124**, 33-44.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P.J., Bennett, M., and Sandberg, G.** (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *Plant Cell* **14**, 589-597.

- Nodzon, L.A., Xu, W.H., Wang, Y., Pi, L.Y., Chakrabarty, P.K., and Song, W.Y.** (2004). The ubiquitin ligase XBAT32 regulates lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J* **40**, 996-1006.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., and Tasaka, M.** (2007). ARF7 and ARF19 Regulate Lateral Root Formation via Direct Activation of LBD/ASL Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 118-130.
- Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A.** (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* **17**, 444-463.
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., and Bennett, M.J.** (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* **14**, 399-408.
- Reed, R.C., Brady, S.R., and Muday, G.K.** (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **118**, 1369-1378.
- Rogg, L.E., Lasswell, J., and Bartel, B.** (2001). A gain-of-function mutation in IAA28 suppresses lateral root development. *Plant Cell* **13**, 465-480.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* **53**, 247-259.
- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J., and Estelle, M.** (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast *grr1p*. *Genes Dev* **12**, 198-207.

- Stephen, H.H.** (1998). Root Development. *Molecular Genetics of Plant Development* (CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS) **1st edition**, 289-311.
- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M.K., Harper, R.M., Liscum, E., and Yamamoto, K.T.** (2004). MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 379-393.
- Tian, Q., and Reed, J.W.** (1999). Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene. *Development* **126**, 711-721.
- Uehara, T., Okushima, Y., Mimura, T., Tasaka, M., and Fukaki, H.** (2008). Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **49**, 1025-1038.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**, 1963-1971.
- Woodward, A.W., and Bartel, B.** (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot (Lond)* **95**, 707-735.
- Yang, X., Lee, S., So, JH., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., Jensen, C., Hangarter, R., Hobbie, L., and Estelle, M.** (2004). The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate of SCF(TIR1). *Plant J* **40**, 772-782.

VI. 謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科形質発現植物学講座の田坂昌生教授のご指導のもと、平成 17 年 4 月から平成 22 年 5 月まで行われました。

本研究を行うにあたり、田坂昌生教授には熱心なご指導ご鞭撻をいただき、まことに感謝いたしております。また、主に第一部における研究を進めるにあたっては神戸大学大学院理学研究科の深城英弘准教授に終始ご指導をいただきました。篤く御礼申し上げます。第二部にあたる研究は前任者である廣田敦子博士の先行研究あってのものでした。研究材料ならびに多くの示唆をいただき、また当研究室に在籍時より多数のご助言をいただきました。まことに感謝いたします。当研究室の森田美代准教授、古谷将彦助教、打田直行助教には本研究を行うにあたり、多くのご助言をいただき、まことにありがとうございます。また、形態統御機構研究グループの相田光宏特任准教授ならびに武田征士特任助教からも日々多くの助言をいただきました。深く感謝申し上げます。バイオサイエンス研究科植物遺伝子機能学講座の加藤壮英助教、植物組織形成学講座の奥島葉子助教には助言、研究サンプルの提供などひとかたならずお世話になりました。篤く御礼申し上げます。そのほか、当研究室に所属している研究員、技術補佐ならびに院生の皆様には日々の研究生活において公私ともに多大な支援をいただきました。深く感謝いたします。また、かつて在籍しておられた多くの方々におきましても、同じく研究生活を支えていただきました。感謝いたしております。

本研究は奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科ならびに文部科学省グローバル COE プログラムの支援の元に行われました。ここに感謝の意を表します。