

博士論文番号 : 0881016

植物の器官成長における極長鎖脂肪酸の役割の解明

信澤 岳

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物成長制御研究室

(梅田正明教授)

2012年6月1日提出

目次

主要略語一覧	3
緒論	4-8
図表（緒論）	9-10
<hr/>	
第一章 極長鎖脂肪酸の色素体分裂における役割	
1.1. 序論	12-15
1.2. 材料と方法	14-16
1.3. 結果	17-20
1.4. 考察	21-24
図表（第一章）	25-35
<hr/>	
第二章 細胞増殖における極長鎖脂肪酸の役割	
2.1. 序論	37-39
2.2. 材料と方法	40-46
2.3. 結果	47-56
2.4. 考察	57-61
図表（第二章）	62-90
参考文献	91-105
謝辞	106

主要略語一覧

- ATHB8** : *Arabidopsis thaliana* homeobox gene-8
ATML1 : *Arabidopsis thaliana* LAYER1
ARR : Arabidopsis response regulator
Col : Columbia
CoA : coenzyme A
CKX : cytokinin oxidase (サイトカイニンオキシダーゼ)
CZ : central zone (中心部)
DAG : days after germination
ECR : enoyl-CoA reductase
ENR : enoyl-ACP reductase
FAS: fatty acid synthase
FtsZ : filamentous temperature sensitive
GFP : green fluorescent protein (緑色蛍光タンパク質)
GUS : β -glucuronidase
HCD : 3-hydroxy acyl-CoA dehydratase
iP : N^6 -isopentenyladenine (イソペンテニルアデニン)
IPT : adenosine phosphate-isopentenyltransferase (イソペンテニルトランスフェラーゼ)
KAS : ketoacyl-ACP synthase
KCR : 3-ketoacyl-CoA reductase
KCS : ketoacyl-CoA synthase
KNAT : *KN1*-like in *Arabidopsis thaliana*
KNOX : class-I *Knotted1*-like homeobox
Ler : *Lansberg erecta*
LCFA : long-chain fatty acid (長鎖脂肪酸)
Pro : promoter (プロモーター)
PZ : peripheral zone (周縁部)
RNAi : RNA interference (RNA 干渉)
RZ : rib-zone (髄状部)
SAM : shoot apical meristem (茎頂分裂組織)
tZ : *trans*-zeatin (トランスゼアチン)
VLCFA: very-long-chain fatty acid (極長鎖脂肪酸)
WT : wild-type (野生型)

緒論

増殖は、生命にとって最も本質的な現象である。特に多細胞生物の発生においては、個々の細胞の増殖が、時間的・空間的・量的な要素に基づいた厳密な制御を受けることで、器官の形成ならびに成長がなされる。高等植物の器官形成の仕組みは、胚発生の段階でほぼ全ての器官が形成される動物の発生と比較すると、きわめて柔軟にできている。すなわち、植物は一生を通して未分化な細胞を保持しつつ、その細胞をもとに新たな器官を形成し続けることができる。さらに、形成された器官の成長が最適化されることで、個々の器官の大きさ、ひいては個体の大きさが決定される。こうした植物の器官形成および器官成長は、遺伝的プログラムと外部環境からのシグナルをもとに、個々の細胞の増殖および伸長が柔軟に制御されることによってなされている。しかし、その詳細な分子機構については、未解明な点が多く残されている。

胚発生後の植物の地上部器官の形成は、茎頂分裂組織 (shoot apical meristem; SAM) における、細胞増殖の厳密な制御によって成り立っている。SAM は形態的および機能的に異なる 3つの領域、すなわち、SAM の頂端から SAM の中央にかけて中心部 (central zone; CZ), CZ の側面の領域である周縁部 (peripheral zone; PZ), そして CZ の基部側の領域である髄状部 (rib zone; RZ) より構成される (Vernoux et al. 2000; Fig. 0-1A)。CZ は幹細胞領域であり、CZ においては未分化な細胞の増殖が一生続けられる。CZ において増殖した細胞の一部は、側面もしくは基部側に押しやられて、それぞれ PZ もしくは RZ を構成する細胞となる。PZ ならびに RZ では、分化シグナルを受けて細胞の運命が決定され、PZ において増殖した細胞はさらに側面に存在する領域に押しやられて器官の原基を形成し、RZ の細胞からは茎の内部組織が形成される。

CZ, PZ, RZ といった機能的な領域の区分に加えて、双子葉植物の SAM は、表層から順に L1, L2, L3 と呼ばれる、細胞系譜的に独立した細胞からなる層構造を持っている (Szymkowiak & Sussex 1996; Fig. 0-1B)。L1 層および L2 層は層に対して水平方向にのみ分裂し、L3 層は全方向に分裂する。この層構造は一生を通して保持されており、L1 層に由来する細胞は器官の表皮へと、L2, L3 層は器官の内側の組織を形成するように分化していく。

SAM の維持や器官形成は、種々のホメオボックス遺伝子ならびに低分子のペプチドなどによって制御されている (Tucker & Laux 2007)。例えば、CZ の基部側において発現する *WUSCHEL* (*WUS*) と、CZ の L1 および L2 層で発現する分泌性ペプチド *CLAVATA3* との間ではたらくフィードバック制御のループは、

SAM の領域維持において中心的な役割を担っていることが知られている (Brand et al. 2000)。また, SAM で発現する *Knotted1-like homeobox (KNOX)* ファミリーに属する遺伝子は, SAM の維持ならびに機能において欠かせない役割を担っている (Hay & Tsiantis 2009)。加えて, 植物ホルモンもまた, 器官の形成や SAM の維持機構に密接に関わっており, 例えば KNOX は, サイトカイニンの合成やジベレリンの分解を介して SAM の維持ならびに器官形成の制御に関わることが示唆されている (Jasinski et al. 2005)。また, PZ と原基の境界は, CUP-SHAPED COTYLEDONS などによって, オーキシンの極性輸送が厳密に制御される結果, 決定されると考えられている (Bohn-Courseau 2010)。

植物は種ごとに固有の器官サイズを持つことが知られており, 器官の大きさを制御する因子がシロイヌナズナにおいていくつか同定されてきている (Krizek 2009)。例えば, 転写因子 ARGOS (auxin-regulated gene involved in organ size) や AINTEGUMENTA は細胞分裂を促進させるように機能し, それらをコードする遺伝子の過剰発現体は葉や花器官の拡大を引き起こす (Krizek 1999; Hu et al. 2003)。また, E3 ユビキチンリガーゼをコードする *BIG BROTHER (BB)* は器官成長を抑制しており, *BB* の過剰発現体では器官成長が強く抑えられる一方, *bb* 機能欠損変異体では器官成長が促進される (Disch et al. 2006)。加えて, ユビキチンの受容体をコードし, 器官成長について抑制的にはたらく因子として *DA1* が同定されている (Li et al. 2008)。さらに, シトクロム P450 をコードする *CYP78A5/KLUH* の発現が減少すると器官が小さくなり, 反対に過剰に発現させると器官が大きくなることが解っている (Anastasiou et al. 2007)。興味深いことに, *KLUH* の発現部位と器官成長の変化が観られる部位とは異なることなどから, *KLUH* は未知の経路で細胞増殖を制御し, 細胞非自律的に器官の大きさを制御する可能性が示されている (Anastasiou et al. 2007)。しかし, 器官成長を調節する詳細な分子機構については十分に解明されておらず, この機構に関わる未同定な因子が他にも存在すると考えられる。加えて, *DA1* の発現が, 環境ストレスによって誘導される植物ホルモン, アブシジン酸の投与によって上昇することから, *DA1* は環境変化に応じた器官成長の制御に関与する可能性が示唆されているが (Li et al. 2008), 環境シグナルが器官成長の制御機構にどのように関わるかについての知見も乏しい。

最近の研究から, L1 層ならびに L1 層の細胞に由来する表皮は, 単純な外界との接点であるだけでなく, 植物の器官形成や器官成長を支える上でも重要な役割を担う組織であることがわかってきた。表皮の機能を欠損したシロイヌナズナの変異体は, 組織全体を構成する細胞形態や器官の形成に重篤な異常を示

す (Abe et al. 2003; Tanaka et al. 2004; Tanaka et al. 2007)。加えて、SAM 表面において、エクспанシンを用いて異所的に細胞壁をゆるませると、その部位において葉の原基形成を誘導できることが示されている (Fleming et al. 1997; Pien et al. 2001)。つまり、表皮は内側の細胞層に対して物理的な制限を加えることで、植物の成長を制限している可能性が示唆されている。また、ブラシノステロイド合成遺伝子を欠損したシロイヌナズナの変異体は矮化するが、この変異体において、表皮特異的にブラシノステロイドのレセプタータンパク質もしくは合成酵素を発現させることで、表現型を回復できる (Savaldi-Goldstein et al. 2007)。このことから、表皮由来のブラシノステロイドシグナルが、植物体内側の組織の成長を促進させることが示唆された (Savaldi-Goldstein et al. 2007)。これらの知見は、表皮から内側の細胞層の細胞増殖を制御し、ひいては器官や個体の成長を調節するシグナルが存在する可能性を示している。しかし、実際にそのようなシグナルが存在するかどうかについてはわかっていない。

地上部表皮の特徴のひとつに、外側にクチクラとよばれる脂質を主成分とする疎水性物質で覆われた層を保持していることが挙げられる。クチクラは植物体の乾燥を防ぐとともに病原体の侵入を防ぐ役割を担っている (Kunst & Samuels 2009)。クチクラを欠損したシロイヌナズナの変異体では、病原菌に対する抵抗性に変化が生じる他 (Reina-Pinto & Yephremov 2009)、地上器官の合着が引き起こされることや (Sieber et al. 2000; Chen et al. 2003)、生育の阻害ならびに形態形成の異常が引き起こされる (Panikashvili 2007)。したがって、クチクラの形成と維持は、植物の生存ならびに器官形成において重要であると考えられる。

クチクラは、クチンならびにクチクラワックスより構成されている。クチンは主に長鎖脂肪酸 (long-chain fatty acid, LCFA; 炭素数 18 までの脂肪酸) をもとに合成され、クチクラワックスは極長鎖脂肪酸 (very-long-chain fatty acid, VLCFA; 炭素数 20 以上の脂肪酸) を出発原料として合成される。LCFA の生合成は色素体においておこなわれ、脂肪酸伸長酵素 (FAS: fatty acid synthase) とよばれる酵素の複合体による、縮合・還元・脱水・還元の一連の反応を繰り返して炭素鎖の伸長が行われる (Li-Beisson et al. 2010; Fig. 0-2)。FAS による伸長反応 1 回ごとに 2 個の炭素が付加されてゆき、色素体においては炭素数 16 もしくは 18 までの脂肪酸が伸長合成により作られる。一方、VLCFA は小胞体において行われ、色素体で合成された LCFA を最初の基質として伸長合成される (Bach et al. 2010; Fig. 0-2)。小胞体における VLCFA の伸長合成反応は LCFA の伸長合成反応と類似しており、縮合、還元、脱水、還元よりなる

4段階の反応を繰り返し、一回の反応ごとに2個の炭素が付与されていく。それぞれの伸長合成反応を触媒する酵素は、順に ketoacyl-CoA synthase (KCS), 3-ketoacyl-CoA reductase (KCR), 3-hydroxy acyl-CoA dehydratase (HCD), enoyl-CoA reductase (ECR)である。また、2個の炭素の供与体となるのはマロニル CoA であり、細胞質型 ACCase の触媒活性によってアセチル CoA から合成される。

シロイヌナズナにおいて、HCD や KCR の機能を完全に失うと胚発生致死になることから、植物の発生において VLCFA が不可欠であることが示されている (Bach et al. 2008; Beaudoin et al. 2009)。また、KCS や KCR, ECR を欠損する種々のシロイヌナズナの変異体の解析から、VLCFA はクチクラワックス形成を介して、正常な器官形成を支えていることが示されている (Millar & Kunst 1997; Millar et al. 1999; Todd et al. 1999; Yephromov et al. 1999; Fiebig et al. 2000; Zheng et al. 2005; Beaudoin et al. 2009; Lee et al. 2009)。一方で、クチクラワックスの生成以外の VLCFA の役割も示唆されている。シロイヌナズナ HCD をコードする *PAS2* の機能を部分的に欠損した *pas2-1* 変異体は、VLCFA 含量の減少を示すとともにサイトカニンに対して高感受性になり、異所的な細胞増殖の活性化を示すことが報告されている (Faure et al. 1998; Bellec et al. 2002; Haberer et al. 2002; Harrar et al. 2003; Bach et al. 2008)。同様に、シロイヌナズナにおいて、細胞質型 ACCase をコードする *PAS3/GURKE* や、VLCFA 伸長酵素複合体の足場タンパク質をコードする *PAS1* を欠損した変異体でも VLCFA の減少がみられ、*pas2-1* 変異体と同様の表現型を示すことが報告されていることから (Faure et al. 1998; Baud et al. 2004; Roudier et al. 2010)、細胞分裂の制御に VLCFA が関わっている可能性が示唆されている。さらに、過敏感細胞死の誘導に VLCFA が関わることも示されており (Raffaele et al. 2008)、植物の発生や環境応答において VLCFA が多面的な役割を担っていると考えられる。

VLCFA は、シグナル伝達に関わるリン脂質やスフィンゴ脂質にも含まれることが知られている (Samuels et al. 2008; Worall et al. 2003)。リン脂質は生体膜の主要な成分であり、主に花や葉において多く含まれていることが知られている (Franke & Schreiber 2007)。リン脂質の一種、フォスファチジルエタノールアミン合成を欠損した *phosphorylethanolamine cytidyltransferase1* 変異体は、植物の一生を通して種々の形態的異常を示すことから、リン脂質は植物の発生において重要な役割を担っていると考えられる (Mizoi et al. 2006)。加えて、他のリン脂質種に比べてフォスファチジルセリン (PS) は特に VLCFA を多く含み、PS の合成が花粉形成において重要な役割を持っていることや (Yamaoka et al. 2011)、VLCFA 合成を欠損した *cer10* 変異体では変形した不稔の花粉が形成さ

れることから (Zhen et al. 2005), 植物の生殖において VLCFA を含むリン脂質は重要な役割を担っている可能性が示唆される。また, スフィンゴ脂質はシグナル分子として, 細胞増殖や細胞死, ストレス応答に寄与していることが酵母や動物において知られている (Worrall et al. 2003)。植物においても, スフィンゴ脂質を作れないシロイヌナズナの変異体は, 細胞成長の阻害や致死を示すことから, 発生において欠かせない役割をもっていると考えられる (Chen et al. 2006; Dietrich et al. 2008)。さらに近年, LCFA を含むスフィンゴ脂質ではなく, VLCFA を含むスフィンゴ脂質が正常な植物の発生に必須であることが示され (Markham et al. 2011), 植物の発生において, VLCFA に由来する脂質は特別かつ不可欠な役割を担っていると考えられる。しかし, VLCFA が植物の発生や細胞増殖を制御するシグナル伝達系へどのように関与しているかについての知見は乏しい。加えて, トウモロコシの葉緑体の包膜中からは, VLCFA や VLCFA を含む脂質が検出されていることや (Poincelot 1976), KCS をコードする *FAEI* を過剰発現させると, 葉緑体におけるチラコイド膜の構造が変化することから (Millar et al. 1998)。VLCFA が葉緑体においても何らかの機能を持っている可能性が示唆される。

本研究では, 植物の器官成長に加えて, 色素体分裂において VLCFA が重要な役割を担っていることを明らかにした。本論文では, 第一章において, VLCFA が色素体分裂に欠かせない分裂リング (Z リング) の正常な形成に重要な役割を持つことを示す。続く第二章においては, 植物の地上部での細胞増殖制御における VLCFA の役割について解析し, 表皮で合成された VLCFA が, 維管束におけるサイトカイニン合成の抑圧を介して, 植物体全体の細胞増殖活性を調節するという新しいモデルを提唱する。

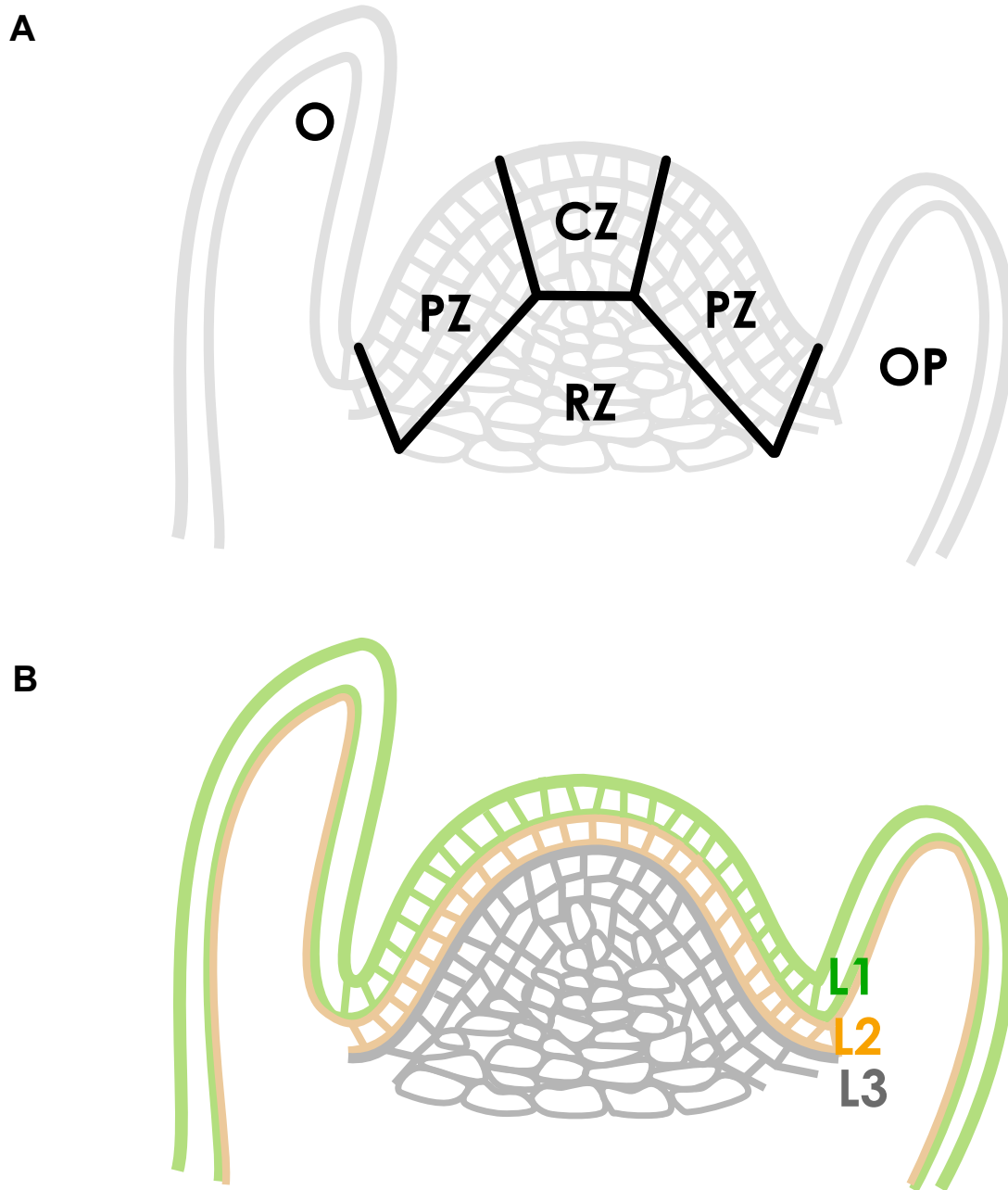
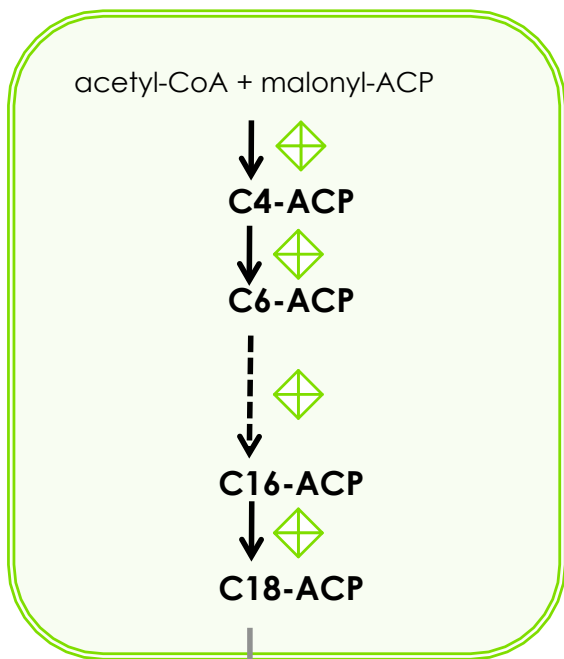


Figure 0-1. 双子葉植物における茎頂分裂組織（SAM）の構造

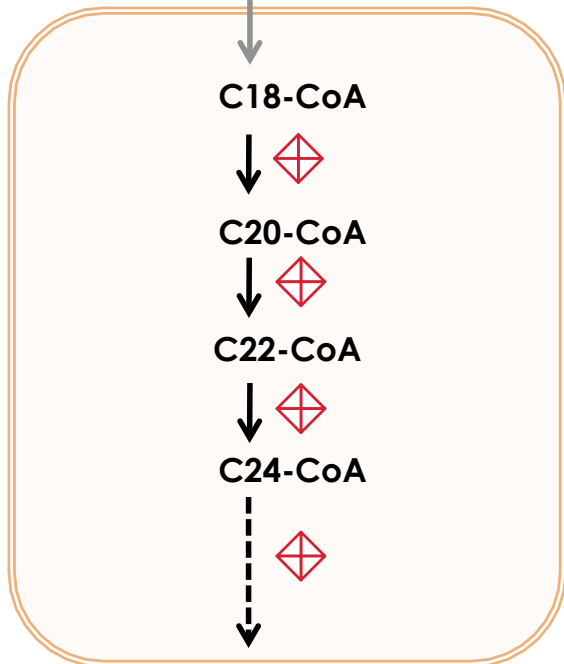
(A) SAMを構成する主な3つの領域を示す。

CZ, 中心部; **PZ**, 周縁部, **RZ**, 髄状部; **OP**, 器官の原基; **O**, 器官

(B) SAMの層構造を示す。表層から順に, L1層 (緑), L2層 (橙) L3層 (灰) で示す。

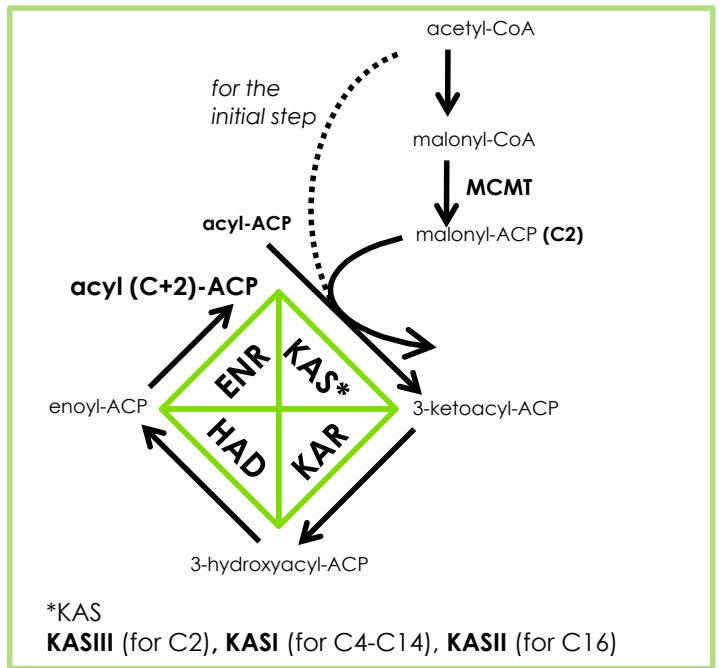


Plastid



Endoplasmic Reticulum

Fatty Acid Synthase



VLCFA elongase complex

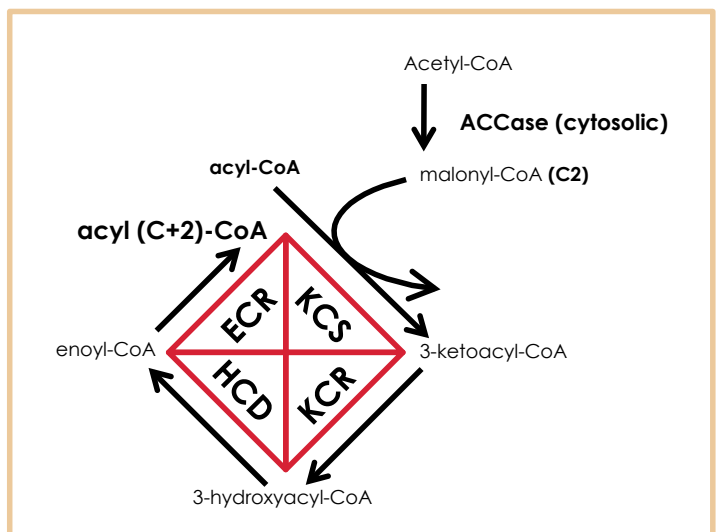


Figure 0-2. 植物における脂肪酸の伸長合成経路

左側に炭素鎖伸長の大きな流れを示し、各反応を触媒する因子を緑もしくは赤い菱形として略示した。緑色で囲った反応（脂肪酸の新規合成ならびに長鎖脂肪酸の伸長合成）は色素体において、橙色で囲った反応（極長鎖脂肪酸の伸長合成）は小胞体において行われる。右側に、左側のそれぞれの色の菱形について、反応の詳細を示す。

ACP, acyl-carrier protein; **MCMT**, malonyltransferase; **KAS**, ketoacyl-ACP synthase; **KAR**, 3-ketoacyl-ACP reductase; **HAD**, 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase; **ENR**, enoyl-ACP reductase; **VLCFA**, very-long-chain fatty acid; CoA, coenzyme A; **KCS**, 3-ketoacyl-CoA synthase; **KCR**, 3-ketoacyl-CoA reductase; **HCD**, 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase; **ECR**, enoyl-CoA reductase

第一章

極長鎖脂肪酸の色素体分裂における役割

1.1. 序論

色素体は、植物特異的な細胞内小器官であり、アミノ酸や脂質の生合成など重要な役割を担っている (Galili 1995; Ohlrogge & Browse 1995)。色素体は、SAM においては未分化なプロプラスチドの状態を保ち、光合成器官においてはチラコイド膜を発達させて葉緑体へと分化して光合成を行う。加えて、花や果実では色素を蓄積するクロモプラストへと変化する。また、根端や胚軸の組織においてはアミロプラストへと分化し、デンプンの合成や蓄積を行う他、重力方向の感知において重要な役割を担う (Morita & Tasaka 2004)。色素体の起源は、真核生物が取り込んだシアノバクテリアであると考えられており、宿主である真核細胞とは独立したゲノム情報を保持している (Reyes-Prieto et al. 2007)。色素体は細胞内に新規に生じることではなく、既に存在する色素体から、分裂によってのみ増殖することができる。しかし、色素体の分裂に必要な因子をコードする遺伝子のほとんどは宿主である植物細胞のゲノムに移行しており、色素体の分裂は宿主細胞が主に制御していると考えられる (Kuroiwa et al. 1998)。

色素体はシアノバクテリアを起源としていることもあり、色素体分裂の機構は原核生物のサイトキネシスに進化的に類似している。原核生物および色素体の分裂において主要な役割を担っているのが、filamentous temperature-sensitive (FtsZ) タンパク質である (Osteryoung & Vierling 1995; Strepp et al. 1998; Yang et al. 2008)。FtsZ タンパク質はチューブリン様 GTPase であり、自己重合を行って FtsZ-リング (Zリング) を分裂面に形成し、分裂に必要な収縮力を与える (Osawa et al. 2008)。植物には2種類の FtsZ タンパク質、FtsZ1 と FtsZ2 が存在し、宿主ゲノム中にそれぞれをコードする遺伝子が存在している (Vitha et al. 2001)。

原核生物においては、MinC, MinD および MinE タンパク質から構成される Min システムとよばれる機構が、FtsZ タンパク質を分裂面にのみ局在させる (Margolin 2005)。Min システムは高等植物においても保存されており、ARC3, MinD (ARC11) および MinE (ARC12) が、それぞれ原核生物の MinC, MinD および MinE に対応する機能をもち、葉緑体内膜における Zリングの正常な形成に重要であることがわかっている (Yang et al. 2008)。加えて、植物特異的な膜タンパク質である MCD1 が、MinE と直接相互作用することで、正常な Zリングの局在を決めていることが示されている (Nakanishi et al. 2009)。Zリングの形成場所が決定されると、葉緑体内膜に局在する膜貫通型タンパク質、ARC6 および PARC6 によって Zリングは安定化される (Vitha et al. 2003; Glynn et al. 2008; Glynn et al. 2009)。次いで、ARC6 および PARC6 は、葉緑体外膜に局在する植物特異的な膜貫通型タンパク質、PDV2 および PDV1 とそれぞれ相互作用

する (Glynn et al. 2008; Glynn et al. 2009)。その後、植物特異的なダイナミン様 GTPase, ARC5 (DRP5)が葉緑体外膜に動員され、収縮力を与えることで葉緑体分裂が進行する (Gao et al. 2003; Miyagishima et al. 2003; Yoshida et al. 2006; Fig. 1-1)。

上記の色素体分裂に必要な因子を欠損したシロイヌナズナの変異体は、いずれも葉緑体における Z リングの形成が正常に行われず、葉緑体分裂の不全が引き起こされる (Vitha et al. 2003; Miyagishima et al. 2006; Glynn et al. 2007; Fujiwara et al. 2008; Glynn et al. 2009; Nakanishi et al. 2009; Wilson et al. 2011)。色素体分裂を制御する宿主細胞側の因子として、近年では、メカノセンシティブチャネル (浸透圧調節などに関わると考えられている) タンパク質の一種、MSL2 および MSL3 が、Min システムに密接に関わることで、膜の張力と色素体の分裂を調節している可能性が示唆された (Wilson et al. 2011)。しかし、真核細胞に由来する色素体分裂を制御する因子についての知見は未だに乏しい。

本章では、VLCFA 含量の減少が、シロイヌナズナにおいてアミロプラストおよび葉緑体の分裂を阻害することを明らかにする。加えて、VLCFA 含量の減少による葉緑体の分裂阻害は、葉緑体上の Z リング形成の異常によるものであることを示す。これらの結果は、宿主細胞により合成される VLCFA が、正常な色素体分裂を支えている可能性を示す。

1.2. 材料と方法

1.2.1 植物材料

本研究では、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を植物材料として用いた。本章での野生型は Columbia (Col-0) とし、本章で用いたシロイヌナズナの系統は、次の通りである。なお、すべて Col-0 バックグラウンドである。

pas2-1 変異体 (Faure *et al.* 1998)

pdv2-1 変異体 (Miyagishima *et al.* 2006)

Pro35S:PDV2 (Okazaki *et al.* 2009)

ProFtsZ2:FtsZ2-GFP (Nakanishi *et al.* 2009)

1.2.2 生育条件

シロイヌナズナの種子は、ムラシゲ・スクーグ固形培地 (1 × MS 無機塩類, 1 × MS ビタミン, 2% [w/v] スクロース, pH 6.3 ; 0.8% [w/v] 寒天) 上に無菌播種した。4°C 暗所において 2 日間の低温処理を施した後、23°C 連続照明下において生育させた。スクロースを欠乏させた MS 固形培地は、浸透圧を保つために、上記 MS 培地の組成のうちスクロースを 1.064% (w/v) のマンニトールに置き換えた。

カフェンストロール (cafenstrole, 和光純薬) は、dimethylsulfoxide (DMSO) に任意の濃度で溶解後、固化する前の MS 培地に 1/1000 量を添加した。コントロールの培地には、DMSO のみを添加した。

1.2.3 デンプンの定量

新鮮重量 100 mg 程度の植物体全体を液体窒素で急速凍結後、凍結乾燥器を用いて組織を乾燥させた。組織を粉碎した後、Starch Assay Kit (Sigma-Aldrich) を用いてデンプンの定量を行った。

1.2.4 組織切片の作成

組織切片の作成は、主に Adachi *et al.* 2009 に従った。すなわち、グルタルアルデヒド (2.5% v/v in PBS) で固定後、エタノールシリーズでの脱水を経て、最終的に Technovit 7100 樹脂溶液 (Heraeus Kulzer) に置換した。固化後、ミクロトームを用いて、厚さ 4–5 μm の組織切片を作成した。デンプンの染色は、得られた組織切片にルゴール液 (Sigma-Aldrich Corp.) を滴下することで行った。

1.2.5 脂質定量解析

全脂肪酸の抽出・精製ならびにメチルエステル化は、脂肪酸メチレーションキット (ナカライテスク) および脂肪酸メチルエステル精製キット (ナカライテスク) を用いて行った。その後、ULBON HR-SS-10 キャピラリーカラム ($\phi 0.25\text{ mm} \times 30\text{ m}$; 信和化工) を繋いだガスクロマトグラフィー/質量分析計 (Hewlett Packard 5890 Series II/ JEOL JMS-700 MStation; selected ion monitor モード [m/z 74]) を用いて定量を行った。脂肪酸種の判別には、脂肪酸メチルエステル標準品 (GLC Reference Standard GLC62; NU-CHEK-PREP) を用いた。

1.2.6 葉緑体の観察

葉緑体の観察法は、主に Pyke and Leech (1991) に従った。すなわち、本葉を 3.5% (v/v) のグルタルアルデヒド水溶液で 1 時間固定した後、0.1 M Na_2EDTA (pH 9) 溶液中で 1–2 時間、60°C で処理した。その後、葉をスライドガラスに載せてカバーガラスをかけ、カバーガラス越しにピンセットを用いて軽く数回タッピングすることで、葉肉細胞を単離した。その後、ノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いて観察した。色素体面積および数の定量解析は、得られた顕微鏡画像を画像解析ソフト ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) を用いて行った。

FtsZ2-GFP タンパク質の蛍光および葉緑体の自家蛍光の観察は、葉を水で封入したプレパラートを作成し、共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus Corp.) を用いて観察した。

1.2.7 定量 RT-PCR

Total RNA の抽出は、発芽後 5 日目の植物体全体から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。cDNA の合成は、2 μ g の total RNA を鋳型として、SuperscriptII 逆転写酵素 (Invitrogen)を用いて行った。

定量 RT-PCR は、蛍光色素 SYBR Green I (タカラバイオ)および次のプライマーセットを含む反応液を調整し、LightCycler system (Roche Applied Science)を用いて、95°C, 45 秒で編成させた後、95°C, 15 秒 60°C, 30 秒 72°C, 45 秒の順で 44 サイクル増幅反応させ、解析した。

	Forward	Reverse
<i>PDV2</i>	5'-AGCTCTTGAGTCTCAGCTTGC-3'	5'-GAGCCAGTTGCTTCTCATATTGT-3'
<i>MinD</i>	5'-TCCTCGGGTATGTATGCATTG-3'	5'-GCAAAAGAGACAAAATCTTCAAAA-3'
<i>MinE</i>	5'-CACCGTAATCGCCTCTCATT-3'	5'-TGCTTATGAATCCCGTGAAA-3'
<i>ARC3</i>	5'-CTCTTCCTCTGCGATTTTGG-3'	5'-CTTCAAGGCATTATCTTGGTGA-3'
<i>MCD1</i>	5'-CCCTCCTGTTGTCTTCCTGA-3'	5'-AAAACAGTAGCCGTGATGCAG-3'
<i>MSL2</i>	5'-CCAACGGTTTTGTAATCCAGA-3'	5'-ATGTTGTCCCAACGGAACAC-3'
<i>MSL3</i>	5'-AGTTTCTGGCACAGTAGAGCAA-3'	5'-CCCGGTCATCACCTCTGATA-3'
<i>FtsZ1</i>	5'-CTTTTAACTCGTGGGCTTGG-3'	5'-CTTCTGCAGCTTGTTCTCCA-3'
<i>FtsZ2</i>	5'-TCAGATATGGTCTTTGTACACAGC-3'	5'-ATTACAGGGGCTGCACCA-3'
<i>TUBULIN4</i>	5'-AGAGGTTGACGAGCAGATGA-3'	5'-CCTCTTCTTCCTCCTCGTAC-3'

1.3. 結果

1.3.1 極長鎖脂肪酸の減少はアミロプラストの分裂阻害およびデンプンの蓄積を誘導する

pas2 変異体は、VLCFA の含量が低下した変異体である (Bach et al. 2008)。*pas2-1* 変異体では、地上部における細胞増殖の亢進や (Faure et al. 1998), 地上器官の融合 (Bellec et al. 2002; Harrar et al. 2003), 主根の伸長阻害 (Bach et al. 2011) の他, 分化した組織からのカルス様構造物の出現 (Bellec et al. 2002) が主な表現型として報告されている。本研究では先ず, *pas2-1* 変異体の詳細な表現型解析を行った。その結果, *pas2-1* 変異体の胚軸および子葉は, ルゴール染色液によって野生型よりも強く染色されることが新たにわかった (Fig. 1-2A)。そこでデンプン含量の定量比較を行ったところ, *pas2-1* 変異体では野生型に比べて約 10 倍のデンプンを含有していることが明らかになった (Fig. 1-2B)。胚軸の切片を作製してルゴール染色を行ったところ, デンプンは皮層細胞のアミロプラストにおいて顕著に蓄積していた (Fig. 1-2C)。加えて, *pas2-1* 変異体のアミロプラストは野生型にくらべて肥大していた (Fig. 1-3A)。そこで, *pas2-1* 変異体の胚軸皮層細胞に含まれるアミロプラストの大きさおよび数の定量観察を行った。その結果, *pas2-1* 変異体のアミロプラストの断面積は, 野生型の 3 倍以上に増加していた (Figs. 1-3A, B, +Suc)。一方で, アミロプラストの数は野生型に比べて半分以下に減少していた (Figs. 1-3A, C, +Suc)。これらの観察結果から, VLCFA 含量が低下するとアミロプラストの数が減少し, デンプンを多量に蓄積するようになることがわかった。

デンプンの合成は, 光合成によって固定した炭素源, もしくは培地中から取り込まれた炭素源をもとに, 色素体において行われる。本研究では, 培地中の糖源として用いているスクロースを欠乏させた条件で植物体を生育させ, アミロプラストの表現型を観察した。その結果, アミロプラスト中のデンプンは, スクロースの欠乏によって野生型および *pas2-1* 変異体のいずれにおいても減少した (Fig. 1-3A)。アミロプラストの面積および数の定量化を行ったところ, スクロース存在下と同様に, *pas2-1* 変異体のアミロプラストの断面積は野生型の 3 倍程度に増加し, 数は半分以下に減少していた (Figs. 1-3B,C, -Suc)。これらの結果から, VLCFA 含量の低下の阻害は, デンプンの蓄積とは独立して, アミロプラストの分裂を阻害することがわかった。

次に, VLCFA 生合成の阻害剤として知られる, カフェンストロールを用いた

解析を加えた。カフェンストロールは、酵母において発現させたシロイヌナズナの KCS (VLCFA の伸長合成の一段階目を触媒する酵素; Fig. 0-2) の活性を阻害することが報告されている (Trenkamp et al. 2004)。また、カフェンストロールを投与すると、オオムギやキュウリにおいても VLCFA 含量の低下を引き起こすことが確かめられている (Yang et al. 2010)。そこでまず、カフェンストロールを含む培地で野生型シロイヌナズナを生育させ、植物体に含まれる VLCFA 含量の定量解析を行った。その結果、炭素数 22 および 24 の VLCFA 含量が、カフェンストロールの投与量依存的に有意に減少していることが明らかとなった。一方で、炭素数 20 の VLCFA や、炭素数 18 の LCFA の含量には変化がみられなかった (Fig. 1-4)。本研究においては炭素数 26 以上の VLCFA の検出はできなかったが、カフェンストロールは炭素数 22 および 24 の VLCFA 合成を阻害する薬剤として、シロイヌナズナでも有効であることがわかった。そこで、カフェンストロールを野生型植物に処理したときのデンプンの蓄積を観察した。その結果、カフェンストロール処理によっても、アミロプラスト中のデンプン蓄積を誘導することがわかった (Fig. 1-5)。したがって、VLCFA の減少がアミロプラストの表現型の原因となることがより明らかとなった。

これまでに、*pas2-1* 変異体はサイトカイニンに対して高感受性を示すことが報告されている (Faure et al. 1998)。したがって、サイトカイニンレベルの増加もしくはサイトカイニンシグナル伝達の活性化が、アミロプラストの表現型の原因であると考えられた。この可能性を検証するために、活性型サイトカイニンの分解酵素である、サイトカイニンオキシダーゼ (cytokinin oxidase) を過剰に発現させた植物体 (*Pro35S:CKX2*; Werner et al. 2003) を用いた解析を行った。カフェンストロールを含む培地で *Pro35S:CKX2* 植物体を育て、茎頂の組織切片を作成した後にルゴール染色を行った。しかし、アミロプラストの肥大や、デンプン蓄積の状態は野生型と同レベルであった (Fig. 1-5)。したがって、VLCFA 合成の阻害は、サイトカイニンシグナル系とは独立の経路でアミロプラストの表現型を引き起こすことがわかった。

1.3.2 極長鎖脂肪酸は葉緑体の正常な分裂に必要である

アミロプラストへの影響に加えて、VLCFA 合成の低下が葉緑体に与える影響について調べた。まず、発芽後 5 日目の若い植物体、ならびに、発芽後 2 週間の成熟した植物体において、本葉第 1 葉の葉肉細胞を単離して葉緑体観察を行った。野生型植物体の葉肉細胞は、いずれの生育段階においても、球状の葉緑

体を多く内包していた(Fig. 1-6)。一方, *pas2-1* 変異体および VLCFA 合成阻害剤を処理した野生型植物体の葉肉細胞には, 楕円形の葉緑体が多く内包されていることがわかった (Fig. 1-6)。次に, 葉緑体の面積および数の定量解析を行った。その結果, *pas2-1* 変異体およびカフェンストロールを処理した植物体では, 発芽後 5 日目の若い段階において, 葉緑体の面積が増加傾向にあることがわかった (Fig. 1-7A)。一方, 成熟した植物体においては, *pas2-1* 変異体およびカフェンストロール処理を行った植物体において, 葉緑体の面積の増加はほとんど認められなくなった (Fig. 1-7B)。葉緑体の数は, 発芽後 5 日目と 2 週間後のいずれの時点においても, カフェンストロール処理を行った野生型および *pas2-1* 変異体において有意に減少していた (Figs. 1-7C, D)。これらの結果から, VLCFA 含量の低下は, 特に若い葉における葉緑体分裂の低下および葉緑体の肥大を引き起こすことが明らかになった。

これまでに, 葉緑体外膜に動員される PDV タンパク質が, 特に若い葉において発現し, 色素体分裂の律速として機能する可能性が示されている (Okazaki et al. 2009; Fig. 1-1)。したがって, VLCFA が PDV 遺伝子の発現もしくは PDV タンパク質の機能に関わる可能性が考えられた。そこで, カフェンストロールを *pdv2-1* 変異体 (Miyagishima et al. 2006) ならびに, PDV2 過剰発現体 (*Pro35S:PDV2*; Okazaki et al. 2009) に投与しての観察を行った。まず, 以前の報告どおり, *pdv2-1* 変異体および PDV2 過剰発現体の葉緑体数はそれぞれ減少および増加した (Figs. 1-8, 1-9A; Miyagishima et al. 2006; Okazaki et al. 2009)。次に, *pdv2-1* 変異体にカフェンストロールを処理したが, 葉緑体の数や形状に変化は認められなかったことから, PDV2 が葉緑体分裂の律速として重要な機能を持っていることが確かめられた (Figs. 1-8, 1-9A)。その一方で, *Pro35S:PDV2* 植物体にカフェンストロールを処理すると, PDV2 過剰発現による葉緑体数の増加は, ほぼ抑圧された (Figs. 1-8, 1-9A)。野生型植物体においても, カフェンストロール処理は PDV2 の遺伝子発現レベルに大きな影響を及ぼさなかったことから (Fig. 1-9B), VLCFA はおそらく PDV2 の発現制御には関わっていないと考えられる。VLCFA が PDV2 のタンパク質の機能や, その下流で機能する因子に何らかの影響を与えている可能性については否定できないが, VLCFA は PDV とは異なる経路で葉緑体分裂を制御する可能性が示唆された。

1.3.3 極長鎖脂肪酸は葉緑体の Z リングの形成にかかわる

正常な Z リングの形成は, 葉緑体分裂に必須である。VLCFA 含量の低下によ

って葉緑体の分裂に異常が認められたことから、VLCFA が減少した植物体の葉緑体において、Zリング (Fig. 1-1) が正常に形成されているかを観察した。Zリングを観察するために、本研究では FtsZ2-GFP 融合タンパク質を *FtsZ2* のプロモーターの下流で発現する形質転換植物体を用いた (*ProFtsZ2:FtsZ2-GFP*; Nakanishi et al. 2009)。通常、カフェンストロールを添加しない条件下では、FtsZ2-GFP タンパク質は1つの葉緑体の中央に1つだけ形成された (Fig. 1-10A; Nakanishi et al. 2009)。一方、カフェンストロールを添加した条件下では、1つの葉緑体に多数のリングが、異なる方向に向かって形成された (Fig. 1-10A)。1つの葉緑体上に存在するZリングの数を定量比較したところ、カフェンストロール処理によって、1本のZリングをもつ葉緑体の割合が減少し、かわりに複数のZリングをもつ葉緑体の数が顕著に増加していた (Fig. 1-10B)。これら複数のZリングが形成されることに加えて、ドット状のFtsZ2-GFP 融合タンパク質の局在が、カフェンストロールを処理した植物体において多数観察されるようになった (Fig. 1-10A)。これらの結果から、VLCFA 合成の障害は、Zリングの正常な形成を乱すことで、正常な葉緑体分裂を抑圧することがわかった。

単一の葉緑体上に複数のZリングが形成される表現型は、葉緑体分裂に必要ないずれの因子を障害した変異体、*minD*, *minE* (Vitha et al. 2003; Fujiwara et al. 2008), *arc3* (Glynn et al. 2007), *mcd1* (Nakanishi et al. 2009), *msl2 msl3* (Wilson et al. 2011), *arc6* (Vitha et al. 2003), *parc6* (Glynn et al. 2009), *pdv1*, *pdv2*, そして *arc5/drp5b* (Miyagishima et al. 2006) 変異体において共通して観察されている表現型である。その一方で、カフェンストロール処理を行った植物体の葉緑体において観察されたようなドット状のFtsZ タンパク質の凝集は、Zリング形成の初期段階である Min システムを攪乱した場合においてのみ報告されている (Vitha et al. 2003; Fujiwara et al. 2008; Wilson et al. 2011)。そこで、VLCFA の減少がZリング形成の初期段階に関わる遺伝子 (*FtsZ1*, *FtsZ2*, *MinD*, *MinE*, *ARC3*, *MCD1*, *MSL2*, *MSL3*) の発現に影響を与えるかを調べた。定量的 RT-PCR の結果、カフェンストロール処理によって、*FtsZ* 遺伝子の発現はわずかな減少を示し、Min システムやその関連遺伝子は、わずかな発現増加を示しただけだった (Fig. 1-11)。しかし、*ARC3* に限っては、カフェンストロール処理によって顕著に発現が低下した (Fig. 1-11)。

1.4. 考察

本研究では、*pas2-1* 変異体がアミロプラスト数の減少およびデンプン含量の劇的な増加を引き起こすことを明らかにした。タバコ培養細胞である BY-2 株では、サイトカイニンの添加がアミロプラストにおけるデンプン蓄積を誘導することが報告されている (Miyazawa et al. 1999)。加えて、アグロバクテリウムのもつサイトカイニン合成の主要酵素をコードする、*isopentenyltransferase (ipt)* 遺伝子をタバコ植物体において異所的に発現させると、その部位で過剰のサイトカイニン合成が誘導され、デンプン粒を異常に蓄積することが報告されている (Guivarc'h et al. 2002)。*pas2-1* 変異体はサイトカイニンに対して高感受性を示すことが報告されているため (Faure et al. 1998; Harrar et al. 2003)、VLCFA の減少はサイトカイニンシグナルの活性化を介してデンプン蓄積を誘導している可能性が考えられた。しかし、活性型サイトカイニンを分解し、サイトカイニン応答遺伝子の発現を抑圧する *Pro35S:CKX2* 植物体 (Werner et al. 2003) においても、VLCFA の減少は高度のデンプン蓄積を誘導した。このことから、VLCFA の減少は、サイトカイニンシグナルを介した経路とは独立に、デンプンの過剰蓄積を誘導していると考えられる。

デンプンが過剰に蓄積する原因のひとつとして、アミロプラストの構造的な変化がデンプンの合成あるいは分解系に影響を与えている可能性があげられる。これまでに、野生型に比べて大きなアミロプラストを保持する *arc5* 変異体において、デンプン代謝系の変動が起こっていることが示されている (Yun & Kawagoe 2009)。加えて、葉緑体が野生型に比べて大きくなる *arc3* 変異体や *arc5* 変異体、*arc6* 変異体においても、葉緑体においてデンプン粒を多く蓄積するようになることが示されている (Austin II & Webber 2005)。したがって、VLCFA の減少によって誘導されたデンプンの過剰蓄積は、アミロプラスト分裂の異常から生じた二次的影響である可能性が考えられる。

VLCFA 含量の減少は、アミロプラストおよび葉緑体の分裂を阻害することが明らかになった。*PDV2* の過剰発現によってもカフェンストロール処理による葉緑体分裂の減少を完全には相補しなかったことや、VLCFA の阻害によって、Zリングの形成不全やドット上の FtsZ タンパク質の凝集が引き起こされたことから、VLCFA は正常な Z リング形成において欠かせない役割を担っていると考えられる。これまでに、脂肪酸の葉緑体分裂への関与を示唆する報告として、シロイヌナズナの *kasI* 変異体および *modI* 変異体についての知見が挙げられる

(Mou et al. 2000; Wu & Xue 2010)。KASI および MOD1 は色素体における LCFA の伸長合成を行う酵素であり，*kasI* 変異体および *mod1* 変異体は野生型に比べて，葉緑体分裂の阻害や，葉緑体数の減少が引き起こされることが報告されている(Mou et al. 2000; Wu & Xue 2010)。加えて，*kasI* 変異体においては，若い葉における Z リング形成の不全が報告されている (Wu & Xue 2010)。色素体で合成された LCFA は，小胞体における VLCFA 合成において欠かせない前駆体であるため，*kasI* および *mod1* 変異体においても，VLCFA 含量が低下していると推測される。カフエンストロール処理や，*pas2-1* 変異体においては脂肪酸中の LCFA の占める割合に減少がみとめられなかったことから (Bach et al. 2008)，LCFA よりもむしろ VLCFA が正常な色素体分裂に重要な役割をもっている可能性が強く示唆される。

本研究の結果から，VLCFA が，Z リングを葉緑体の中央部に形成するために必要であることが明らかとなった。その詳細な分子機構の解明には至らなかったものの，VLCFA の Z リング形成への関与の仕方として，次の3つの可能性が考えられる。一つは，VLCFA が何らかのシグナル経路に関与して，色素体分裂を制御している可能性があげられる。これは，Z リング形成に関わる遺伝子の発現が，VLCFA の減少によって影響を受けていたことに起因する。これまでに，Z リング形成にかかわる遺伝子群の発現のバランスが厳密に制御されることが正常な色素体分裂に重要であることが示されてきている。例えば，*FtsZ1* と *FtsZ2* 発現の量的バランスが崩れた場合に，正常な葉緑体分裂の乱れが生じることが報告されている (Osteryoung et al. 1998; Stokes et al. 2000)。加えて，*MinD* と *MinE* の相対的な発現レベルの差に応じて，Z リングが複数形成されたり，ドット状の FtsZ タンパク質の局在が生じたりし，正常な葉緑体分裂ができなくなることが示されている (Fujiwara et al. 2008)。本研究の解析結果からは，VLCFA の減少が *FtsZ1* と *FtsZ2*，ならびに，*MinD* と *MinE* の発現バランスには影響を与えなかったことから，VLCFA はそれら既知のタンパク質の存在比について，遺伝子レベルで関与していないと考えられる。一方で，VLCFA の減少により *ARC3* の発現は顕著に減少していたことから，VLCFA が *ARC3* の発現制御を介して，FtsZ タンパク質の局在および重合に関与している可能性が考えられる。しかし，*arc3* 単独変異体では葉緑体上に複数の Z リングが形成されるだけであり (Glynn et al. 2007)，VLCFA 低下時に観察されたようなドット状の FtsZ タンパク質の局在は報告されていない。したがって，VLCFA は *ARC3* 以外の遺伝子の発現制御にも関与していると考えられる。動物や酵母，バクテリアにおいては，VLCFA や VLCFA を含む脂質の遺伝子発現制御における役割が示唆さ

れており (Black et al. 2000), 最近では, シロイヌナズナにおいてもアラキドン酸 (C20:4) がストレス関係の遺伝子の発現を正に制御していることが示されている (Savchenko et al. 2010)。VLCFA 減少による *ARC3* の発現減少が, 葉緑体分裂の阻害による二次的な影響である可能性であることを否定するデータはないが, VLCFA が何らかの色素体分裂に関わる遺伝子の発現を制御あるいは仲介している可能性が考えられる。

二つ目に, 色素体の包膜上に存在する VLCFA が, 色素体分裂に必要なタンパク質の正常な局在に必要であるという可能性が考えられる。トウモロコシにおいては, VLCFA が葉緑体の包膜中に含まれることがわかっており, おそらくリン脂質の形でも含まれている (Poincelot 1976)。したがって, VLCFA が色素体の包膜において, 何らかの重要な機能を担っている可能性が考えられる。これまでに, VLCFA や VLCFA を含む脂質が膜タンパク質の局在に与える可能性は, 脂質ラフトにおいて示唆されている。脂質ラフトは, VLCFA やリン脂質, スフィンゴ脂質, コレステロール, ならびに種々のタンパク質から構成される, シグナル伝達において重要な役割をもつ微細な膜領域として知られている (Gaigg et al. 2006; Mongrand et al. 2010)。脂質ラフトは, 界面活性剤に不溶な膜画分 (DRM; detergent-resistant membranes) として抽出できると考えられており, これまでに, シロイヌナズナの色素体外膜に局在することが知られているタンパク質, *TOC75* が DRM に含まれることが報告されている (Borner et al. 2005)。したがって, 色素体の分裂面において VLCFA を含むラフト様の膜領域が作られ, おそらくは VLCFA を含むリン脂質が足場となることで, 色素体分裂に関わるタンパク質の局在を支えている可能性が考えられる。VLCFA を含む脂質は, 高度に屈曲した膜ドメインを安定化させるのに重要な役割を演じている可能性が示されていることから (Schneider et al. 2004), VLCFA や VLCFA を含む脂質が色素体の分裂面に存在することで, Z リングを構成するタンパク質の局在が支えられるとともに, 分裂時における高度な膜の湾曲を支えている可能性が考えられる。

三つ目に, VLCFA を介した膜輸送が, 色素体の分裂に必要なタンパク質の輸送に欠かせない可能性が考えられる。シロイヌナズナにおいて, VLCFA ならびに VLCFA を含むスフィンゴ脂質の量が減少した, *cer10*, *pas1*, ならびに *pas3* 変異体において, 内膜輸送系が損傷していることが報告されている (Zheng et al. 2005; Roudier et al. 2010)。加えて, VLCFA を含むリン脂質が, 小胞体由来の小胞の安定性に関わる可能性が示されている (Sturbois-Balcerzak et al. 1999)。さらに近年, 細胞質分裂の進行に際し, 細胞板の形成に必要な内膜輸送系の動態維持に, VLCFA が重要な役割を担っていることが示された (Bach et al. 2011)。

これらの知見から, VLCFA 自身あるいは VLCFA を含む脂質が, ARC3 や MinD, MinE などの色素体の分裂に必要なタンパク質の輸送を支えている可能性が考えられる。

これら 3 つの可能性のいずれが正しいのか, また, VLCFA あるいは VLCFA を含む脂質がそこにどのように関わりつつ, FtsZ タンパク質の正常な局在に寄与しているのかは, 今後の研究課題である。

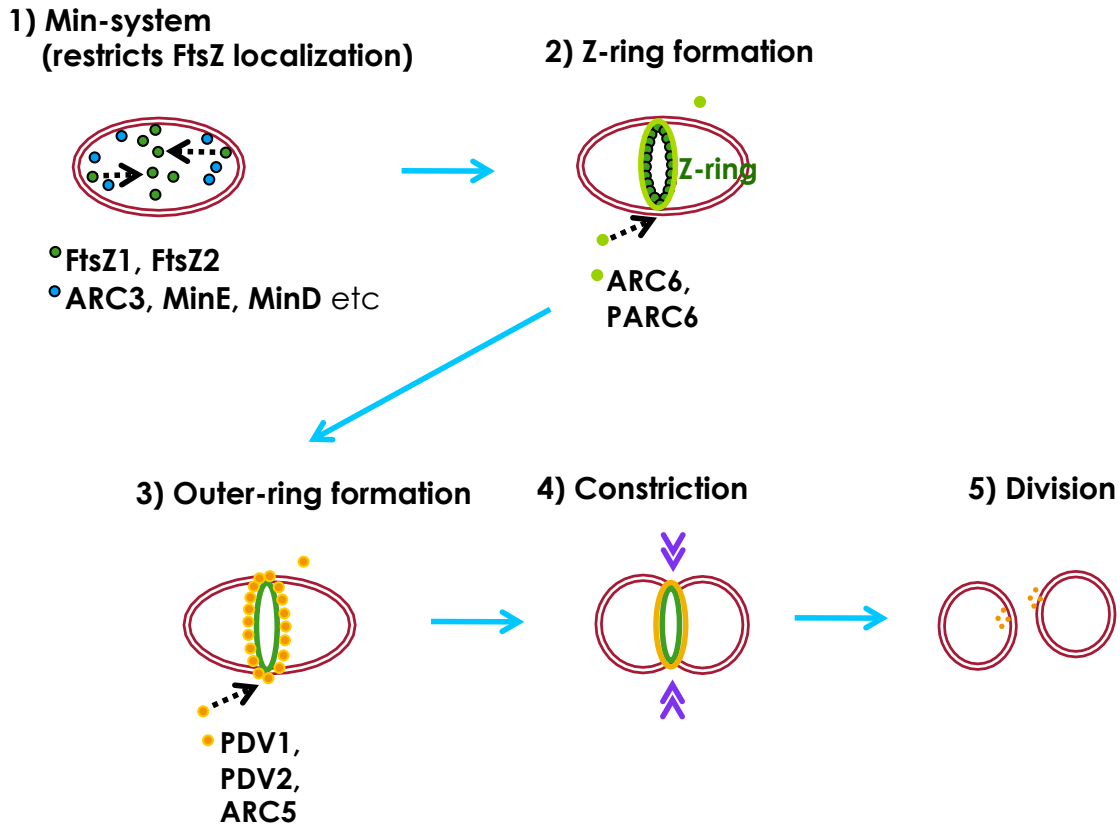


Figure 1-1. 葉緑体分裂プロセスの模式図

- 1) Minシステムの構成因子（ARC3, MinE, MinD）が、FtsZ1 FtsZ2タンパク質を葉緑体内膜の中央に局在させる。
- 2) 葉緑体中央でFtsZ1とFtsZ2タンパク質が自己重合し、Zリングを形成する。ZリングはARC6およびPARC6タンパク質によって安定化される。
- 3) 外膜にPDV1およびPDV2タンパク質が動員され、PARC6およびARC6とそれぞれ結合する。その後、ARC5が動員され、ARC6およびPARC6と相互作用して外膜にもリングを形成する。
- 4) 形成されたリングが収縮していく。
- 5) 2個の葉緑体に分裂する。

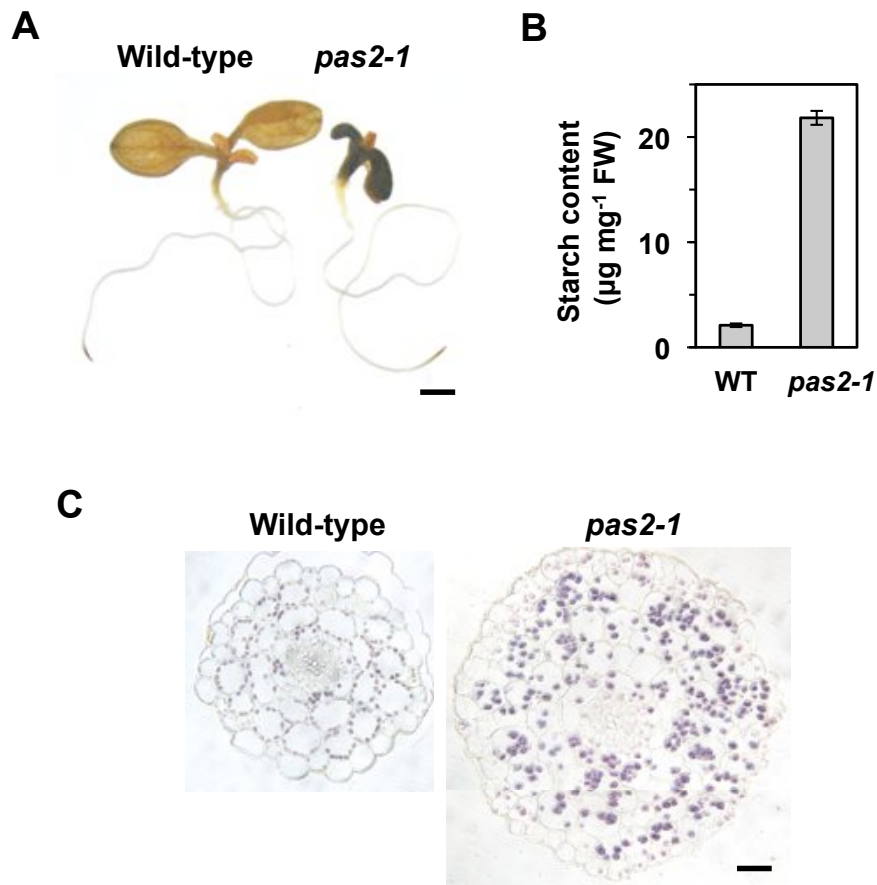


Figure 1-2. *pas2-1*変異体はデンプンを過剰に蓄積する

(A) 発芽後5日目の野生型（左）および*pas2-1*変異体（右）の芽生え。ルゴール染色を行った。

(B) デンプン含量の定量結果。値は平均 \pm S.D. (n=3)。発芽後5日目の植物体全体をサンプルとして用いた。FW, 新鮮重量。

(C) 発芽後5日目の野生型（左）および*pas2-1*変異体（右）における、胚軸の組織切片。ルゴール液でデンプンを染色した。

Bars, 1 mm (A), 50 μm (C).

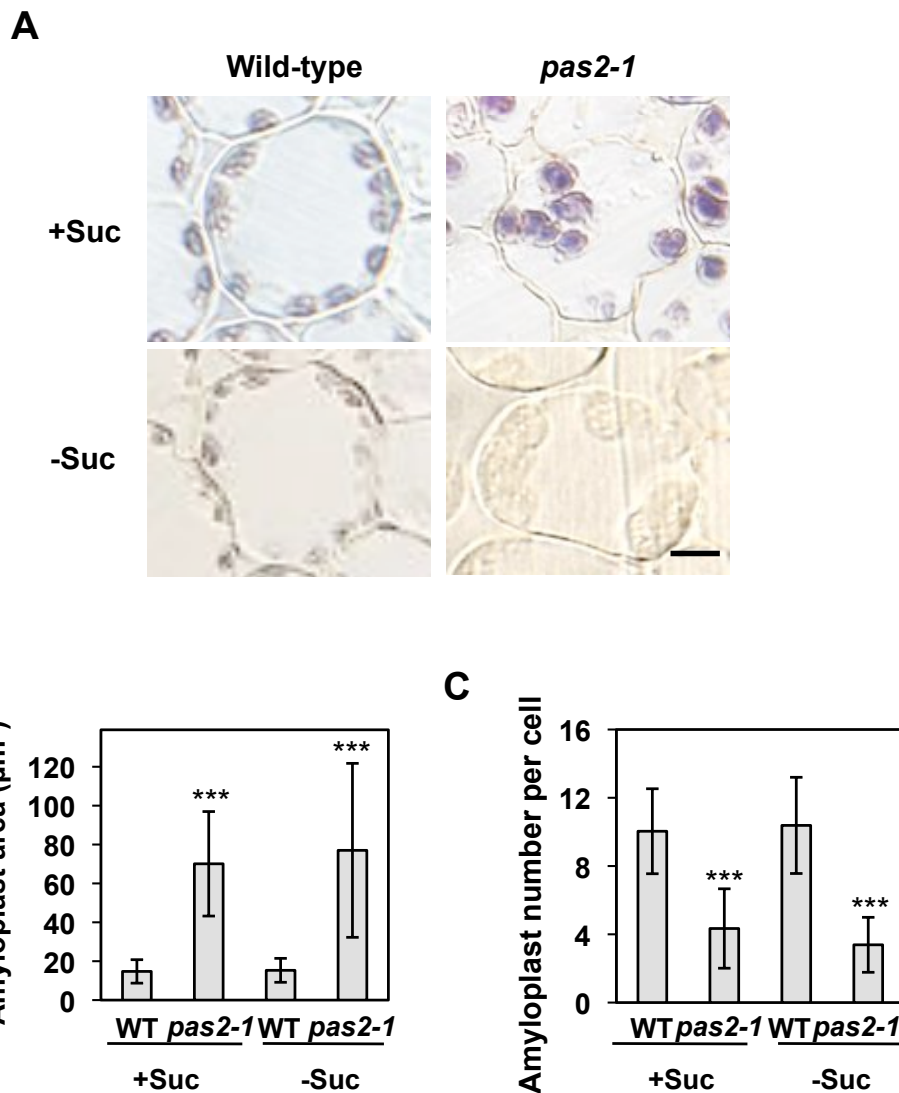


Figure 1-3. 胚軸におけるアミロプラストの解析

(A) 野生型 (Wild-type) および *pas2-1* 変異体における、胚軸皮層細胞におけるアミロプラスト。発芽後5日目の胚軸切片をルゴール染色した。+Suc: スクロースを含む培地で育てた植物体 -Suc: スクロースを含まない培地で育てた植物体 Bar, 10 µm

(B,C) アミロプラストの面積 (B) と皮層細胞中のアミロプラスト数 (C) を示す。値は平均±S.D. (n ≥ 191 (B), n ≥ 50 (C)) で、切片の写真をもとに定量した。有意差は、野生型および *pas2-1* 変異体間において、Student's t-test により算出した。***は P < 0.001 であることを示す。

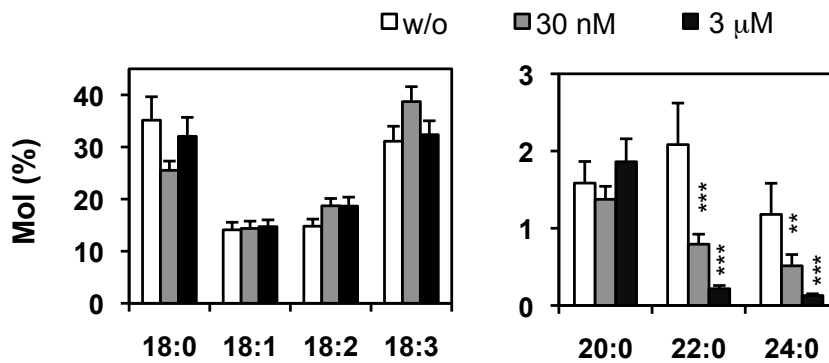


Figure 1-4. カフェンストールは極長鎖脂肪酸合成を阻害する

カフェンストールを含まない培地(w/o)ならびに、30 nMもしくは3 μMのカフェンストールを含む培地(30 nM, 3 μM)で生育した発芽後5日目の植物体全体から全脂質を抽出し、解析した。値は検出した脂肪酸中の割合(%)で、平均±S.D. (n=3)で示す。有意差は薬剤処理したものとw/o間での比較で、Student's t-testによって算出した。***はP < 0.001, **はP < 0.01をそれぞれ示す。

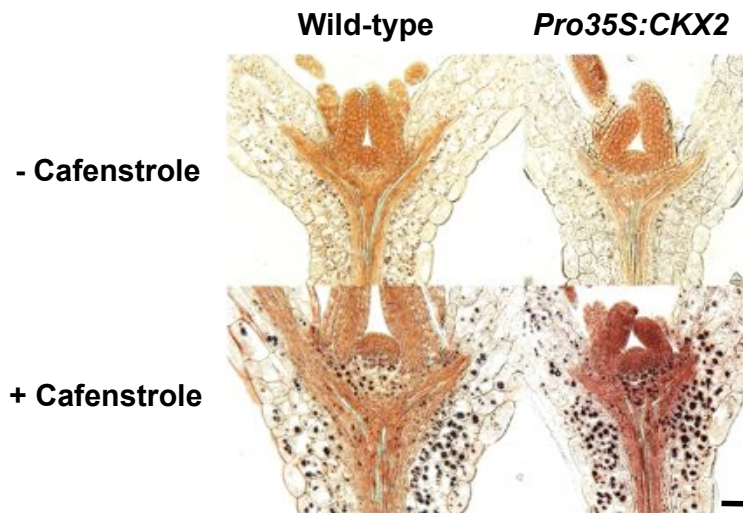


Figure 1-5. 極長鎖脂肪酸の減少によるデンプンの蓄積は、サイトカイニンシグナルとは独立して引き起こされる

30 nMのカフェンストロールを含む培地（下段）もしくは含まない培地（上段）において育った5日目の野生型植物体（左）ならびに*Pro35S:CKX2*植物体（右）の茎頂の縦断切片を示す。切片はそれぞれルゴール液で染色した。Bar, 50 μ m



Figure 1-6. 極長鎖脂肪酸の減少が葉緑体に与える影響

野生型, *pas2-1*変異体, ならびに3 μ Mのカフェンストロールを含む培地で育った野生型植物体の葉緑体。発芽後5日目(上)ならびに2週間(下)の植物体の, 本葉第一葉の葉肉細胞から単離した葉緑体をそれぞれ示す。Bars, 10 μ m

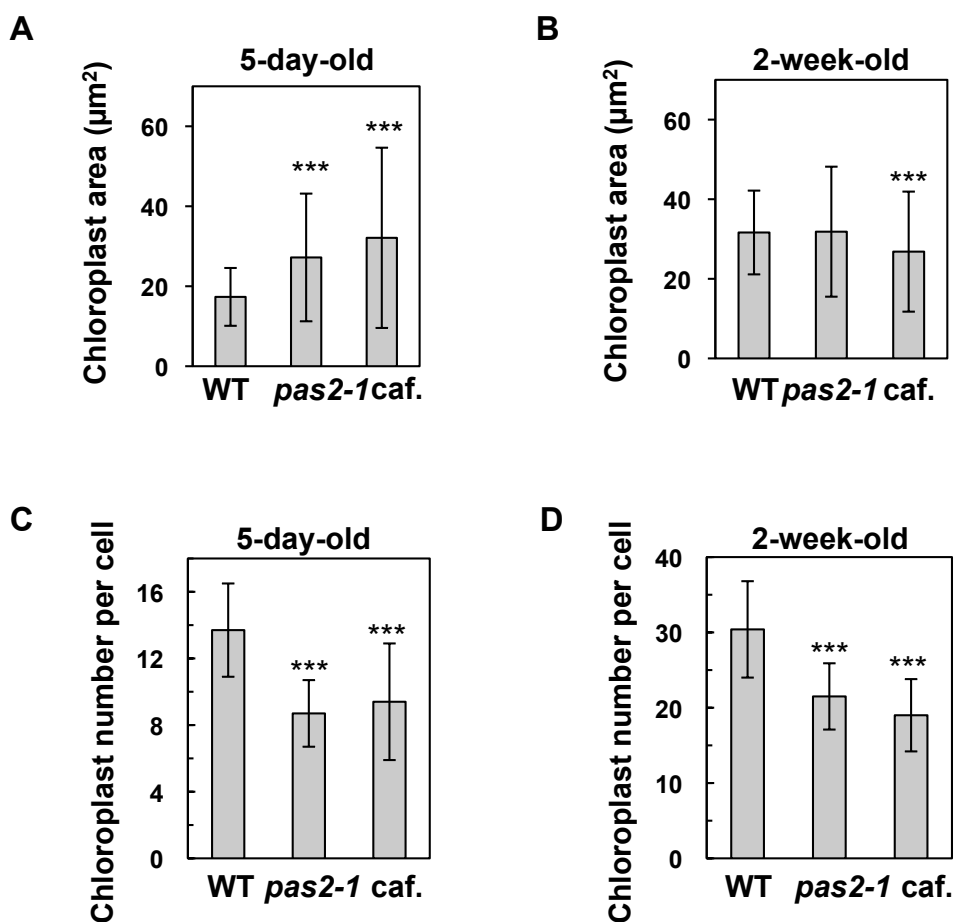


Figure 1-7. 極長鎖脂肪酸の減少は葉緑体数の低下を引き起こす

葉緑体1個あたりの面積 (A, B), ならびに葉肉細胞1個あたりに含まれる葉緑体数 (C, D) を示す。発芽後5日目 (A, C) ならびに2週間 (B, D) の野生型 (WT), *pas2-1*変異体, ならびに3 μM カフェンストロール処理を行った野生型 (*caf.*) において, 本葉第1葉における葉肉細胞を単離し, 撮影した顕微鏡画像を解析した。値は平均 \pm S.D.($n \geq 178$ [A, B], $n = 50$ [C, D])で示す。

*pas2-1*変異体もしくは*cafenstrole*を処理した植物体の, WTに対する有意差を Student's t-test により算出した。***は $P < 0.001$ を示す。

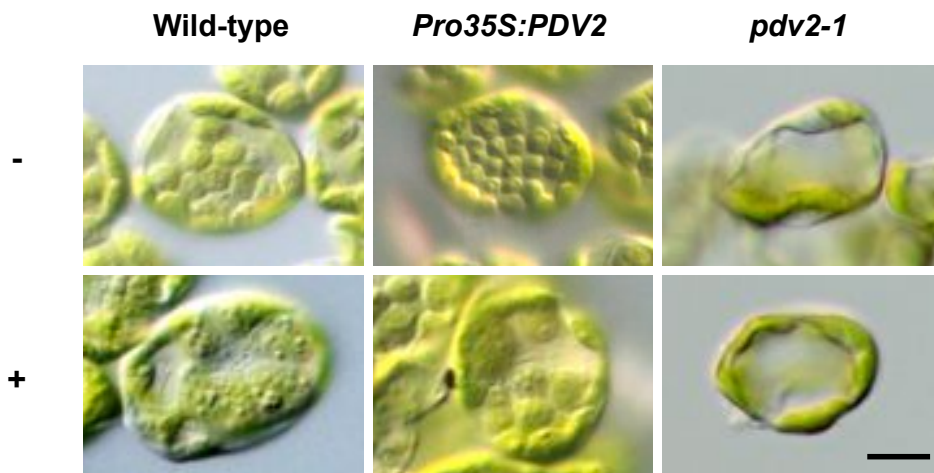


Figure 1-8. *PDV2*過剰発現体および*pdv2-1*変異体におけるカフェンストロールの効果

3 μ Mのカフェンストロールを含む培地 (+) もしくは含まない培地 (-) で育った野生型 (Wild-type), *PDV2*過剰発現体 (*Pro35S:PDV2*), ならびに*pdv2-1*変異体において, 発芽後5日目の本葉第1葉から単離した葉肉細胞を示す。Bar, 10 μ m

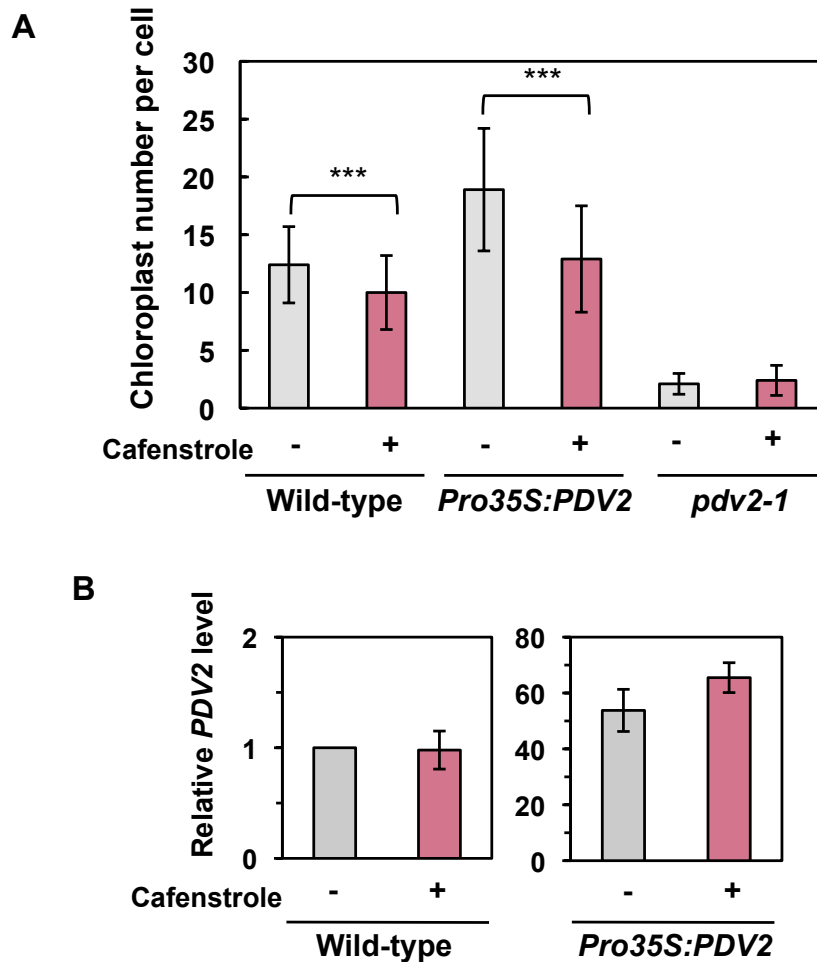


Figure 1-9. PDV2を介した葉緑体分裂制御にカフェンストロールが与える影響

(A) 葉緑体数。3 μ M カフェンストロールを含む培地 (+) , もしくは 含まない培地 (-) で育てた発芽後5日目の植物体の、本葉第1葉の葉肉細胞中の葉緑体数を観察し、得られた顕微鏡画像をもとに定量化した。値は平均 \pm S.D. (n = 50)。有意差は(-)と(+)間において、Student's t-testによって算出した。***は P < 0.001を示し、その他の値はP > 0.05であった。

(B) PDV2の発現量の比較を示す。3 μ Mのカフェンストロールを含む培地 (+) , もしくは含まない培地(-)において育てた発芽後5日目の野生型植物体全体から抽出したRNAを用いた。値はTUBULIN4の発現量で標準化し、w/oの値を1としたときの相対値を示す。値は平均 \pm S.D. (n=3) で示す。

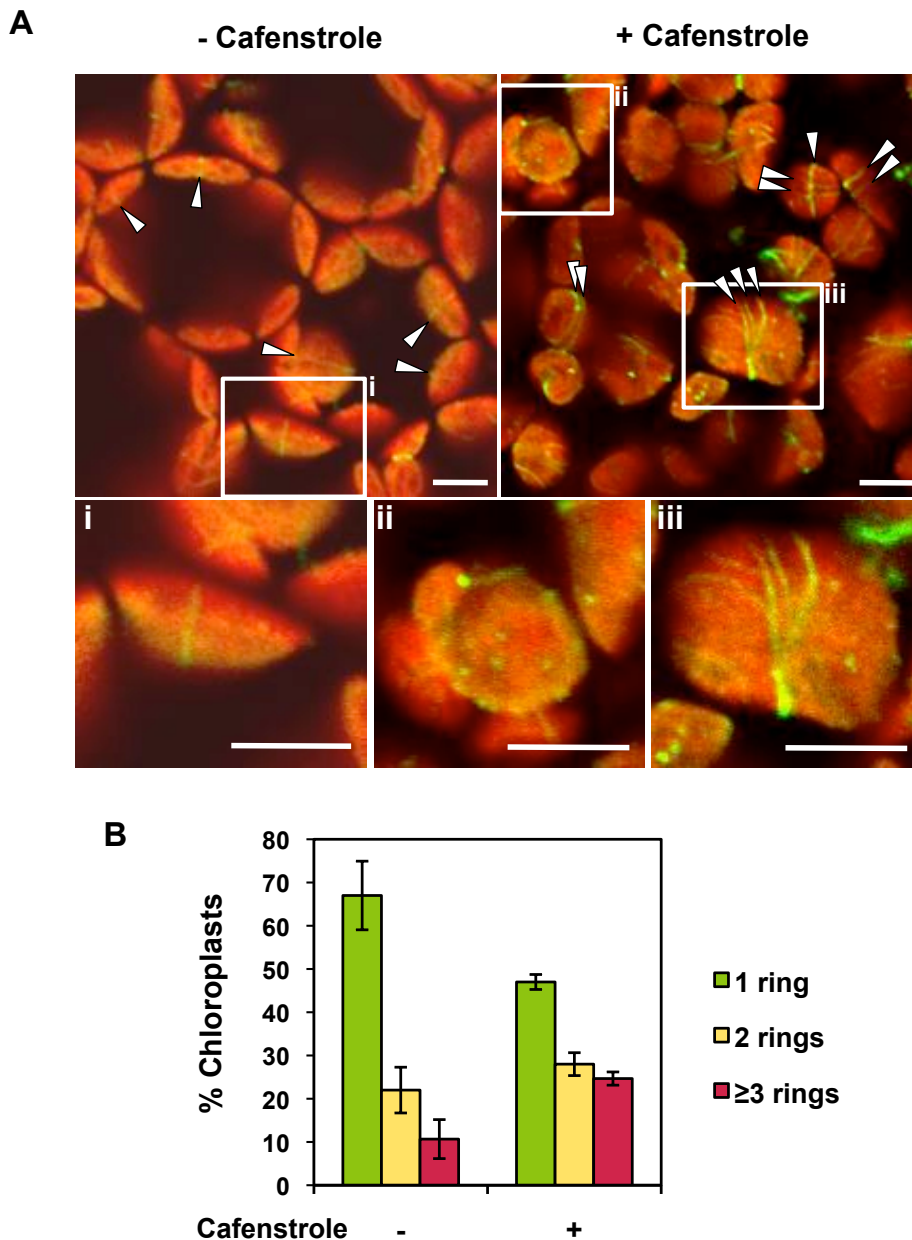


Figure 1-10. 極長鎖脂肪酸含量の低下はZリング形成の異常を引き起こす

(A) 葉緑体におけるFtsZ2-GFPの局在を示す。*ProFtsZ2:FtsZ2-GFP* 植物体を3 μ Mのカフェンストロールを含む培地 (+ Cafenstrole) もしくは含まない培地 (- Cafenstrole) で育て、本葉第1葉の葉肉細胞を観察した。疑似色の赤で葉緑体の自家蛍光を示す。また、いくつかのZリングを矢尻で示している。パネル下段の i–iiiは、それぞれ上段の四角で囲んだ領域の拡大図を示す。Bars, 5 μ m

(B) 3 μ Mのカフェンストロールを含む培地 (+) もしくは含まない培地 (-) で育った *ProFtsZ2:FtsZ2-GFP* 植物体において、Zリングを1つ、2つ、もしくはそれ以上もつ葉緑体の割合 (%) を示す。値は平均 \pm S.D. (n=3)で、それぞれのnにつき90個以上の葉緑体を観察した結果を示す。

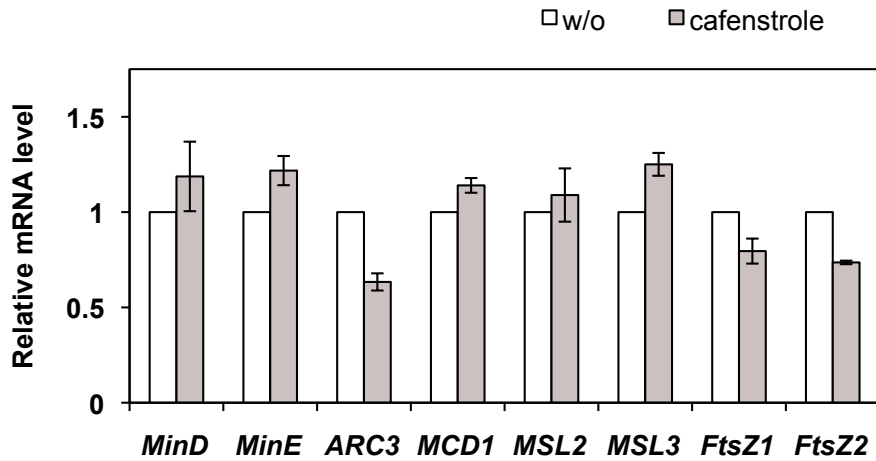


Figure 1-11. 色素体分裂の初期を制御する遺伝子の発現にカフェンストロール処理が与える影響

定量RT-PCRを用いた色素体分裂の初期を制御する遺伝子の発現量の比較。3 μ Mのカフェンストロールを含む培地（灰色），もしくは含まない培地(白)において育てた発芽後5日目の野生型植物体全体から抽出したRNAを用いた。値は*TUBULIN4*の発現量で標準化し，w/oの値を1としたときの相対値を示している。値は平均 \pm S.D. (n=3)で示した。

第二章

細胞増殖における極長鎖脂肪酸の役割

2.1. 序論

本研究では、器官形成ならびに器官成長を支える細胞増殖の制御機構を解明するために、細胞増殖が組織レベルで異常に活発になるシロイヌナズナの変異体、*pasticcino2* (*pas2*) 変異体に着目してきた。*pas* 変異体群 (*pas1*, *pas2*, *pas3* 変異体) は、外来のサイトカイニン (ベンジルアデニン) に対して高感受性を示し、細胞増殖の活性化ならびにカルス様構造物を生じる変異体として単離されてきた (Faure et al. 1998)。*pas* 変異体群は互いによく似た表現型を示し、地上部器官の融合や葉の形成不全など種々の形態形成の異常を示すが、特に地上部における細胞増殖の亢進をはじめ、髄状部 (RZ; Fig. 0-1) の拡大、細胞層の増加に伴う胚軸の肥大、サイトカイニン応答遺伝子の発現上昇と主要なオーキシン応答遺伝子の発現低下、*KNOX* 遺伝子群の発現上昇が主な表現型として報告されている (Faure et al. 1998; Vittorioso et al. 1998; Bellec et al. 2002; Haberer et al. 2002; Harrar et al. 2003)。以上の知見から、*PAS* 遺伝子群は細胞増殖を抑制的に制御する可能性が示唆されてきた。

続いて、*PAS2* が、細胞周期進行において中心的な役割を担う A 型サイクリン依存性キナーゼ (CDKA;1) の負の制御因子である可能性が示唆された (Da Costa et al. 2006)。CDKA;1 は、スレオニンおよびチロシン残基 (T14 および Y15) がリン酸化されることによって、キナーゼ活性が可逆的に抑制される。*PAS2* は、T14 および Y15 がリン酸化された CDKA;1 に結合し、これらの残基が脱リン酸化されないように保護することで、細胞周期の進行を抑制していると考えられた (Da Costa et al. 2006)。しかし、T14 および Y15 に変異をいれた CDKA;1 植物体 (すなわち、*PAS2* が結合できない状態) は、*pas2* 変異体と掛け合わせたときに加算的な表現型を示したことから、*PAS2* は CDKA;1 活性の制御とは独立した経路で細胞増殖を制御している可能性が示唆された (Dissmeyer et al. 2009)。

近年、シロイヌナズナの *PAS2* タンパク質は小胞体に局在し、HCD (Fig. 0-2) として機能することが明らかとなった (Bach et al. 2008)。*PAS2* の完全な欠損は致死を示すが、*PAS2* の機能を部分的に欠損した *pas2-1* 変異体では VLCFA 含量が減少していたとともに、VLCFA 伸長合成反応における HCD の基質分子 (3-hydroxyacyl-CoA; Fig. 0-2) が蓄積していることが示された (Bach et al. 2008)。

興味深いことに、*PAS2* 共通の経緯で同定された *PAS1* および *PAS3* 遺伝子もまた、VLCFA の伸長合成に欠かせない酵素をコードしていることが明らかになっている。*PAS3* は VLCFA 合成において欠かせないマロニル CoA の合成を行う、

アセチル CoA カルボキシラーゼ (acetyl-CoA carboxylase, ACCase ; Fig. 0-2) をコードし (Baud et al. 2004), *PAS1* は VLCFA 合成酵素の足場タンパク質をコードすることが示されている (Roudier et al. 2010)。地上部における葉の形態異常や器官の合着など, *pas* 変異体でみられる表現型の一部については, VLCFA がクチクラの合成に使われることから説明できる。しかし, 細胞増殖の制御に VLCFA がどのように関わるかについては, 全く明らかにされていなかった。

細胞増殖や器官成長活性を制御する重要な植物ホルモンとして, サイトカイニンが挙げられる。SAM における幹細胞維持機構において, サイトカイニンシグナルは *WUS* ならびに *CLV* の発現を誘導することが示されている (Gordon et al. 2009)。また, サイトカイニンは *KNOX* の発現を誘導することも示されており (Rupp et al. 1999), 外来サイトカイニンの投与は, 主要な *KNOX* 遺伝子の一つ, *STM* を欠損した変異体の表現型を抑圧できることに加え (Long et al. 1996), *STM* の異所的な発現はサイトカイニン合成を誘導することが示されている (Yanai et al. 2005)。さらに, 内生サイトカイニン量の減少は, シロイヌナズナにおいて SAM および器官の縮小を引き起こし (Werner et al. 2003), 反対に, 内生サイトカイニン量の増加は SAM や器官の拡大を引き起こすことが示されている (Bartrina et al. 2011)。

植物体で生合成される主要なサイトカイニンは, イソペンテニルアデニン (*N*⁶-isopentenyladenine, iP) ならびにトランスゼアチン (*trans*-Zeatin, tZ) である。iP ならびに tZ の生合成は, イソペンテニルトランスフェラーゼ (adenosine phosphate-isopentenyltransferase, IPT) による触媒により, アデニンヌクレオチド (ATP, ADP, AMP) およびジメチルアリル二リン酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) から, イソペンテニルアデニンヌクレオチド (iPRTP, iPRDP, iPRMP ; 総称して iPRPs とする) を合成することから始まる (Kakimoto 2001 ; Fig. 2-1)。IPT はサイトカイニン合成における主要な酵素であると考えられ, 主要な *IPT* 遺伝子を欠損した *ipt3;5;7* 三重変異体では, iP および tZ の含量が著しく低下するとともに, 器官成長が阻害されることが報告されている (Miyawaki et al. 2006)。iPRPs は, iP の合成に使われる他, CYP735A の触媒によって側鎖が水酸化され, トランスゼアチンヌクレオチド (tZRTP, tZRDP, tZRMP ; 総称して tZRPs とする) となる (Takei et al 2004)。これら iPRPs および tZRPs は, リン酸基とリボースが外されることによって, 活性型の iP および tZ となる。サイトカイニンシグナル伝達系には様々な環境要因が影響を与え, 植物の発生ならびに成長を制御していることが知られている (Werner & Schmülling 2009)。しかし, サイトカイニン生合成そのものを制御するような因子についての知見は

乏しく、硝酸イオンやオーキシシン (Miyawaki et al. 2004; Takei et al. 2004), *KNOX* 遺伝子 (Yanai et al. 2005; Sakamoto et al. 2006) によって誘導される例に限られている。

本章では、まず、表皮で合成された VLCFA が植物の発生に必須であることを示す。加えて、表皮で合成された VLCFA が、維管束におけるサイトカイニン合成の抑圧を介して植物体全体の細胞増殖を抑制し、器官成長を調節していることを示す。本研究の結果から、表皮から細胞非自律的なシグナルが維管束へと送られ、植物体全体の細胞増殖活性ならびに器官成長を調節する仕組みが存在することが強く示唆された。

2.2. 材料と方法

2.2.1 植物と生育条件

本研究では、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を植物材料として用いた。本章での野生型は Columbia (Col-0)としたが、一部変異体は *Ler* (*Landsberg erecta*)をバックグラウンドとしており、その場合は特筆する。尚、本研究で形質転換に用いた野生型はすべて Col-0 である。

本研究で用いた変異体および形質転換体は次の通りである。

pas1-3 (Smyczynski et al. 2006)

pas2-1 (Faure et al. 1998)

pas3-1 (Baud et al. 2004)

mod1 (Mou et al. 2000)

cer4-1 (Rowland et al. 2006; NASC stock: N34; *Ler* background)

mah1-3 (Greer et al. 2003)

wax2 (SALK_020265)

fdh-13 (Tanaka et al. 2004; *Ler* background)

ipt3;5;7 (Miyawaki et al. 2006)

ProPDF1:GUS (Abe et al. 2001)

ProIPT3:GUS (Miyawaki et al. 2004)

ProARR6:GUS (To et al. 2004; NASC stock: N25262)

ProATHB8:GUS (Ruberti et al. 1991; NASC stock: N296)

ProCDKB2:NT-GUS (Adachi et al. 2006)

ProCYCB1;2:NT-GUS (Culligan et al. 2006)

尚、生育条件は 1.2.2 に同じである。

2.2.2 *pas2-1* 変異の検出

植物体より抽出したゲノム DNA を鋳型として、プライマーセット

Forward: 5'-TCCACTGGTATCAGGGGAG-3'

Reverse: 5'-CTACTGAGAAGGAACCAATGATT-3'

により増幅した PCR 産物を制限酵素 *MvaI* (Fermentas) で処理し、DNA 鎖長に基づいて判別した。

2.2.3 DNA コンストラクトの作成

ProPAS2:GUS

PAS2 のプロモーター領域(開始コドン上流 2 kb)を PCR で増幅し、pBI101.2 バイナリーベクター (Clontech Laboratories)の *SalI-BamHI* サイトに導入することで、*ProPAS2:GUS* コンストラクトを得た。

ProPAS2:PAS2-GUS

上記の *PAS2* プロモーター領域および *PAS2* のゲノム領域を PCR で増幅し、Gateway エントリーベクター pDONR221 (Invitrogen) に BP 反応により導入した。その後、pGWB3 バイナリーベクター (Nakagawa et al. 2007)に LR 反応により導入することで、*GUS ProPAS2:PAS2-GUS* コンストラクトを得た。

ProATML1:PAS2-GUS, ProATML1:PAS2RNAi

ATML1 のプロモーター領域 3.4 kb, ならびに *PAS2* のゲノム領域をそれぞれ PCR で増幅し、pBluescript II KS(-) ベクター (Stratagene)の *EcoRI* サイトおよび *SmaI* サイトにそれぞれ導入した。その後、得られたプラスミドを *BamHI* および *HindIII* で消化して得たフラグメントを pBI101 バイナリーベクター (Clontech) の *HindIII* から *BamHI* サイトの間にライゲーションし、*ProATML1:PAS2-GUS* コンストラクトを得た。

PAS2RNAi コンストラクトは *PAS2* の ORF のうち 6 bp から 641 bp の領域を PCR で増幅し、pHANNIBAL ベクター (Wesley et al. 2001) の *EcoRI* から *KpnI* サイトの間 (sense) および *BamHI* から *HindIII* の間 (antisense) に導入することで、まず *Pro35S:PAS2RNAi* コンストラクトを得た。その後、*Pro35S* を 3.4 kb の *ATML1* プロモーター領域に置き換えることで得た *ProATML1:PAS2RNAi* フラグメントを pART27 バイナリーベクター (Gleave et al. 1992) の *NotI* サイトに

導入した。

ProATML1:CKX1-Venus, ProATHB8:CKX1-Venus, ProATHB8:PAS2-GUS,
ProATHB8:PAS2RNAi

ATML1 のプロモーター領域 3.4 kb および *ATHB8* のプロモーター領域 1.7 kb はそれぞれ PCR で増幅し，Gateway エントリーベクター pDONRP4-P1R (Invitrogen) に BP 反応により導入した。

CKX1-Venus の作成については，まず *Venus* の ORF を PCR で増幅した後，pAN19 (pUC19 ベクター[Invitrogen]) を改変したもの，本学の加藤壮英博士より分与) の *SalI* サイトに導入し，*Venus/pAN19* を得た。次に *CKX1* をコードするゲノム領域を PCR により増幅し，*Venus/pAN19* の *SalI* サイトに導入することで，*CKX1-Venus/pAN19* を作成した。その後，*CKX1-Venus* を PCR で増幅して pDONR221 に BP 反応により導入した。

PAS2-GUS ならびに *PAS2RNAi* は，先に述べた *ProATML1:PAS2-GUS* ならびに *ProATML1:PAS2RNAi* コンストラクトを鋳型として増幅したのち，Gateway エントリーベクター pDONR221 に BP 反応により導入した。

フラグメントを導入した pDONRP4-P1R ならびに pDONR221 を適宜組み合わせ，LR 反応によりバイナリーベクター pGWB501 (Nakagawa et al. 2008) に導入することで，6 種類のコンストラクトを得た。

以上の作成した遺伝子コンストラクトを含むバイナリーベクターは，アグロバクテリウム (Gv2260; ただし，*ProATHB8:PAS2-GUS* および *ProATHB8:PAS2RNAi* は Gv3101) に導入した後，花序浸し法を用いてシロイヌナズナ (Col-0 ecotype, もしくは *pas2-1* 変異体ヘテロ株) に導入した。

尚，本研究のコンストラクションに用いたプライマーは以下の通りである。また，すべてのコンストラクトの作成に際し，PCR エラーによる塩基置換等がないことを適切なプライマーを用いた DNA シークエンシングによって確認した。

DNA fragment (Construct)	Forward primer (5'–3')
	Reverse primer (5'–3')
<i>PAS2</i> promoter (<i>ProPAS2:GUS</i>)	AGTCGACCGGAATATCCACTGTTAGCTTTAGACG AGGATCCATGGAAAGTGAATACGCGAGAACGAC
<i>ProPAS2:PAS2</i> (<i>ProPAS2:PAS2–GUS</i>)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCGG AATATCCACTGTTAGCTTTAGACGTTCC GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTCC CTCTTGGATTTGGAGAGAGCTCTC
<i>ATML1</i> promoter (<i>ProATML1:PAS2</i> and <i>ProATML1:PAS2RNAi</i>)	AGAATTCATTGATTCTGAACTGTACCC TGAATTCAACCGGTGGATTCAGGG
<i>PAS2</i> CDS (<i>ProATML1:PAS2–GUS</i>)	ATGGCGGGCTTTCTCTCCGTT TTCCCTCTTGGATTTGGAGAGAGCTC
<i>PAS2</i> ORF No. 6-641 sense (<i>PAS2RNAi</i>)	AGAATTCGGGCTTTCTCTCCGTTGTCC AGGTACCGCTCTCTTTCGCTGACCAAGC
<i>PAS2</i> ORF No. 6-641 antisense (<i>PAS2RNAi</i>)	AGGATCCGGGCTTTCTCTCCGTTGTCC AAAGCTTGCTCTCTTTCGCTGACCAAGC
<i>Venus</i> ORF (<i>CKX1–Venus</i>)	AAAGTCGACATGGTGAGCAAGGGCG ACTCGAGTACTTGTACAGCTCGTCCATG
<i>CKX1</i> CDS (<i>CKX1–Venus</i>)	AGTCGACATGGGATTGACCTCATCCTTAC AGTCGACTACAGTTCTAGGTTTCGGCAGTAT
<i>CKX1–Venus</i> (<i>ProATML1:CKX1–Venus</i> and <i>ProATHB8:CKX1–Venus</i>)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCATG GGATTGACCTCATCCTTAC GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAC TTGTACAGCTCGTCCATG
<i>ATML1</i> promoter (<i>ProATML1:CKX1–Venus</i> , <i>ProATML1:PAS2–GUS</i> and <i>ProATML1:PAS2RNAi</i>)	GGGGACAAGTTTGTATAGAAAAGTTGATTGATTC TGAAGTGTACCC GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGAACCGGTG GATTCAGGGAG
<i>ATHB8</i> promoter (<i>ProATHB8:CKX1–Venus</i> , <i>ProATHB8:PAS2–GUS</i> and <i>ProATHB8:PAS2RNAi</i>)	GGGGACAAGTTTGTATAGAAAAGTTGCGGATAAAA CCAATTTTCAAATGATA GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGCTTTGATCC TCTCCGATCTCTCTAT
<i>PAS2–GUS</i> (<i>ProATML1:PAS2–GUS</i> and <i>ProATHB8:PAS2–GUS</i>)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCATG GCGGGCTTTCTCTCCGT GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAT TGTTTGCCTCCCTGCTGC

<i>PAS2RNAi</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGG
<i>(ProATML1:PAS2RNAi and</i>	GCTTTCTCTCCGTTGTCC
<i>ProATHB8:PAS2RNAi)</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCTC
	TCTTTCGCTGACCAAGC

2.2.4 組織学的観察

GUS 染色は、植物体を -30°C の 90% (v/v) のアセトンで 20 分固定した後、リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄し、5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide および 0.5 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indoryl-[beta]-D-glucuronide を含むリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中において、37°C で 2-24 時間、反応させることで行った。実体顕微鏡レベルでの観察は、染色後の植物体を酢酸エタノール (酢酸 1:エタノール 9) で固定・脱クロロフィルさせた後、透明化液 (8 g 抱水クロラール: 1 mL H₂O: 2 mL グリセリン) で処理して観察した。

組織切片の作成方法は、1.2.4 に同じである。組織切片の通常の染色には、0.05% (w/v) toluidine blue O を用いた。また、GUS 染色サンプルの対比染色には、0.05% (w/v) ruthenium red を用いた。

2.2.5 定量 RT-PCR

基本手法は 1.2.7 に同じである。

用いたプライマーセットは次の通りである。

PAS2 Forward: 5'- CGCCGTTCTCGAGATTCTT-3'
Reverse: 5'- CAAGTGAGAAATAGCCTTGAACC -3'

IPT3 Forward: 5'- CGGGTTCGTGTCTGAGAGAG -3'
Reverse: 5'- CTGACTTCCTCAACCATTCCA -3'

TUB4 Forward: 5'- AGAGGTTGACGAGCAGATGA -3'
Reverse: 5'- CCTCTTCTTCCTCCTCGTAC -3'

2.2.6 *In situ* RNA hybridization

シロイヌナズナの茎頂を FAA (50% [v/v] ethanol, 5% [v/v] acetic acid, and 3.7% [v/v] formaldehyde) 溶液中で固定し、エタノールシリーズで脱水を行った。エタノールをレモゾールに置換した後、さらにパラフィンへと置換した。パラフィンを固化後、約 8 μm の切片を作成し、スライドガラスに焼き付けた後、脱パラフィン処理を行った。その後、DIG-application manual (Roche) に従い、digoxigenin でラベルした *PAS2* アンチセンスプローブをハイブリダイズさせ、シグナルを検出した。*PAS2* のプローブは、*PAS2* の ORF 666 bp のうち、6 bp から 506 bp までの領域を対象となるように設計した。

2.2.7 葉身面積，細胞面積，ならびに細胞数の算出

サンプリングした本葉第 1 葉を 2.5% グルタルアルデヒドを用いて 4°C で固定し、透明化液 (8 g 抱水クロラル: 1 mL H₂O: 2 mL グリセリン) で透明化した。細胞面積ならびに数の算出は De Veylder et al. 2011 に従い、葉身の背軸側において、先端と基部の中央部かつ葉の中心と縁との中間部分における表皮細胞を顕微鏡により観察・画像化することで行った。その後、少なくとも 1 個体あたり 40 個以上の細胞面積を NIH ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) を用いて定量した。葉身の面積も同様に、撮影した顕微鏡画像をもとに解析した。葉の細胞数は、葉身の面積を細胞ひとつあたりの面積で割ることで算出した。

2.2.8 透過型電子顕微鏡観察

植物サンプルは 2.5% グルタルアルデヒド (リン酸緩衝液, pH 7.0) を用いて 4°C で一晩固定した後、さらに 1% osmium tetroxide (リン酸緩衝液, pH 7.0) を用いて 4°C で 1 時間固定した。固定したサンプルは、エタノールシリーズで脱水した後、Spurr resin を用いて 73°C で重合、包埋した。ダイヤモンドナイフを用いて作成した超薄層切片をウラニル酢酸およびクエン酸鉛で染色した後、JEOL 1200EX を用いて観察した。本実験操作は日本女子大学の設備において行われた。

2.2.9 ホルモン定量解析

新鮮重量およそ 100 mg の植物体全体を用い、Kojima et al. (2009)の記述に従って抽出し、ホルモンの定量解析をおこなった。データは MassLynx software および QuanLynx (version 4.0, Waters)を用いて処理した。本解析は、理化学研究所(横浜)の設備において行われた。

2.2.10 GeneChip 解析

トータル RNA は、発芽後 3 日の植物体全体から TRIzol (Invitrogen)により抽出した後、RNeasy microkit (QIAGEN)で精製した。GeneChip 解析は、GeneChip Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix)に従い、Arabidopsis ATH1 Genome Array (Affymetrix) を用いて独立して 2 回行った。プローブ合成は GeneChip 3' IVT Express kit (Affymetrix) を用いて通常のプロトコルにより行った。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は GeneChip Expression Analysis Technical Manual に従った。シグナルの検出および標準化は、GeneChip Operating Software (Affymetrix; version 1.4)を用いて標準の設定値において行った。本解析は、東京大学の設備において行われた。

2.2.11 共焦点顕微鏡観察

植物体を固化直前の 7%アガロース(/MS 培地)を用いて包埋した後、カミソリを用いて目視で組織切片を作成した。その後、共焦点顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss)を用いて Venus 蛍光および植物体の自家蛍光を観察した。

2.3. 結果

2.3.1. 極長鎖脂肪酸合成の欠損は細胞増殖の活性化を引き起こす

pas2-1 変異体は種々の形態的異常を示すことが報告されており、例えば、地上器官の融合や (Faure et al. 1998; Bellec et al. 2002; Harrar et al. 2003; Fig. 2-2A), 細胞層が増加することで胚軸が肥大すること (Faure et al. 1998; Fig. 2-2B, C) などが挙げられる。加えて、異常な細胞増殖の結果として、カルス様の構造物が生じることも報告されている (Faure et al. 1998; Bellec et al. 2002; Haberer et al. 2002; Harrar et al. 2003; Fig. 2-2D)。SAM における組織切片を作成したところ、*pas2* 変異体では、髄状部 (RZ, rib zone) において細胞が蓄積していることが確かめられた (Faure et al. 1998; Fig. 2-2E)。RZ は SAM の基部側に位置する領域であり (Fig. 0-1), *pas2* 変異体で観察される胚軸の肥大は、RZ における細胞数の増加に起因するものと考えられる。

VLCFA 合成において欠かせないマロニル CoA の合成を行う、アセチル CoA カルボキシラーゼ (acetyl-CoA carboxylase, ACCase; Fig. 0-2) をコードする *PAS3* を欠損した変異体、ならびに、VLCFA 合成酵素の足場タンパク質をコードする *PAS1* を欠損した変異体はいずれも VLCFA 含量の低下を引き起こし、*pas2* 変異体と類似の表現型を示すことが報告されている (Faure et al. 1998; Baud et al. 2004; Roudier et al. 2010)。したがって、VLCFA 含量の低下は細胞増殖の活性化を引き起こすと考えられる。

2.3.2. *PAS2* の表皮特異的な発現が正常な生育に必須である

PAS2 の組織レベルでの発現様式を知るために、*PAS2* のプロモーター領域およそ 2 kb の下流で *GUS* を発現させるコンストラクト (*ProPAS2:GUS*) を導入した形質転換植物体を作成して発現様式を観察した。その結果、*GUS* シグナルは成熟胚、子葉、本葉、花茎、花芽など、発生を通して様々な部位から検出された (Fig. 2-3)。組織切片を作製して発現を詳細に検討したところ、*GUS* シグナルは主に表皮細胞層および L1 層から強く検出された (Fig. 2-4A–2-4C)。特に、古い葉に比べて、SAM ならびに若い葉におけるシグナルが強く検出された (Fig. 2-4B)。野生型植物体において、*PAS2* のアンチセンスプローブを用いた *in situ* RNA ハイブリダイゼーションを行ったところ、やはり SAM の L1 層において、

強いシグナルが検出された (Fig. 2-4D)。次いで、タンパク質レベルでの発現様式を調べるために、上記と同じ PAS2 プロモーターの下流で、C 末端に GUS を融合させた PAS2 タンパク質を発現させるコンストラクト (*ProPAS2:PAS2-GUS*) を導入した形質転換植物体を作成した。尚、この PAS2-GUS 融合タンパク質は機能的である (後述)。その結果、GUS の発現はやはり L1 層から強く検出されるとともに、弱くではあるが、維管束においても発現が検出された (Fig. 2-4E)。

そこで、PAS2 の表皮における発現が植物の正常な発生に必要であるかを検討した。表皮特異的な遺伝子の発現を誘導するために *ATML1* のプロモーター (Sessions et al. 1999) を用い、PAS2 発現をサイレンシングさせるコンストラクト (*ProATML1:PAS2RNAi*) を野生型植物体に導入しての検討を行った。その結果、*pas2* 様の表現型が観察される 8 系統を得た。観察される表現型の重篤さには広いばらつきがあったものの、*pas2-1* 変異体に特徴的な表現型である、肥大した胚軸や器官の合着、重篤な生育障害が引き起こされることがわかった (Fig. 2-5A)。リアルタイム PCR の結果から、*pas2* 様の重篤な表現型を示した個体での PAS2 発現は 7 割程度抑圧されていることが確かめられた (Fig. 2-5B)。加えて、*ProATML1:PAS2RNAi* の中には一見すると表現型のないものもみられた。しかし、茎頂付近の組織切片を作製しての観察を加えたところ、いくつかの植物体において、特に RZ における細胞増殖の活性化が観察された (Fig. 2-5C)。これらの結果から、表皮における PAS2 の発現が、正常な生育に必要であることがわかった。

次に、*ATML1* プロモーターの下流で前述の *PAS2-GUS* 融合タンパク質を発現させるコンストラクト (*ProATML1:PAS2-GUS*) を *pas2-1* 変異体に導入して表現型を観察した。その結果、6 ライン中 5 ラインにおいて、*pas2-1* 変異体の表現型が完全に相補された (Fig. 2-6A)。このときの GUS シグナルは、維管束からも弱く検出されたものの、表皮において強く検出された (Fig. 2-6B)。したがって、表皮における PAS2 の発現が正常な生育に必要である可能性が示唆された。しかし、*ProPAS2:PAS2-GUS* は維管束において微弱ながらも発現していた。そこで、維管束特異的な発現を誘導する *ATHB8* のプロモーター (Baima et al. 1995) を用いて維管束における PAS2 の機能を検討した。まず、*ATHB8* のプロモーターの下流で PAS2 のサイレンシングを誘導するコンストラクト (*ProATHB8:PAS2RNAi*) を野生型植物体に導入して、得られた T1 世代植物の表現型を調べた。その結果、*ProATHB8:PAS2-RNAi* コンストラクトを持つ T1 個体 83 個体のすべてが野生型の表現型を示し、*pas2-1* 変異体様の表現型をもつ個体は現れなかった。したがって、維管束における微弱な PAS2 発現を喪失しても、植物の生育には影響しないことがわかった。次に、*ATHB8* のプロモーター

を用いて *PAS2-GUS* 融合タンパク質を発現させるコンストラクト (*ProATHB8:PAS2-GUS*) を *pas2-1* 変異体のヘテロ植物体に導入して、T1 世代の植物の表現型観察を行った。*pas2-1* 変異は劣性であり、*pas2-1* ヘテロ変異体の種子からは約 25 パーセントの割合で *pas2-1* ホモ変異体を得られる。維管束特異的に *PAS2-GUS* を発現する T1 植物 83 個体を得たが、そのうち約 1/4 に相当する 19 ラインが *pas2-1* 変異体の表現型を示した。したがって、維管束における *PAS2* の発現は、*PAS2* の機能発揮には関連しないことがわかった。以上の結果から、表皮特異的な *PAS2* の発現が、植物の正常な生育の必要十分条件であることが明らかとなった。

2.3.3. 極長鎖脂肪酸の軽度の合成阻害は細胞増殖の活性化とシュートの成長を促進させる

pas2-1 変異体では、クチクラワックスの含量が強く減少している (Bach et al. 2008)。クチクラ合成にのみ異常をもつ変異体においても、地上部器官の融合をはじめとした重篤な表現型が引き起こされることがわかっている (Bird et al. 2007, etc)。したがって、VLCFA の減少によって引き起こされる細胞増殖の活性化と、VLCFA の減少に伴うクチクラワックスの損傷による表現型とを切り離して考える必要がある。そこで、野生型植物体において、VLCFA 生合成の阻害剤であるカフェンストロール (前章記載) を用いた表現型観察を行った。その結果、3 μM のカフェンストロールを含む培地で育った植物体では、*pas2-1* 変異体と同様に、著しい生育阻害とともに、肥大した胚軸ならびに、葉の合着が観察された (Figs. 2-7A,B)。一方、30 nM のカフェンストロールを含む培地で植物体を育てた場合には、生育阻害はまったく引き起こされず、むしろ胚軸の肥大に加えて、葉面積の拡大が観察された (Figs. 2-7A)。そこで、本葉第 1 葉において、葉身の面積、表皮細胞の面積、ならびに表皮細胞の数を経時的に測定した (Figs. 2-8)。カフェンストロール処理を行った植物体の葉身の面積は、薬剤無処理の植物体のものに比べて、発芽後 4 日以降において有意に拡大していった。カフェンストロール処理・無処理に関わらず、いずれの場合も、発芽後 10 日以降は葉面積の拡大がほとんどみられなくなり、発芽後 12 日の植物体の本葉第 1 葉は、30 nM のカフェンストロール処理によって 1.7 倍に拡大していた (薬剤無処理: $14.4 \pm 2.5 \text{ mm}^2$, 30 nM 処理: $24.0 \pm 5.0 \text{ mm}^2$, 平均値 \pm s.d., $n \geq 11$)。このときの葉の表皮細胞の面積には有意差が認められなかった (薬剤無処理: $830 \pm 55 \mu\text{m}^2$, 30 nM 処理: $852 \pm 158 \mu\text{m}^2$)。これらの結果をもとに

葉身の細胞数を算出したところ、30 nM カフェンストロール処理を行った植物体では無処理と比べて 1.7 倍に増加していることがわかった (無処理: 17,265 ± 2,467 個, 30 nM 処理 9,297 ± 6,765 個)。発芽後 4 日から 7 日の間における細胞数の増加が顕著であったことから、この期間における細胞周期が 1 周する時間 (cell cycle duration) を計算したところ、無処理では 23.6 時間であったのに対して、30 nM のカフェンストロール処理では、19.0 時間となった。したがって、VLCFA 含量の減少は、特に若い葉における細胞増殖を活性化させると考えられる。

続いて、カフェンストロール処理を行った植物体において、組織切片を作製して茎頂付近の細胞構造を詳細に観察した。その結果、*pas2-1* 変異体で観察されたように、RZ において多数の細胞が蓄積していることがわかった (Fig. 2-9)。細胞増殖の活性を観察するために、細胞周期の G2/M 期のレポーター遺伝子、*ProCDKB2;1:NT-GUS* を発現する植物体を用いた検討を加えた。このレポーターは、*CDKB2;1* のプロモーターの下流で、*CDKB2;1* の第 1 エキソン (NT) に *GUS* を融合させたコンストラクトであり、細胞周期の G2 期から M 期にある細胞において *GUS* シグナルを呈するものである (Adachi et al. 2006)。その結果、特に RZ ならびに維管束において、*GUS* シグナルを持つ細胞の数がカフェンストロールの濃度に応じて増加した (Fig. 2-9)。これらの結果から、VLCFA の減少は特に RZ における細胞増殖を活性化させ、肥大した胚軸を生じさせると考えられる。その一方で、*pas2-1* 変異体や 3 μM のカフェンストロール処理による強い VLCFA 合成の阻害は、クチクラ形成の欠損 (次節に記載する) などによって全体の生育が大きく阻害されると考えられる。

2.3.4 極長鎖脂肪酸の低下はクチクラ形成とは独立した経路で細胞増殖を活性化化する

VLCFA はクチクラワックスの原料としても利用されることが知られている。クチクラ形成の状態を観察するために、透過型電子顕微鏡を用いて表皮細胞を観察した (Fig. 2-10)。クチクラ層は、透過型電子顕微鏡画像上で高電子密度をもつ層として黒い線で観察される (Fig. 2-10, 矢印)。一方、*pas2-1* 変異体においては、クチクラを示す黒い線が全く検出されなくなった。同様に、3 μM のカフェンストロール処理を行った植物体においては、薄く断続的な黒い線が検出されるのみであった。しかし、30 nM のカフェンストロールを処理した植物体

においては、クチクラを示す黒い線は野生型と同じように観察されたことから (Fig. 2-10), クチクラ形成は強く損傷していないと考えられる。したがって、30 nM のカフェンストロール存在下で生育させた植物で観察される細胞増殖の活性化は、クチクラが欠損したことによる影響ではないと考えられた。

pas2-1 変異体では重篤な表皮形成の異常が観察されていることから、表皮細胞層が表皮としての性質を喪失している可能性が考えられた。そこで、*pas2-1* 変異体において、L1 層特異的に発現する表皮のレポーター遺伝子、*ProPDF1:GUS* (Abe et al. 2001) の発現を観察した。その結果、*pas2-1* 変異体においても、*PDF1* の発現は野生型と同様、表皮特異的な発現様式を明確に保っていた。すなわち、L1 層および表皮のアイデンティティは完全に保たれていることが明らかとなった (Fig. 2-11)。したがって、VLCFA の欠損は、表皮の形成および維持には影響しないと考えられる。

2.3.5. 極長鎖脂肪酸合成はサイトカイニン合成を抑圧している

細胞増殖の活性化が観察されたことから、植物ホルモンの定量解析を行った。その結果、活性型サイトカイニンである iP および tZ, ならびにそれらの前駆体 (iPR, iPRPs, tZR, tZRPs) の含量が、*pas2-1* 変異体ならびに 30 nM もしくは 3 μ M のカフェンストロールを処理した野生型植物体において増加していることが明らかとなった (Table 1)。この結果から、VLCFA の減少によってサイトカイニン合成が活発になる可能性が示唆された。実際、サイトカイニン応答のマーカである *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 6 (ARR6)* (To et al. 2004) の発現が維管束および RZ において強く誘導されていることがわかった (Figs. 2-12A,B)。この領域は、VLCFA が低下した場合に細胞増殖が活性化された部位に相当する (Fig. 2-9)。

次に、サイトカイニン内生量が顕著に減少している *ipt3;5;7* 三重変異体 (Miyawaki et al. 2006) を用いてカフェンストロール処理に対する応答を調べた。*ipt3;5;7* 変異体において 30 nM のカフェンストロール処理を行ったところ、野生型において誘導されるような葉面積の増大はみられなくなり、むしろ細胞数と葉の面積がわずかに減少した (Fig. 2-13)。この結果から、カフェンストロール処理による葉面積の拡大は、サイトカイニン合成を介していると考えられる。*pas2-1* 変異体がサイトカイニン処理に対して高感受性を示すという以前の報告があるが (Faure et al. 1998; Harrar et al. 2003), サイトカイニン含量が増加しているということで説明できるかもしれない。

サイトカイニン含量が増加した一方で、インドール酢酸 (IAA)および生理活性型ジベレリン (GA1, GA4) は大きな変動を示さず、IAAが3 μ Mのカフェンストロール処理によって増加したのみであった (Table 1)。したがって、オーキシンやジベレリンではなく、サイトカイニン合成の活性化が、VLCFA減少による細胞増殖の活性化の原因であると考えられる。

サイトカイニン内生量が増加した理由を探るため、野生型ならびに *pas2-1* 変異体において、マイクロアレイを用いてサイトカイニン合成系の遺伝子の発現を調べた。その結果、*pas2-1* 変異体において、*CYP735A2* が6.6倍に増加するとともに、主要なサイトカイニンの合成酵素である *IPT3* の発現量が野生型に比べて3.9倍に増加していた (Table 2)。*IPT3* は、シロイヌナズナでは9遺伝子存在する *IPT* のうちの1つであり、*IPT* はサイトカイニン合成の初期段階 (isopentenyladenine riboside phosphates (iPRPs)の合成反応) を触媒し、サイトカイニン合成の律速段階であると考えられている (Miyawaki et al. 2006; Fig. 2-1)。定量PCRを用いて *IPT3* の発現量をさらに調べたところ、やはり *pas2-1* 変異体において4倍近くに増加していることが確かめられた (Fig. 2-14) 加えて、*ProATML1:PAS2-GUS/pas2-1* 植物体における *IPT3* の発現量は、野生型と同程度に戻っていた (Fig. 2-14)。そこで、*ProIPT3:GUS* 植物体 (Miyawaki et al. 2004) を用いて、*IPT3* の発現を組織レベルで調べることにした。以前の報告通り、*ProIPT3:GUS* は通常、維管束において発現していた (Miyawaki et al. 2004; Fig. 2-15)。一方、カフェンストロール処理を行った植物体ならびに *pas2-1* 変異体上において、GUSシグナル強度の増加ならびに発現領域の拡大が維管束に沿って観察された (Fig. 2-15)。カフェンストロール処理を行った植物体の葉では、*IPT3* の発現は維管束だけでなく、葉肉細胞組織にまで広がっていたのに対して (Fig. 2-15C)、維管束マーカーである *ProATHB8:GUS* (Baima et al. 1995) の発現は維管束にのみ制限されていた (Fig. 2-16)。このことから、*IPT3* の発現領域の増加は、維管束の領域が広がったためではないと考えられた。したがって、VLCFAの減少は、維管束における *IPT3* の発現量の増加に加えて、維管束以外の組織における異所的な *IPT3* の発現を誘導することで、サイトカイニン合成と細胞増殖の活性化を引き起こすと考えられた。

2.3.6. 極長鎖脂肪酸合成による細胞増殖の活性化はサイトカイニン含量の増加によるものである

VLCFA合成の減少により引き起こされる、サイトカイニン合成の活性化な

らびに細胞増殖の活性化の2つの現象について、どちらが原因で結果であるかを詳細に調べた。通常の生育培地で育った発芽後3日目の *ProIPT3:GUS* および *ProCYCB1;2:NT-GUS* (Culligan et al. 2006; *CYCDKB2;1* のプロモーターの下流で、*CYCB1;2* の第1エクソン (NT) に *GUS* を融合させたコンストラクトであり、細胞周期のG2期からM期にある細胞において *GUS* シグナルを呈する) 植物体を 30 nM もしくは 3 μ M のカフェンストロールを含む培地に移して、経時的に発現量の比較を行った。その結果、*ProIPT3:GUS* の発現は、3 μ M のカフェンストロールを含む培地に移してからは6時間後に、30 nM のカフェンストロールを含む培地に移してからは12時間後に、それぞれカフェンストロール無処理のものに比べて強くなった (Fig. 2-17)。一方、*ProCYCB1;2:NT-GUS* の発現は、12時間から24時間後から、カフェンストロールの投与量に依存せずにSAMや若い葉において増加した。したがって、この生育段階において、細胞分裂活性は高まっていると考えられる。その後、48時間後において、カフェンストロール未処理の場合は発現の強さに変化は観られなかったが、30 nM および 3 μ M のカフェンストロール処理によって、発現が強く誘導された (Fig. 2-17; a-c)。次いで、野生型植物体を同様の実験条件でカフェンストロール処理し、サイトカイニンの定量解析を行った。その結果、カフェンストロール処理後6時間の時点においては、iP, iPR, tZ, tZR の含量は増加しなかったのに対して、それらの前駆体である iPRPs および tZRP の含量が増加を示した (Table 3)。その後、12時間の時点においては、iP, iPR, tZ, tZR についてもカフェンストロール処理によって増加する傾向を示し、24時間の時点では、生理活性型の iP および tZ の含量の明らかな増加が認められた。iP, iPR, tZ, tZR よりも早い時点で iPRPs の含量から増加していったことは、IPT3 が iPRPs の生成を行う主要な酵素である点と一致する。以上の結果から、カフェンストロール処理によって先ずサイトカイニン合成が増加し、その後で細胞増殖の活性化が誘導されることが明らかとなった。

2.3.7. サイトカイニン含量の増加は極長鎖脂肪酸の低下によるものでクチクラワックスの減少によるものではない

VLCFA 合成の低下がサイトカイニン含量の増加ならびに細胞増殖の活性化を引き起こすことをより確かにするために、VLCFA および LCFA の合成酵素を損傷した変異体、*pas1-3*, *pas3-1*, *fiddlehead-13* (*fdh-13*) および *mosaic death1* (*mod1*) 変異体を用いた解析を加えた (Fig. 2-18)。*pas1-3* および *pas3-1* 変異体

では、VLCFA 含量が劇的に減少しており、器官成長が強く抑制される (Faure et al. 1998; Baud et al. 2004; Roudier et al. 2010)。サイトカイニン定量の結果、*pas2-1* 変異体で観察されたように、*pas1-3* および *pas3-1* 変異体において、tZ および iP の含量が野生型に比べて増加していることがわかった (Fig. 2-19)。加えて、茎頂における組織切片を作製しての観察を加えたところ、*pas1-3* および *pas3-1* 変異体では、*pas2-1* 変異体と同様に RZ において細胞が蓄積していたことから、細胞増殖が活性化されていることが示された (Fig. 2-20)。FDH/KCS10 は VLCFA 合成に関わる KCS コードしているが (Fig. 2-18)、*fdh-13* 変異体は葉において弱い表現型を示すのみである (Tanaka et al. 2004)。*fdh-13* 変異体におけるサイトカイニン含量は tZ がわずかに増加し、細胞増殖の活性化も観察されたが、*pas* 変異体群において観察されたほどの影響はみられなかった (Figs. 2-19, 20)。同様に、LCFA の伸長合成の 4 段階目を触媒する ENR (Figs. 0-2, 2-18) の酵素活性を半分失った *mod1* 変異体でも (Mou et al. 2000)、tZ および iP の含量が増加するとともに、細胞増殖の活性化が観察された (Figs. 2-19, 20)。*mod1* 変異体において LCFA および VLCFA の定量解析はこれまでに行われていないが、前駆体である LCFA の減少に伴い、VLCFA の含量が減っている可能性が考えられる。これらの結果から、表皮において合成された VLCFA が、サイトカイニン含量の低下ならびに細胞増殖の抑制を行っていると考えられる。

加えて、VLCFA をもとにしたクチクラワックスの生合成が、サイトカイニン合成ならびに細胞増殖に与える影響を調べるために、CER4 (VLCFA からのワックスエステルの合成を行う酵素; Rowland et al. 2004)、WAX2 (VLCFA からのアルデヒド合成を行う酵素; Chen et al. 2003)、MAH1 (ケトンの合成を行う酵素; Greer et al. 2007) をコードする遺伝子をそれぞれ損傷した変異体、*cer4-1*、*wax2*、*mah1-3* について観察した (Fig. 2-18)。しかし、これらのクチクラワックス生合成にかかわる変異体において、サイトカイニン合成の増加ならびに RZ における細胞増殖の活性化は観察されなかった (Figs. 2-19, 20)。一見、*cer4-1* 変異体の RZ は拡大しているように見受けられたが、コントロールである *Ler* においても、*Col-0* と比べて RZ が拡大していたことから、*cer4-1* 変異体の表現型ではないと考えられた (Fig. 2-19)。これらの結果から、VLCFA 減少によって引き起こされるサイトカイニン含量の増加ならびに細胞増殖の活性化は、クチクラワックスとは無関係であることがわかった。

2.3.8. 極長鎖脂肪酸はサイトカイニン合成を維管束に制限する

ここまでの結果より、表皮において合成された VLCFA は、サイトカイニンの合成領域を維管束にのみ限定させるとともに、維管束におけるサイトカイニン合成を抑制させるという仮説が得られた。この仮説を検証するために、生理活性型サイトカイニンの分解酵素である cytokinin oxidase 1 (CKX1; Werner et al. 2003) の C 末端に蛍光タンパク質 Venus を融合したタンパク質を *ATML1* および *ATHB8* のプロモーターを用いて組織特異的に発現させるコンストラクト、*ProATML1:CKX1-Venus* および *ProATHB8:CKX1-Venus* を作成してカフェンストロールに対する応答を調べた。まず、Venus の蛍光が表皮ならびに維管束においてそれぞれ特異的に検出されたことから、*ProATML1:CKX1-Venus* および *ProATHB8:CKX1-Venus* コンストラクトは有効に機能していることが確かめられた (Fig. 2-21)。

次に、これらの形質転換植物体を 30 nM のカフェンストロールを含む培地で育てた。その結果、30 nM のカフェンストロール処理によって野生型植物体で観察される葉面積の拡大が、*ProATML1:CKX1-Venus* では野生型と同様に引き起こされたものの、*ProATHB8:CKX1-Venus* においては引き起こされなくなっていた (Fig. 2-22A)。30 nM のカフェンストロール処理による葉身面積の変化について、独立した形質転換体それぞれ 3 系統において定量比較を行ったが、いずれの系統においても *ProATML1:CKX1-Venus* では面積の拡大が野生型と同程度であったのに対して、*ProATHB8:CKX1-Venus* では、薬剤無処理と同程度の面積を示した (Fig. 2-22B)。そこで、さらに独立した系統において、葉身の面積、表皮細胞の面積、ならびに細胞数の定量解析を行った。その結果、*ProATHB8:CKX1-Venus* では細胞数の増加が認められなかったことから、維管束特異的なサイトカイニンの分解促進は、カフェンストロールで誘導される葉における細胞増殖の活性化を抑圧することが明らかになった (Fig. 2-23)。加えて、野生型、*ProATML1:CKX1-Venus* および *ProATHB8:CKX1-Venus* において、30 nM のカフェンストロール処理による胚軸の太さを定量比較した。その結果、*ProATML1:CKX1-Venus* では野生型と同じく胚軸が肥大化したのに対して、*ProATHB8:CKX1-Venus* では胚軸の肥大化が抑圧されることがわかった (Fig. 2-24)。

茎頂における縦断切片を作成したところ、30 nM のカフェンストロール処理によって、野生型ならびに *ProATML1:CKX1-Venus* では RZ の拡大が認められたのに対して、*ProATHB8:CKX1-Venus* では薬剤処理による RZ の拡大が抑圧された (Fig. 2-25A)。そこで、*ProATHB8:CKX1-Venus* が、*pas2-1* 変異体における RZ での細胞増殖の活性化も抑圧するかを検討した。その結果、*ProATML1:CKX1-Venus* は *pas2-1* 変異体の表現型に全く影響を与えなかったの

に対して、*ProATHB8:CKX1-Venus* は RZ における細胞増殖の活性化を部分的に抑圧した (Fig. 2-25B)。完全には抑圧できなかった理由は、*pas2-1* 変異体において増加したサイトカニン含量が *CKX1* による分解能力を超えていた可能性に加えて、*pas2-1* 変異体では維管束以外においても異所的な *IPT3* 発現が誘導されていた点にあると考えられた。すなわち、*ATHB8* の発現は *pas2-1* 変異体においても維管束のみに制限されていたことから、*CKX* によるサイトカニン分解が維管束以外の組織に及ばなかった可能性が考えられた。これらの結果をまとめると、VLCFA の減少による細胞増殖の活性化は、維管束におけるサイトカニン合成の活性化に加えて、サイトカニン合成を維管束にのみ制限できなくなった結果によるものであると考えられた。なお、VLCFA 減少による細胞増殖の活性化について *ProATML1:CKX1-Venus* が抑制的に機能しなかったのは、サイトカニン以外の細胞非自律的なシグナルが葉肉細胞から表皮細胞に送られている可能性 (Serralbo et al. 2006) を支持するものであると考えられた。

2.4. 考察

高濃度のカフェンストロール ($3\ \mu\text{M}$)を植物体に処理することで、*pas2-1* 変異体で観察される表現型に類似した、器官の合着や胚軸の肥大をはじめとする重篤な生育の異常が引き起こされることがわかった。低濃度のカフェンストロール ($30\ \text{nM}$) を与えても同様の胚軸の肥大が引き起こされたが、一方で器官の合着や生育の阻害などは観察されなくなった。むしろ $30\ \text{nM}$ のカフェンストロール処理は、葉の細胞数の増加を誘導し、 $3\ \mu\text{M}$ 処理では観察されない葉の面積の拡大を引き起こすことがわかった。 $3\ \mu\text{M}$ と $30\ \text{nM}$ の処理時において葉でみられるこの違いは、 $3\ \mu\text{M}$ のカフェンストロール処理時には、 $30\ \text{nM}$ の処理時には観察されないクチクラ形成の重篤な異常が引き起こされることによって説明できる。すなわち、 $3\ \mu\text{M}$ の処理時には、クチクラの欠損による影響などにより、葉における細胞増殖の活性化を打ち消すような影響が生じているためと考えられる。

pas2-1 変異体ならびにカフェンストロール処理を行った植物体では、主要なサイトカイニン合成遺伝子である *IPT3* の発現量が増加し、維管束以外の組織においても異所的な発現が誘導されていることがわかった。加えて、サイトカイニンの含量が VLCFA の減少によって増加した一方で、カフェンストロール処理による細胞増殖の活性化は *ipt3;5;7* 変異体や *ProATHB8:CKX1-Venus* 系統においては認められなくなった。したがって、表皮で合成された VLCFA が、サイトカイニンの合成場所を維管束にのみ制限するとともに、維管束におけるサイトカイニン合成量を制限することで、細胞増殖を制限していると考えられる。これまでに、*IPT3* をシロイヌナズナにおいて過剰発現させると、サイトカイニン含量が約 3 倍に増加し、細胞数の増加を介した葉の面積拡大を引き起こすことが報告されている (Galichet et al. 2008)。したがって、表皮において合成された VLCFA は、主に *IPT3* を抑圧している可能性が高いだろう。ただし、*IPT3* に加えて、*CYP735A2* の発現量も *pas2-1* 変異体において増加していたことから、VLCFA が *CYP735A2* 遺伝子も制御対象としている可能性が考えられる。

本研究結果をまとめると、表皮に由来するシグナルが存在し、それが植物体の表層 (表皮) から中心 (維管束) に向かって送られることで、植物体全体の細胞増殖活性を調節するような機構が存在すると考えられる (Fig. 2-26)。実際、VLCFA 含量を低下 ($30\ \text{nM}$ カフェンストロール処理) させると葉の面積が増大したことから、器官の大きさを決定するための細胞非自律的なシグナルが送られている可能性が示唆される。表皮が植物の発生ならびに器官形成において

重要な役割を保持している可能性は、表皮のアイデンティティを喪失する *atml1;pdf2* 二重変異体において重篤な形態形成の異常が観察されたことから支持される (Abe et al. 2003)。加えて、表皮の機能維持において重要な ALE2 ならびに ACR4 の下流で、KCS をコードする *FDH* が表皮特異的に発現するように制御されている可能性が示唆されている (Tanaka et al. 2007)。実際、L1 層および表皮特異的な遺伝子発現を誘導する転写因子、ATML1 および PDF2 が結合するシスエレメントである L1 ボックス (Abe et al. 2003) が、*PAS2*, *KCS11*, *KCS16*, *KCS20* には 1 つ、*KCS6*, *KCS9*, *KCS10/FDH*, *KCS18* には 2 つ、それぞれプロモーター領域に存在する。*PAS2* は HCD をコードする唯一の遺伝子であることから (Bach et al. 2008)、VLCFA が主に表皮において合成されるように制御されている可能性が高い。興味深いことに、*PAS2* 遺伝子は、SAM や特に若い葉など、分裂活性の高い組織において強く発現していた。また、VLCFA 合成の阻害は、特に葉の成長段階の初期における細胞増殖の活性を促進させた。したがって、VLCFA は表皮から維管束に向かうシグナルとして機能し、SAM や若い葉など、分裂活性の高い組織における細胞増殖を制限することで、植物全体の成長を調節していると考えられる。

シロイヌナズナおよびイネにおいて、VLCFA 合成遺伝子の欠損により、*KNOTTED-like homeobox (KNOX)* 遺伝子の発現が増加することが報告されている (Harrar et al. 2003; Ito et al. 2011)。加えて、シロイヌナズナにおいて *class I KNOX (KNOXI)* 遺伝子を過剰発現させることで、サイトカイニン合成が促進されることが知られている (Yanai et al. 2005)。これらの知見から、VLCFA の減少によるサイトカイニン合成の活性化は、*KNOX* の発現誘導の下流で起こる可能性も考えられた。しかし、VLCFA の減少による細胞増殖の活性化は葉においても観察されたのに対して、*KNOXI* は葉においては発現しておらず、主に SAM において発現している。したがって、少なくとも葉においては、VLCFA が *KNOXI* の発現を直接抑制することでサイトカイニンレベルを調節しているとは考えにくいだろう。これまでに、サイトカイニンが *KNOXI* 遺伝子の *KNAT1/BREVIPEDICELLUS* および *SHOOT MERISTEMLESS* の発現を誘導することがわかっていることから (Rupp et al. 1999)、VLCFA 合成の低下時に報告されている *KNOX* 発現の増加は、茎頂におけるサイトカイニン合成が活発になった結果であると考えられる。

酵母や動物においては、スフィンゴ脂質がシグナル分子として、細胞増殖や細胞死、ストレス応答に寄与していることが知られている (Worrall et al. 2003)。シロイヌナズナにおいても、LCFA ではなく VLCFA を含むスフィンゴ脂質が正常な生育に必要であることが示されている (Markham et al. 2011)。シロイヌナ

ズナでは、スフィンゴ脂質合成が欠損すると細胞成長の阻害や、致死を示すものの (Chen et al. 2006; Dietrich et al. 2008), 細胞増殖の活性化が引き起こされることは報告されていない。しかし, VLCFA を含むある特定のスフィンゴ脂質がサイトカイニン合成と密接に関係し, 細胞増殖を制御している可能性もあるだろう。加えて, 動物や酵母, バクテリアにおいても提唱されているように, VLCFA 分子それ自身か, あるいは VLCFA を含む脂質がシグナルの仲介因子やリガンドとして機能し, 遺伝子発現を制御している可能性も考えられる (Black et al. 2000)。実際, シロイヌナズナにおいては, VLCFA の一種であるアラキドン酸はストレス関連遺伝子の発現を誘導し, 防御シグナルを活性化させることが示されている (Savchenko et al. 2010)。したがって, VLCFA が植物においても細胞増殖を制御する役割を担う可能性が示唆される。ただし, VLCFA 欠損による代謝系の変動も示唆されたように (第一章), VLCFA の下流で変動する何らかの代謝物を介して, サイトカイニン合成が制御されている可能性は残されている。

pas2 変異体やカフェンストロール処理を行った植物体に加えて, LCFA の合成酵素を欠損した *mod1* 変異体や, VLCFA 合成関連遺伝子を欠損した *pas1*, *pas3*, *fdh* 変異体においても, サイトカイニン合成の増加と茎頂における細胞増殖の活性化が観察された。*pas1* および *pas3* 変異体で観察されたサイトカイニン含量の増加に比べると, *mod1* 変異体での増加は少なく, さらに *fdh* 変異体での増加はわずかであった。これら変異体のサイトカイニン含量は, 表現型の重篤さと相関していると考えられる。すなわち, *pas1*, *pas3* 変異体においては, 強い葉の形成阻害が引き起こされ, 成長を発生の初期に停止する (Faure et al. 1998)。一方で, *mod1* 変異体では淡色の葉を生じ, 葉の形態異常, 弱い成長阻害などが引き起こされるものの, 明確な本葉が形成されるなど, 一連の *pas* 変異体と比較して表現型は明らかに弱い (Mou et al. 2000)。*fdh* 変異体は *mod1* 変異体よりもさらに弱い表現型を示し, クチクラ欠損による葉の合着のみが主な表現型である (Tananka et al. 2004)。したがって, これら変異体間でのサイトカイニン含量増加の程度は, 表現型の重篤さを反映していると考えられる。

特に *fdh* 変異体におけるサイトカイニン合成の増加がわずかであったのは, *KCS* をコードする遺伝子の冗長性によるものであると考えられる。すなわち, 21 個の *KCS* をコードする遺伝子のうち, *KCS1* や *CER6*, *FDH* を含む 8 遺伝子が強く発現しており, それらは *FDH* と同様の組織で発現している (Joubes et al. 2008)。*KCS1* を完全に欠損した変異体は, 乾燥条件下では強い生育阻害が観察されるものの, 湿度を保持した生育条件下においては茎以外に明らかな表現型は現れない (Todd et al. 1999)。また, *CER6* の欠損は, 茎に弱い表現型を引き

起こすのみである(Hooker et al. 2002)。したがって、FDH と他の KCS は VLCFA 合成において重複した機能を持つ可能性が示唆されている。カフェンストロールは複数の KCS の酵素活性を同時に阻害するため (Trenkamp et al. 2004)、高濃度のカフェンストロール処理により、VLCFA の減少に伴う重篤な表現型を誘導できたと考えられる。

表皮は単純な外界との接点であるだけでなく、植物の器官形成や器官成長を支える上でも重要な役割を担う組織であることがわかってきた。しかし、サイクリン依存性キナーゼの阻害因子を L1 層特異的に発現させると、表皮における細胞数が減少するものの、皮層や葉肉細胞の分裂活性は変化しないことが示されている (Bemis and Torii 2007)。このことから、表皮から内側の組織に向かって、細胞増殖活性そのものを協調させる機構はないと考えられる。一方で、本研究の結果から、表皮で合成された VLCFA によって、維管束におけるサイトカイニン合成が制御されることで、内側組織の細胞増殖の活性が調節される可能性が強く示唆された。

本研究から導きだされたこの機構は、植物がクチクラの形成と器官成長を調節しながら、種々の環境条件に応じた最適な発生を遂げる上で意義を持っていると考えられる。これまでに、いくつかの KCS をコードする遺伝子の発現は、塩や乾燥、浸透圧などのストレスによって誘導されることが報告されている (Joubès et al. 2008)。加えて、VLCFA 合成遺伝子の発現を活性化させる転写因子、MYB30 は、病原菌感染によって誘導されることが報告されている (Raffaele et al. 2008)。植物の器官成長と外部環境へ抵抗・適応する力はトレードオフの関係にあると考えられ、例えばサリチル酸の過剰生産などにより植物体に高い抵抗性を与えると、植物の成長は著しく阻害される (Heil & Baldwin 2002)。植物はストレス環境条件において、クチクラ形成を促進させて環境耐性を高めつつ、細胞増殖活性を抑圧させることでエネルギーの消費を抑えているのかもしれない。興味深いことに、ブラシノステロイドシグナルの下流で機能する転写因子 BES1 が、直接 MYB30 と相互作用することで下流遺伝子の転写を促進させることが示されている (Li et al. 2009; Raffaele et al. 2008)。BES1 は、表皮から植物全体の成長を促進させるブラシノステロイドシグナルの伝達機構に関わるが (Savaldi-Goldstein et al. 2007)、その一方で、表皮におけるブラシノステロイドシグナルは、MYB30 ならびに VLCFA 合成を促進させることで細胞増殖を調節している可能性も考えられる。今後、細胞層をまたいで機能するシグナルが特定されることで、植物が器官形成を持続的に行うメカニズムや、植物体が細胞成長や細胞増殖を調節しつつ、環境の変化に応じた器官成長の制御を行う機構について理解することができると期待される。

第一章で得られた研究結果と統合すると、VLCFA は細胞増殖を抑制するとともに色素体の適正な数を維持することで、植物の発生と生育を支えていると考えられる。表皮で合成された VLCFA が、内側の組織をどのように制御するかについてはまだわかっていない。しかし、可能性のひとつとして、表皮から原形質連絡などを伝って輸送された VLCFA あるいは VLCFA 由来の脂質が、表皮から内側の組織を制御するシグナルとしてはたらいていることが挙げられる。同時に、VLCFA が表皮における何らかのシグナル伝達経路、もしくは代謝系に関与することで、内側の組織を制御している可能性も考えられる。VLCFA を介した細胞非自律的な細胞増殖の制御機構について、その詳細な分子機構の解明が今後の研究課題である。

生体内には多種多様な脂質が存在し、数多くの重要な機能を担っている。ある特定の脂質の動態を組織レベルで観察することは困難であるが、近年、脂質一分子を観る技術が開発されるなど、脂質を解析するアプローチにおいて目覚ましい進展が見受けられる。また、今後もさまざまな研究が進展していく中で、脂質合成や脂質修飾に関わるような遺伝子が数多く同定されていくと予想される。それら脂質系の因子について、植物の発生の視点から解析することによって、植物の器官成長を制御するような脂質系の新奇シグナル分子の発見につながると期待している。

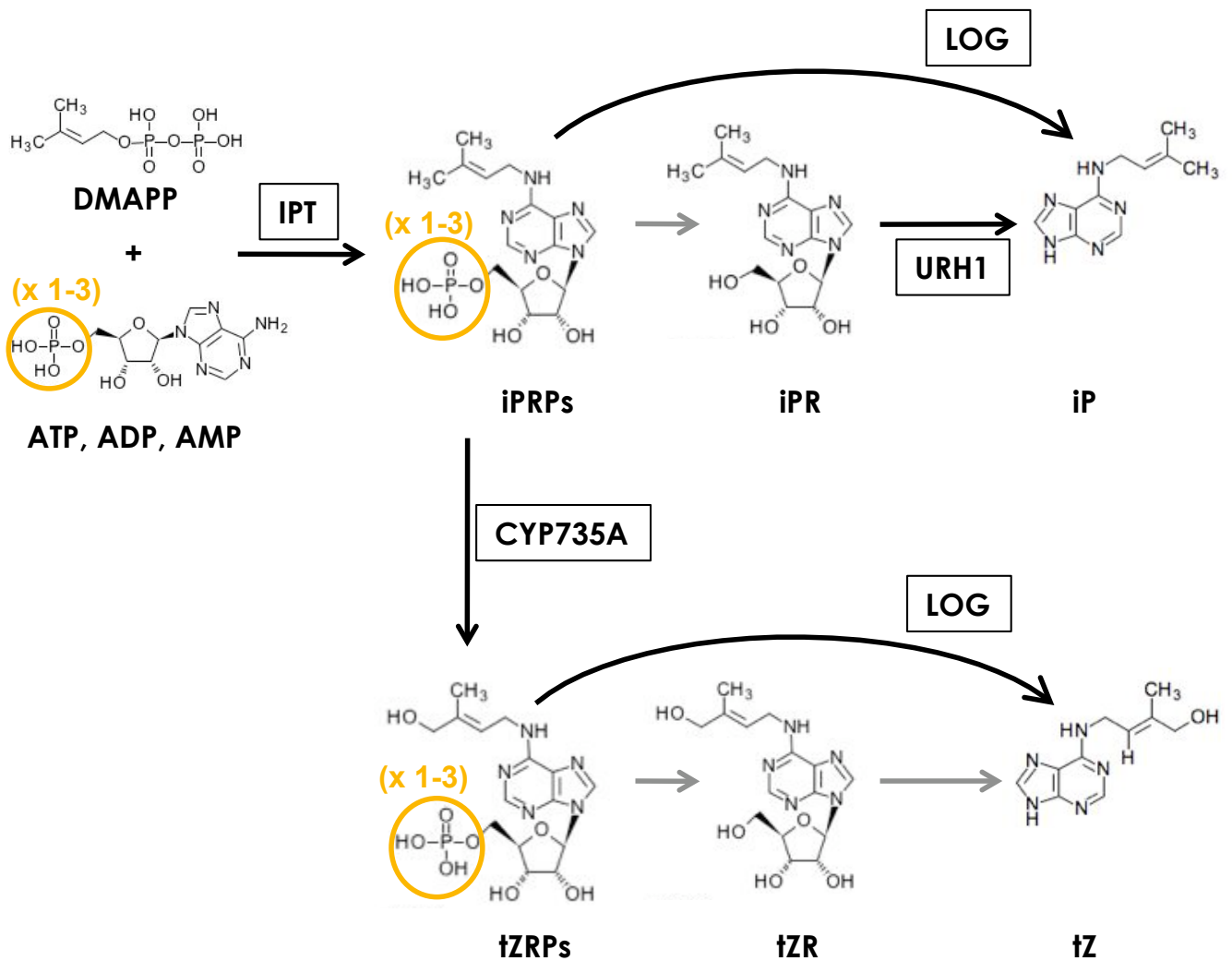


Figure 2-1. 植物における主要なサイトカイニンの生合成経路

それぞれの段階を触媒する酵素を四角で囲んで示す。
 酵素が同定されていない経路は灰色の矢印で示す。

IPT, adenosine phosphate-isopentenyltransferase; **DMAPP**, dimethylallyl diphosphate;
LOG, LONELY GUY; **URH1**, uridine-ribohydrolase 1; **iPRPs**, isopentenyladenine riboside phosphates; **tZRPs**, *trans*-zeatin riboside phosphates; **iPR**, isopentenyladenine riboside;
tZR, *trans*-zeatin riboside; **iP**, N⁶-isopentenyladenine; **tZ**, *trans*-Zeatin

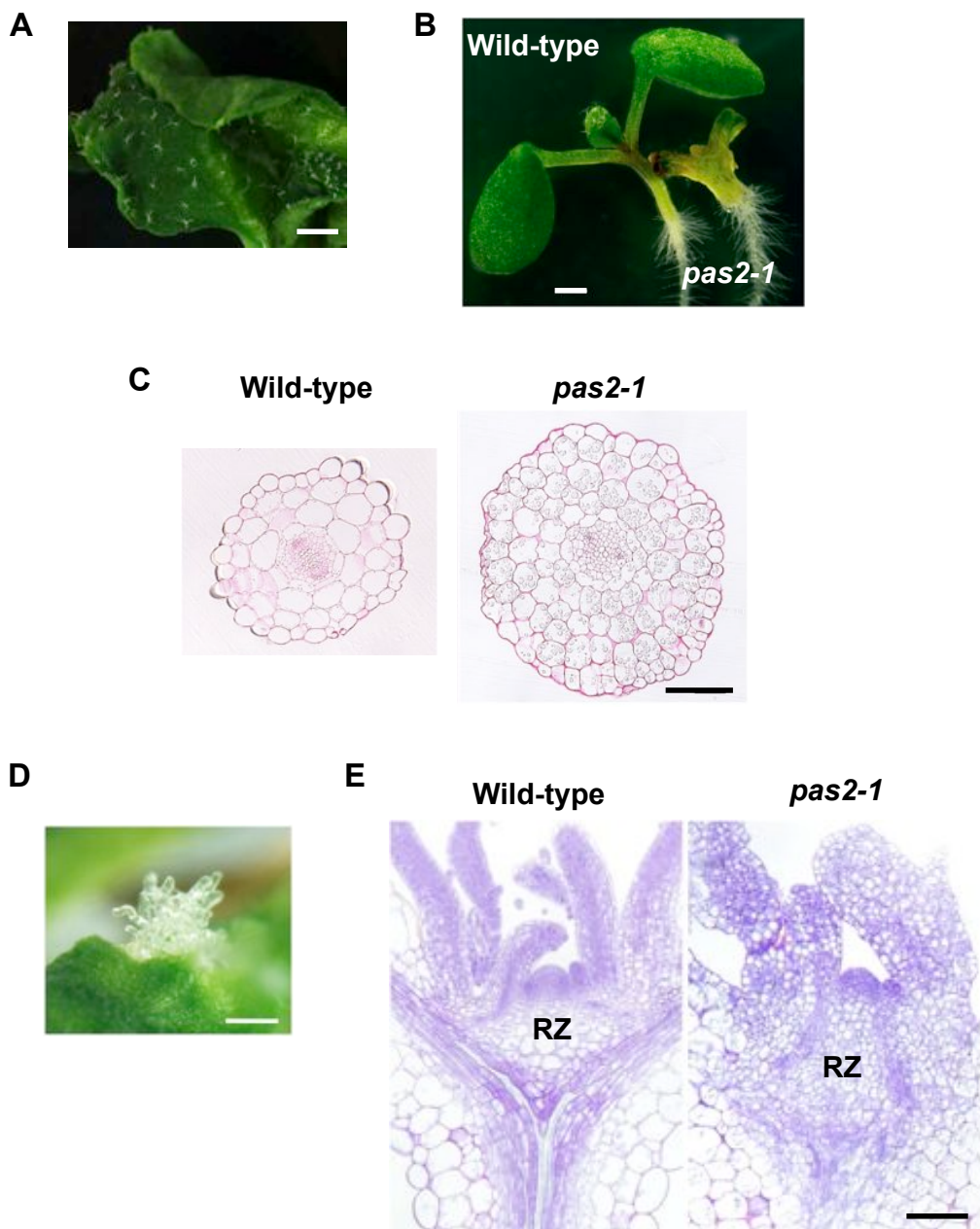


Figure 2-2. *pas2-1*変異体では細胞増殖が活性化する

- (A) *pas2-1*変異体の発芽後2週間の葉を示す。クチクラ形成の異常により本葉が合着している。
 (B) 野生型植物体（左）ならびに*pas2-1*変異体（右）の発芽後5日目の芽生えを示す。
 (C) 野生型植物体（左）ならびに*pas2-1*変異体（右）における発芽後5日目の胚軸切片を示す。
 (D) *pas2-1*変異体の葉から自発的に出現したカルス様の構造物を示す。
 (E) 野生型植物体（左）ならびに*pas2-1*変異体（右）における発芽後7日目の茎頂の縦断切片を示す。

Bars, 1 mm (A), 500 mm (B), 100 mm (C, E), 500 μm (D)

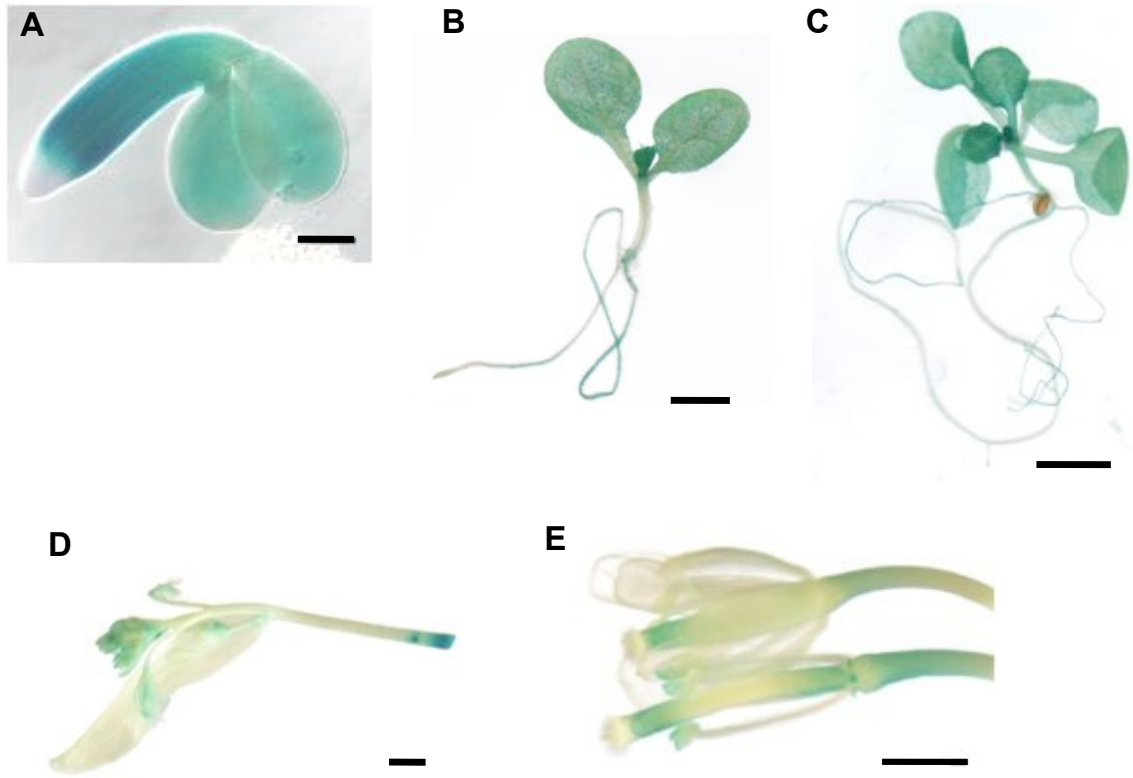


Figure 2-3. *ProPAS2:GUS*の発現様式

*ProPAS2:GUS*の成熟胚 (A) , 発芽後5日目の植物体 (B) , 発芽後8日目の植物体 (C) , ならびに, 花と葯 (D, E) における発現様式を示す。
Bars, 100 μ m (A), 1 mm (B, E), 2 mm (C, D)

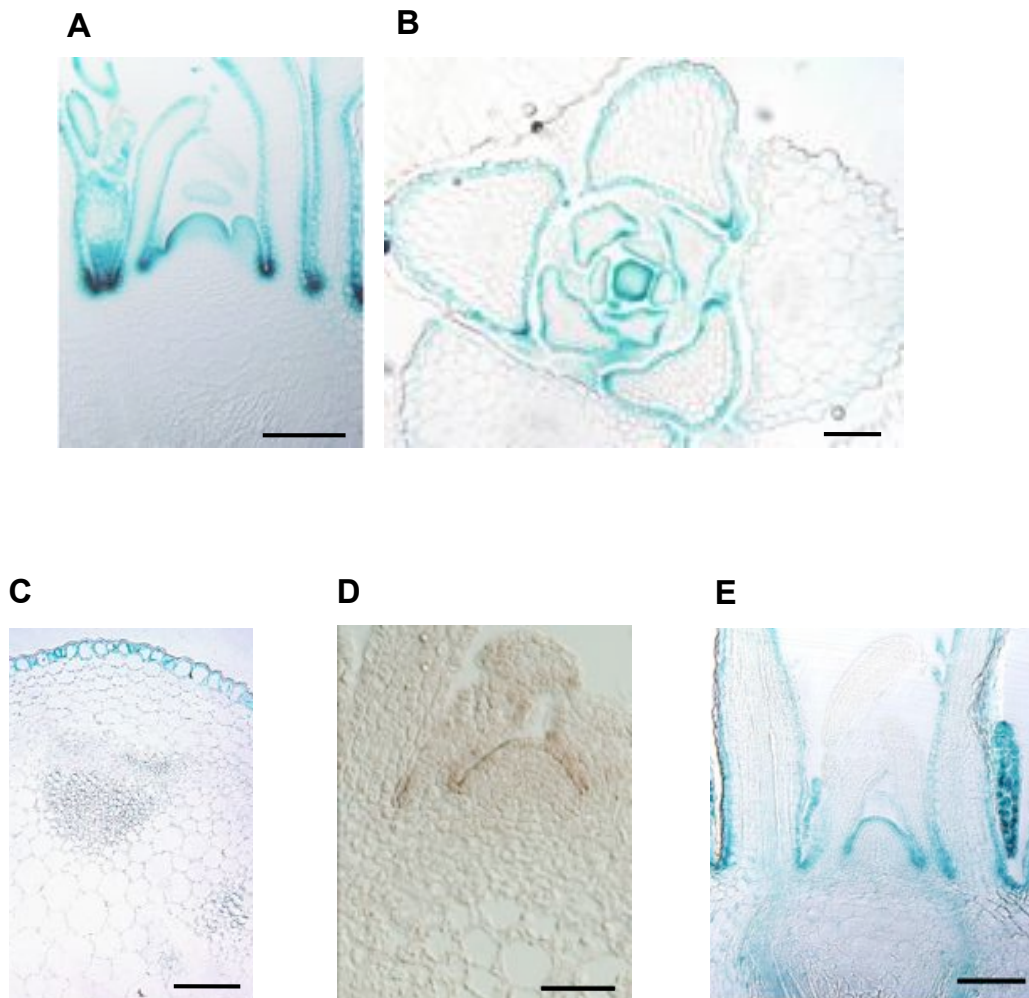


Figure 2-4. *PAS2*は表皮特異的に発現する

(A–C) 発芽後7日目の植物体の茎頂の縦断切片 (A) , 発芽後10日目の茎頂の縦断切片 (B) , ならびに、発芽後3週間程度の花茎 (C)における*ProPAS2:GUS*の発現様式を示す。

(D) *In situ* ハイブリダイゼーションによる*PAS2* mRNAの局在を示す。発芽後7日目の野生型植物体において、茎頂の縦断切片に*PAS2*のアンチセンスプローブをハイブリダイズさせた。

(E) 発芽後7日目の茎頂の縦断切片における*ProPAS2:GUS*の発現様式を示す。

Bars, 100 μ m

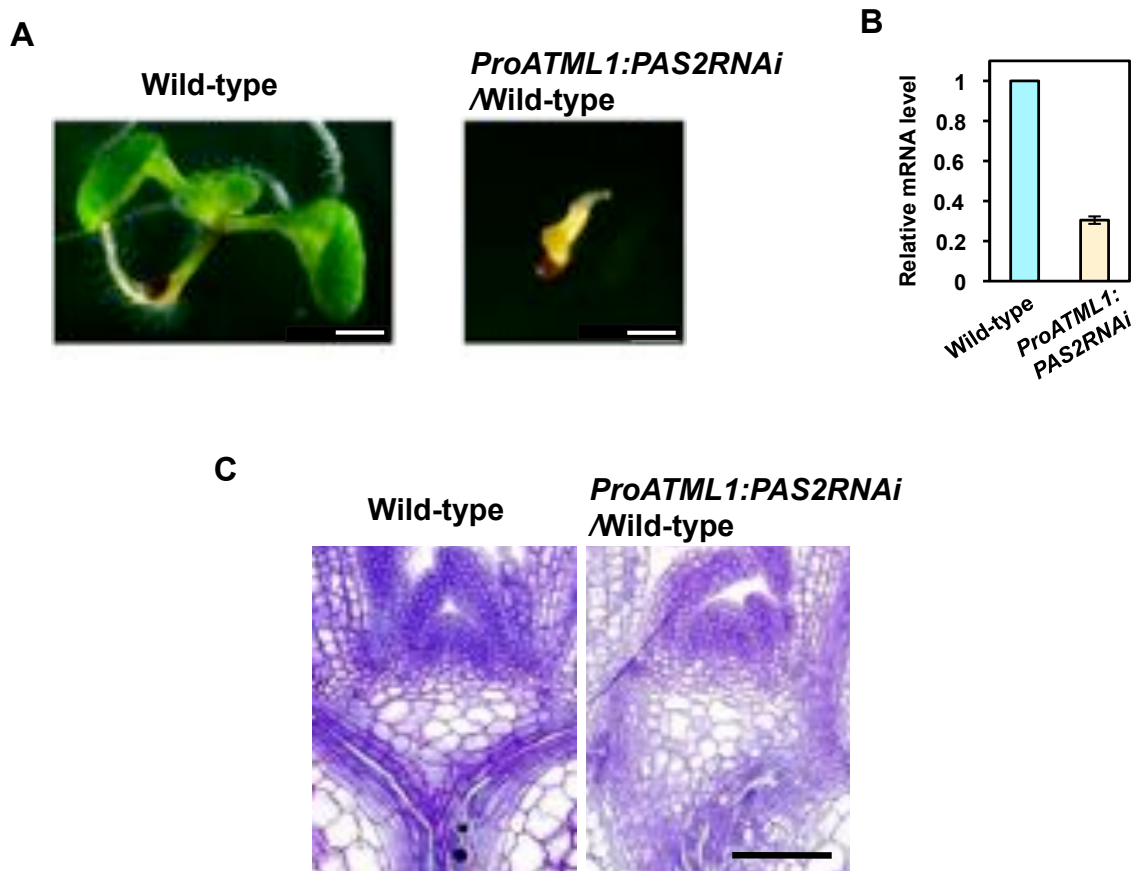


Figure 2-5. 表皮特異的な*PAS2*発現の抑圧は*pas2-1*変異体様の表現型を引き起こす

(A) 発芽後5日目の野生型植物体（左）と*ProATML1:PAS2RNAi*を発現させた植物体（右）を示す。Bars, 1 mm

(B) *ProATML1:PAS2RNAi*における*PAS2*の発現量を定量的RT-PCRで比較した。*TUBULIN4*の発現量で標準化し、野生型を1としたときの相対値で示している。発芽後5日目の植物体全体から抽出したRNAを用いた。値は平均±S.D. (n = 3)で示す。

(C) 野生型（左）ならびに *ProATML1:PAS2RNAi*ライン（右）の、発芽後7日目の植物体の茎頂の縦断切片を示す。Bar, 100 μm

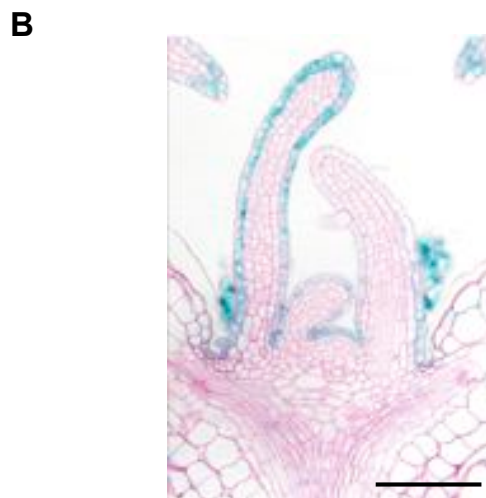
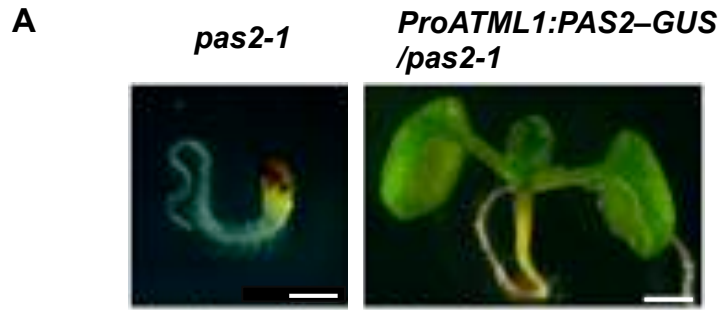


Figure 2-6. 表皮特異的なPAS2発現により *pas2-1* 変異体の表現型は相補される

(A) 発芽後5日目の *pas2-1* 変異体 (左) ならびに *ProATML1:PAS2-GUS* を発現させた *pas2-1* 変異体 (右) を示す。Bars, 1 mm

(B) 発芽後5日目の *ProATML1:PAS2-GUS/pas2-1* 植物における, 茎頂付近の縦断切片を示す。Bar, 100 μ m



Figure 2-7.カフェンストロール処理により引き起こされる表現型

(A) カフェンストロールを含む培地 (30 nM, 3 μ M) もしくは含まない培地 (w/o) で育った野生型植物体ならびに*pas2-1*変異体における、発芽後12日目の地上部 (上段), ならびに、それらの胚軸の上部 (下段) を示す。

(B) 3 μ Mのカフェンストロールを含む培地で2週間育てた野生型植物体の地上部。本葉が合着している。

Bars, 2 mm (A上段), 500 μ m (B下段), 1 mm (B),

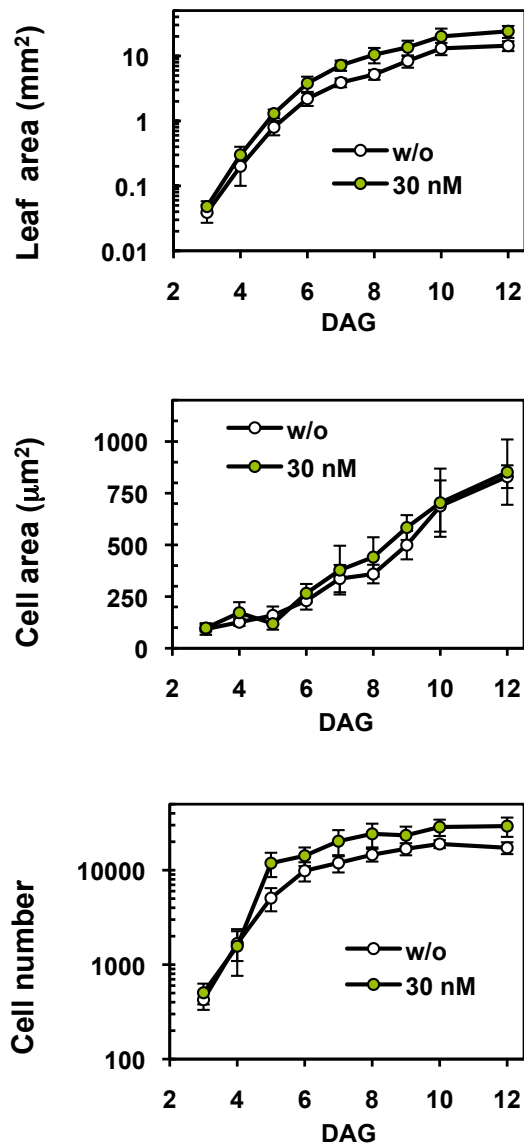


Figure 2-8. 葉の成長の経時変化

30 nMのカフェンストロールを含む (30 nM, 緑) あるいは含まない (w/o, 白) 培地で育てた野生型植物体の本葉第1葉の葉身における、葉面積、葉の細胞面積、ならびに、葉の細胞数を示す。値は平均±S.D. (n ≥ 10)で示す。

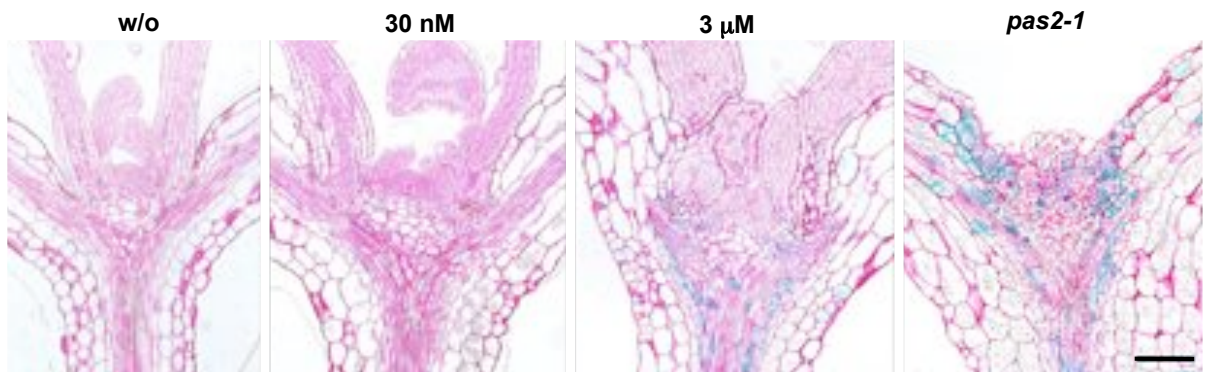


Figure 2-9. 極長鎖脂肪酸含量の減少は*CDKB2;1*の発現を増加させる

カフェンストロールを含まない(w/o)あるいは含む(30 nM, 3 μ M)培地で育った *ProCDKB2;1:NT-GUS* 植物体, ならびに *ProCDKB2;1:NT-GUS/pas2-1* 植物体の, 発芽後5日目の茎頂の縦断切片を示す。Bar, 100 μ m

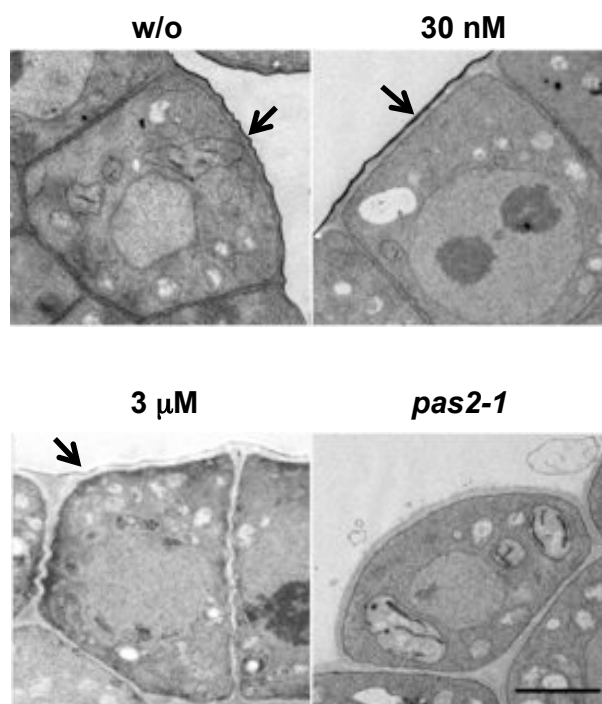


Figure 2-10. 透過型電子顕微鏡によるクチクラの観察

カフェンストロールを含む培地(30 nM, 3 μM)もしくは含まない培地 (w/o) で育てた野生型植物体, ならびに *pas2-1* 変異体において, 発芽後3日目の茎頂分裂組織L1層の透過型電子顕微鏡観察の画像を示す。矢印はクチクラ層を示す高電子密度層を示す。 *pas2-1* ではクチクラ層が全く観られず, 3 μMのカフェンストロール処理ではほとんどクチクラ層が観られない。

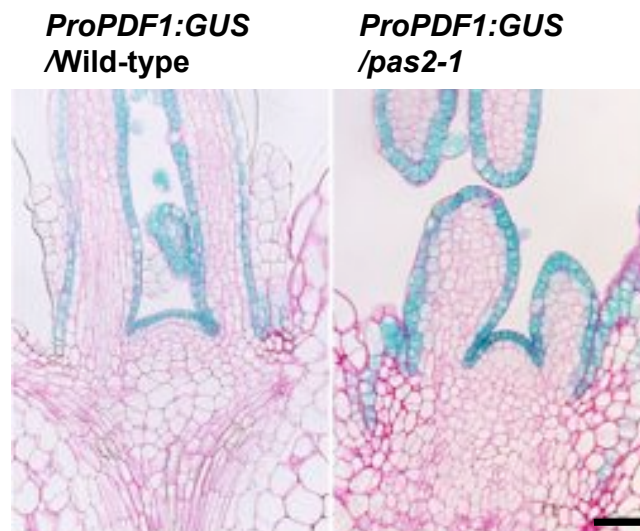


Figure 2-11. 極長鎖脂肪酸含量の低下は*PDF1*の発現に影響を与えない

発芽後5日目の野生型（左）および*pas2-1*変異体（右）の茎頂における*ProPDF1:GUS*の発現を示す。Bar, 50 μ m

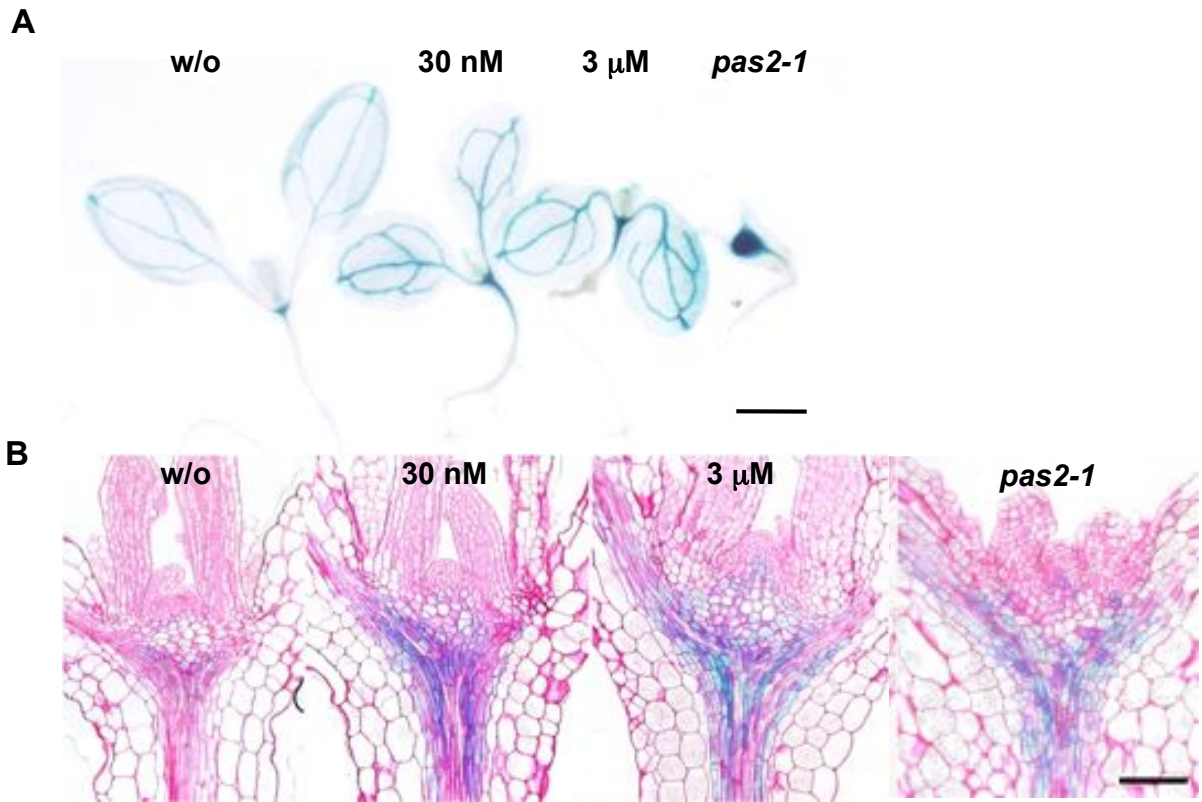


Figure 2-12. 極長鎖脂肪酸含量の減少はARR6の発現を増加させる

カフェンストロールを含まない培地(w/o)あるいは含む(30 nM, 3 μ M)培地で育った *ProARR6:GUS*植物体, ならびに *ProARR6:GUS/pas2-1*植物体における, 発芽後5日目の植物体 (A) ならびに茎頂の縦断切片 (B) を示す。Bars, 1 mm (A), 100 μ m (B)

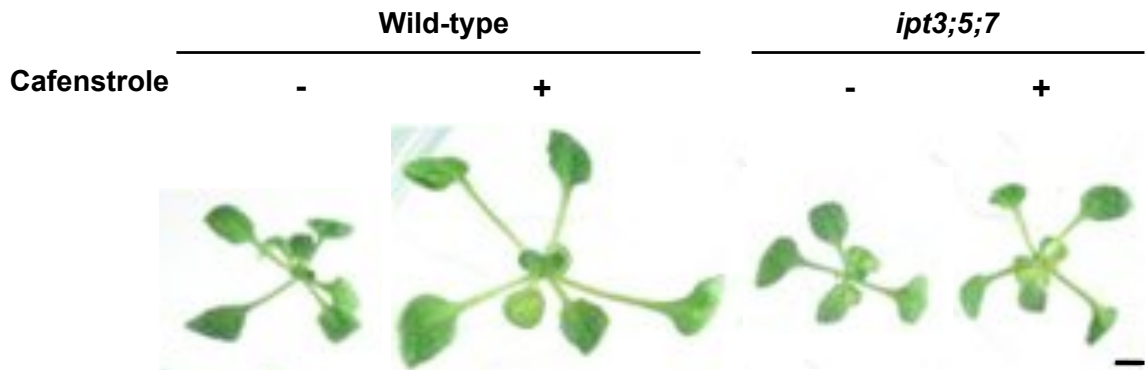
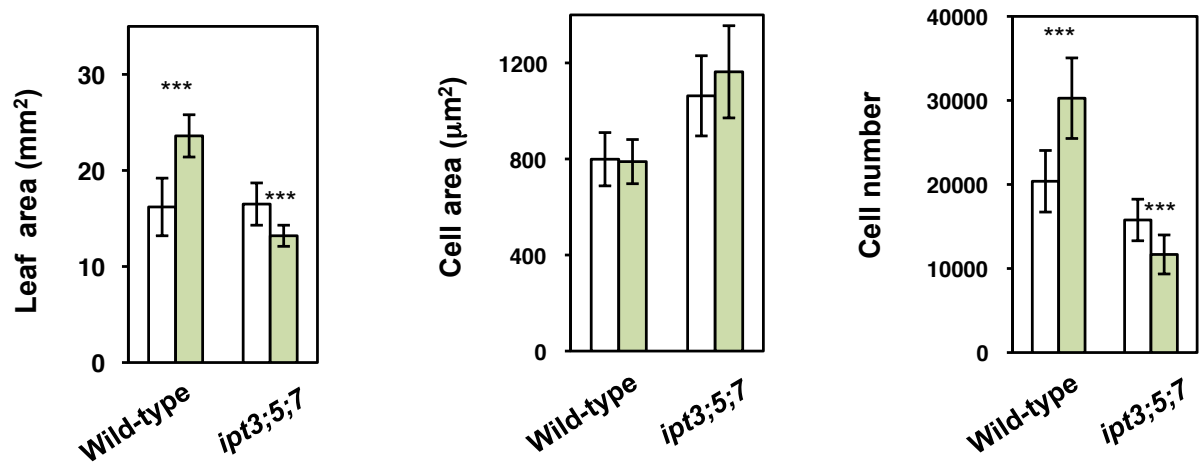
A**B**

Figure 2-13. カフェンストロール処理による葉の拡大は*ipt3;5;7*変異体では誘導されない

(A) 30 nMのカフェンストロールを含む培地 (+) あるいは含まない培地 (-) で育った、発芽後11日の野生型ならびに*ipt3;5;7* 三重変異体の地上部を示す。Bar, 5 mm

(B) 30 nMのカフェンストロールを含む培地 (緑色) あるいは含まない培地 (白色) で育った、発芽後11日の野生型ならびに*ipt3;5;7* 三重変異体において、発芽後11日の本葉第1葉の葉身の面積、表皮細胞の面積、ならびに細胞数を示す。値は平均±S.D. (n ≥ 13)で示す。カフェンストロール処理と未処理の値を比較し、Student's t-testsによって有意差を算出した。*** P < 0.001

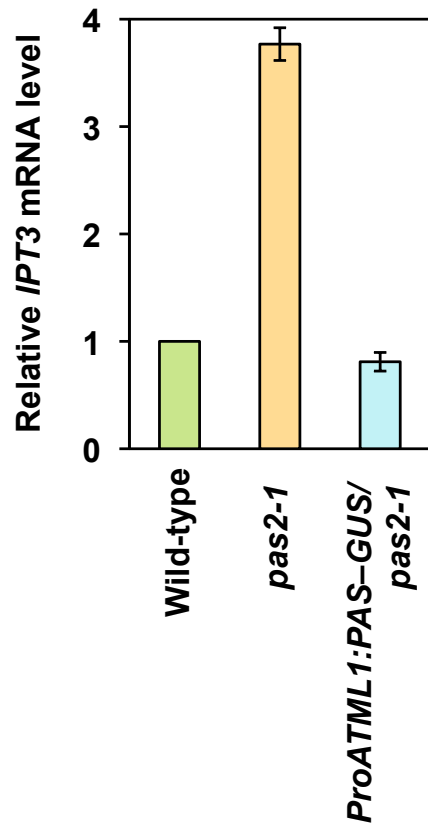


Figure 2-14. 表皮におけるPAS2発現がIPT3の発現抑制に必要である

野生型, *pas2-1*変異体, ならびにProATML1:PAS2RNAiにおけるIPT3発現量を定量的RT-PCRにより比較した。IPT3の発現量はTUBULIN4の発現量で標準化し, 野生型を1としたときの相対値で示している。サンプルは発芽後7日目の植物体全体を用いた。値は平均±S.D. (n = 3)で示す。

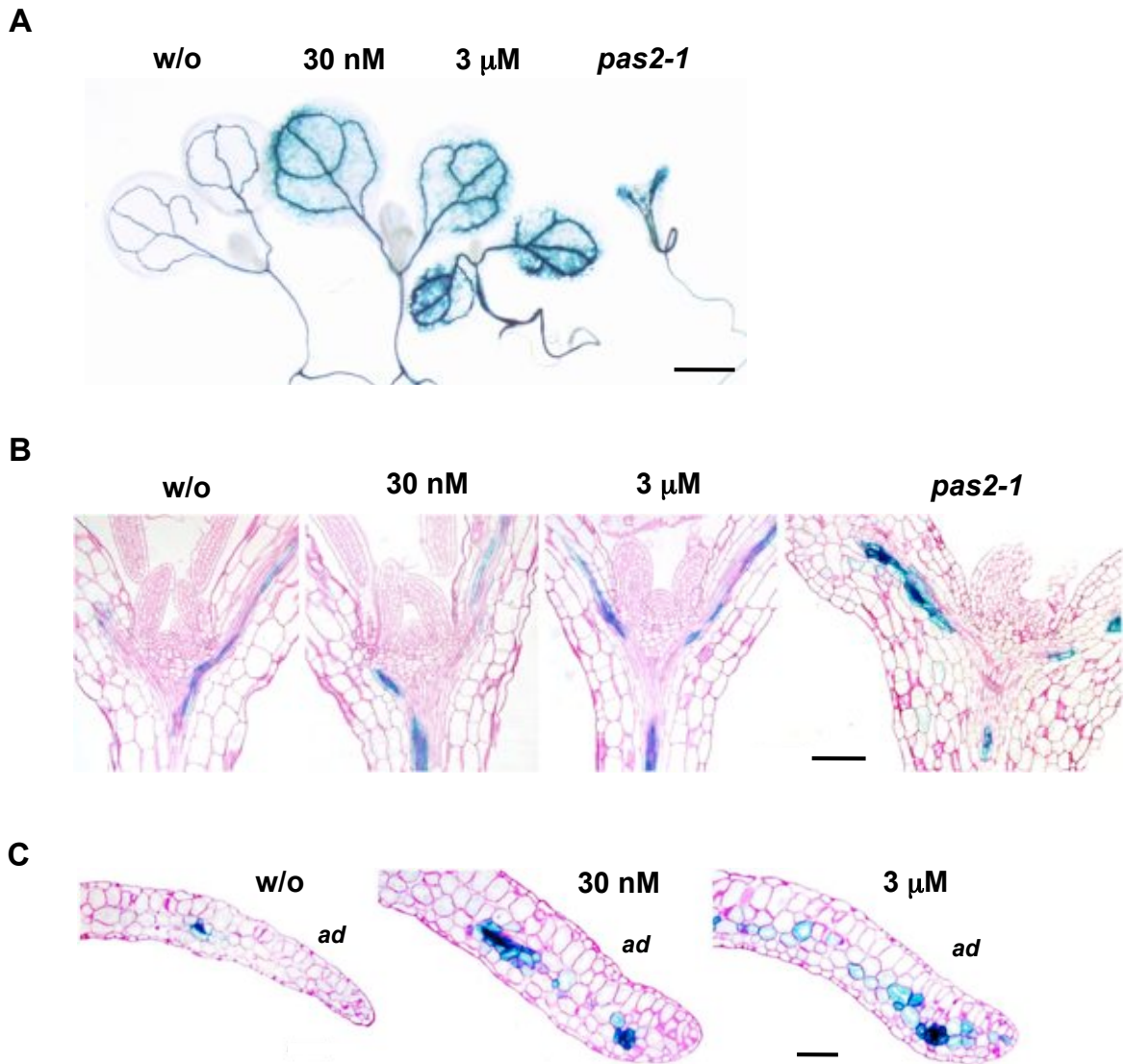


Figure 2-15. 極長鎖脂肪酸含量の減少はIPT3の発現を組織レベルで増大させる

カフェンストロールを含まない(w/o)あるいは含む(30 nM, 3 μ M)培地で育った*ProIPT3:GUS*植物体, ならびに*ProIPT3:GUS/pas2-1*植物体における, 発芽後5日目の植物体 (A) ならびに茎頂の縦断切片 (B) および子葉の横断切片 (C) をそれぞれ示す。Bars, 1 mm (A), 100 μ m (B, C)

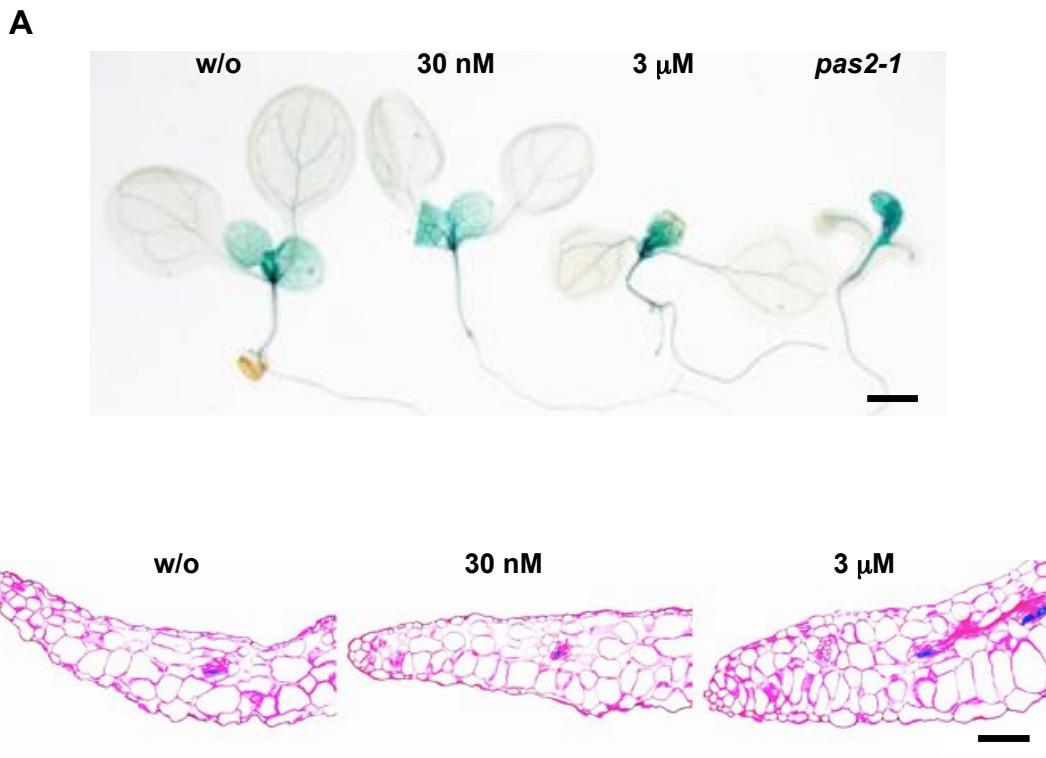


Figure 2-16. 極長鎖脂肪酸含量の減少は*ATHB8*の発現パターンに影響を与えない

カフェンストロールを含まない(w/o)あるいは含む(30 nM, 3 μM)培地で育った *ProATHB8:GUS*植物体, ならびに*ProATHB8:GUS/pas2-1*植物体の, 発芽後5日目の植物体 (A) ならびに子葉の横断切片 (B) を示す。Bars, 1 mm (A), 100 μm (B).

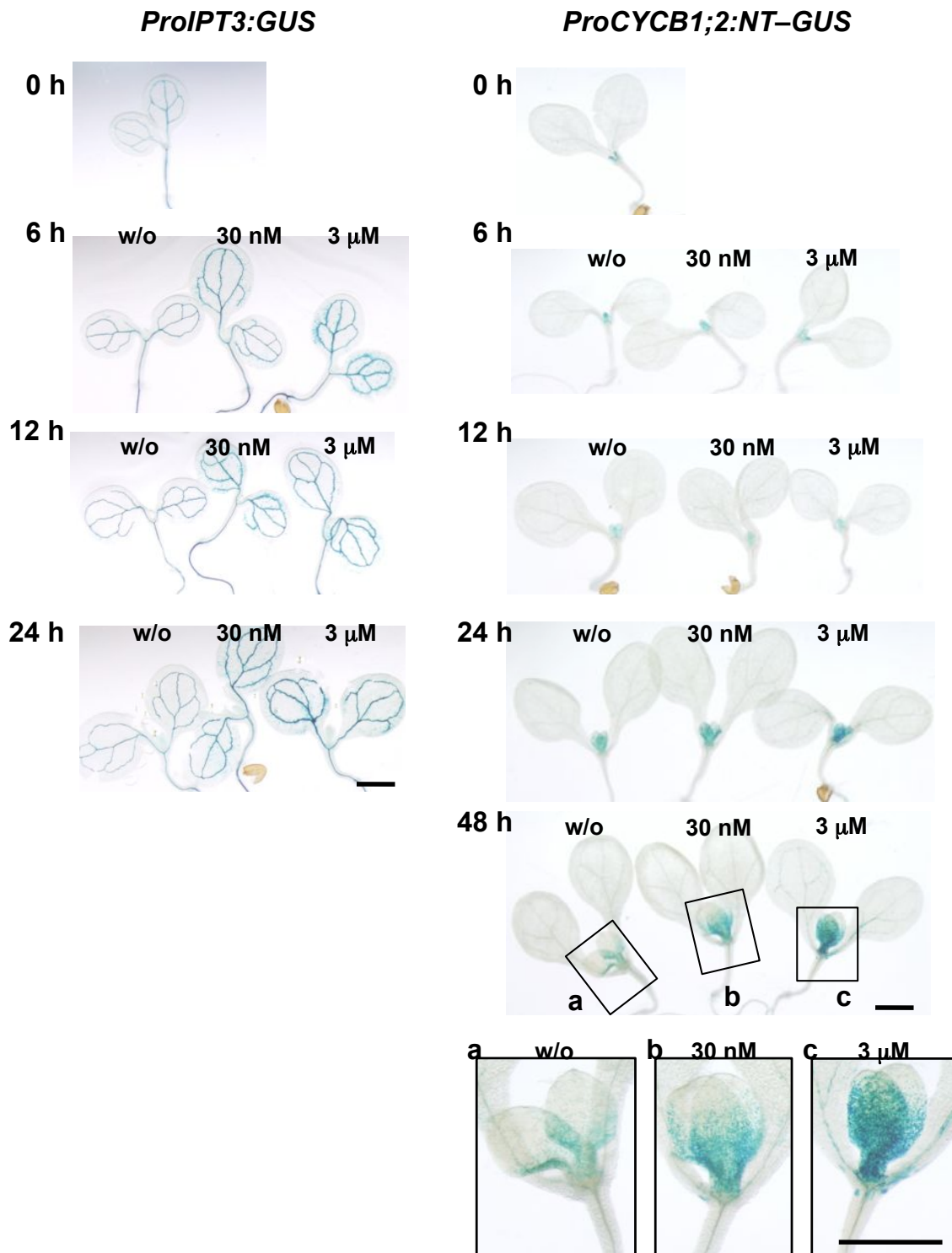


Figure 2-17. 極長鎖脂肪酸合成の阻害からサイトカイニン合成ならびに細胞増殖の活性化に至るまでの経時変化

通常のMS培地で育った発芽後3日の*ProIPT3:GUS* (左) ならびに*ProCYCB1;2:NT-GUS*植物体をカフェンストールを含まない培地 (w/o), または30 nMもしくは3 μM含む培地に移して、6, 12, 24, 48時間後にサンプリングし、GUS染色を行った。a, b, cは、48時間の時点における*ProIPT3:GUS*の茎頂付近の拡大図をそれぞれ示す。

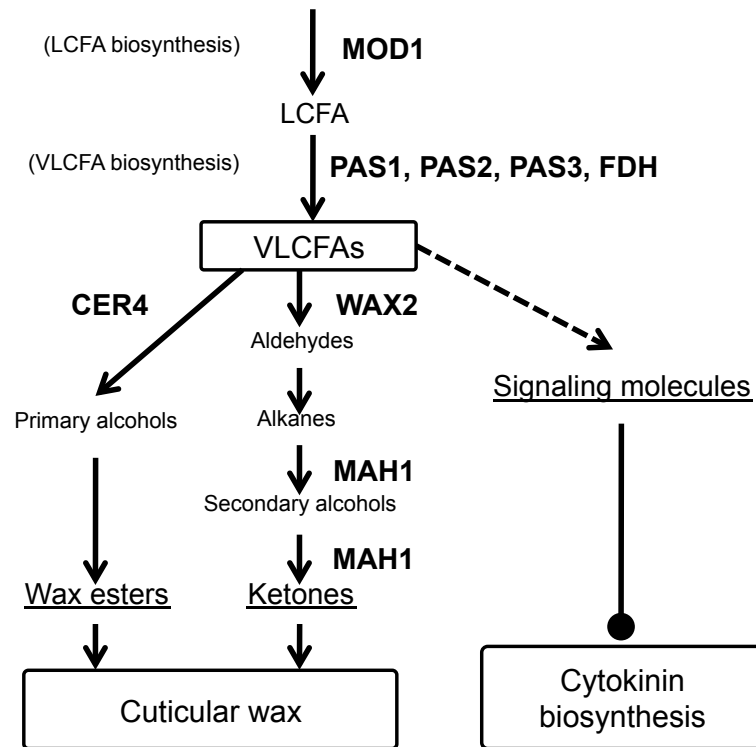


Figure 2-18. クチクラワックスの合成経路

解析対象とした、VLCFA合成ならびにクチクラワックスの生合成にかかわる因子を矢印の脇に太字で示す。

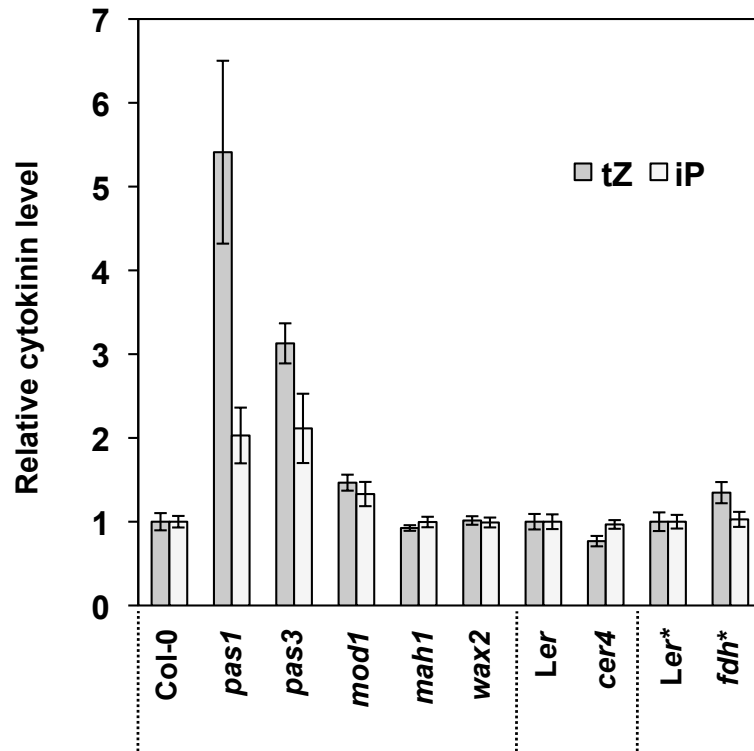


Figure 2-19. 種々の変異体におけるサイトカイニンの定量解析結果

野生型植物体中のtZおよびiPの含量をそれぞれ1としたときの相対値で示す。*cer4*および*fdh*変異体は*Ler*背景で、他は*Col-0*背景である。サイトカイニンの定量は発芽後7日目（*については発芽後14日目）の植物体全体を用いた。値は平均±S.D. (n=3)で示す。

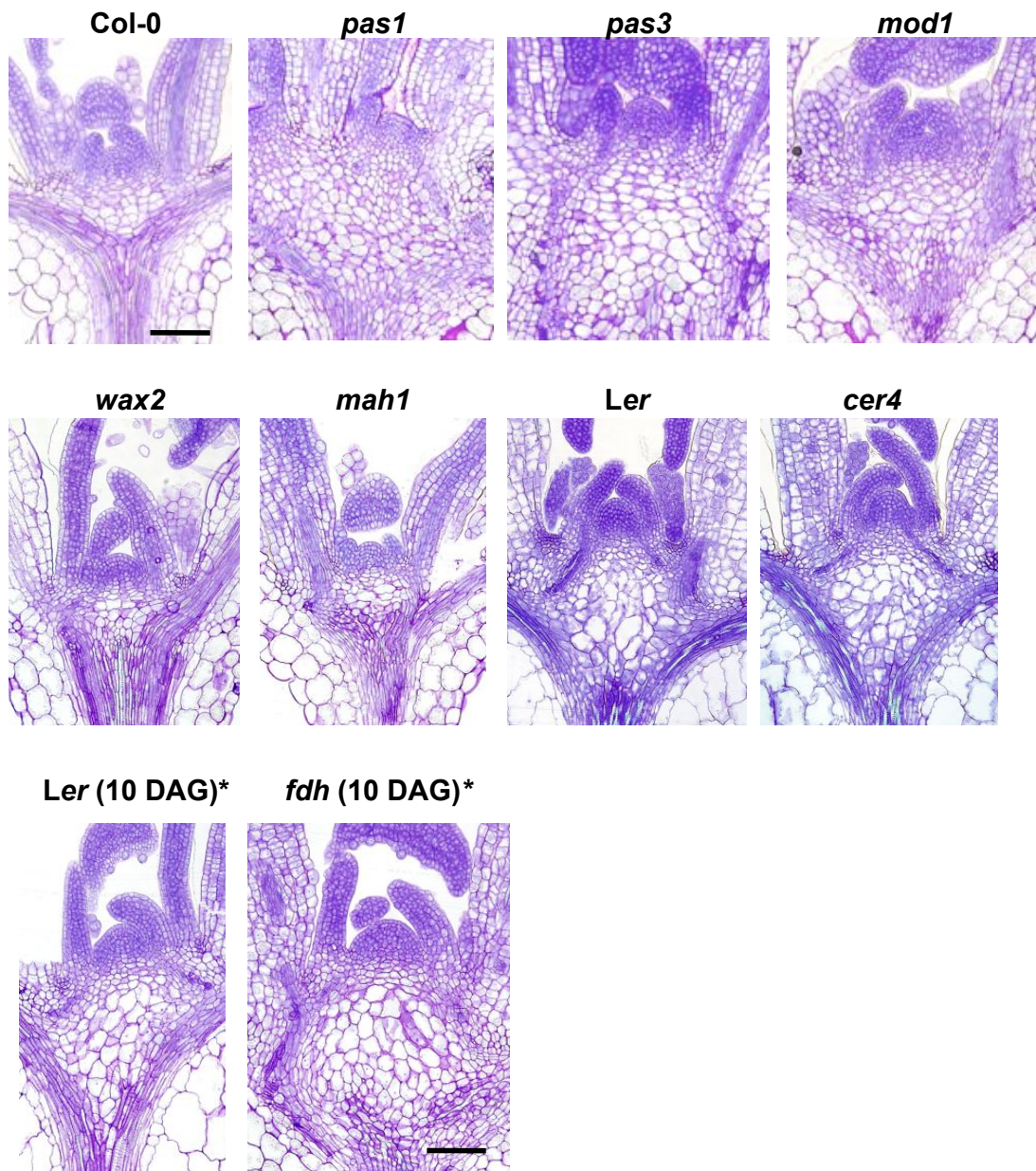


Figure 2-20. クチクラワックス合成の阻害でなく極長鎖脂肪酸の減少が細胞増殖を活性化させる

発芽後7日目 (*については発芽後10日目) の茎頂の縦断切片を示す。 *cer4*および*fdh*変異体は *Ler*背景で、他は*Col-0*背景である。 Bar, 100 μ m

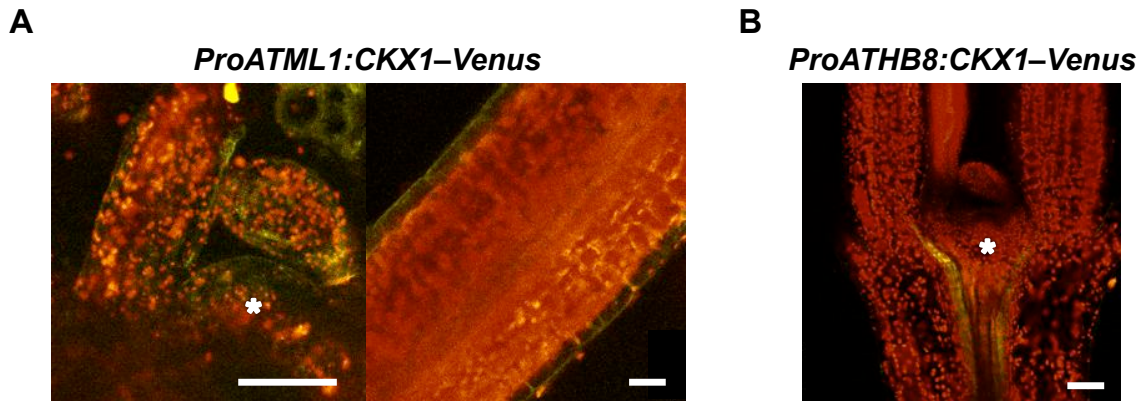


Figure 2-21. *ProATML1:CKX1-Venus*および*ProATHB8:CKX1-Venus*の発現領域

*ATML1*プロモーター (A) および*ATHB8*プロモーター (B) 制御下での*CKX1-Venus*の発現様式を示す。莖頂の縦断切片 (A左, B) ならびに本葉第1葉の縦断切片 (A右) を共焦点顕微鏡で観察した。Venusの蛍光 (黄色) と自家蛍光 (赤) とを重ね合わせた画像を示す。*は莖頂分裂組織を示す。Bars, 50 μ m (A), 20 μ m (B).

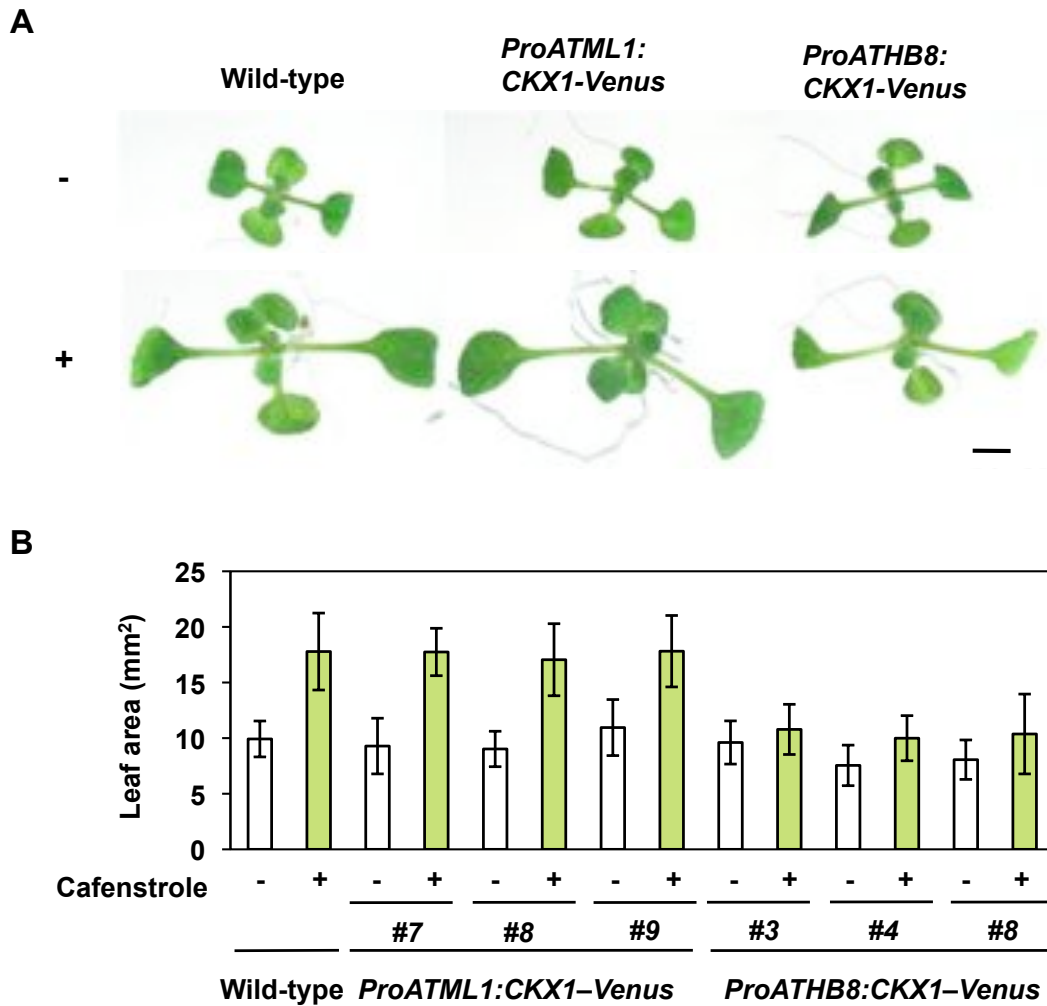


Figure 2-22. 維管束特異的なCKX1の発現はカフェンストロールで誘導される成長促進効果を抑圧した

(A) 30 nMのカフェンストロールを含む培地 (+) あるいは含まない培地 (-) で育った、発芽後8日の野生型、*ProATML1:CKX1-Venus*ならびに *ProATHB8:CKX1-Venus*の地上部を示す。(B) 30 nMのカフェンストロールを含む培地 (緑色) あるいは含まない培地 (白色) で育った、発芽後10日の野生型、*ProATML1:CKX1-Venus*、ならびに *ProATHB8:CKX1-Venus*の本葉第1葉の葉身の面積を示す。値は平均±S.D. (n ≥ 20)で示す。Bar, 5 mm

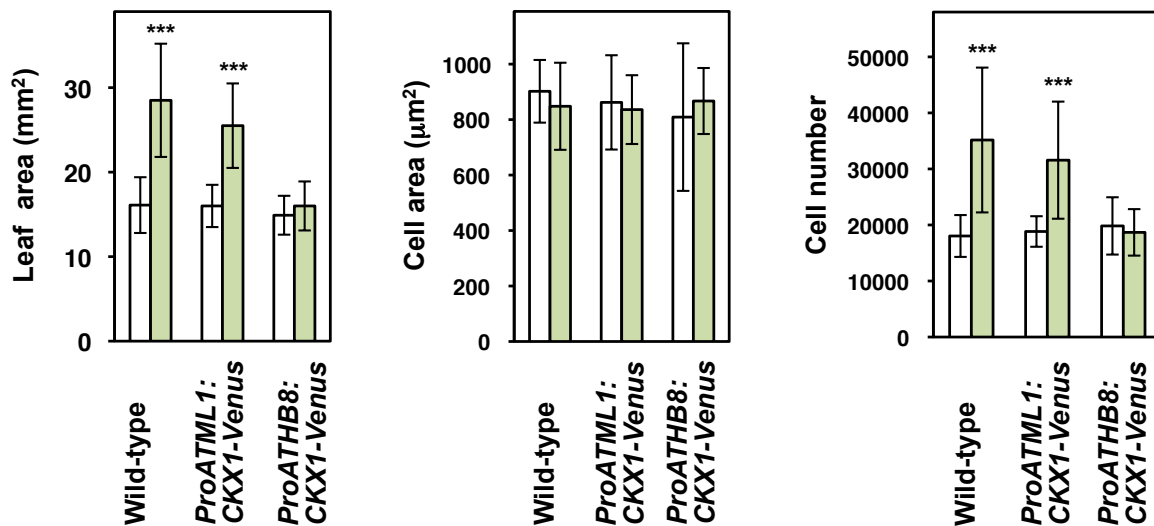


Figure 2-23. 維管束特異的なCKX1の発現はカフェンストロールで誘導される成長促進効果を細胞増殖レベルで抑圧した

30 nMのカフェンストロールを含む培地（緑色）あるいは含まない培地（白色）で育った、発芽後12日の野生型、*ProATML1:CKX1-Venus*、ならびに *ProATHB8:CKX1-Venus*の地上部において、発芽後10日の本葉第1葉の葉身の面積、表皮細胞の面積、ならびに細胞数を示す。値は平均±S.D. (n ≥ 11)。カフェンストロール処理と未処理の値を比較し、Student's t-testsによって有意差を算出した。*** P < 0.001

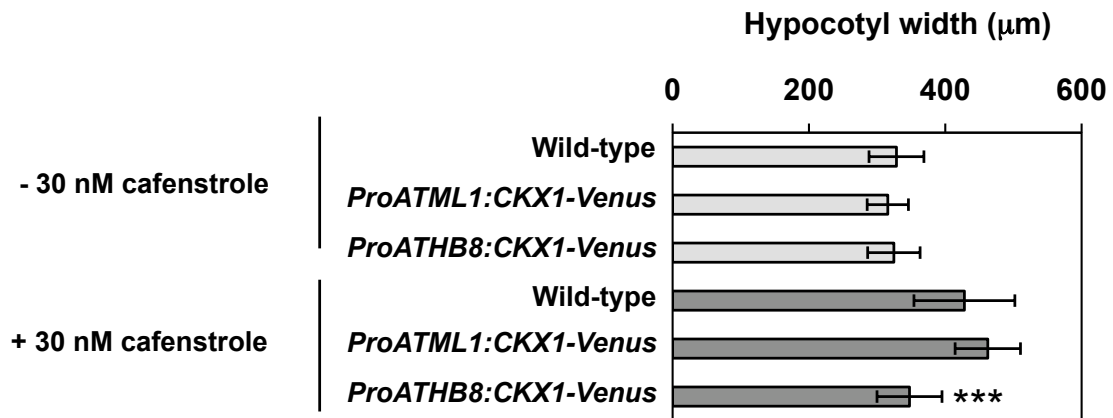


Figure 2-24. 維管束特異的なCKX1の発現はカフェンストロール処理により誘導される胚軸の肥大を抑圧する

30 nMのカフェンストロールを含む培地 (+)ならびに含まない培地(-)で育てた発芽後8日の芽生えにおいて、子葉の基部を基準として胚軸の直径を測定した。値は平均±S.D. (n ≥ 20)で示す。各系統においてカフェンストロール処理と未処理の値を比較し、Student's t-testsによって有意差を算出した。*** P < 0.001

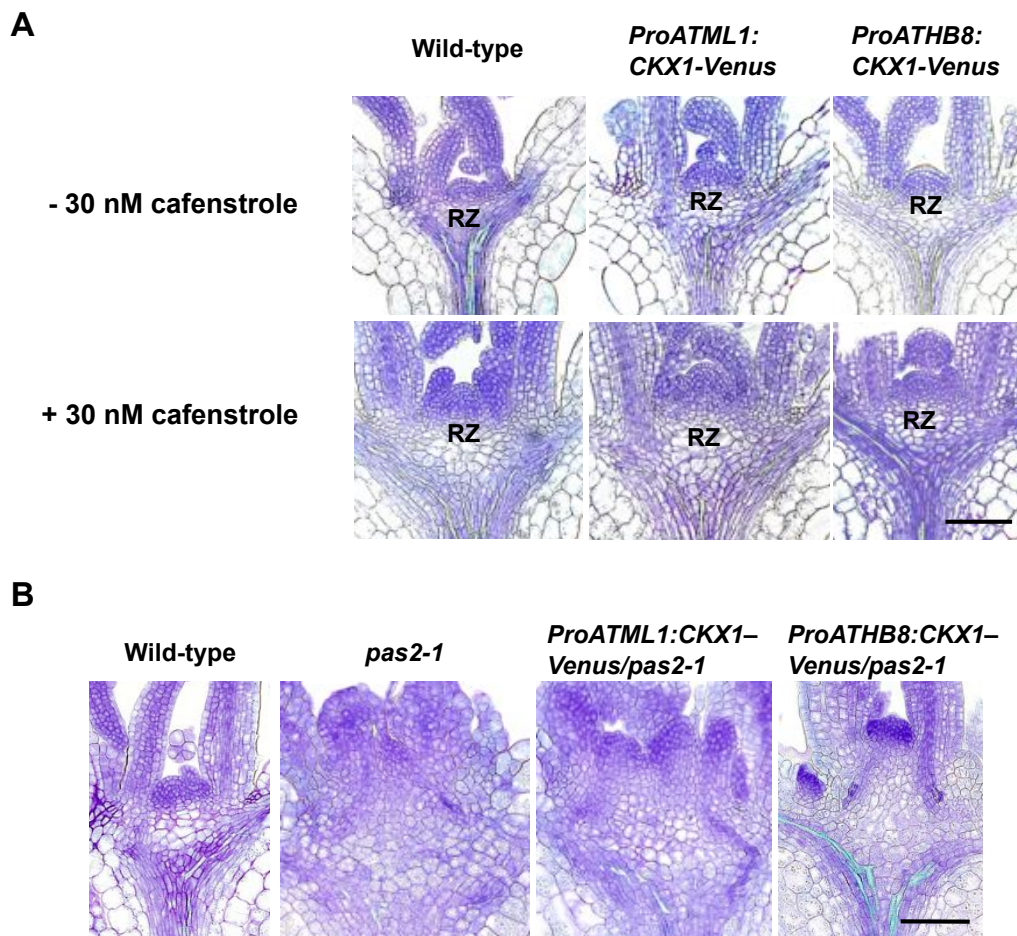


Figure 2-25. 維管束特異的なCKX1の発現は極長鎖脂肪酸の減少による細胞増殖の活性化を抑圧する

(A) 野生型, *ProATML1:CKX1-Venus*, ならびに *ProATHB8:CKX1-Venus*における, 発芽後5日目の茎頂における縦断切片を示す。

(B) 野生型, *pas2-1*変異体, ならびに*pas2-1*変異体バックグラウンドで*ProATML1:CKX1-Venus*もしくは *ProATHB8:CKX1-Venus*を発現させた植物体における, 発芽後7日目の茎頂における縦断切片を示す。

Bars, 100 μm

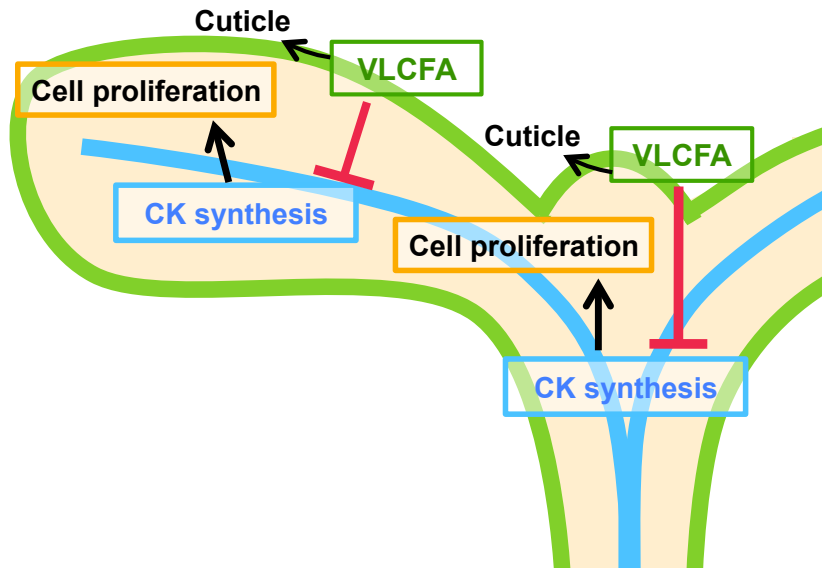


Figure 2-26. 極長鎖脂肪酸を介して表皮から細胞増殖を調節する機構

表皮で合成されたVLCFAが、細胞非自律的シグナルを介して、維管束におけるサイトカイニン（CK）合成を制限し、細胞増殖活性を調節している。VLCFAはクチクラワックスの合成にも使われるため、植物の発生において、クチクラ合成と細胞増殖活性がVLCFAを介して調節されていると考えられる。図中の緑、赤、青の線は、それぞれ表皮、細胞間シグナル経路、維管束を示す。

Hormone	3 DAG (pmol/g fresh weight)			5 DAG (pmol/g fresh weight)				
	w/o	30 nM	3 μ M	<i>pas2-1</i>	w/o	30 nM	3 μ M	<i>pas2-1</i>
tZ	1.08 \pm 0.22	2.22 \pm 0.07	2.31 \pm 0.25	6.36 \pm 0.85	0.81 \pm 0.22	0.95 \pm 0.10	1.44 \pm 0.24	4.49 \pm 0.24
tZR	2.50 \pm 0.36	36.69 \pm 2.68	29.17 \pm 0.97	118.64 \pm 18.09	1.63 \pm 0.38	6.49 \pm 1.17	19.66 \pm 2.07	108.23 \pm 15.53
tZRP	33.64 \pm 4.72	221.40 \pm 11.07	189.47 \pm 28.32	245.46 \pm 17.34	19.33 \pm 1.81	71.06 \pm 9.71	143.57 \pm 7.89	363.67 \pm 31.70
iP	0.79 \pm 0.18	2.38 \pm 0.15	2.47 \pm 0.20	1.76 \pm 0.31	0.57 \pm 0.09	1.44 \pm 0.23	2.85 \pm 0.34	1.70 \pm 0.03
iPR	0.25 \pm 0.03	1.76 \pm 0.11	1.45 \pm 0.06	2.14 \pm 0.24	0.17 \pm 0.01	0.74 \pm 0.08	1.78 \pm 0.15	3.13 \pm 0.59
iPRP	41.81 \pm 5.18	353.11 \pm 25.27	275.74 \pm 35.66	74.99 \pm 4.83	24.33 \pm 1.22	147.64 \pm 11.40	390.17 \pm 49.42	155.17 \pm 14.60
IAA	612.0 \pm 104.3	741.7 \pm 100.0	909.9 \pm 89.2	481.6 \pm 283.8	731.3 \pm 72.1	780.0 \pm 94.6	1546.4 \pm 273.0	624.9 \pm 115.5
GAI	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GA4	0.79 \pm 0.14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Table 1. *pas2-1*変異体ならびにカフェンストロール処理を行った植物体ではサイトカイニン含量が増加する

*pas2-1*変異体ならびに、カフェンストロールを含む培地(30 nM, 3 μ M)もしくは含まない培地(w/o)で育った植物体において、発芽後3日目 (3 DAG) ならびに5日目 (5 DAG) の植物体全体に含まれる、サイトカイニン、オーキシン、ならびにジベレリンの定量解析を行った。値は平均 \pm S.D. ($n \geq 3$)で示す。n.d., not detected

Cytokinin biosynthesis genes	Fold change (<i>pas2-1</i> /wild-type)
<i>IPT1</i>	0.9
<i>IPT2</i>	1.0
<i>IPT3</i>	3.9
<i>IPT4</i>	1.6
<i>IPT5</i>	0.8
<i>IPT6</i>	0.9
<i>IPT7</i>	1.5
<i>IPT8</i>	0.6
<i>IPT9</i>	1.0
<i>CYP735A1</i>	0.8
<i>CYP735A2</i>	6.6
<i>URH1</i>	1.5

Table 2. *pas2-1*変異体におけるサイトカイニン生合成関連遺伝子の発現変化

発芽後3日目の野生型および*pas2-1*変異体を用いてマイクロアレイ解析を行い、サイトカイニン生合成関連遺伝子の発現を調べた。それぞれ2回の解析の平均値を求め、野生型植物体の発現量を1としたときの相対値で示す。

iPRPs				
	0 h	6 h	12 h	24 h
w/o	30.70 ± 2.23	36.43 ± 2.78	38.78 ± 10.82	33.07 ± 2.89
30 nM		47.64 ± 3.88	41.64 ± 7.36	46.46 ± 11.17
3 μM		48.05 ± 13.40	77.63 ± 15.76	129.41 ± 33.31
iPR				
	0 h	6 h	12 h	24 h
w/o	0.20 ± 0.07	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.05	0.15 ± 0.05
30 nM		0.20 ± 0.06	0.17 ± 0.03	0.23 ± 0.08
3 μM		0.21 ± 0.02	0.30 ± 0.06	0.43 ± 0.05
iP				
	0 h	6 h	12 h	24 h
w/o	0.60 ± 0.15	0.49 ± 0.05	0.52 ± 0.09	0.48 ± 0.01
30 nM		0.56 ± 0.05	0.52 ± 0.04	0.54 ± 0.09
3 μM		0.54 ± 0.09	0.67 ± 0.05	0.74 ± 0.07
tZRP				
	0 h	6 h	12 h	24 h
w/o	6.74 ± 1.22	16.45 ± 3.65	21.12 ± 6.47	14.70 ± 2.14
30 nM		20.57 ± 3.37	23.26 ± 4.40	22.15 ± 0.51
3 μM		18.48 ± 6.73	30.96 ± 5.31	57.45 ± 10.35
tZR				
	0 h	6 h	12 h	24 h
w/o	1.06 ± 0.29	1.29 ± 0.20	1.43 ± 0.43	1.08 ± 0.25
30 nM		1.57 ± 0.11	1.69 ± 0.19	2.01 ± 0.27
3 μM		1.71 ± 0.51	3.45 ± 0.86	6.35 ± 1.12
tZ				
	0 hr	6 hrs	12 hrs	24 hrs
w/o	0.60 ± 0.21	0.72 ± 0.07	0.85 ± 0.18	0.67 ± 0.06
30 nM		0.85 ± 0.06	0.93 ± 0.21	0.86 ± 0.02
3 μM		0.75 ± 0.19	0.96 ± 0.14	1.25 ± 0.08

pmol/g fresh weight

Table 3. カフェンストロール処理後のサイトカイニン合成量の経時変化

通常のMS培地で育った発芽後3日の野生型植物体をカフェンストロールを含まない培地 (w/o), または30 nMもしくは3 μM含む培地に移して, 6, 12, 24, 48時間後に植物体全体をサンプリングし, サイトカイニンの定量解析を行った。値は平均±S.D. (n=3)で示す。

参考文献

- Abe, M., Katsumata, H., Komeda, Y. & Takahashi, T. (2003) Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development* 130: 635–643.
- Adachi, S., Uchimiya, H. & Umeda, M. (2006) Expression of B2-type cyclin-dependent kinase is controlled by protein degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 1683–1686.
- Adachi, S., Nobusawa, T. & Umeda, M. (2009) Quantitative and cell type-specific transcriptional regulation of A-type cyclin-dependent kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Biol.* 329: 306–314.
- Anastasiou, E., Kenz, S., Gerstung, M., MacLean, D., Timmer, J., Fleck, C. & Lenhard, M. (2007) Control of plant organ size by *KLUH/CYP78A5*-dependent intercellular signaling. *Dev. Cell* 13: 843–856.
- Austin II, J. & Webber, AN. (2005) Photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced chloroplast number. *Photosynth. Res.* 85: 373–384.
- Bach, L. & Faure, JD. (2010) Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. *C. R. Biol.* 333: 361–370.
- Bach, L., Michaelson, LV., Haslam, R., Bellec, Y., Gissot, L., Marion, J., Da Costa, M., Boutin, JP., Miquel, M., Tellier, F., Domergue, F., Markham, JE., Beaudoin, F., Napier, JA. & Faure, JD. (2008) The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105: 14727–14731.
- Baima, S., Nobili, F., Sessa, G., Lucchetti, S., Ruberti, I. & Morelli, G. (1995) The expression of the *Athb-8* homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 121: 4171–4182.
- Barttrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T. & Schmülling, T. (2011) Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and, Thus, Seed Yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 69–80.

- Baud, S., Bellec, Y., Miquel, M., Bellini, C., Caboche, M., Lepiniec, L., Faure, JD. & Rochat, C. (2004) *gurke* and *pasticcino3* mutants affected in embryo development are impaired in acetyl-CoA carboxylase. *EMBO Rep.* 5: 515–520.
- Beaudoin, F., Wu, X., Li, F., Haslam, RP., Markham, JE., Zheng, H., Napier, JA. & Kunst, L. (2009) Functional Characterization of the Arabidopsis b-Ketoacyl-Coenzyme A Reductase Candidates of the Fatty Acid Elongase. *Plant Physiol.* 150: 1174–1191.
- Bellec, Y., Harrar, Y., Butaeye, C., Darnet, S., Bellini, C. & Faure, JD. (2002) *Pasticcino2* is a protein tyrosine phosphatase-like involved in cell proliferation and differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32: 713–722.
- Bemis, SM. & Torii, KU. (2007) Autonomy of cell proliferation and developmental programs during Arabidopsis aboveground organ morphogenesis. *Dev. Biol.* 304: 367–381.
- Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Wu, X., Yephremov, A. & Samuels, L. (2007) Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J.* 52: 485–498.
- Black, PN., Faergeman, NJ. & DiRusso, CC. (2000) Long-chain acyl-CoA-dependent regulation of gene expression in bacteria, yeast and mammals. *J. Nutr.* 130: 305S–309S.
- Bohn-Courseau, I. (2010) Auxin: a major regulator of organogenesis. *C. R. Biol.* 333: 290–296.
- Borner, GH., Sherrier, DJ., Weimar, T., Michaelson, LV., Hawkins, ND., Macaskill, A., Napier, JA., Beale, MH., Lilley, KS. & Dupree, P. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* 137, 104–116.
- Brand, U., Fletcher, JC., Hobe, M., Meyerowitz, EM. & Simon, R. (2000) Dependence of Stem Cell Fate in Arabidopsis on a Feedback Loop Regulated by CLV3 Activity. *Science* 289: 617–619.
- Chen, M., Han, G., Dietrich, CR., Dunn, TM. & Cahoon, EB. (2006) The essential

- nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell* 18: 3576–3593.
- Chen, X., Goodwin, SM., Boroff, VL., Liu, X. & Jenks, MA. (2003) Cloning and characterization of the *WAX2* gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell* 15: 1170–1185.
- Culligan, KM., Robertson, CE., Foreman, J., Doerner, P. & Britt, AB. (2006) ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J.* 48:947–961.
- Da Costa, M., Bach, L., Landrieu, I., Bellec, Y., Catrice, O., Brown, S., De Veylder, L., Lippens, G., Inzé, D. & Faure, JD. (2006) *Arabidopsis* PASTICCINO2 is an antiphosphatase involved in regulation of cyclin-dependent kinase A. *Plant Cell* 18: 1426–1437.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, GT., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. & Inzé, D. (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 1653–1668.
- Dietrich, CR., Han, G., Chen, M., Berg, RH., Dunn, TM. & Cahoon, EB. (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of *Arabidopsis* *LCB2* genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.* 54: 284–298.
- Disch, S., Anastasiou, E., Sharma, VK., Laux, T., Fletcher, JC. & Lenhard, M. (2006) The E3 ubiquitin ligase *BIG BROTHER* controls *Arabidopsis* organ size in a dosage-dependent manner. *Curr. Biol.* 16: 272–279.
- Dissmeyer, N., Weimer, AK., Pusch, S., De Schutter, K., Alvim Kamei, CL., Nowack, MK., Novak, B., Duan, GL., Zhu, YG., De Veylder, L. & Schnittger, A. (2009) Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the *Arabidopsis* Cdk1 homolog CDKA;1. *Plant Cell* 21: 3641–3654.
- Faure, JD., Vittorioso, P., Santoni, V., Fraissier, V., Prinsen, E., Barlier, I., Van Onckelen, H., Caboche, M. & Bellini, C. (1998) The *PASTICCINO* genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and

- differentiation. *Development* 125: 909–918.
- Fiebig, A., Mayfield, JA., Miley, NL., Chau, S., Fischer, RL. & Preuss, D. (2000) Alterations in *CER6*, a gene identical to *CUT1*, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell* 12: 2001–2008.
- Fleming, AJ., McQueen-Mason, S., Mandel, T. & Kuhlemeier, C. (1997) Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. *Science* 276: 1415–1418.
- Franke, R. & Schreiber, L. (2007) Suberin – a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 202–259.
- Fujiwara, MT., Hashimoto, H., Kazama, Y., Abe, T., Yoshida, S., Sato, N. & Itoh, RD. (2008) The assembly of the FtsZ ring at the mid-chloroplast division site depends on a balance between the activities of AtMinE1 and ARC11/AtMinD1. *Plant Cell Physiol.* 49: 345–361.
- Gaigg, B., Toulmay, A. & Schneiter, R. (2006) Very long-chain fatty acid-containing lipids rather than sphingolipids per se are required for raft association and stable surface transport of newly synthesized plasma membrane ATPase in yeast. *J. Biol. Chem.* 281: 34135–34145.
- Galichet A, Hoyerová K, Kamínek M, Gruissem W (2008) Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146: 1155–1164.
- Galili, G. (1995) Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. *Plant Cell* 7, 899–906.
- Gao, H., Kadirjan-Kalbach, D., Froehlich, JE. & Osteryoung, KW. (2003) ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100: 4328–4333.
- Gleave, AP. (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.* 20: 1203–1207.
- Glynn, JM., Froehlich, JE., Osteryoung, KW. (2008) *Arabidopsis* ARC6 coordinates the division machineries of the inner and outer chloroplast membranes through interaction with PDV2 in the intermembrane space. *Plant Cell* 20: 2460–2470.

- Glynn, JM., Miyagishima, SY., Yoder, DW., Osteryoung, KW. & Vitha, S. (2007) Chloroplast division. *Traffic* 8: 451–461.
- Glynn, JM., Yang, Y., Vitha, S., Schmitz, AJ., Hemmes, M., Miyagishima, SY. & Osteryoung, KW. (2009) PARC6, a novel chloroplast division factor, influences FtsZ assembly and is required for recruitment of PDV1 during chloroplast division in *Arabidopsis*. *Plant J.* 59: 700–711.
- Gordon, SP., Chickarmane, VS., Ohno, C. & Meyerowitz, EM. (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106: 16529–16534.
- Greer, S., Wen, M., Bird, D., Wu, X., Samuels, L., Kunst, L. & Jetter, R. (2007) The cytochrome P450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 145: 653–667.
- Guivarc'h, A., Rembur, J., Goetz, M., Roitsch, T., Noin, M., Schmülling, T. & Chriqui, D. (2002) Local expression of the *ipt* gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation. *J. Exp. Bot.* 53: 621–629.
- Haberer, G., Erschadi, S. & Torres-Ruiz, RA. (2002) The *Arabidopsis* gene *PEPINO/PASTICCINO2* is required for proliferation control of meristematic and non-meristematic cells and encodes a putative anti-phosphatase. *Dev. Genes Evol.* 212: 542–550.
- Harrar, Y., Bellec, Y., Bellini, C. & Faure, JD. (2003) Hormonal control of cell proliferation requires *PASTICCINO* genes. *Plant Physiol.* 132: 1217–1227.
- Hay, A. & Tsiantis, M. (2009) A KNOX family TALE. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 593–598.
- Heisler, MG., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, GV., Long, JA. & Meyerowitz, EM. (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr. Biol.* 15: 1899–1911.
- Hooker, TS., Millar, AA. & Kunst, L. (2002) Significance of the expression of the

- CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 1568–1580.
- Hu, Y., Xie, Q. & Chua, NH. (2003) The *Arabidopsis* auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size. *Plant Cell* 15: 1951–1961.
- Ito, Y., Kimura, F., Hirakata, K., Tsuda, K., Takasugi, T., Eiguchi, M., Nakagawa, K. & Kurata, N. (2011) Fatty acid elongase is required for shoot development in rice. *Plant J.* 66: 680–688.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P. & Tsiantis, M. (2005) KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr. Biol.* 15: 1560–1565.
- Joubès, J., Raffaele, S., Bourdenx, B., Garcia, C., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Domergue, F. & Lessire, R. (2008) The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Mol. Biol.* 67: 547–566.
- Kakimoto, T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* 42: 677–685.
- Kojima, M., Kamada-Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K., Kuroha, T., Mizutani, M., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M., Suzuki, K. & Sakakibara, H. (2009) Highly-sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* 50: 1201–1214.
- Krizek, BA. (1999) Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs. *Dev. Genet.* 25: 224–236.
- Krizek, BA. (2009) Making bigger plants: key regulators of final organ size. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 17–22.
- Kunst, L. & Samuels, L. (2009) Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 721–727.
- Kuroiwa, T., Kuroiwa, H., Sakai, A., Takahashi, H., Toda, K. & Itoh, R. (1998) The

- division apparatus of plastids and mitochondria. *Int. Rev. Cytol.* 181: 1–41.
- Lee, SB., Jung, SJ., Go, YS., Kim, HU., Kim, JK., Cho, HJ., Park, OK. & Suh, MC. (2009) Two *Arabidopsis* 3-ketoacyl CoA synthase genes, *KCS20* and *KCS2/DAISY*, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *Plant J.* 60: 462–475.
- Li, L., Yu, X., Thompson, A., Guo, M., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J. & Yin, Y. (2009) *Arabidopsis* MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. *Plant J.* 58: 275–286.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, MX., Arondel, V., Bates, PD., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durrett, TP., Franke, RB., Graham, IA., Katayama, K., Kelly, AA., Larson, T., Markham, JE., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, KM., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R. & Ohlrogge, J. (2010) Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*. 8: e0133.
- Li, Y., Zheng, L., Corke, F., Smith, C. & Bevan, MW. (2008) Control of final seed and organ size by the *DA1* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 22: 1331–1336.
- Long, JA., Moan, EI., Medford, JI. & Barton, MK. (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379: 66–69.
- Maple, J., Vojta, L., Soll, J. & Møller, SG. (2007) ARC3 is a stromal Z-ring accessory protein essential for plastid division. *EMBO Rep.* 8: 293–299.
- Margolin, W. (2005) FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 862–871.
- Markham, JE., Molino, D., Gissot, L., Bellec, Y., Hématy, K., Marion, J., Belcram, K., Palauqui, JC., Satiat-Jeunemaître, B. & Faure, JD. (2011) Sphingolipids Containing Very-Long-Chain Fatty Acids Define a Secretory Pathway for Specific Polar Plasma Membrane Protein Targeting in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 2362–2378.

- Millar, AA., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, EM., Taylor, DC. & Kunst, L. (1999) *CUT1*, an Arabidopsis gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell* 11: 825–838.
- Millar, AA. & Kunst, L. (1997) Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J.* 12: 121–131.
- Millar, AA., Wrischer, M. & Kunst, L. (1998) Accumulation of very-long-chain fatty acids in membrane glycerolipids is associated with dramatic alterations in plant morphology. *Plant Cell* 10: 1889–1902.
- Miyagishima, SY., Froehlich, JE. & Osteryoung, KW. (2006) PDV1 and PDV2 mediate recruitment of the dynamin-related protein ARC5 to the plastid division site. *Plant Cell* 18: 2517–2530.
- Miyagishima, SY., Nishida, K., Mori, T., Matsuzaki, M., Higashiyama, T., Kuroiwa, H. & Kuroiwa, T. (2003) A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell* 15: 655–665.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. & Kakimoto, T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* 37: 128–138.
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G. & Kakimoto, T. (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 16598–16603.
- Miyazawa, Y., Sakai, A., Miyagishima, S., Takano, H., Kawano, S. & Kuroiwa, T. (1999) Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol.* 121: 461–469.
- Mizoi, J., Nakamura, M. & Nishida, I. (2006) Defects in CTP:PHOSPHORYLETHANOLAMINE CYTIDYLYLTRANSFERASE affect embryonic and postembryonic development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:3370–3385.

- Mongrand, S., Stanislas, T., Bayer, EM., Lherminier, J. & Simon-Plas, F. (2010) Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci.* 15: 656–663.
- Morita, MT. & Tasaka, M. (2004) Gravity sensing and signaling. *Curr. Opinl. Plant Biol.* 7: 712–718.
- Mou, Z., He, Y., Dai, Y., Liu, X. & Li, J. (2000) Deficiency in fatty acid synthase leads to premature cell death and dramatic alterations in plant morphology. *Plant Cell* 12: 405–418.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. & Kimura, T. (2007) Development of series of Gateway Binary Vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* 104: 34–41.
- Nakagawa, T., Nakamura, S., Tanaka, K., Kawamukai, M., Suzuki, T., Nakamura, K., Kimura, T. & Ishiguro, S. (2008) Development of R4 gateway binary vectors (R4pGWB) enabling high-throughput promoter swapping for plant research. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 624–629.
- Nakanishi, H., Suzuki, K., Kabeya, Y. & Miyagishima, SY. (2009) Plant-specific protein MCD1 determines the site of chloroplast division in concert with bacteria-derived MinD. *Curr. Biol.* 19: 151–156.
- Ohlrogge, J. & Browse, J. (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7, 957–970.
- Okazaki, K., Kabeya, Y., Suzuki, K., Mori, T., Ichikawa, T., Matsui, M., Nakanishi, H. & Miyagishima, SY. (2009) The PLASTID DIVISION1 and 2 components of the chloroplast division machinery determine the rate of chloroplast division in land plant cell differentiation. *Plant Cell* 21: 1769–1780.
- Osawa, M., Anderson, DE. & Erickson, HP. (2008) Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science* 320: 792–794.
- Osteryoung, KW., Stokes, KD., Rutherford, SM., Percival, AL. & Lee, WY. (1998) Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial *ftsZ*. *Plant Cell* 10: 1991–2004.
- Osteryoung, KW. & Vierling, E. (1995) Conserved cell and organelle division. *Nature*

376: 473–474.

- Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, RB., Höfer, R., Schreiber, L., Chory, J. & Aharoni, A. (2007) The Arabidopsis *DESPERADO/AtWBC11* transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol.* 145: 1345–1360.
- Perilli, S., Moubayidin, L. & Sabatini, S. (2010) The molecular basis of cytokinin function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 21–26.
- Pien, S., Wyrzykowska, J., McQueen-Mason, S., Smart, C. & Fleming, A. (2001) Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 11812–11817.
- Poincelot, RP. (1976) Lipid and Fatty Acid composition of chloroplast envelope membranes from species with differing net photosynthesis. *Plant Physiol.* 58: 595–598.
- Pyke, KA. & Leech, RM. (1991) Rapid Image Analysis Screening Procedure for Identifying Chloroplast Number Mutants in Mesophyll Cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 96: 1193–1195.
- Raffaele, S., Vailliau, F., Léger, A., Joubès, J., Miersch, O., Huard, C., Blée, E., Mongrand, S., Domergue, F. & Roby, D. (2008) A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 752–767.
- Reina-Pinto, JJ. & Yephremov, A. (2009) Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 540–549.
- Reyes-Prieto, A., Weber, AP. & Bhattacharya, D. (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu. Rev. Genet.* 41: 147–168.
- Roudier, F., Gissot, L., Beaudoin, F., Haslam, R., Michaelson, L., Marion, J., Molino, D., Lima, A., Bach, L., Morin, H., Tellier, F., Palauqui, JC., Bellec, Y., Renne, C., Miquel, M., Dacosta, M., Vignard, J., Rochat, C., Markham, JE., Moreau, P., Napier, J. & Faure, JD. (2010) Very-Long-Chain Fatty Acids Are Involved in Polar Auxin Transport and Developmental Patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 364–375.

- Rowland, O., Zheng, H., Hepworth, SR., Lam, P., Jetter, R. & Kunst, L. (2006) *CER4* encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142:866–877.
- Ruberti, I., Sessa, G., Lucchetti, S. & Morelli, G. (1991) A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *EMBO J.* 10:1787–1791.
- Rupp, HM., Frank, M., Werner, T., Strnad, M. & Schmülling, T. (1999) Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J.* 18: 557–563.
- Sakamoto, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Yamamoto, Y., Nagasaki, H., Inukai, Y., Sato, Y. & Matsuoka, M. (2006) Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiol.* 142: 54–62.
- Samuels, L., Kunst, L. & Jetter, R. (2008) Sealing Plant Surfaces: Cuticular Wax Formation by Epidermal Cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 277–290.
- Savaldi-Goldstein, S., Peto, C. & Chory, J. (2007) The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature* 446: 199–202.
- Savchenko, T., Walley, JW., Chehab, EW., Xiao, Y., Kaspi, R., Pye, MF., Mohamed, ME., Lazarus, CM., Bostock, RM. & Dehesh, K. (2010) Arachidonic Acid: An Evolutionarily Conserved Signaling Molecule Modulates Plant Stress Signaling Networks. *Plant Cell* 22: 3193–3205.
- Schneiter, R., Brügger, B., Amann, CM., Prestwich, GD., Epanand, RF., Zellnig, G., Wieland, FT. & Epanand, RM. (2004) Identification and biophysical characterization of a very-long-chain-fatty-acid-substituted phosphatidylinositol in yeast subcellular membranes. *Biochem. J.* 381: 941–949.
- Serralbo, O., Pérez-Pérez, JM., Heidstra, R. & Scheres, B. (2006) Non-cell-autonomous rescue of anaphase-promoting complex function revealed by mosaic analysis of *HOBBIT*, an *Arabidopsis CDC27* homolog. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 13250–13255.

- Sessions, A., Weigel, D. & Yanofsky, MF. (1999) The *Arabidopsis thaliana* *MERISTEM LAYER 1* promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J.* 20: 259–263.
- Sieber, P., Schorderet, M., Ryser, U., Buchala, A., Kolattukudy, P., Métraux, JP. & Nawrath, C. (2000) Transgenic Arabidopsis plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *Plant Cell* 12: 721–738.
- Smyczynski, C., Roudier, F., Gissot, L., Vaillant, E., Grandjean, O., Morin, H., Masson, T., Bellec, Y., Geelen, D. & Faure, JD. (2006) The C Terminus of the Immunophilin PASTICCINO1 Is Required for Plant Development and for Interaction with a NAC-like Transcription Factor. *J. Biol. Chem.* 281:25175–254784.
- Stokes, KD., McAndrew, RS., Figueroa, R., Vitha, S. & Osteryoung, KW. (2000) Chloroplast division and morphology are differentially affected by overexpression of *FtsZ1* and *FtsZ2* genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 124: 1668–1677.
- Strepp, R., Scholz, S., Kruse, S., Speth, V. & Reski, R. (1998) Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95: 4368–4373.
- Sturbois-Balcerzak, B., Vincent, P., Maneta-Peyret, L., Duvert, M., Satiat-Jeunemaitre, B., Cassagne, C. & Moreau, P. (1999) ATP-Dependent formation of phosphatidylserine-rich vesicles from the endoplasmic reticulum of leek cells. *Plant Physiol.* 120: 245–256.
- Szymkowiak, EJ. & Sussex, IM. (1996) WHAT CHIMERAS CAN TELL US ABOUT PLANT DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 351–376.
- Takei, K., Yamaya, T. & Sakakibara, H. (2004) *Arabidopsis* *CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-Zeatin. *J. Biol. Chem.* 279: 41866–71872.
- Tanaka, T., Tanaka, H., Machida, C., Watanabe, M. & Machida, Y. (2004) A new

- method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in *Arabidopsis*. *Plant J.* 37: 139–146.
- Tanaka, H., Watanabe, M., Sasabe, M., Hiroe, T., Tanaka, T., Tsukaya, H., Ikezaki, M., Machida, C. & Machida, Y. (2007) Novel receptor-like kinase ALE2 controls shoot development by specifying epidermis in *Arabidopsis*. *Development* 134: 1643–1652.
- To, JP., Haberer, G., Ferreira, FJ., Deruère, J., Mason, MG., Schaller, GE., Alonso, JM., Ecker, JR. & Kieber, JJ. (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* 16: 658–671.
- Todd, J., Post-Beittenmiller, D. & Jaworski, JG. (1999) *KCSI* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 17: 119–130.
- Trenkamp, S., Martin, W. & Tietjen, K. (2004) Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101: 11903–11908.
- Tucker, MR. & Laux, T. (2007) Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends Cell Biol.* 17: 403–410.
- Vernoux, T., Autran, D. & Traas, J. (2000) Developmental control of cell division patterns in the shoot apex. *Plant Mol. Biol.* 43: 569–581.
- Vitha, S., Froehlich, JE., Koksharova, O., Pyke, KA., van Erp, H. & Osteryoung, KW. (2003) ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2. *Plant Cell* 15: 1918–1933.
- Vitha, S., McAndrew, RS. & Osteryoung, KW. (2001) FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *J. Cell Biol.* 153, 111–120.
- Vittorioso, P., Cowling, R., Faure, JD., Caboche, M. & Bellini, C. (1998) Mutation in the *Arabidopsis PASTICCINO1* gene, which encodes a new FK506-binding protein-like protein, has a dramatic effect on plant development. *Mol. Cell Biol.* 18: 3034–3043.

- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. & Schmülling, T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532–2550.
- Werner, T. & Schmülling, T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 527–538.
- Wesley, SV., Helliwell, CA., Smith, NA., Wang, MB., Rouse, DT., Liu, Q., Gooding, PS., Singh, SP., Abbott, D., Stoutjesdijk, PA., Robinson, SP., Gleave, AP., Green, AG. & Waterhouse, PM. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27: 581–590.
- Wilson, ME., Jensen, GS. & Haswell, ES. (2011) Two Mechanosensitive Channel Homologs Influence Division Ring Placement in *Arabidopsis* Chloroplasts. *Plant Cell* 23: 2939–2949.
- Worrall, D., Ng, CK. & Hetherington, AM. (2003) Sphingolipids, new players in plant signaling. *Trends Plant Sci.* 8: 317–320.
- Wu, GZ. & Xue, HW. (2010) *Arabidopsis* β -ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase I is crucial for fatty acid synthesis and plays a role in chloroplast division and embryo development. *Plant Cell* 22: 3726–3744.
- Xiao, F., Goodwin, SM., Xiao, Y., Sun, Z., Baker, D., Tang, X., Jenks, MA. & Zhou, JM. (2004) *Arabidopsis* *CYP86A2* represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J.* 23: 2903–2913.
- Yamaoka, Y., Yu, Y., Mizoi, J., Fujiki, Y., Saito, K., Nishijima, M., Lee, Y. & Nishida, I. (2011) *PHOSPHATIDYLSERINE SYNTHASE1* is required for microspore development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 67: 648–661.
- Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A. & Ori, N. (2005) *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr. Biol.* 15: 1566–1571.
- Yang, X., Guschina, IA., Hurst, S., Wood, S., Langford, M., Hawkes, T. & Harwood, JL. (2010) The action of herbicides on fatty acid biosynthesis and elongation in barley and cucumber. *Pest Manag. Sci.* 66: 794–800.

- Yang, Y., Glynn, J.M., Olson, B.J., Schmitz, A.J. & Osteryoung, K.W. (2008) Plastid division: across time and space. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 557–584.
- Yephremov, A., Wisman, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K. & Saedler, H. (1999) Characterization of the *FIDDLEHEAD* gene of Arabidopsis reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *Plant Cell* 11: 2187–2201.
- Yun, M.S. & Kawagoe, Y. (2009) Amyloplast division progresses simultaneously at multiple sites in the endosperm of rice. *Plant Cell Physiol.* 50: 1617–1626.
- Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Misumi, O., Nishida, K., Yagisawa, F., Fujiwara, T., Nanamiya, H., Kawamura, F. & Kuroiwa, T. (2006) Isolated chloroplast division machinery can actively constrict after stretching. *Science* 313: 1435–1438.
- Zheng, H., Rowland, O. & Kunst, L. (2005) Disruptions of the Arabidopsis Enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *Plant Cell* 17: 1467–1481.

謝辞

本研究は、梅田正明教授の熱心なご指導の下で行われました。単に学位取得をさせるのではなく、私を一人前の研究者へと育てることを意識してくださりながら、6年間にわたって手厚くご指導くださりましたことに深く感謝いたします。また、特に研究実験の遂行や、投稿論文ならびに本論文の執筆に際しまして、懇切にご指導ご協力をくださりました、奥島葉子助教に深く感謝いたします。加えて、研究結果や内容について議論していただき、貴重な意見や配慮をくださりました、研究室内外の多数の皆様には感謝いたします。

本研究の研究結果のうち、植物ホルモンの定量解析は理化学研究所の榊原均博士ならびに小嶋美紀子博士に、透過型電子顕微鏡観察は日本女子大学の永田典子博士らに、脂質の定量分析は本学技術職員の塚本順子様、GeneChip 解析は東京大学の岩本訓知様に、それぞれ多大なるご協力をいただきました。ここに深くお礼申し上げます。

本研究を行う上で、*pasticcino* 変異体群はフランス INRA の Jean-Denis Faure 博士に、*Pro35S:PDV2* 系統、*ProFtsZ2:FtsZ2-GFP* 系統および *pdv2* 変異体は国立遺伝学研究所の宮城島進也博士に、*ipt3;5;7* 変異体および *ProIPT3-GUS* 系統は大阪大学の柿本辰男博士に、*ProCYCB1;2:GUS* 系統はカリフォルニア大学デービス校の Anne Britt 博士に、*ProPDF2:GUS* 系統は岡山大学の高橋卓博士に、*mod1* 変異体は中国科学院の Jiayang Li 博士に、*fdh* 変異体は名古屋大学の町田泰則博士に、種々の pGWB ベクターは島根大学の中川強博士に、pAN19 ベクターは本学の加藤壮英博士に、それぞれ快く提供していただきましたことに、お礼申し上げます。

論文投稿にあたりましては、英語論文の校閲を丁寧にしていただきました本学の Ian Smith 教授や、ご意見をいただきました東京工業大学の太田啓之博士、ならびに INRA の Jean-Denis Faure 博士に感謝いたします。

学資面におきましては、両親である明・由美子夫妻からの多大なる援助をいただけ、不自由なく研究生活を送ることができました。おふたりからの理解と愛情にこころから感謝いたします。また、伯母様やご祖母様をはじめ、経済的にも助け、応援していただきました親族の皆様には深くお礼申し上げます。加えて、日本学術振興会の特別研究員に採用していただき、支援をいただけましたことに、関係者の皆様にお礼申し上げます。

最後に、ときに大きな不安と困難を伴った大学院での研究生活を乗りきれだけの精神的な強さを与え、さまざまなかたちで支えて励ましてくれた、両親や親しい友人たち、そしてある女性に特別な深い感謝を送ります。