

根冠細胞の剥離に関与する細胞壁関連酵素
遺伝子の機能解析

神谷 雅子
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 植物発生シグナル
(中島 敬二 教授)

平成 28 年 10 月 25 日提出

目次

1.	序論	3
2.	材料と方法	8
3.	結果	13
4.	考察	21
5.	図表	26
6.	謝辞	61
7.	参考文献	62

序論

種子植物の根端は、根冠組織 (Root cap : RC) に包み込まれている。根冠は根の重力屈性や根端分裂組織の保護、土壌への代謝物の分泌など、根の成長のみならず、植物個体の生育に重要な機能を担う。モデル植物のシロイヌナズナにおいて、根冠は 4-5 層からなるコルメラ (Columella) と、それを取り囲む側部根冠 (Lateral root cap : LRC) からなる (図 1A)。これらの組織は、根端分裂組織 (Root meristem : RM) に存在する細胞系譜の異なる 2 種類の幹細胞から生み出される。根端分裂組織においては、数細胞からなる静止中心 (Quiescent center : QC) を取り囲むように、根の各組織を生み出す幹細胞 (始原細胞) が配置されており (Dolan et al., 1993、Scheres et al., 1994)、静止中心は細胞非自律的に周囲の幹細胞を維持する役割を持つ (van den Berg et al., 1997、Sarkar et al., 2007)。コルメラ細胞は、静止中心の真下に位置するコルメラ始原細胞 (Columella initial cell) の並層分裂で生じた娘細胞から分化する (図 1B)。一方、側部根冠は、表皮 (Epidermis : Ep) と側部根冠に共通の始原細胞 (表皮・側部根冠始原細胞、Ep/LRC initial cell : ELI) の規則正しい分裂と分化により生産される (図 1C)。このようにして、2 種類の異なる始原細胞から生み出されたコルメラ細胞と側部根冠細胞は、同心円状の層構造を維持しながら協調的に分化し、成熟してゆく (Wenzel and Rost., 2001)。そのため、根冠では新しい細胞層が作られるにつれて、古い細胞層が根の外側へと押し出され、最外層の細胞から順に欠失するターンオーバーを繰り返す。

シロイヌナズナにおいて、根冠分化の最終ステップである最外層の欠失には、2 つの異なる過程が関与する。一つは、側部根冠細胞のプログラム細胞死 (Programmed cell death : PCD) である。植物のプログラム細胞死は、免疫応答や、薬分化過程のタペート細胞、胚柄、根の木部など、様々な組織の発生・分化過程で起こる (reviewed by van Hautegeem et al., 2015)。シロイヌナズナの根端は、細胞分裂が活発に起こる meristematic zone、細胞伸長に備え細胞壁の再構築や液胞が発達する transition zone、細胞伸長が起こる elongation zone、細胞が可視的に分化する differentiation zone からなるが (reviewed by Verbelen et al., 2006)、側部根冠のプログラム細胞死は、elongation zone に位置する PCD site I と、コルメラとつながる位置にある PCD site II と呼ばれる 2 つの領域で起こる (図 2 赤矢印) (Fendrych et al., 2014)。側部根冠のプログラム細胞死では、液胞の崩壊で引き起こされる細胞質の pH の低下に続き、老化や細胞死に関与する S1-P1 型ヌクレアーゼの BFN1 が関与することが示唆されている (Fendrych et al., 2014)。また、プログラム細胞死に関与する酵素遺伝子の発現は、PCD に先立って PCD

build-up zone と呼ばれる領域で起こることが明らかになっている (Fendrych et al., 2014)。

根冠最外層の欠失に関与するもう 1 つの過程は、コルメラと側部根冠の一部からなる根冠先端部の細胞が、生きたまま剥離する過程である。ワタやエンドウマメの根の先端部を水に浸けると、個々の根冠細胞が独立して剥がれ落ちる。これらの剥離する根冠細胞は、根の表面と土壌の境目にあることから **Border cell (BC)** と名付けられている (Hawes and Lin, 1990)。BC は土壌中に放出され、根圏環境の形成に機能していると考えられている。そして、エンドウマメの BC の剥離過程に、ペクチン分解酵素やペクチンメチルエステラーゼが関与することが示唆されている (Hawes and Lin, 1990, Stephenson and Hawes, 1994, Wen et al., 1999)。シロイヌナズナの根冠細胞は、ワタやエンドウマメとは異なり、層構造を保ったまま剥がれ落ちることから (図 2A,B 黄矢印)、これらの剥離する細胞群は、**Border-like cell (BLC)** と名付けられている (Vicré et al., 2005)。BLC は、多くのミトコンドリア、小胞体、ゴルジ層板、またゴルジ由来の小胞を持ち、細胞壁成分のペクチン多糖やアラビノガラクトタンパク質 (arabinogalactan proteins : AGPs) などを細胞外へ輸送していることが示唆されている (Vicré et al., 2005, Driouich et al., 2007)。また、シロイヌナズナの BLC の剥離様式に、ペクチン主鎖のホモガラクトuronan を合成する糖鎖転移酵素をコードすると推定される *QUASIMODO1 (QUA1)* や、ペクチンメチル基転移酵素をコードすると推定される *QUA2* が関与することから、BLC の剥離はペクチンの主鎖を構成するホモガラクトuronan (Homogalacturonan : HG) の量や性状に依存することが示唆されている (Durand et al., 2009)。また、根冠特異的に発現し、セルロース分解酵素をコードすると予測される *CELLULASE5 (CEL5)* 遺伝子が関与することも示唆されているが (del Campillo et al., 2004)、その寄与は必ずしも大きくない。BLC の剥離過程を制御する分子メカニズムは、ほとんど明らかになっていない。

植物の細胞壁は、様々な多糖やタンパク質によって複雑に構成され、細胞に力学的強度を持たせている。また、生物的・非生物的なストレスにも対抗している。細胞壁の構成成分は、主にセルロース、ヘミセルロース、ペクチンである。双子葉類の一次細胞壁は、セルロースが約 30%、ヘミセルロースが約 30%、ペクチンが約 35% 含まれる。一次細胞壁の基本骨格は、結晶性のセルロース微繊維の間をヘミセルロースが架橋し、その隙間をペクチンが充填している。ペクチンは、酸性多糖であるホモガラクトuronan、キシロガラクトuronan (Xylogalacturonan : XGA)、ラムノガラクトuronan I (Rhamnogalacturonan : RG-I)、そしてラムノガラクトuronan II (RG-II) からなる。ホモガラクトuronan は D-ガラクトuron酸が α -1,4-結合したポリガラクトuron酸の直鎖上ポリマーを主鎖とし、ガラクトuron酸のカルボキシル基がメチルエステル化されたものはペク

チン、メチルエステル化されていないものはペクチン酸と呼ばれる。また、ホモガラクトuronanは、カルシウムイオンを介して架橋され、ゲル化される。これらの物理的特性により、ペクチンは細胞壁の接着剤として機能すると考えられているが、細胞分化、形態形成、器官脱離、果物の軟化などの多様な機能も果たしている (reviewed by Fischer and Bennett, 1991、Mohnen, 2008)。ペクチンの分解には、複数のペクチン分解酵素 (Pectinase) が関与する。ペクチン分解酵素には、ポリガラクトuron酸の α -1,4-結合を加水分解するポリガラクトナーゼ (Polygalacturonase : PG) (図 3)、メチルエステル化されたペクチンを脱離分解するペクチンリアーゼ (Pectin lyase)、そしてペクチンのメチルエステル結合を切断するペクチンメチルエステラーゼ (Pectin methylesterase : PME) が含まれる。シロイヌナズナの花粉四分子の分離における細胞壁の分解は、PME をコードする *QUARTET1* (*QRT1*)、PG をコードする *QRT2*、*QRT3*、*ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1* (*ADPG1*)、*ADPG2* などによって制御されている (Preuss et al., 1994、Rhee and Somerville, 1998、Rhee et al., 2003、Francis et al., 2006、Ogawa et al., 2009)。これら PG をコードする遺伝子のうち *QRT2*、*ADPG1* および *ADPG2* は、Glycosyl Hydrolase 28 (GH28) と呼ばれる共通のドメインを持ち、同一の遺伝子ファミリーに属している (Ogawa et al., 2009、Tyler et al., 2010)。シロイヌナズナのゲノムには、GH28 ドメインを持ち PG をコードする遺伝子が 67 個存在する。それらのうち 85% の遺伝子がコードするタンパク質は推定シグナルペプチドを持つことから、細胞壁に輸送されて機能することが示唆されている (Cao, 2012)。しかし、多くのペクチン分解酵素について、生物学的機能はほとんどわかっていない。

シロイヌナズナにおける根冠分化のマスター制御因子として NAC (*NAM*、*ATAF*、*CUC*) 型転写因子の *SOMBRERO* (*SMB*)、*BEARSKIN1* (*BRN1*) および *BRN2* (以下、*BRN1* と *BRN2* を *BRN1/2* と総称する) が知られている (Willemsen et al., 2008、Bennett et al., 2010、Waki et al., 2013)。これらは、NAC 転写因子ファミリーのグループ I に属するが、この clade には木部分化や二次壁形成のマスター因子である 7 個の *VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN* 転写因子 (*VND1-VND7*) や、3 つの *NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR* (*NST1-NST3*) が含まれる (Pereira-Santana et al., 2015)。*VND6* と *VND7* は、それぞれ後生木部 (metaxylem : MX) と原生木部 (protoxylem : PX) の道管分化過程において、プログラム細胞死や二次壁の形成を制御することが明らかになっている (Demura et al., 2002、Kubo et al., 2005、Ohashi-Ito et al., 2010)。また、*NST1* および *NST2* は薬壁内皮細胞層の二次細胞壁の形成、*NST1* および *NST3* は茎、胚軸や鞘で二次木部の形成を正に制御することが明らかになっている (Mitsuda et al., 2005、Mitsuda et al., 2007)。しかし、根冠分化過程にお

ける *SMB* および *BRN1/2* の下流遺伝子については不明である。

これまでに、根冠細胞における *SMB* および *BRN1/2* の発現が報告されている (Willemsen et al., 2008、Bennett et al., 2010)。所属研究室では、細胞自律的な核局在 YFP-GUS タンパク質を用いたレポーターラインを作成することで、*SMB* および *BRN1/2* のより詳細な発現パターンが解析された。*SMB* はこれまでの報告通り分化した根冠細胞で発現するのに対し、*BRN1* および *BRN2* の発現は、根冠全体ではなく、根冠の外側 1-2 層に限定されていることが確かめられた (図 4A, 5A-D)。また、変異体解析の結果、*smb* 変異体は、コルメラ始原細胞及び表皮・側部根冠始原細胞の分裂異常による層構造の乱れが観察されるとともに、側部根冠のプログラム細胞死や根端部の剥離異常により根冠の細胞層数が増加することが報告されている (Willemsen et al., 2008、Bennett et al., 2010)。これに対し、*BRN1* および *BRN2* は単独変異体では表現型を示さないが、*brn1 brn2* 二重変異体においては、根端先端部の剥離異常のみが観察され、*smb brn1 brn2* 三重変異体では、*smb* 変異体をより重篤化した表現型が観察されることが報告されている (Willemsen et al., 2008、Bennett et al., 2010)。また、*SMB*, *BRN1*, *BRN2* 遺伝子を 35S プロモーターの制御下で誘導的に過剰発現させると、根の維管束に異所的な二次細胞壁を合成することが観察されたことから、*SMB* および *BRN1/2* には、重複した機能があることが示唆されている (Bennett et al., 2010)。また、*SMB*, *BRN1*, *BRN2* 遺伝子を 35S プロモーターの制御下で誘導的に過剰発現させると、同じ NAC 転写因子グループの *VND/NST* と同様に、根の維管束に異所的な二次細胞壁を合成することが観察されているが、これらは異所的な過剰発現による人工的な表現型である可能性が高い (Bennett et al., 2010)

所属研究室において、過去に行われたアクチベーションタギングスクリーニングにより、根の表皮細胞が失われるドミナント変異体 *urp7-D* が単離され、発芽後の根で特異的に *SMB* を過剰発現する変異体であることが明らかになった (中西・修士論文, 2009、Waki et al., 2013)。また、*SMB* および *BRN1/2* が転写活性化因子であることが確かめられた (磯本・修士論文, 2011)。そして、誘導的 *SMB* 過剰発現体や *smb* 変異体を用いたマイクロアレイ解析により、*SMB* の下流で機能する下流候補遺伝子が 30 個見出された。これらの遺伝子は、プログラム細胞死、細胞壁多糖の代謝、脂質代謝、防御応答への関与が予測されるタンパク質などをコードしていた。その中の 19 遺伝子については、野生型背景におけるレポーター解析により、根冠の最外層で優先的に発現することが確かめられた (東尾・修士論文, 2012)。さらに *smb brn1 brn2* 三重変異体を用いたマイクロアレイ解析が行われ、*SMB* 過剰発現体で発現が上昇し、*smb brn1 brn2* 三重変異体で発現が低下し、かつ根冠で優勢に発現すると予測される 3 つの遺伝子が新たに見出された (表 1-No. 14, 15, 21)。

私は、シロイヌナズナの根冠分化の最終ステップにおいて、側部根冠細胞のプログラム細胞死と根端先端部最外層の生細胞の剥離という2つの異なる過程が時空間的に精密に制御され、根冠組織を構成する細胞がターンオーバーすることに興味を持った。その中でも、根冠先端部の最外層がBLCとして、生きたまま、かつ層構造を保ちながら剥離する過程を明らかにしたいと考えた。そして、これらの細胞が自己の細胞壁成分を自律的に分解、あるいは構造変換するための遺伝的プログラムを保持しているのではないかと予測した。根冠分化のマスター因子と提唱される *SMB* および *BRN1/2* の下流で機能すると考えられる22個の候補遺伝子の中に、細胞壁多糖の代謝に関与すると予想される4つの遺伝子 (*AT2G32610*、*AT3G47400*、*AT2G32620* および *AT1G65570*) が含まれていた (表 1-No. 5, 6, 14, 21)。そこで、本研究では、これまでに同定された *SMB* および *BRN1/2* 下流候補遺伝子の機能解析を通じ、シロイヌナズナにおいて根冠先端部の最外層の生細胞が剥離するメカニズムを明らかにすることを試みた。

材料と方法

植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の accession Columbia-0 (Col-0) を、野生型として用いた。*smb* 変異体 (*smb-3*; SALK_143526C) (Willemsen et al., 2008)、*brn1* 変異体 (*brn1-1*; SALK 151986)、*brn2* 変異体 (*brn2-1*; SALK 151604) (Bennett et al., 2010) は、Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) より入手したラインを用いた。これらの多重変異体は、既に所属研究室でホモラインが確立されていたものを用いた。*rcpg* 変異体 (GABI_100C05) は、ABRC より入手した。表 2 に示すプライマーセット (At1G65570 LP、At1G65570 RP、GABI-o8409) を用いてホモ挿入ラインを確立した。

発現解析に用いた転写レポーターライン、*pSMB-nYG/Col*、*pSMB-nYG/smb*、*pSMB-nYG/brn1 brn2*、*pSMB-nYG/smb brn1 brn2*、*pBRN1-nYG/Col*、*pBRN1-nYG/smb*、*pBRN2-nYG/Col*、*pBRN2-nYG/smb*、*pCSLB1-nYG/Col*、*pPME33-nYG/Col* については、所属する研究室で既にホモ接合体が確立されていた。*SMB*、*BRN1*、*BRN2*、*CSLB1*、および *PME33* 遺伝子の発現解析には、それぞれ開始コドン上流の 4,137-bp、2,583-bp、3,849-bp、708-bp、973-bp の DNA 断片をプロモーター領域として用いて (*pSMB*、*pBRN1*、*pBRN2*、*pCSLB1*、*pPME33* とする) レポーターラインを作成した。*CSLB2* および *RCPG* については、新たにレポーターコンストラクトを作製し、野生型シロイヌナズナ植物に導入した (*pCSLB2-nYG/Col* 及び *pRCPG-nYG/Col*)。 *CSLB1* 及び *PME33* の各レポーターラインは *smb brn1 brn2* 三重変異体と交配し、F3 または F4 で分離した個体から、*smb* 単独変異体、*brn1 brn2* 二重変異体、および *smb brn1 brn2* 三重変異体の各遺伝子型を持つラインを確立した。遺伝子型の決定においては、*smb* 変異体は表 2 に示す *SMB(-)246*、*SMB-398c* と *pROK-RB1* プライマーセット、*brn1* 変異体は *SBL2-1246c*、*SBL2-606* と *LBc1* プライマーセット、*brn2* 変異体は *SBL1-140*、*SBL1-468c* と *LBc1* プライマーセットを用いた。*RCPG* については、それぞれの変異体植物に直接アグロバクテリウムを介して、レポーターコンストラクト (*pRCPG-nYG*) を導入した。*smb* 単独変異体、*brn1 brn2* 二重変異体、および *smb brn1 brn2* 三重変異体背景の植物体は、野生型の柱頭にレポーターラインの花粉を受粉し、得られた F1 個体の根を観察することで、レポーターの発現の低下が *smb* や *brn1*、*brn2* の変異によるものであることを確認した (後述)。

タンパク質レベルでの発現解析に用いた *pRCPG-gRCPG-tagRFP/Col*、過剰発現体解析で用いた *35S:GVG-UAS-erGFP/UAS-RCPG*、そして *rcpg* 変異体の相補実験に用いた *pRCPG-gRCPG-tagRFP/rcpg* は、以下に記す方法で作製した。

植物体の生育条件

シロイヌナズナの種は 2% Plant Preservative Mixture (PPM, Plant Cell Technology)、0.1% (v/v) TritonX-100、50 µg/mL MgSO₄ の溶液で、室温の回転ローターを用いて一晩滅菌処理した後、4°Cの暗所で 2 日間の低温処理を行った。その後、2.5 mM KNO₃、1.25 mM KPO₄、1 mM Ca(NO₃)₂、1 mM MgSO₄、35 µM Fe-EDTA、7 µM MnCl₂、5 µM NaCl、0.5 µM ZnSO₄、0.25 µM CuSO₄、0.1 µM NaMoO₄、0.005 µM CoCl₂、1% (w/v) Sucrose および 1% (w/v) agar を含む、シロイヌナズナ培養用寒天培地 (Okada and Shimura, 1992) に播種した。そして、23°C の長日条件 (16 時間明所/8 時間暗所) 下で培地を垂直に立てて発芽させたものを使用した。また、交配や種子を回収するため、発芽後 10 日前後の植物体を培養土に植え替え、23°C の長日条件下 (16 時間明所/8 時間暗所) で生育させた。

RT-PCR 法を用いた発現解析

発芽後 5 日目の 30 個体から根端部の約 5 mm をチューブに回収し、液体窒素で凍結させ、RNeasy Plant mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて total-RNA を抽出した。逆転写反応は、300 ng total-RNA を鋳型として、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA, Shiga, Japan) を用いた反応液を調製し、一本鎖 cDNA を作成した。RCPG の RT-PCR 解析は、作成した cDNA を鋳型として Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO, Osaka, Japan) で反応液を調整し [94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 30 sec] の PCR プログラムを 30 cycle 行った。増幅装置には、TaKaRa PCR Thermal Cycler (TaKaRa, Shiga, Japan) を用いた。開始コドンから終始コドンまでの全長を挟む 1,194-bp は、表 3 に示すプライマー At1g65570_RT_For と At1g65570_RT_Rev、第 1 イントロンを挟む 435-bp 断片は PL_F12 (+)56 と PL_R (+836)、第 2 イントロンを挟む 116-bp 断片は PL_qRT_F2 と PL_qRT_R2、そして、第 3 エキソン内の 142-bp は PL_qRT_F3 と At1g65570_RT_Rev を用いた。コントロールとしては、TUB4 を用いた (TUB4_Fw と TUB4_Rv)。

qRT-PCR 法を用いた発現解析

上記と同様の方法で total-RNA を抽出した。逆転写反応は、490 ng total-RNA を鋳型として、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA, Shiga, Japan) を用いた反応液を調製し、一本鎖 cDNA を作成した。作成した cDNA を鋳型として SYBER Premix Ex Taq (Takara bio co, Shiga, Japan) を用いた反応液を調製し、LightCycler 96 system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて [95°C, 10 sec; 54°C, 10 sec; 72°C, 10 sec] の PCR プログラムを 45 cycle 行った。

RCPG 遺伝子は表 3 に示した PL_qRT_F2 と PL_qRT_R2 プライマーセットを用いた。コントロールとしては *ACT2* を用いた (*ACT2*-qPCR-Fw と *ACT2*-qPCR-Rv)。

コンストラクションの作製

CSLB2 および *RCPG* 遺伝子の転写レポーターの作成には、5' 上流配列 1,229-bp および 1,752-bp (*pCSLB2* および *pRCPG* とする) を表 3 に示すプライマー Bam-At2g32620-ProEnd-R と Xho-At2g32620-(-)1229、Bam-At1g65570-ProEnd-R と Xho-At1g65570-(-)1752 を用いて増幅し、植物におけるカナマイシン耐性遺伝子と核移行型 EYFP : GUS 融合レポーター (nls:EYFP:GUS; nYG) 遺伝子を持つ *pBI-Kan-NLS-EYFP-GUS* ベクターに挿入した (*pCSLB2-nYG*、*pRCPG-nYG*)。

RCPG の過剰発現体は、Col ゲノム DNA を鋳型とし、表 3 に示したプライマー、Spe-Pectin-lyase-CtR と Apa-Pectin-Lyase-Nt を用いて 1,749-bp の *RCPG* ゲノム断片を増幅し、*pBIB-UAS-NosT* に挿入した。そして、カナマイシン耐性を持つ *35S:GVG-UAS-erGFP* 植物体へ形質転換した (*35S:GVG-UAS-erGFP/UAS-RCPG*)。

RCPG のタンパク質の局在解析には、Gateway Technology (Life technologies, CA) を用いて宮島俊介博士から分与して頂いたベクターを用いて作製した。表 3 に示した ProAt1g65570 For と ProAt1g65570 Rev プライマーを用いて *RCPG* 遺伝子の 5' 上流配列 1,749-bp (*pRCPG* とする) を増幅し、*pDONRP4_P1R* ベクターに BP clonase を用いて挿入した。*RCPG* のコード領域とイントロンを含む断片 (gRCPG) は、表 3 に示した At1g65570 For と At1g65570 Rev プライマーセットを用いて *RCPG* のゲノム断片 1,749-bp を増幅し *pDONR221* ベクターに BP clonase を用いて挿入した。これらのプラスミドと tagRFP を持つ *pDONR P2R_P3-tagRFP-OcsT* を、Basta 耐性遺伝子を持つディスティネーションベクター *pBm43GW* に LR clonase を用いて挿入した (Karimi et al., 2005)。

形質転換体の作成

シロイヌナズナの野生型および各変異体の形質転換は、アグロバクテリウムを介した floral dip 法 (Clough and Bent, 1998) で行った。目的のコンストラクトを持つプラスミドを *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (pMP90) 株へ形質転換し、抗生物質を含む LB 培地で培養した後、5% [w/v] sucrose, 0.05% [v/v] silwet L-77 に懸濁した。懸濁液を、花芽および腋芽に浸透させ、高湿度下で一晩静置した後、さらに 4 週間生育させた植物体から T0 種子を回収した。それぞれのラインについて、薬剤耐性を持つ T1 形質転換体 15~30 ラインを選別した。T2 世代において、薬剤耐性個体が 3 : 1 に分離するラインを一遺伝子座への挿入ラインとみなして選別した。T3 世代においてホモ挿入ラインを確立した。

顕微鏡観察

蛍光レポーターの観察は、C2-ECLIPSE 80i confocal laser-scanning microscope (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて行った。シロイヌナズナの根冠先端部では、種子の発芽 5 日後に初めの最外層が剥離することが報告されている (Vicré et al., 2005) ため、発芽後 4 日目の根端約 1 cm をメスで切断して採取し、10 μ M propidium iodide (PI) または 2 μ g/mL fluorescein diacetate (FDA) の溶液でマウントし、細胞を可視化した。RCPG 過剰発現体の観察には、dexamethasone (DEX) 誘導型過剰発現植物体 (T2) を、20 μ M ハイグロマイシンを含む寒天培地上で 5 日育てた後、1 μ M DEX を添加した寒天培地に移し替え、3 日後に観察した。rcpg 変異体の観察には、剥離する最外層に対する物理的刺激を最小限に抑えるため、根を寒天培地ごとスライドガラスに移し、PI または FDA 溶液を滴下して、静かにカバーガラスをかけたものを用いた。

クロマチン免疫沈降 (Chromatin Immunoprecipitation : ChIP)、ChIP-sequence 及び ChIP-qPCR 解析

ChIP 解析は、Arabidopsis Protocols (Human press, 405-426 ページ) を参考に、理化学研究所の金鐘明博士との共同研究により行った。本解析には、SMB 及び BRN1 と GFP 融合タンパク質を発現する植物体の根 (*pSMB-SMB-GFP/smb* 及び *pBRN1-BRN1-GFP/brn1 brn2*)、コントロールには *pBRN1-nYG* の根 (500 μ L 分の種に相当する量) を用いた。根冠でのみ発現する SMB 及び BRN1 タンパク質を十分回収するため、オーキシン誘導により側根数を増やし、サンプル中の根冠細胞数の割合を増加させた。シロイヌナズナ培養用寒天培地に、オートクレーブ滅菌したナイロンメッシュ (77 μ m) を敷き、低温処理した滅菌種子を播種し 5 日間生育させた。その後、メッシュ上に生育した植物をメッシュごと、25 μ M の IAA を添加した寒天培地に移して 3 日間生育させ、異所的な側根形成を誘導した。その植物体から根端部分の約 1 cm を回収し (1.17 g wet volume)、ChIP 解析に用いた。ChIP には抗 GFP ポリクローナル抗体 (ab290) (abcam, Cambridge, UK) を用いた。

ChIP-sequence には Life Technology の SOLiD5500 ChIP-seq を用いた。生データ解析は、理化学研究所の遠藤高帆博士に行って頂いた。結合解析のブラウジングには、Integrated Genome Browser (IGB) (Nicol et al., 2009) を用いた。

ChIP-qPCR 解析は、単離した ChIPed-DNA (1 ng) を鋳型として SYBER Premix Ex Taq (Takara, Shiga, Japan) を用いた反応液を調製し、LightCycler 96 system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて [95°C, 10 sec; 55°C, 10 sec; 72°C, 10 sec] の PCR プログラムを 45 cycle 行った。表 4 に示すプライマーセットを用いた (RCPG ターゲット領域 1 は PL_F8 (-)1749 と PL_R8 (-)1682、RCPG タ

ターゲット領域2はPL_F4 (-)986とPL_R4 (-)875、RCPGターゲット領域3はPL_F6 (-)507とPL_R6 (-)430、RCPLターゲット領域4はPL_F16 (-)251とPL_R18 (-)117、RCPGターゲット領域5はPL_F19_860とPL_R19_951)。ネガティブコントロールとしては TUB4 遺伝子のプロモーターを用いた (TUB4_F1 (-)83 と TUB4_R1 (-)188)。結合度は、input DNA によりノーマライズさせた数値を用いた。

結果

SMB と *BRN1/2* は遺伝学的上下関係を持ち一部異なる機能を担う

NAC 転写因子の SOMBRERO (*SMB*)、BEARSKIN1 (*BRN1*) および *BRN2* は、いずれも根冠細胞で発現し、根冠細胞の成熟過程で一部冗長的に機能することが示唆されている (Bennett et al., 2010)。また、これらの転写因子の過剰発現がいずれも二次細胞壁の合成を促進することから、共通の遺伝子群の転写を活性化することが示唆されている (Bennett et al., 2010)。一方で、所属研究室において行われたトランスクリプトーム解析において、*BRN1* と *BRN2* は *SMB* の過剰発現に応答して発現が上昇する下流遺伝子の候補として同定されていた (表 1)。また、転写レポーターラインを用いた発現解析から、*SMB* が分化した全ての根冠細胞で発現するのに対し、*BRN1* と *BRN2* の発現は、根冠の最外層または外側の 1-2 層に限定されていることも見出されていた (図 4A、図 5A-D)。さらに、*SMB* と *BRN1/2* の制御関係を明らかにするため、*SMB* の発現を *brn1 brn2* 変異体背景で、*BRN1/2* の発現を *smb* 変異体背景で確かめられるレポーターラインが作製された。これらの植物体を観察した結果、*SMB* レポーターの発現は、*smb* 変異体、*brn1 brn2* 二重変異体、*smb brn1 brn2* 三重変異体のいずれの背景においても、野生型と同様に分化した全根冠細胞で検出された (図 4A-D) のに対し、*BRN1* と *BRN2* のレポーターは、*smb* 変異体のコルメラの最外層とその周縁の一部の側部根冠細胞でのみ発現が検出され、その他の側部根冠の最外層での発現は消失していた (図 5A-H)。これらのことから、*BRN1* と *BRN2* の側部根冠での発現は *SMB* に依存するが、コルメラ先端部での発現は *SMB* に依存しないことが示唆されていた。

smb 変異体、*brn1 brn2* 二重変異体および *smb brn1 brn2* 三重変異体については Bennett らによって報告されていたが、所属研究室において作成された多重変異体で確認を行った。その結果、*smb* 変異体が、始原細胞の分裂異常による層構造の乱れや、根冠最外層の細胞死の欠如という表現型を示すのに対し、*brn1 brn2* 二重変異体は、コルメラの先端部の剥離異常という限られた表現型を示し、さらに *smb brn1 brn2* 三重変異体では *smb* 変異体が重篤化した表現型を示すことが確かめられた (図 6) (Bennett et al., 2010)。この結果から、*BRN1* と *BRN2* が、*SMB* とは異なる機能を担っていることが支持された。そこで、これら 3 つの転写因子が根冠細胞の成熟や剥離に果たす機能をより精密に解析するため、プロモータースワップによる変異形質の相補実験を行った。

まず初めに、コントロールとして 3 つの NAC 転写因子それぞれと GFP との

融合タンパク質を、各遺伝子自身のプロモーターで発現させるコンストラクトを各々の変異体背景に導入した植物を観察した。その結果、*SMB-GFP* を導入した *smb* 変異体 (*pSMB:gSMB-sGFP/smb*)、*BRN1-GFP* または *BRN2-GFP* を導入した *brn1 brn2* 二重変異体 (*pBRN1-gBRN1-sGFP/brn1 brn2*、*pBRN2-gBRN2-sGFP/brn1 brn2*) のいずれにおいても、根冠分化の異常が回復していた (図 7A-C)。このことから、これらの GFP 融合タンパク質が機能的であることが確認された。そこで、*SMB-GFP* を *BRN1* プロモーター、*BRN1-GFP* と *BRN2-GFP* を *SMB* プロモーターで発現するプロモータースワップコンストラクトを、それぞれの変異体背景に導入した個体 (*pBRN1:gSMB-GFP/brn1 brn2*、*pSMB:gBRN1-GFP/smb*、*pSMB:gBRN2-GFP/smb*) を観察した。その結果、*BRN1-GFP* および *BRN2-GFP* を *SMB* プロモーターで発現させることで、*smb* 変異体の根冠の異常を完全に回復できることが明らかとなった (図 7D,E)。この結果から、*BRN1* と *BRN2* は *SMB* の標的遺伝子の転写を調節できることが強く示唆される。一方で、*SMB-GFP* を *BRN1* プロモーターで発現する *brn1 brn2* 二重変異体においては、コルメラ先端部の剥離が完全には回復しなかった (図 7F)。このことは、コルメラ先端部の細胞の剥離において、*BRN1* と *BRN2* が *SMB* とは異なる標的遺伝子の発現調節を担っていることを示唆する。興味深いことに、この植物においては、剥離後のコルメラ細胞で通常観察される核での *SMB-GFP* の蛍光消失やヨウ化プロピジウム染色液の細胞内への浸透が、剥離せずに残っている細胞においても観察された。この観察結果は、*SMB-GFP* の発現によりコルメラ最外層の成熟自体は進行しているものの、細胞の剥離が回復しなかったことを示唆している。*BRN1* と *BRN2* が、*SMB* とは異なり根冠外層部でのみ発現することや、コルメラ先端部での発現が *SMB* の影響下でないことと合わせ、これらの観察結果はコルメラ先端部の剥離過程が主として *BRN1* と *BRN2* によって制御されていることを示唆する。

SMB および BRN1/2 の下流で機能する推定細胞壁代謝関連遺伝子群は、根冠の外層で異なる発現パターンを示す

所属研究室で行われた *SMB* 過剰発現体および *smb brn1 brn2* 三重変異体のマイクロアレイによって同定された 22 個の下流候補遺伝子のうち、細胞壁への関与が示唆される 4 つの遺伝子 (*AT2G32610*、*AT2G32620*、*AT3G47400* および *AT1G65570*) は、いずれも生物学的機能が報告されていない。これらは TAIR または NCBI データベースにおいて、それぞれ *CELLULOSE SYNTHASE-LIKE B1* (*CSLB1*)、*CSLB2*、*PECTIN ESTERASE INHIBITOR 33* (*PME33*)、および *Pectin lyase-like superfamily protein* とアノテーションされており、細胞壁多糖の代謝に

関与することが予想された。本論文では後述する発現パターンと機能解析の結果をもとに、AT1G65570 を *ROOT CAP POLYGLACTURONASE (RCPG)* と呼称する。なお、後述するように AT1G65570 がコードするタンパク質は GH28 ドメインをもつ加水分解酵素であり、実際にはペクチンリアーゼではない。

これらの4遺伝子の詳細な発現場所についての報告はなかったため、まずそれぞれの遺伝子のプロモーターに核局在型 YFP-GUS レポーター (*nls-YFP-GUS:nYG*) をつなげたレポーターライン (*pCSLB1:nYG*, *pCSLB2:nYG*, *pPME33:nYG*, *pRCPG:nYG*) を用いて転写領域の解析を行った。それぞれのレポーターについて独立した3ラインの T3 ホモ接合体の根を、共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal laser-scanning microscope : CLSM) を用いて観察した結果、*CSLB1* および *CSLB2* は側部根冠の最外層、特に基部側の PCD build-up zone でよく似た発現パターンを示すことが観察された (図 8A,B,E,F)。 *PME33* は、側部根冠とコルメラからなる根冠の最外層全体で発現が観察された (図 8C,G)。また根冠以外にも、根端分裂組織の中心柱内にある原生木部道管の前駆細胞でも発現していた (図 9A,B)。 *RCPG* の発現は、根冠においては将来 BLC となる剥離途上のコルメラ最外層と、その周縁部の側部根冠の最外層に特異的であり、この過程で急激な発現誘導が起こることが明らかとなった (図 8D,H)。また根冠以外では、伸長領域の二次壁を形成するステージの原生木部道管細胞でも弱い発現が観察された (図 10 A,B)。以上の結果から、これら4つの推定細胞壁代謝酵素遺伝子は、根冠最外層において、それぞれの遺伝子に特徴的な発現パターンを示すことが明らかになった。

BRN1 と BRN2 は推定細胞壁代謝関連遺伝子群の発現に SMB とは異なる寄与をする

上記の推定細胞壁代謝関連遺伝子群の多くは *SMB* の過剰発現に応答する遺伝子として同定され、根冠最外層での特異的な発現が確かめられたが、*smb* や *brn1*, *brn2* 変異体背景での発現は不明であった。そこで、*SMB* および *BRN1* と *BRN2* の寄与をより詳細に解析するため、これらの推定細胞壁代謝関連遺伝子群のレポーターの発現を、*smb* 単独変異体、*brn1 brn2* 二重変異体、*smb brn1 brn2* 三重変異体の背景で観察した。

CSLB1 および *CSLB2* はゲノム上でタンデムに配置しており、またレポーターラインの発現パターンも非常に類似していたため、今回の実験では *CSLB1* の発現のみを解析した。*CSLB1* の発現は *smb* 単独変異体で著しく減少し、一部の側部根冠細胞で低レベルの発現が見られるのみであった (図 11A,B)。 *brn1 brn2* 二重変異体における *CSLB1* の発現は、野生型と同様のレベルであった (図 11A,C)

が、*smb brn1 brn2* 三重変異体では、*CSLB1* の発現がほぼ消失していた (図 11A,D)。 *PME33* の *smb* 単独変異体および *brn1 brn2* 二重変異体背景での発現は、野生型とほとんど変わらなかった (図 12A-C) が、*smb brn1 brn2* 三重変異体の根冠での発現は、ほぼ消失していた (図 12D)。一方で、原生木部道管の前駆細胞では、野生型と同様の発現が観察された。*RCPG* の発現は、*smb* 単独変異体背景では野生型と同様に根冠の最外層で検出されたが (図 13A,B)、*brn1 brn2* 二重変異体ではごく低レベルの発現しか検出されず (図 13A,C)、*smb brn1 brn2* 三重変異体背景においては、数個の細胞で弱い発現が観察されるのみであった (図 13A,D)。一方で、原生木部道管における発現は、全ての変異体背景で野生型植物と同等であった。*RCPG* レポーターは各変異体に直接導入することで作製されたため、ゲノム上の挿入位置の効果によって発現レベルが低下した可能性を排除できなかった。そこで、各変異体背景のレポーター植物を野生型に交配し、得られた F1 個体の根を用いて *RCPG* の発現を観察した。その結果、野生型の *BRN1/2* アレルを戻すことで、*RCPG* の発現が野生型と同様のレベルに回復することが確認された (図 13B-D 挿入図)。この結果は、各変異体背景における *RCPG* の発現変化が、各 NAC 転写因子の機能欠損に起因することを示す。

CSLB1、*CSLB2* および *PME33* の発現については、磯本によって qRT-PCR 法を用いた定量解析が行われていた (磯本・修士論文, 2011)。*CSLB1* および *CSLB2* の発現は、*smb* 単独変異体では野生型と比較して 50%以下に低下し、*smb brn1 brn2* 三重変異体では、ほとんど発現が検出されなかった (磯本・修士論文, 2011)。一方、*brn1 brn2* 二重変異体において、*CSLB1* の発現は野生型の約 3 倍に上昇するのに対して、*CSLB2* は野生型より約 40%低下していた (磯本・修士論文, 2011)。*PME33* の *smb* 単独変異体における発現量は野生型と同等であったが、*brn1 brn2* 二重変異体では野生型より約 1.5 倍上昇し、*smb brn1 brn2* 三重変異体では野生型の 50%以下に減少した (磯本・修士論文, 2011)。*RCPG* については qRT-PCR 法を用いた定量解析が行われていなかったため、発芽後 5 日目の野生型、*smb* 単独変異体、*brn1 brn2* 二重変異体、および *smb brn1 brn2* 三重変異体の根端領域から抽出した RNA を用いて内性 *RCPG* 転写産物の蓄積を定量した。その結果、*smb* 単独変異体では野生型と同等の蓄積量が検出された (図 13E)。一方で、*brn1 brn2* 二重変異体および *smb brn1 brn2* 三重変異では、*RCPG* 転写産物の蓄積量は有意に減少し、*brn1 brn2* 二重変異体では野生型の 12%、*smb brn1 brn2* 三重変異では野生型の 3%の蓄積しか検出されなかった (図 13E)。

以上のレポーターラインおよび qRT-PCR による発現解析の結果から、*CSLB1* および *CSLB2* の発現は、おもに *SMB* に依存していることが示唆される。*PME33* の発現は、3 つの NAC 転写因子により冗長的な制御を受けていることが示唆される。一方で *RCPG* の根冠での発現の大部分は、*BRN1* と *BRN2* の機能に依存し

ていることが強く示唆される。すなわち、根冠外層部で機能する推定細胞壁代謝関連遺伝子群の発現に対して、SMB 及び BRN1/2 が異なる寄与をしていることが明らかとなった。

BRN1 は推定細胞壁代謝関連遺伝子群のプロモーター領域に直接結合する

SMB と BRN1 および BRN2 は根冠の分化や機能発現のマスター制御因子と考えられているが、上記の下流候補遺伝子の発現解析から、標的遺伝子の少なくとも一部は異なっていると考えられる。そこで、これらの NAC 転写因子による下流遺伝子の制御機構をより詳細かつゲノムワイドに解明するため、Chromatin Immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) 解析を行なった。サンプルとしては、機能的な GFP 融合タンパク質により変異形質が相補される *pSMB-SMB-GFP/smb* と *pBRN1-BRN1-GFP/brn1 brn2*、ネガティブコントロールとしては、根冠で発現する転写レポーターの *pBRN1-nYG* を用いた。また、解析に十分な SMB-GFP および BRN1-GFP タンパク質を得るため、これらの根をオーキシシン処理することで、異所的な側根形成を誘導し、採取試料中の根冠細胞数の比率を増加させた (図 14)。この処理により、ウェスタンブロット法で検出できるレベルの SMB-GFP および BRN1-GFP タンパク質を回収することが可能となった (図 15)。このような処理により集めたサンプルを用い、抗 GFP 抗体による ChIP 解析を理化学研究所の金鍾明博士と遠藤高帆博士に行って頂いた。

Integrated Genome Browser を用いて、本研究で注目している 4 つの推定細胞壁代謝関連酵素遺伝子領域に対する結合を表示した。その結果、4 つの遺伝子全てのプロモーター領域に BRN1 の結合が見られた (図 16A-C)。CSLB1、CSLB2 及び RCPG 遺伝子では、転写開始点近くのプロモーター領域にピークが検出された (図 16A,C)、PME33 遺伝子では、プロモーター領域以外にも、第 1 イントロン付近にピークが検出された (図 16B)。PME33 遺伝子では、BRN1 の結合領域が 2 箇所以上ある可能性が示唆される。一方、SMB の結合に関しては、CSLB1、CSLB2 及び PME33 遺伝子のプロモーター領域で僅かなピークが検出されるのみで (図 16A,B)、RCPG 遺伝子では結合のピークが検出されなかった (図 16C)。上記のプロモーターレポーターラインの解析、及び qRT-PCR 解析から、4 つの推定細胞壁代謝関連酵素遺伝子が SMB、BRN1、BRN2 に対して異なる依存度を示すことが示唆されていたが、ChIP-seq 解析の結果では 4 つの遺伝子全てのプロモーター領域に BRN1 が直接結合することが示された。このことは、3 つの転写因子が遺伝的または分子的に相互作用することで、個々の下流遺伝子の発現を複雑に調節していることを示唆している。

rcpg 変異体においては剥離時の BLC の湾曲が阻害される

これまでに *RCPG* が BRN1/2 に依存して根冠先端部の剥離する最外層で特異的に発現すること、また少なくとも BRN1 が *RCPG* のプロモーター領域に直接結合することを明らかにした。*RCPG* 遺伝子は、3つのエクソンを持ち、397 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードする (図 17A)。また、アミノ末端側に高い疎水性を示す推定シグナルペプチド領域を持ち、残りのほぼ全てが Glycoside Hydrolase 28 (GH28) ドメインを形成する (図 17A) ことから、細胞外に分泌されるポリガラクトuron酸加水分解酵素 (Polygalacturonase : PG) と推定されるが、その生物学的機能は報告されていない。

そこで、根冠細胞の剥離における *RCPG* の機能を明らかにするため、機能欠損変異体を単離して表現型を解析した。ストックセンター (ABRC) から T-DNA が挿入されたライン (GABI_100C05) を取り寄せ、ホモ挿入系統を確立した。T-DNA 挿入位置を確かめた結果、T-DNA は、開始コドンから 1,415-bp 下流の第 2 イントロンに挿入され、挿入位置近傍の 25-bp が欠失していた (図 17A)。*RCPG* の転写産物の蓄積量を明らかにするため、*RCPG* 遺伝子全長 (1194-bp)、T-DNA 挿入位置よりも N 末端側の第 1 イントロンを挟む領域 (435-bp)、T-DNA 挿入位置を挟む領域 (116-bp)、そして T-DNA 挿入位置よりも C 末端側の第 3 エクソン内 (142-bp) に対応する転写産物を増幅するプライマーセットを用いて RT-PCR 解析を行なった。その結果、T-DNA 挿入位置よりも N 末端側の第 1 イントロンを挟む領域については、野生型より少ないながら、挿入変異体においても転写産物の蓄積が検出されたが、それ以外の領域に対応する転写産物の蓄積は確認されなかった (図 17B)。高度に保存された GH28 ドメインを含む C 末端側の発現が確認されなかったことから、このラインを *RCPG* の機能欠損変異体 (*rcpg* 変異体) として解析することとした。

シロイヌナズナの BLC は、種子発芽後 5 日目に初めの最外層が剥離することが報告されている (Vicré et al., 2005)。そこで、BLC の剥離における *RCPG* の機能を解析するために、剥離 1 日前の発芽後 4 日目の野生型および *rcpg* 変異体の根を観察した。野生型植物において、BLC は PCD site II 周縁部の側部根冠細胞から根の先端側へと層構造を保ちながら順に剥離してゆく。この際、BLC は外側へ湾曲した独特の形状を作り、最終的にコルメラ層の剥離により根端から離脱する (図 18A,E)。これに対し、*rcpg* 変異体の BLC においても、側部根冠の PCD や、PCD site II 周縁部の細胞剥離はおこっていたが、剥離中の BLC は野生型のように湾曲せず、根冠先端部の最外層一層がキャップ状の外形を維持したままであった (図 18B,F)。また、野生型の根冠最外層は一層ずつ剥がれ落ちるのに対し、*rcpg* 変異体では剥離後の BLC が剥離中の最外層と重なる様子が

複数の根で観察され、弱いながらも剥離の遅延が見られた (図 18A,B)。RCPG 遺伝子の発現が BRN1 および BRN2 に強く依存することから、*brn1 brn2* 変異体でみられるような最外層の剥離異常による根冠層数の増加が見られるか定量解析を行った。その結果、野生型と *rcpg* 変異体では有意差は検出されなかった。これらの観察結果から、*rcpg* 変異体の根冠において、側部根冠での PCD や側部根冠の最終的な剥離は野生型と同様に起こるものの、剥離する BLC の形態には顕著な異常を示し、これが弱い剥離異常となって表れることが示唆された。

rcpg 変異体における BLC の形態異常が、真に RCPG 遺伝子の機能欠損に起因するものであるかを確かめるため、RCPG プロモーターの制御下で RCPG と RFP の融合タンパク質を発現させるコンストラクト (*pRCPG-RCPL-RFP*) を作製し、*rcpg* 変異体に導入した。導入遺伝子が分離する T2 世代を観察したところ、RFP シグナルを示す分離個体においては、剥離する BLC が野生型と同様に外側に湾曲したのに対し、RFP シグナルを示さない分離個体では湾曲が見られなかった (図 18C,D,G,H)。以上の結果から、*rcpg* 変異体の BLC の湾曲異常は、真に RCPG 機能の欠損によるものであり、RCPG が剥離する BLC の湾曲を正に制御することが明らかとなった。

RCPG の過剰発現により根冠最外層の細胞は個別に剥離する

これまでに、RCPG が将来 BLC となる根冠最外層で特異的に発現し、その機能欠損により剥離する BLC の湾曲が阻害されることが明らかとなった。RCPG の機能に対する理解をさらに深めるため、35S プロモーターを用いて RCPG の発現量を高めるとともに、RCPG の発現領域を広げることを試みた。この目的を達成するため、DEX 誘導系を用いた RCPG 過剰発現植物 (*35S:GVG-UAS-erGFP/UAS:RCPG*) を作製した。DEX 添加による過剰発現誘導後の根を観察した結果、コントロール植物体 (*35S:GVG-UAS-erGFP*) では、野生型と同様に BLC が層構造を保ち、湾曲した形状を示した (図 19A)。一方、DEX を添加して RCPG の過剰発現を誘導した植物の根冠最外層では、BLC が層構造を維持できず、個々の細胞が歯抜け状に脱落する表現型を示した (図 19B,C)。この RCPG 過剰発現体においては、GFP の発現で観察される通り根全体で GVG による転写活性化が起こっており、RCPG も根の全体で発現していると推定されるが、根冠最外層以外の内側の細胞層では細胞の剥離は起こらなかった。上記の変異体解析から、RCPG には、剥離する最外層の湾曲を正に制御する機能があることを明らかにしたが、過剰発現体の結果は、RCPG が BLC の細胞剥離を正に制御する機能を持つことを示唆している。

RCPG タンパク質は極性を持って細胞外領域に蓄積する

将来 BLC となる根冠最外層で発現する RCPG は、剥離時の最外層の湾曲だけでなく、細胞接着を正に制御する機能があることを見出した。そこで、RCPG タンパク質の詳細な局在を明らかにするため、相補実験に用いた RCPG-RFP 融合タンパク質の RFP 蛍光の局在を観察した。観察の際には、細胞内に取り込まれた後に加水分解されて緑色蛍光を発する Fluorescein diacetate (FDA) による染色を生細胞のマーカーとして併用した。その結果、RCPG-RFP の興味深い局在パターンが観察された。RCPG-RFP の蛍光は、RCPG 転写レポーターラインと同様に、将来 BLC となる根冠先端部の最外層の細胞で検出された(図 20A,B)。また、RCPG-RFP は細胞壁と思われる細胞外領域に局在し、BLC の根の頂端側の細胞壁において強い RCPG-RFP が検出された。RCPG は、アミノ末端側に高い疎水性を示す推定シグナルペプチド領域を持つことから、翻訳された後に細胞外へ輸送される可能性が考えられる。以上の結果から、RCPG-RFP は細胞外領域に局在し機能することが明らかになった。

BRN1 が結合する RCPG のプロモーター領域には VND 転写因子の結合配列と相同な配列が存在する

上で述べたように、RCPG 遺伝子の発現は BRN1 と BRN2 に依存することが強く示唆されている。また ChIP-seq 解析により BRN1-GFP が RCPG 遺伝子のプロモーター領域へ直接結合することも見出した。そこで、BRN1 の結合を再確認するとともに、結合位置をより正確に推定するために、ChIP-qPCR により定量的な結合解析を行なった。RCPG 遺伝子の開始コドン上流のプロモーター領域の 4 箇所と、コントロールとして RCPG の第 2 エキソン、および無関係な TUB4 遺伝子のプロモーターの各 1 箇所の領域を増幅するプライマーを設計し(表 4)、BRN1-GFP の ChIP により得られた DNA を鋳型として qPCR をおこなった(図 21A)。その結果、RCPG 遺伝子の開始コドン上流 251bp から 117bp の領域で、コントロールの約 7 倍の高いピークを示した(図 21B)。この領域は SND1 を初めとした二次細胞壁の合成を促進する NAC 転写因子群の結合サイトである Secondary Wall NAC Binding Element (SNBE) 配列 (TTnCttnnnnnnnAAGnAA) を含んでいた (Zhong et al., 2010)。以上の結果から、BRN1 は根冠最外層で RCPG 遺伝子のプロモーターに直接結合し、RCPG 遺伝子の発現を正に制御することが明らかになった。また、BRN1 と同じ NAC 転写因子グループに属する SND/NST や VND 転写因子群の標的配列と相同な配列を認識して結合することが示唆された。

考察

本研究では、シロイヌナズナの根冠分化過程において最外層が剥離するメカニズムを明らかにすることを目的とし、根冠分化のマスター制御因子である 3 つの NAC 転写因子、SMB、BRN1、BRN2 の下流で機能する 4 つの推定細胞壁関連遺伝子 *CSLB1*、*CSLB2*、*PME33* および *RCPG* の発現解析を行った。その結果、これらの遺伝子は、根冠内において特徴的な領域やタイミングで発現していることや、SMB および BRN1/2 により異なる発現制御を受けることを明らかにした。さらに、これらの遺伝子のプロモーター領域に BRN1 が直接結合することを明らかにした。*RCPG* 遺伝子は、細胞壁接着に主要な役割を果たすペクチンの主鎖を構成するポリガラクトuron酸を加水分解するポリガラクトuronナーゼをコードすると推定されたため、詳細に機能解析を行った。そして、この遺伝子産物が根冠最外層の細胞外に極性を持って蓄積し、剥離する BLC 層の形態を制御することを見出した。

根冠細胞の分化における SMB と BRN1/2 の役割

シロイヌナズナの根冠分化の最終ステップでは、「側部根冠の細胞死」と「根冠先端部最外層の脱離」の 2 つの異なるイベントが、時空間的に制御され規則正しく起こる (Fendrych et al., 2014、Vicré et al., 2005)。これまでの報告や所属研究室における過去の解析から、3 つの NAC 転写因子、SMB、BRN1、BRN2 が根冠細胞の分化を一部重複して制御することや、BRN1/2 が遺伝的に SMB の下位に位置することが示唆されている (Bennett et al., 2010、中島ら、未発表)。しかし、以下に示す観察結果は、SMB と BRN1/2 が根冠分化において異なる機能を担っていることを支持する。まず、SMB が分化した全ての根冠細胞で発現するのに対し、BRN1/2 の発現は根冠最外層とその内側の、最大 2 層に限定されている。そして、*smb* 変異体が根冠の層構造の乱れや、最外層の細胞死と細胞剥離の欠如という表現型を示すのに対し、*brn1 brn2* 二重変異体は、コルメラの先端部の剥離に限られた異常を示すのみである。また、*smb* 変異体背景においても、根冠先端の最外層では BRN1/2 の発現が維持されており、SMB の過剰発現体では、BRN1/2 の発現が根冠のみならず表皮細胞でも異所的に観察される (中島ら、未発表)。そして、今回のプロモータースワップ解析の結果や、*brn1 brn2* 変異体の表現型から、BRN1/2 は SMB の標的遺伝子の発現を制御できるが、SMB はコルメラ先端部の剥離促進という BRN1/2 機能の少なくとも一部を代替できないことが明らかとなった。そこで、BRN1/2 タンパク質は、SMB と同様に「側部

根冠の細胞死」を制御するポテンシャルを持つものの、野生型の植物では「根冠先端部最外層の脱離」を主に制御している可能性が示唆された。

なぜ *SMB* と同様の機能を持つ *BRN1/2* は、根冠の最外層でのみ発現するのだろうか？ *SMB* が分化した全ての根冠細胞で発現するのに対し、*BRN1/2* の発現は最外層に限定されている。また、*SMB* を異所的に過剰発現させると、*BRN1/2* の発現は根冠のみならず表皮にも観察されるが、この応答は根の表面に露出した表皮細胞に限られる。このことは、*BRN1/2* の発現が、最外層の位置情報に依存して機能する未知の因子と *SMB* により協調的に促進されていることを示唆する (図 22)。所属研究室では、プロモーター解析と酵母 one-hybrid 法により *BRN1* プロモーターに結合する転写因子の探索が進められており (安藤・修士論文、2016)、*BRN1/2* 経路を介する最外層剥離メカニズムについて、新たな知見が得られることが期待される。

***SMB* および *BRN1/2* による下流遺伝子の発現制御**

SMB および *BRN1/2* の下流候補遺伝子として見出された、4つの推定細胞壁代謝関連遺伝子 *CSLB1*、*CSLB2*、*PME33* および *RCPG* は、根冠の最外層で遺伝子ごとに一部異なる発現パターンを示した。*CSLB1* および *CSLB2* は側部根冠の最外層、特に基部側の PCD build-up zone で、*PME33* は、側部根冠とコルメラからなる根冠の最外層全体で、*RCPG* は剥離途上のコルメラとその周縁部で発現していた。*smbrn1brn2* 三重変異体背景の根冠において、これらの遺伝子の発現はほとんど消失していたが、*smbrn1brn2* 単独変異体および *brn1brn2* 二重変異体背景における発現パターンは遺伝子ごとに異なっていた。qRT-PCR を用いた定量解析の結果を併せて考慮すると、*CSLB1* および *CSLB2* の転写は *SMB* に対する依存度が高く、*PME33* は *SMB* および *BRN1/2* による冗長的な発現制御を受け、*RCPG* の転写は *BRN1/2* に強く依存すると考えられた。一方で、*SMB-GFP* および *BRN1-GFP* を用いた ChIP-seq 解析の結果、これらの遺伝子すべてのプロモーター領域に *BRN1* が直接結合することが明らかになった。また、*BRN1* は、下流候補遺伝子 22 個中で、これら 4 つの遺伝子を含む 15 遺伝子のプロモーター領域に直接結合していた (図 23-29)。

今回の ChIP-seq 解析では、技術的な問題により *SMB* の結合サイトは少数しか検出されなかった (図 23-29) が、今後 *SMB* の ChIP-seq データを得ることができれば、*BRN1* との比較解析に *SMB* と *BRN1/2* が共通して直接制御する下流遺伝子、またそれぞれが別々に制御する下流遺伝子を明らかにすることができると期待される。*SMB* と *BRN1* の共通の標的が見つかった場合には、酵母ツーハイブリッド法等を用いて *SMB* と *BRN1/2* がコンプレックスを形成する可能性

を明らかにすることで、複雑な制御機構のメカニズムを明らかにできると期待される。

NAC 転写因子 VND6 と SMB、BRN1/2 は一部共通の下流遺伝子の発現を制御する

PME33 および *RCPG* 遺伝子は、根冠細胞以外にも、それぞれ原生木部道管の前駆細胞や原生木部道管細胞で発現していた。またこれらの遺伝子の木部での発現は、*SMB* や *BRN1/2* の機能に依存しなかった。すなわち、これらの遺伝子の発現は、根冠と道管で異なる転写因子に制御されていると考えられる。

SMB および *BRN1/2* の下流候補遺伝子の中に、プログラム細胞死への関与が示唆される Type II metacaspase の *METACASPASE9* (*MC9*) が含まれていた。*MC9* は道管と根冠の最外層で発現し、道管においては管状要素のプログラム細胞死に関与することが報告されている (Bollhöner et al., 2013)。木部管状要素の分化過程において、*SMB* および *BRN1/2* と同じサブグループに属する *VND6* および *VND7* はプログラム細胞死や二次壁の形成を制御しているが、*MC9* の木部での発現は、*VND6* により直接制御されていることが報告されている (Kubo et al., 2005, Ohashi-Ito et al., 2010)。*MC9* の根冠における発現は、*smb* 変異体の側部根冠細胞でほとんど消失し、*brn1 brn2* 変異体の側部根冠細胞では弱い発現が観察され、*smb brn1 brn2* 三重変異体の根冠では、完全に消失した (図 30)。一方で、道管における *MC9* の発現は、それらの変異体背景において野生型と同様に観察された。よって、*MC9* の発現は、道管では *VND6* に制御され、根冠では主に *SMB* によって制御されていることが示唆される。道管と根冠の分化過程において共通した遺伝子が発現し、かつそれらの発現が、同じサブグループに属する異なる NAC 転写因子によって制御されていることは非常に興味深い。根冠や維管束が進化する以前に分岐したコケ植物において、通水組織の分化を NAC 転写因子ファミリーが制御することが報告されていることから (Xu et al., 2014)、植物の進化過程において NAC 転写因子とその下流遺伝子のモジュールが異なる組織の分化に転用されたことが示唆される。

BLC の形態を制御する RCPG

本研究により、ペクチン分解酵素をコードすると推定される *RCPG* 遺伝子の機能欠損変異体が、根冠から剥離する BLC の湾曲に異常を示すことが明らかとなった。シロイヌナズナの BLC では、ワタやエンドウマメの BC のように細胞が個々に剥がれ落ちず、層構造を保ったまま剥離する (Hawes and Lin, 1990, Vicré

et al., 2005)。RCPG を過剰発現するシロイヌナズナの根においては、コルメラの最外層が層としてではなく、独立した細胞として剥離した。このことは、RCPG の正常な発現量や発現場所が、BLC 型の細胞剥離に重要な意味を持つことを示唆している。過剰量の RCPG タンパク質が発現することにより、根冠細胞壁における RCPG の極性分布が攪乱され、本来起こらないような位置で細胞壁成分の分解が起こった可能性が考えられる。また、35S プロモーターを用いて根の全細胞で RCPG を過剰発現させたにも関わらず、細胞の剥離は根冠の最外層に限定されており、表皮など他の細胞の異所的な剥離は観察されなかった。このことは、RCPG の基質がコルメラ最外層に特異的に存在し、RCPG の過剰発現によって過剰に、あるいは異所的に分解されたことで細胞接着を保てなくなり、その結果として細胞が個々に剥がれ落ちた可能性が考えられる。また、根冠の分化過程では、細胞壁の成分や構造が段階的に変化している可能性が考えられる。

変異体を用いた発現解析や ChIP-qPCR の結果から、RCPG が BRN1 に直接転写制御されることが強く示唆された。*brn1 brn2* 二重変異体は、根冠最外層の剥離異常により層数が増加するが、*rcpg* 機能欠損変異体の根冠最外層の形態異常は見られるものの、剥離の異常は *brn1 brn2* に比べて弱かった。このことは、BRN1/2 が RCPG 以外の細胞壁修飾酵素遺伝子等の発現を介して、最外層の剥離を制御していることを示唆する。以上のことから、正常な発現量に依存した RCPG の分布が、BLC に特有の細胞壁成分、あるいは構造を局所的に修飾し、BLC の形態を制御していることが示唆される。

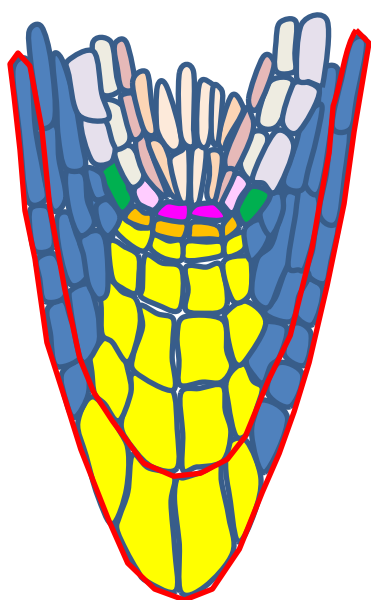
RCPG タンパク質の生化学的機能

ペクチン分解酵素をコードする *QUARTET2* (*QRT2*) 及び *QRT3* 遺伝子の機能欠損型変異体では、花粉四分子の一次壁が分解されず、花粉が融合したままとなる (Rhee and Somerville, 1998, Rhee et al., 2003, Ogawa et al., 2009)。また根冠細胞の外側も、種皮と同様に mucilage と呼ばれる粘性物質に覆われ、その主成分はペクチンであることが知られている。糖転移酵素をコードする *QUA1* や、ペクチンメチル基転移酵素と推定されるタンパク質をコードする *QUA2* 遺伝子の機能欠損変異体の免疫染色を用いた解析から、根冠の細胞壁におけるペクチン量が減少すると BLC が層構造を維持できず個々に剥がれ落ちることが報告されている (Durand et al., 2009)。これらのことから、細胞接着の切断過程において、根冠と花粉に共通したペクチン多糖の切断や減少が関与している可能性が強く示唆される。

RCPG はポリガラクトツロナーゼをコードすると推定されているが、これまでのところ、ペクチン分解酵素活性を持つという生化学的証明は得られていない。

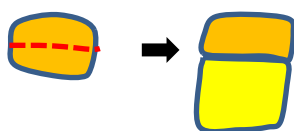
しかし、いくつかの観察結果が、RCPG がポリガラクトナーゼとしてペクチンの分解に機能していることを支持している。まず第 1 に、RCPG-RFP 融合タンパク質が BLC の細胞壁に局在することが挙げられる。この RCPG-RFP タンパク質は *rcpg* 変異体の表現型を相補したことから、RFP 蛍光から明らかとなった RCPG タンパク質の局在は、機能的な RCPG の局在を反映していると考えられる。第 2 に、RCPG の過剰発現体において、根冠細胞どうしの接着が異所的に切断されたことが挙げられる。この結果は RCPG タンパク質の生化学的活性が、根冠の剥離を促進することを強く示唆している。第 3 に、中島によって行われたタンパク質の立体構造モデリングにより、PCPG と既知の *endo* 型 PG 間で、タンパク質全体のフォールディングが保存されていることや、触媒反応や基質認識に重要なアミノ酸残基の配置が完全に一致していることが明らかとなったことが挙げられる (図 31)。以上の点から、RCPG は根冠分化の制御因子である BRN1 により直接的に転写制御を受けて根冠最外層の細胞壁に局在し、ポリガラクトナーゼとしてペクチンの分解を正に制御していることが強く示唆される。

A



- 静止中心 (Quiescent Center : QC)
 - 維管束組織 (Vascular Tissue : VT)
 - 内鞘 (Pericycle : Pe)
 - 内皮 (Endodermis : En)
 - 皮層 (Cortex : Co)
 - 皮層/内皮始原細胞 (Cortex/Endodermis Initial : CEI)
 - 表皮 (Epidermis : Ep)
 - 側部根冠 (Lateral root cap: LRC)
 - コルメラ (Columella)
 - 表皮・側部根冠始原細胞 (Ep/LRC initial cell : ELI)
 - コルメラ始原細胞 (Columella initial cell)
- } 根冠 (Root Cap : RC)

B



C

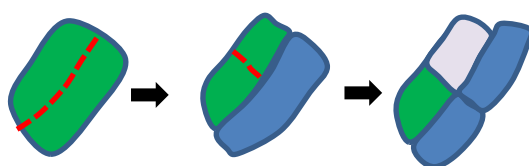


図1. シロイヌナズナの根端分裂組織の構造

(A) 根端分裂組織の縦断面の組織パターンの模式図。赤線で囲った部分は根冠の最外層。(B) コルメラ始原細胞の分裂様式。(C) 表皮・側部根冠始原細胞の分裂様式。赤点線は分裂面を示す。

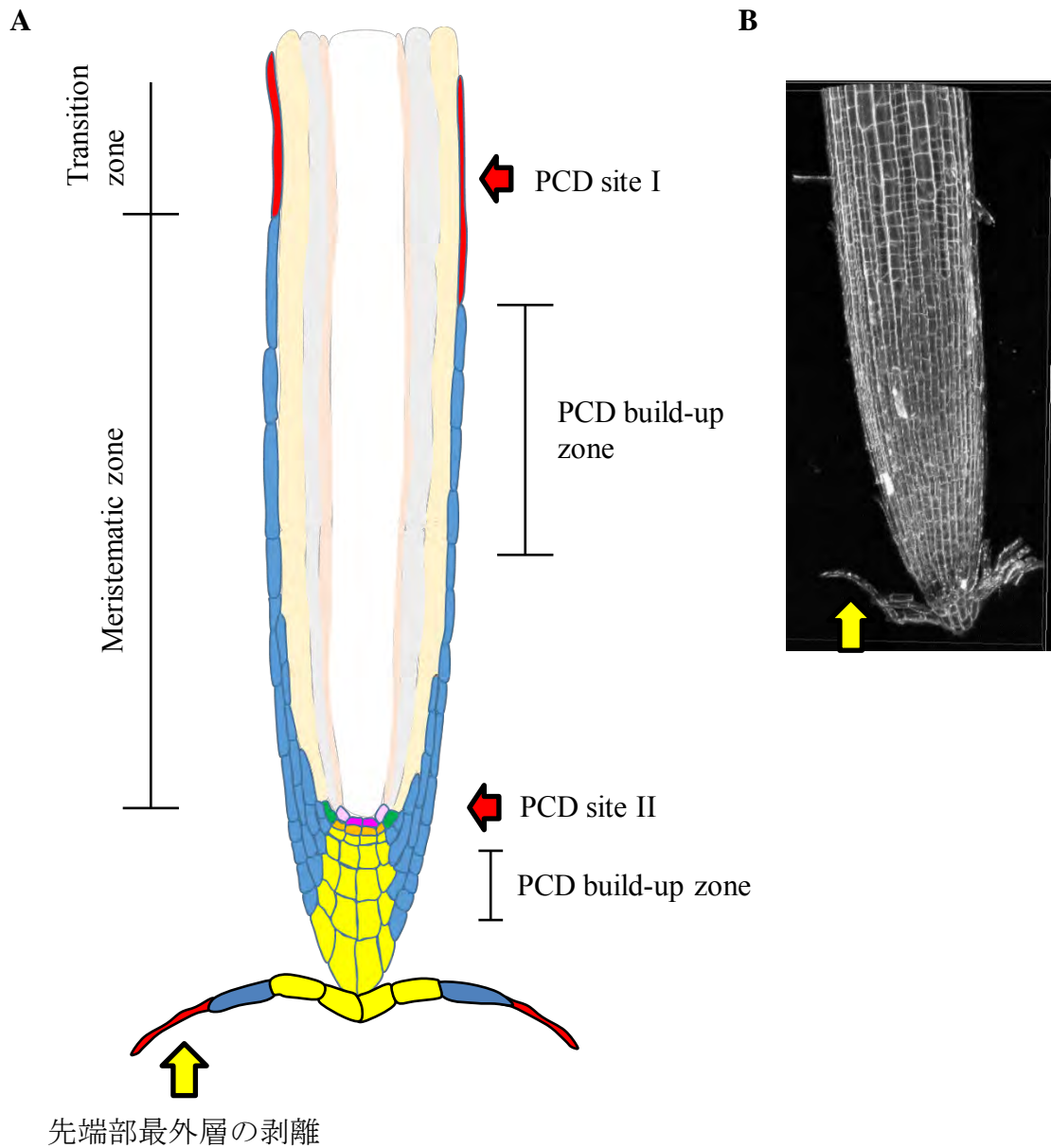


図2. 根冠分化の2つの最終ステップの模式図

(A) シロイヌナズナの側部根冠はプログラム細胞死 (PCD) により欠失し、根冠先端部は最外層の剥離により欠失する。赤矢印：PCD site IIはtransition zoneで、PCD site IIはコルメラとつながる最外層の側部根冠で起こる。黄矢印：根冠先端部の最外層は層構造を維持しながら剥離する。(B) 根の先端部の共焦点画像を3次元立体構築 (3D) したイメージ。

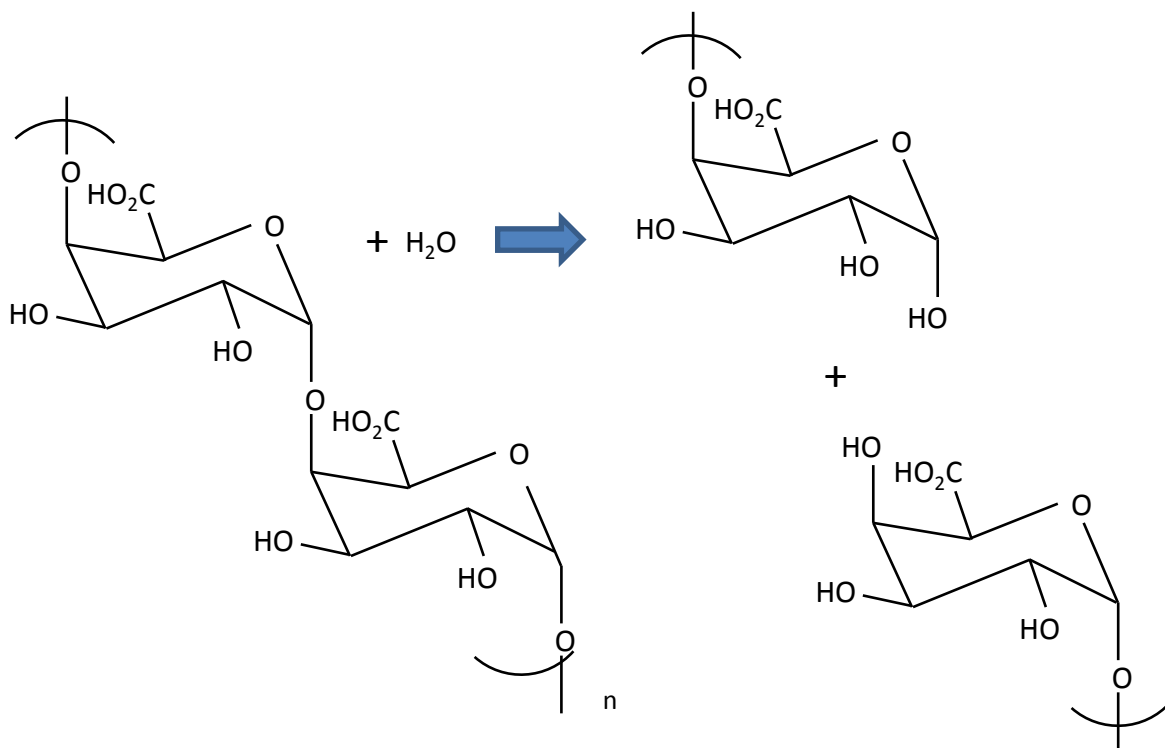
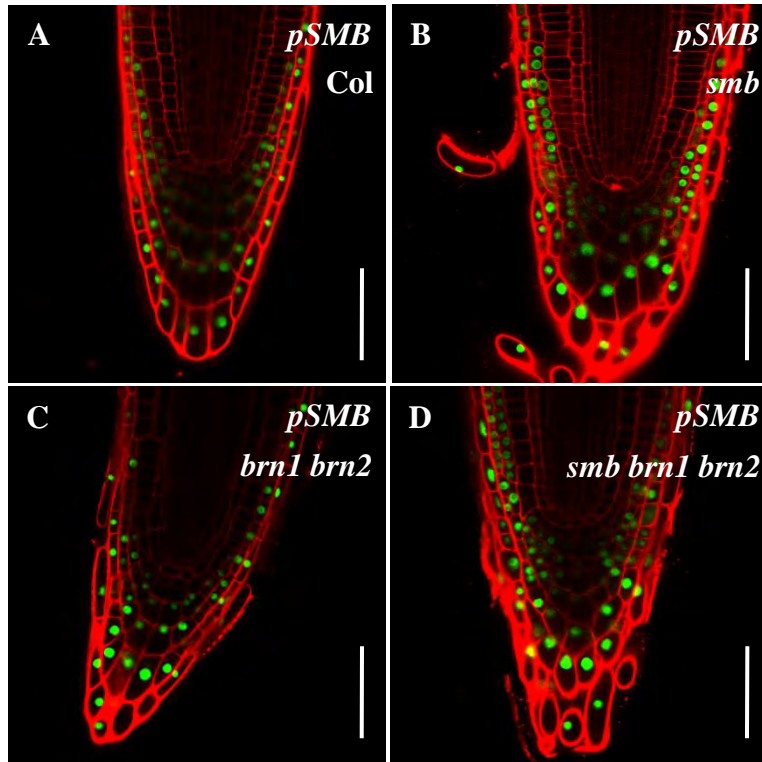


図3. ポリガラクトナーゼによるペクチン分解

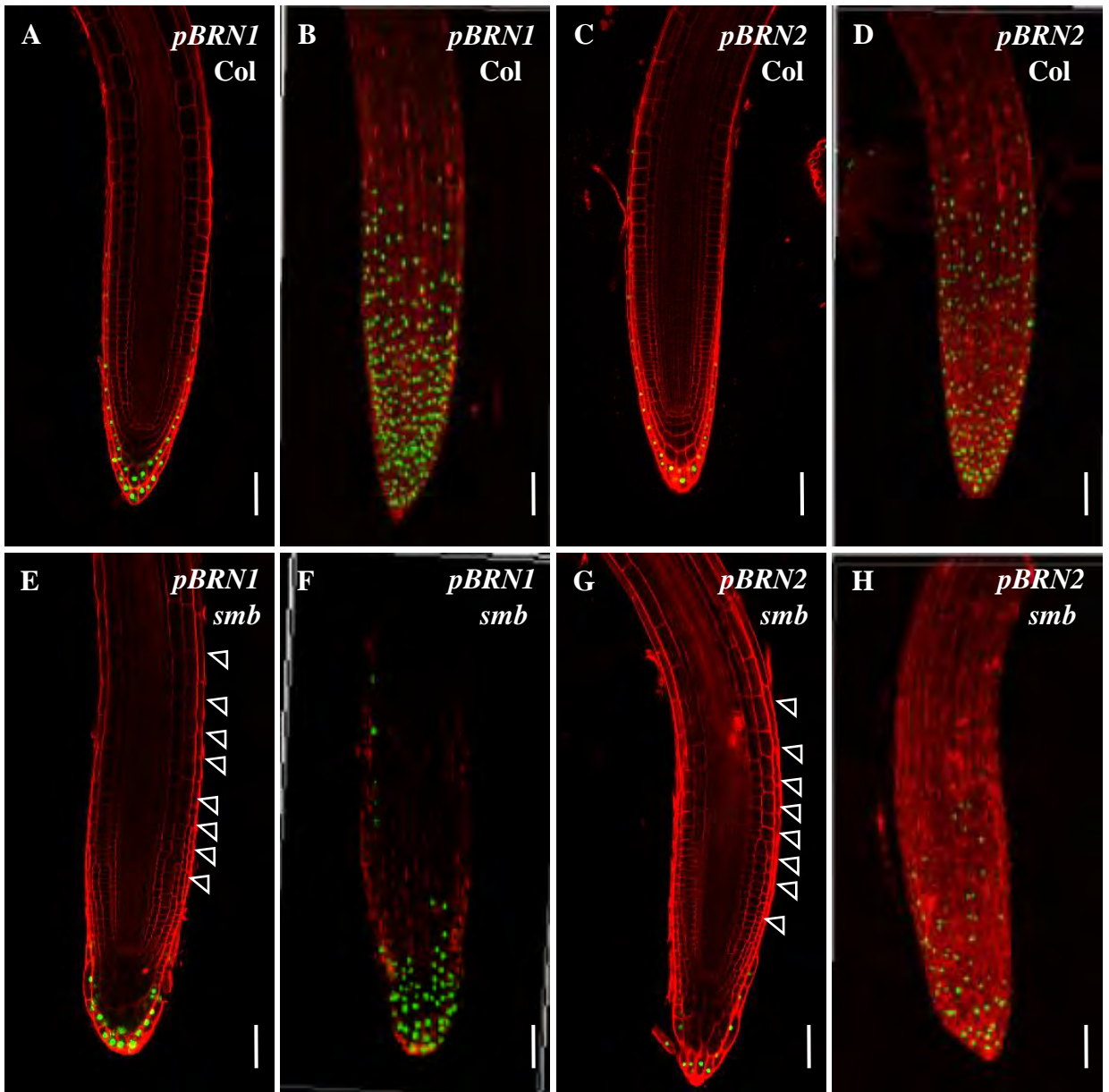
ポリガラクトン酸の分解過程の模式図。ポリガラクトン酸はポリガラクトナーゼによって加水分解される。



赤 : PI
 緑 : YFP

図4. *SOMBRERO* (*SMB*) は分化した根冠細胞で発現する

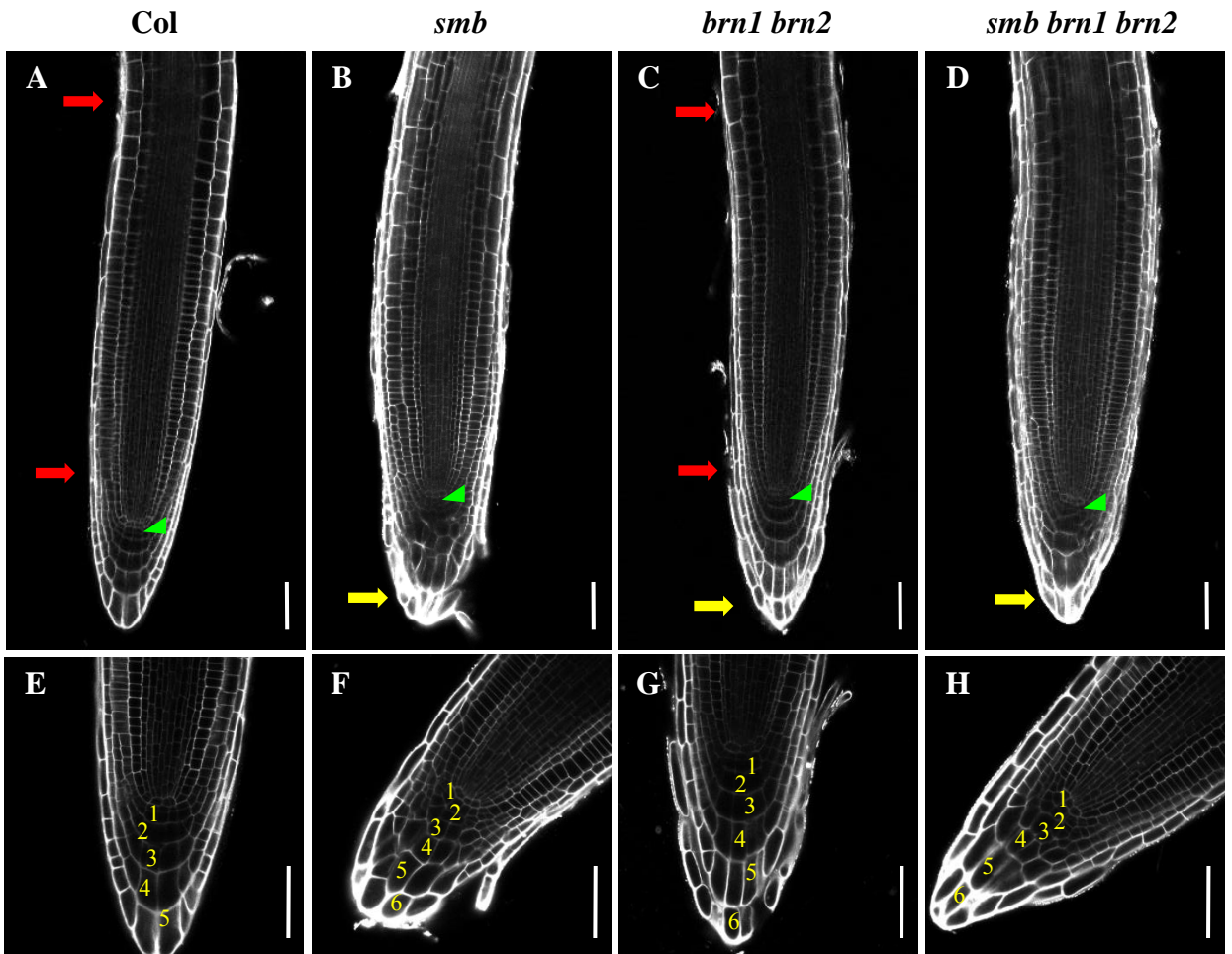
(A-D) 発芽後4日目の*pSMB-nYG*の発現。(A) 野生型背景。(B) *smb*単独変異体背景。(C) *brn1 brn2*二重変異体背景。(D) *smb brn1 brn2*三重変異体背景。緑はYFPシグナル。赤はPI染色。スケールバー : 50 μ m。



赤：PI
 緑：YFP

図5. *BEARSKINI* (*BRN1*) および *BRN2* は根冠の最外層また2層の細胞で発現し、側部根冠での発現はSMBに依存する

(A-H) 発芽後4日目の根端。(A, B, E, F) *pBRN1-nYG* の発現。(C, D, G, H) *pBRN2-nYG* の発現。(A, B, C, D) 野生型背景。(E, F, G, H) *smb* 単独変異体背景。三角印は *pBRN1/2* の側部根冠での発現が消失したことを示す。(A, C, D, G) 縦断面。(B, D, F, H) 3Dイメージ。緑はYFPシグナル。赤はPI染色。スケールバー：50 μm 。

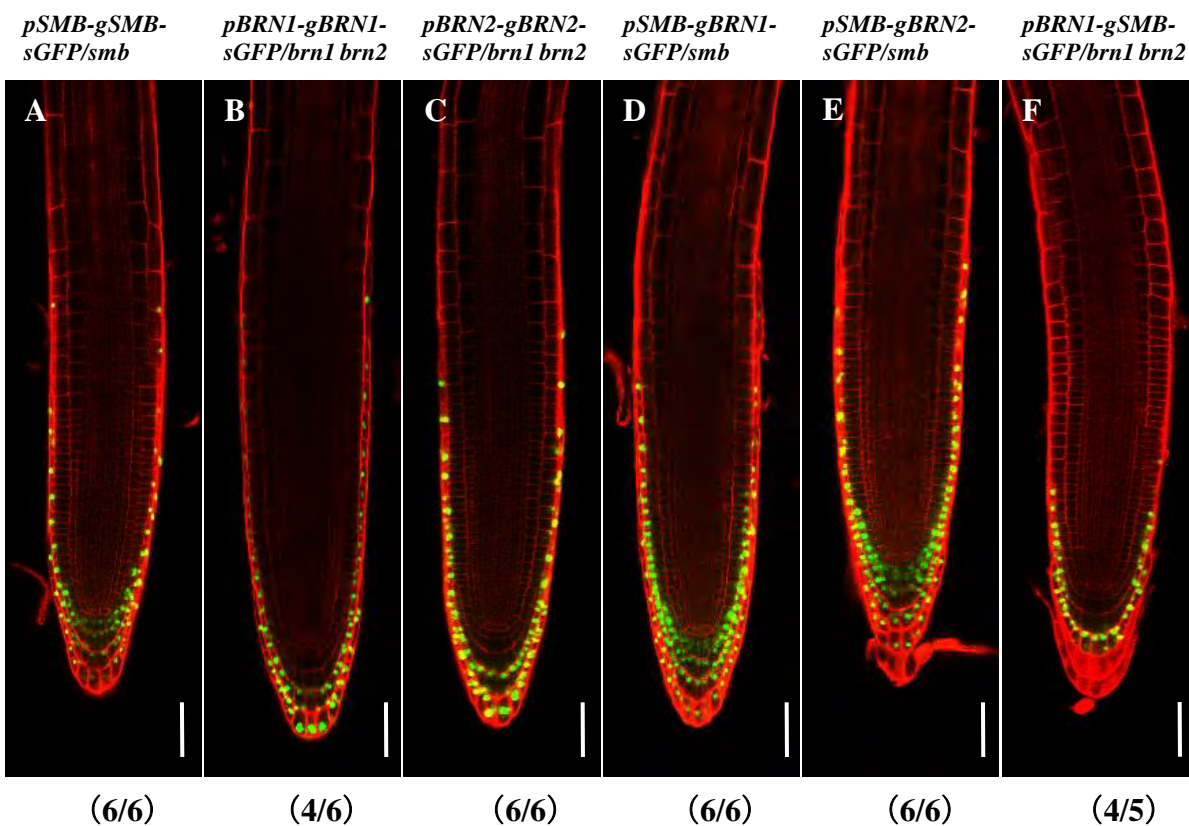


白 : PI

図6. *SMB*および*BRN1/2*の変異体の表現型

(A-H) 発芽後4日目の各変異体の根の縦断面。(A, E) 野生型。(B, F) *smb*単独変異体。(C, G) *brn1 brn2*二重変異体。(D, H) *smb brn1 brn2*三重変異体。

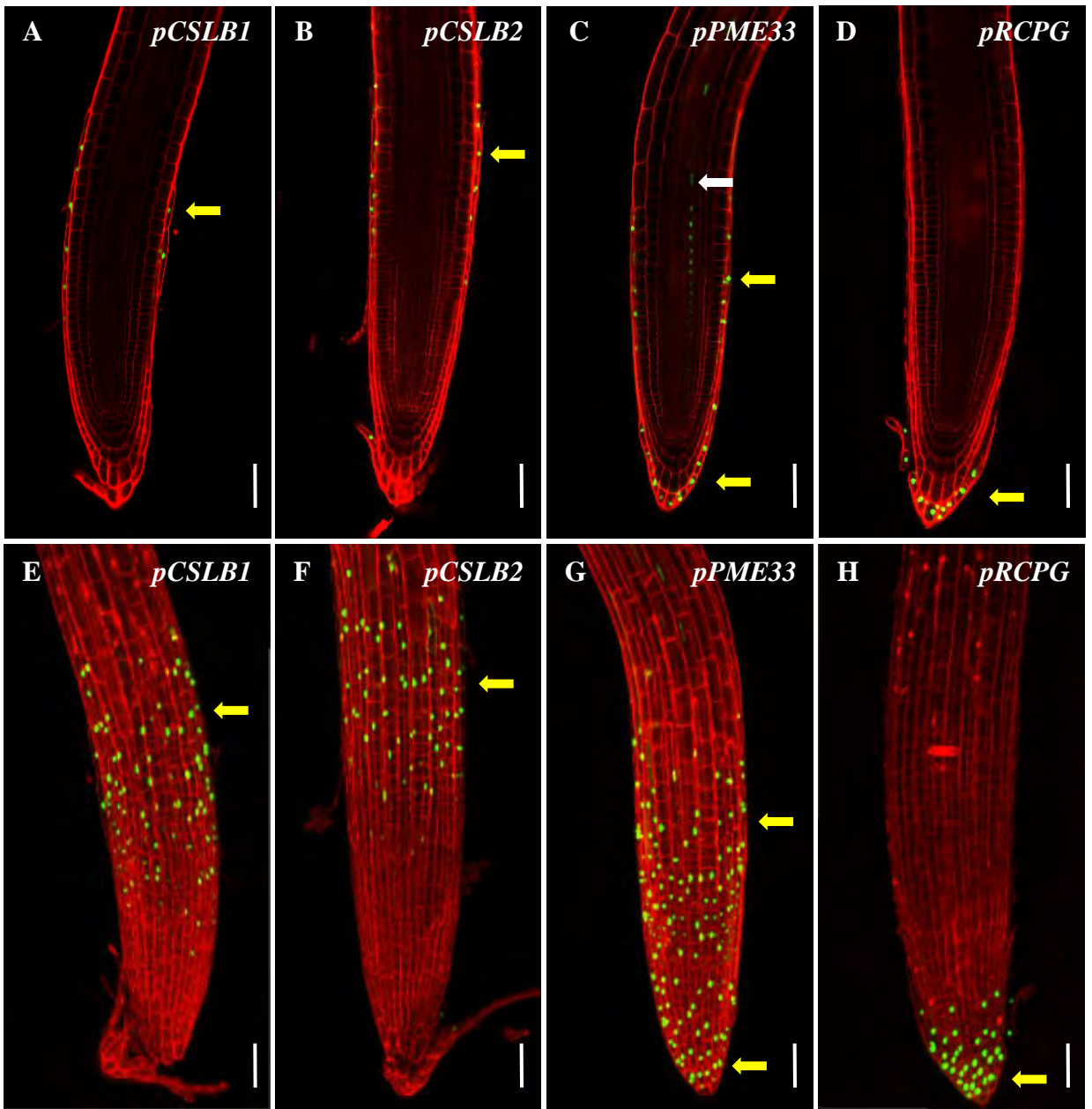
(E-H) 根の先端部の拡大。緑三角印は静止中心 (Quiescent center : QC) の位置を示す。赤矢印はPCD siteを示す。黄色矢印は剥離異常の層を示す。根冠の層数を黄色数字で示した。白はPropidium Iodide (PI) 染色。スケールバー : 50 μ m。



赤 : PI
 緑 : YFP

図7. Promotor swap解析

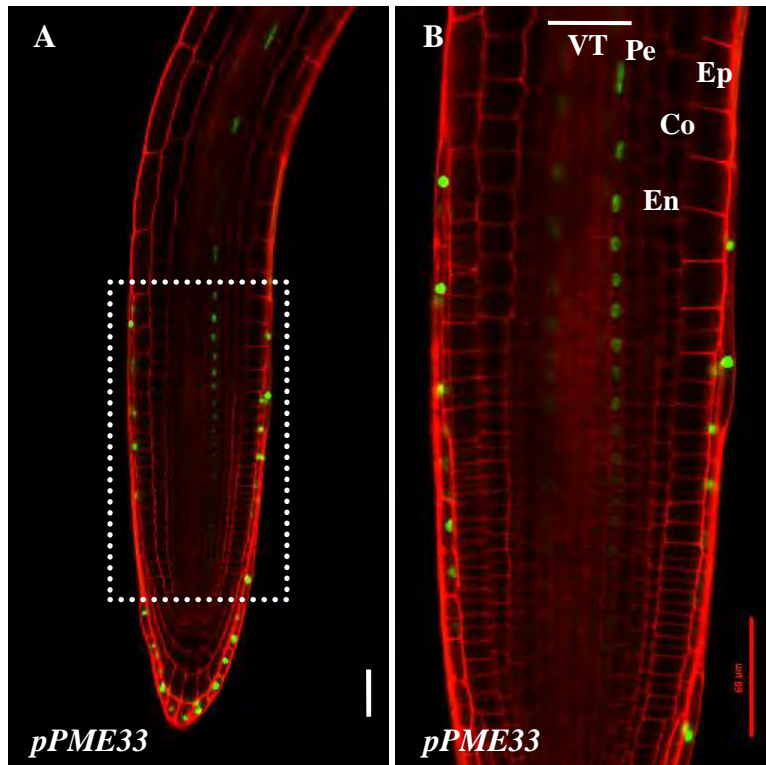
(A-F) 発芽後5日目の根の縦断面。(A) *pSMB-gSMB-sGFP/smb*。(B) *pBRN1-gBRN1-sGFP/brn1 brn2*。(C) *pBRN2-gBRN2-sGFP/brn1 brn2*。(D) *pSMB-gBRN1-sGFP/smb*。(E) *pSMB-gBRN2-sGFP/smb*。(F) *pBRN1-gSMB-sGFP/brn1 brn2*。括弧内の数字：変異体の表現型を回復したライン数/全体のライン数。緑はYFPシグナル。赤はPI染色。スケールバー：50 μ m。



赤 : PI
 緑 : YFP

図8. 同定された推定細胞壁代謝関連遺伝子は根冠の最外層で発現する

(A-H) 発芽後4日目の野生型背景の根。(A-D) 根端部の縦断面。(E-H) 根端部の3Dイメージ。(A,E) *pCSLB1-nYG*の発現。(B, F) *pCSLB2-nYG*の発現。(C, G) *pPME33-nYG*の発現。(D,H) *pRCPG-nYG*の発現。緑はYFPシグナル。赤はPI染色。スケールバー : 50 μ m。



赤 : PI
 緑 : YFP

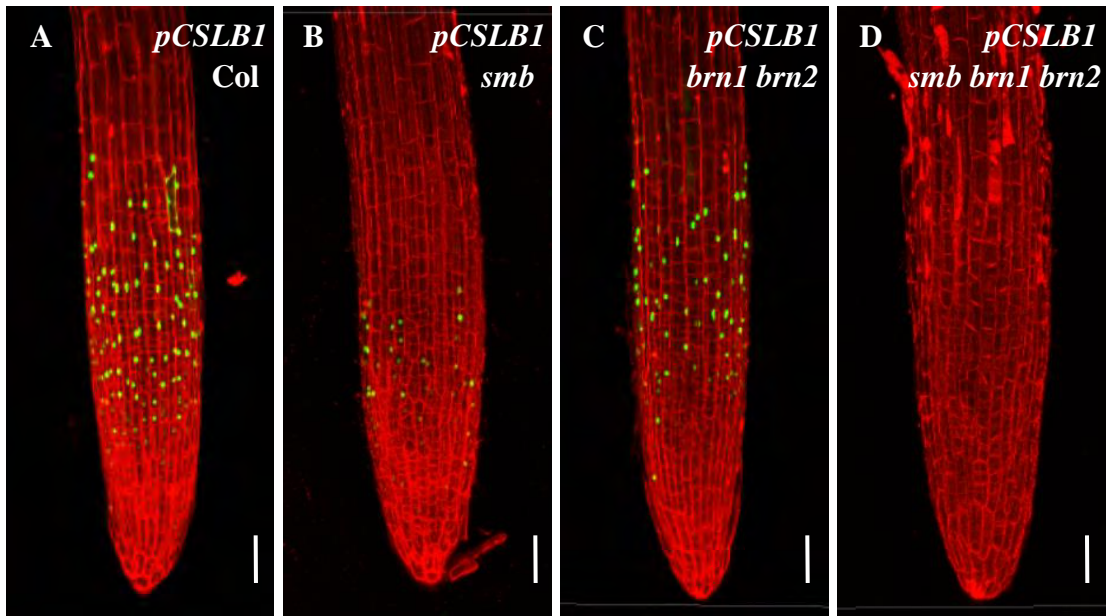
図9. *PME33*は維管束においても発現する

(A,B) 発芽後4日目の*pPME33-nYG*の発現。(A) 根端部の縦断面。(B) Aの点線部位の拡大図。緑はYFPシグナル。赤はPI染色。VT : 維管束組織、PE : 内鞘、En : 内皮、Co : 皮層、Ep : 表皮。スケールバー : 50 μ m。



図10. *RCPG*は伸長領域の原生木部道管細胞でも発現する

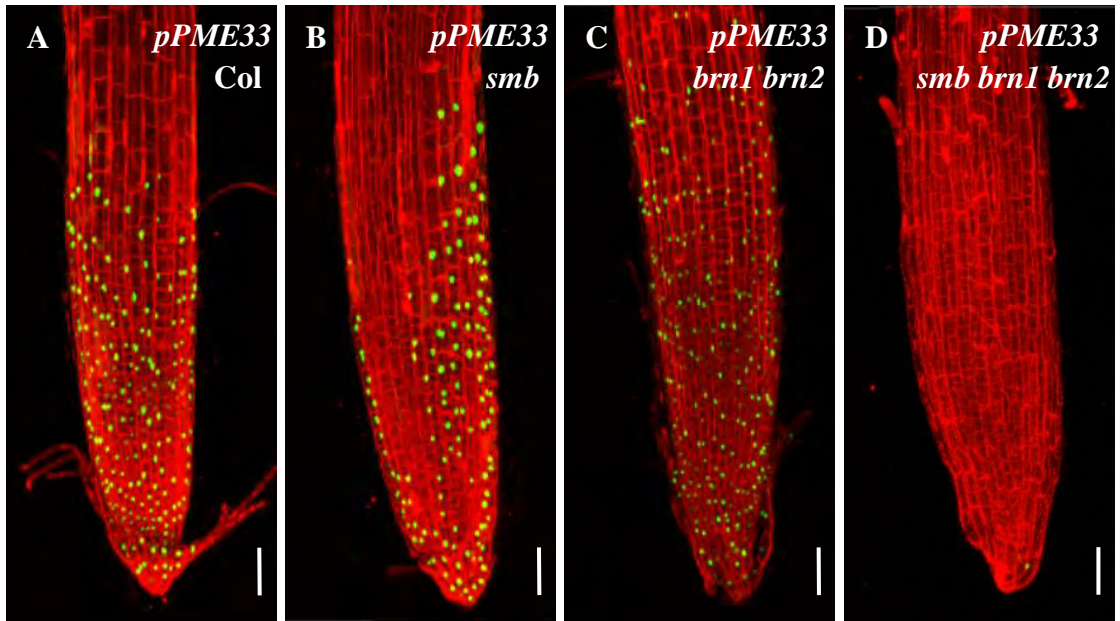
(A, B) 発芽後4日目の*pRCPG-nYG*の発現。(A) 根端部の縦断面。(B) Aの点線部位の拡大図。緑はYFPシグナル。赤はPI染色。スケールバー：100 μm 。



赤 : PI
 緑 : YFP

図11. *CSLB1*の発現はおもにSMBに依存し、*smb brn1 brn2*三重変異体背景でほとんど消失する

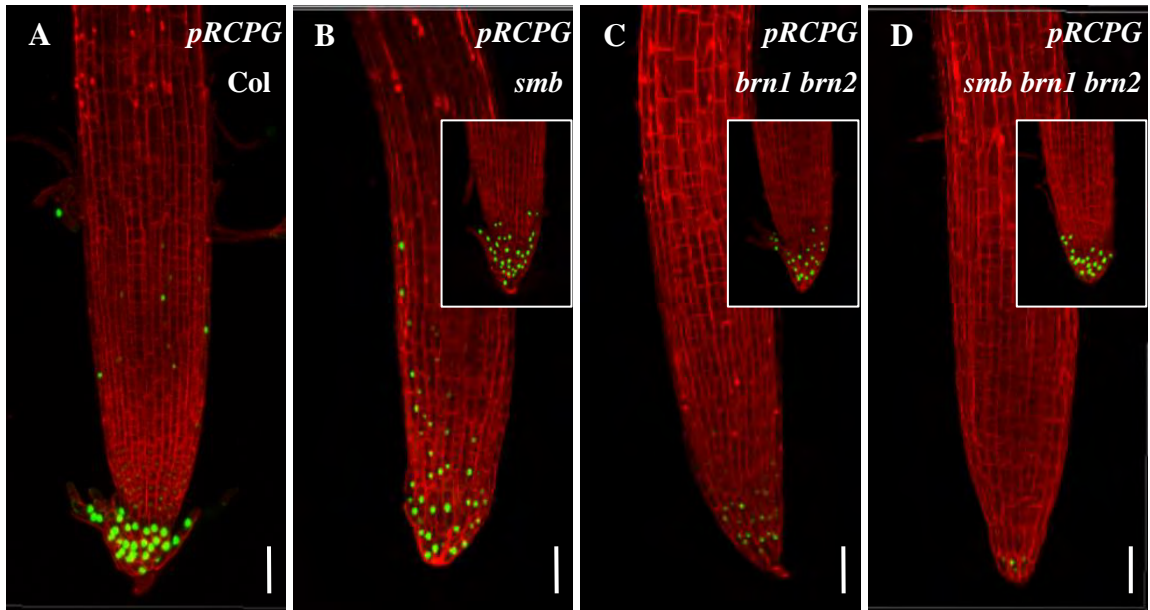
(A-D) *pCSLB1-nYG*の発現。3Dイメージ。(A) 野生型背景。(B) *smb*単独変異体背景。(C) *brn1 brn2*二重変異体背景。(D) *smb brn1 brn2*三重変異体背景。緑はYFPシグナル。赤はPI染色。スケールバー : 50 μ m。



赤 : PI
 緑 : YFP

図12. *PME33*の根端での発現は*smb brn1 brn2*三重変異体背景でほとんど消失する

(A-D) *pPME33-nYG*の発現。3Dイメージ。(A) 野生型背景。(B) *smb*単独変異体背景。(C) *brn1 brn2*二重変異体背景。(D) *smb brn1 brn2*三重変異体背景。緑はYFPシグナル。赤はPI染色。スケールバー : 50 μ m。



赤 : PI
緑 : YFP

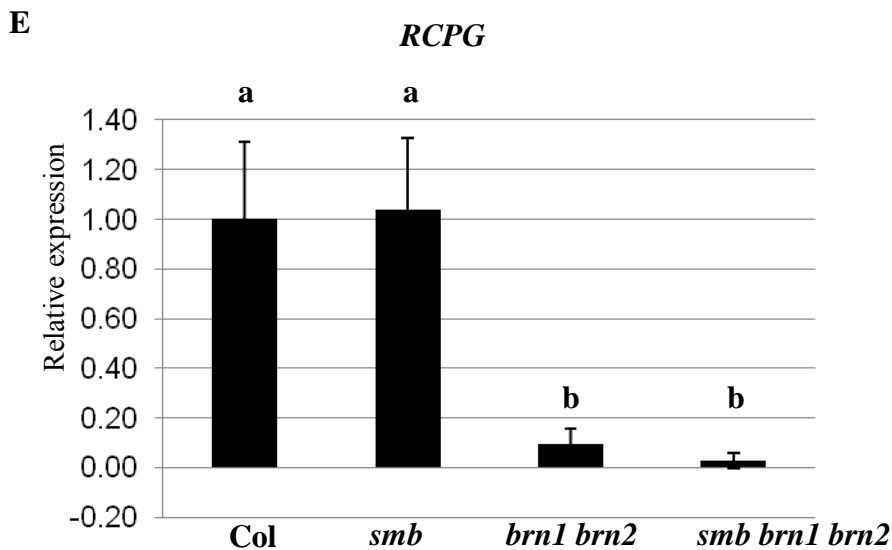
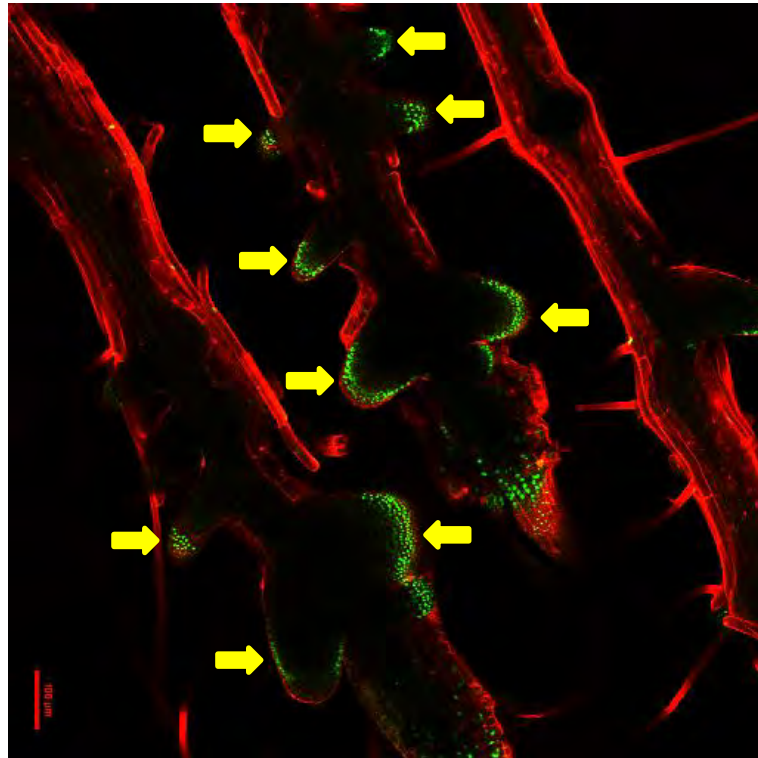


図13. *RCPG*の発現はBRN1/2に依存する

(A-D) *pRCPG-nYG*の発現。3Dイメージ。(A) 野生型背景。(B) *smb*単独変異体背景。(C) *brn1 brn2*二重変異体背景。(D) *smb brn1 brn2*三重変異体背景。

(B-D) 内に挿入した写真は、野生型とバッククロスした各変異体背景をヘテロに持つF1植物の根端。緑はYFPシグナル。赤はPI染色。スケールバー：50 μ m。

(E) qRT-PCR法による*RCPG*の転写産物の定量。*ACT2*をコントロールに用いた。a, bは有意差 ($p < 0.01$) によるグループ分け。



赤：PI
緑：YFP

図14. オーキシンで異所的に側根形成を誘導させた根

*pSMB-gSMB-sGFP/smb*の発現。緑はGFPシグナル。赤はPI染色。黄色矢印はオーキシン誘導による異所的な側根形成を示す。スケールバー：100 μm 。

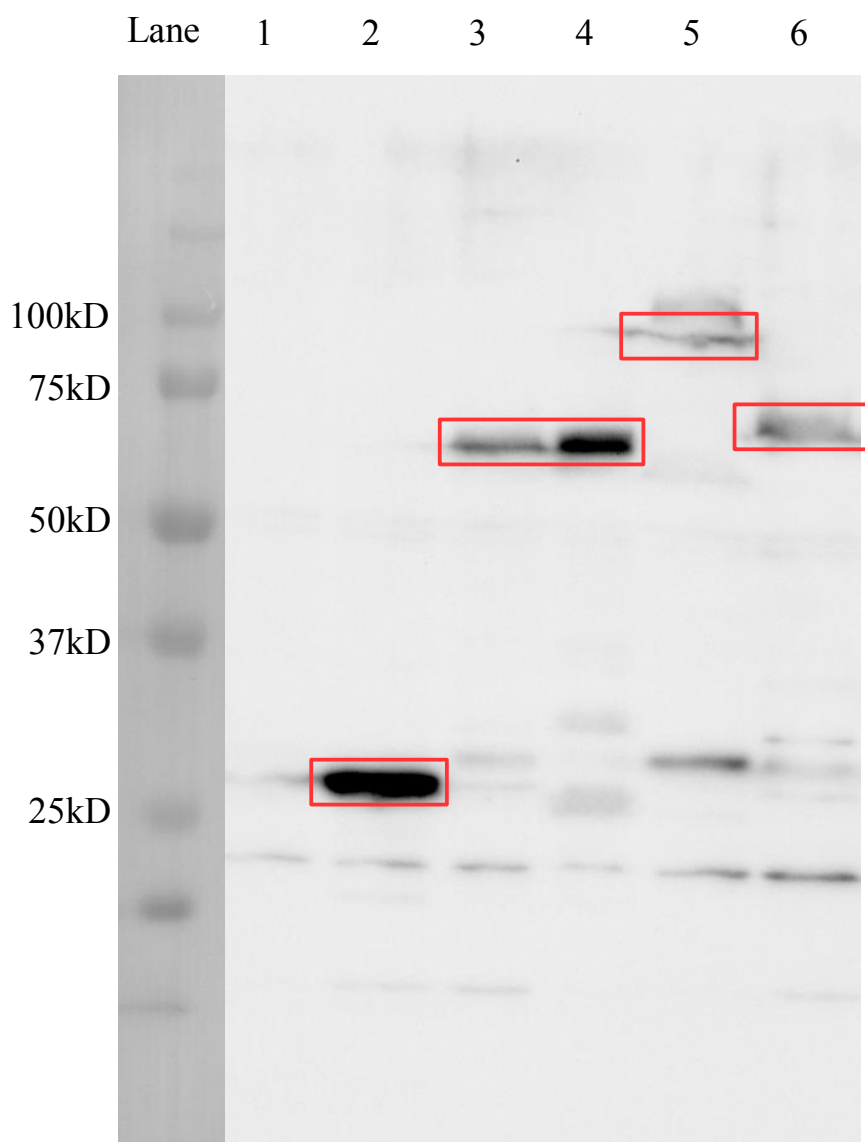


図15. Western blot解析によるSMBおよびBRN1とGFPとの融合タンパク質の検出

抗GFP抗体 (ab290) を用いたSMB-GFPおよびBRN1-GFPタンパク質のwestern blot解析。Lane 1 : Col、Lane 2 : nls-GFP (auxin+)、Lane 3 : BRN1-GFP (auxin-)、Lane 4 : BRN1-GFP (auxin+)、Lane 5 : *pBRN1-nYG* (auxin+)、Lane 6 : SMB-GFP (auxin+)。予想される分子量は、nls-GFPは27kD、BRN1-GFPは63kD、SMB-GFPは70kD、*nYG*は97kD。

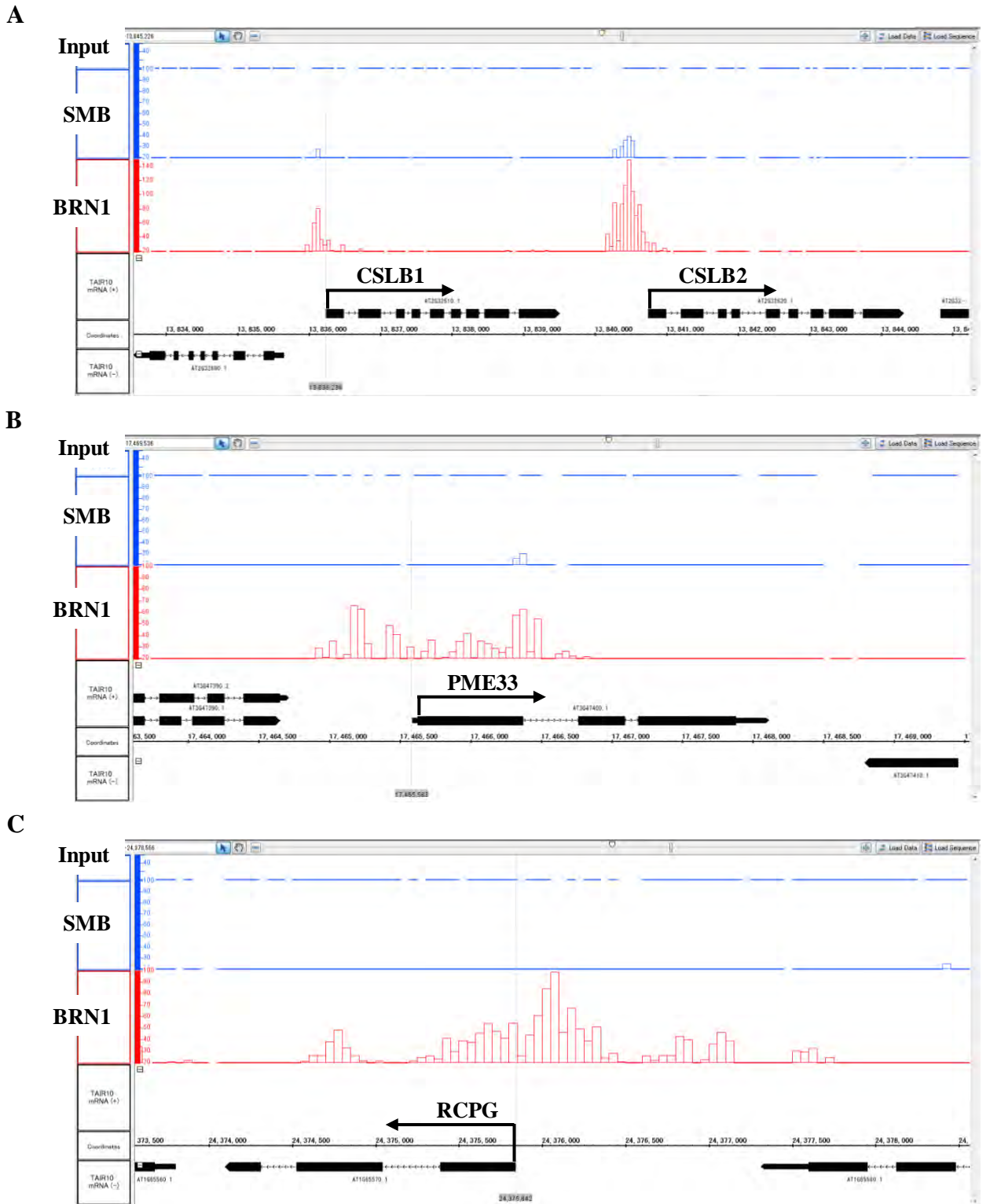


図16. BRN1は*CSLB1/2*、*PME33*、*RCPG*遺伝子のプロモーター領域に直接結合する

(A-C) 抗GFP抗体を用いたSMB-GFPおよびBRN1-GFPの各遺伝子プロモーター領域におけるChIP-seq解析。(A) *CSLB1*と*CSLB2*。(B) *PME33*。(C) *RCPG*。上からInput、SMB-GFP、BRN1-GFPにおけるChIP-seqの結果。

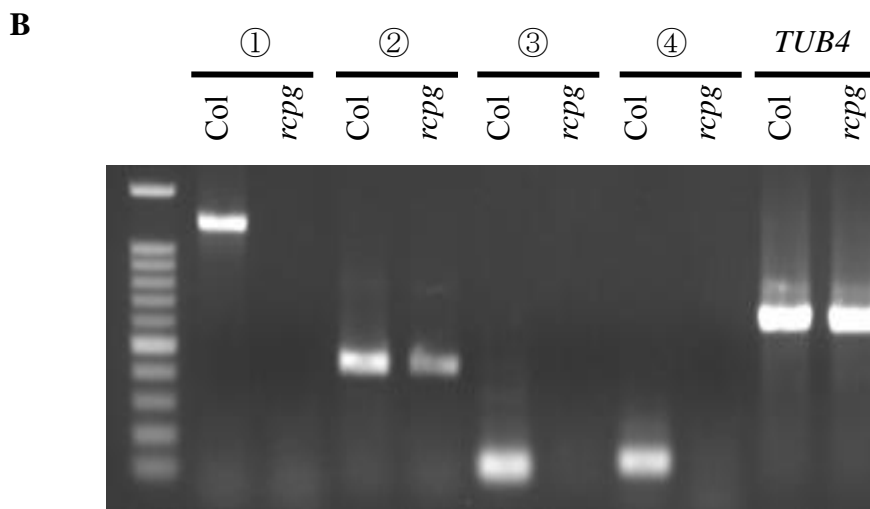
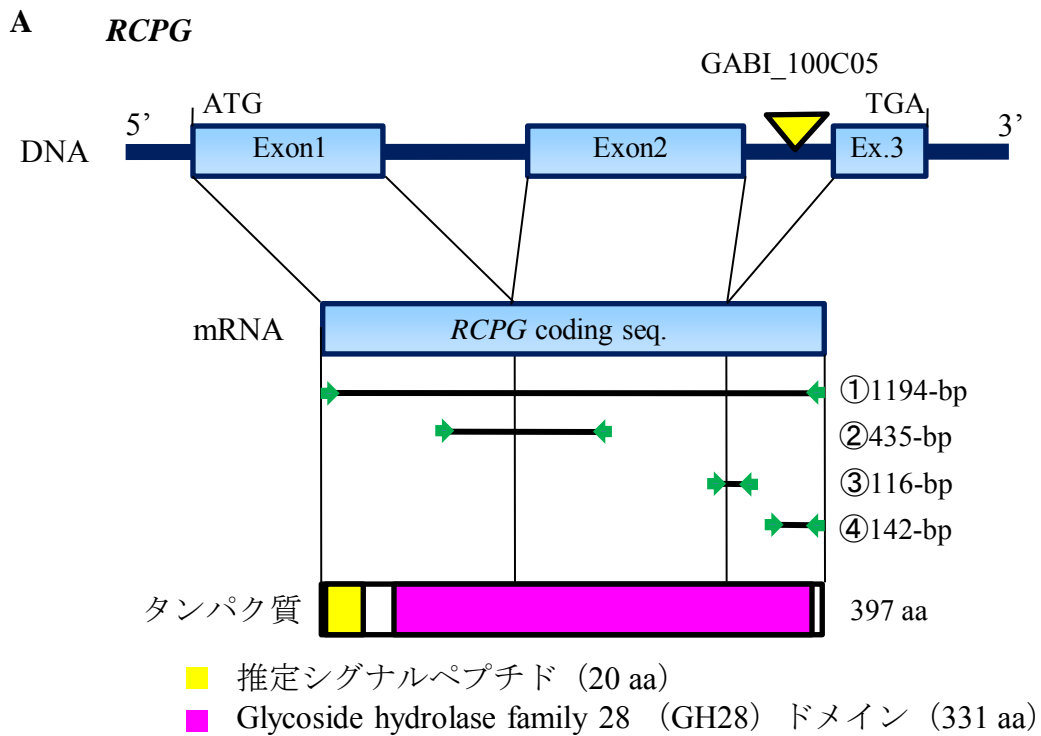
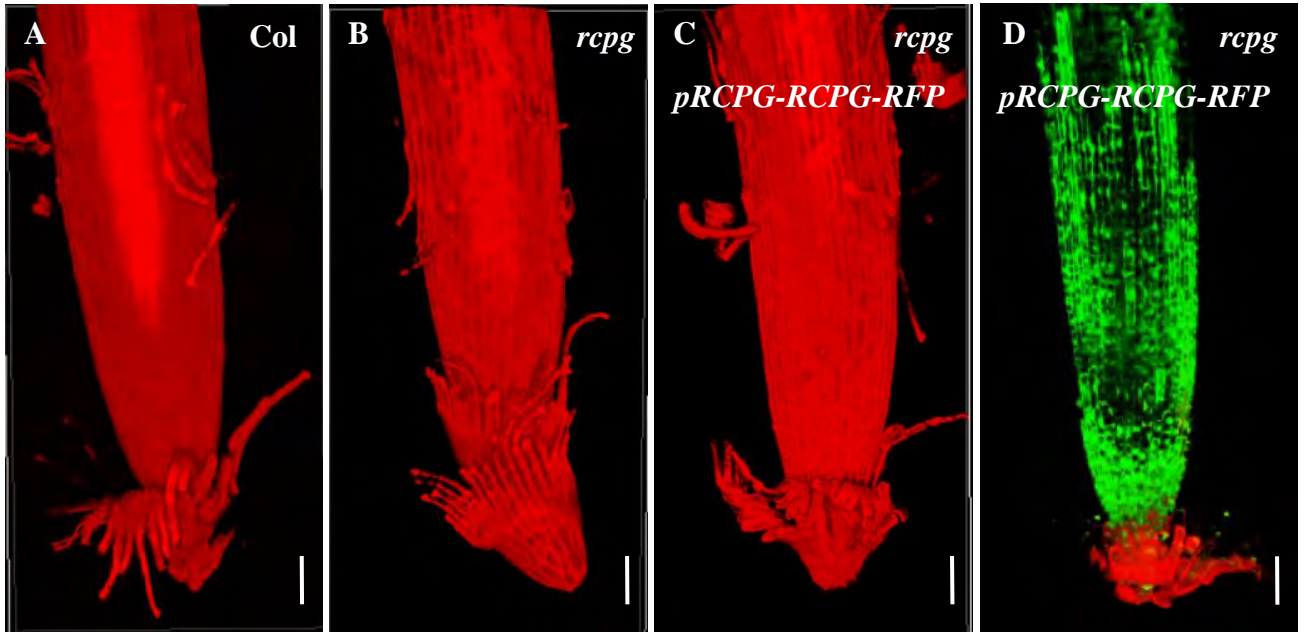


図17. *rcpg*機能欠損変異体の単離

(A) *RCPG*遺伝子の模式図とRT-PCR法を用いた*RCPG*転写産物の解析に用いたプライマーの位置と転写物の長さ。黄色三角はT-DNA挿入箇所。緑色矢印はプライマーの位置。黒実線は転写領域。①全長1194-bp。②第1イントロンを挟む435-bp。③第2イントロンを挟む620-bp。④第3エキソン内の142-bp。(B) RT-PCR法を用いた*RCPG*転写産物の蓄積量。解析に用いた領域と番号を(A)に示す。*TUB4*をコントロールとして用いた。

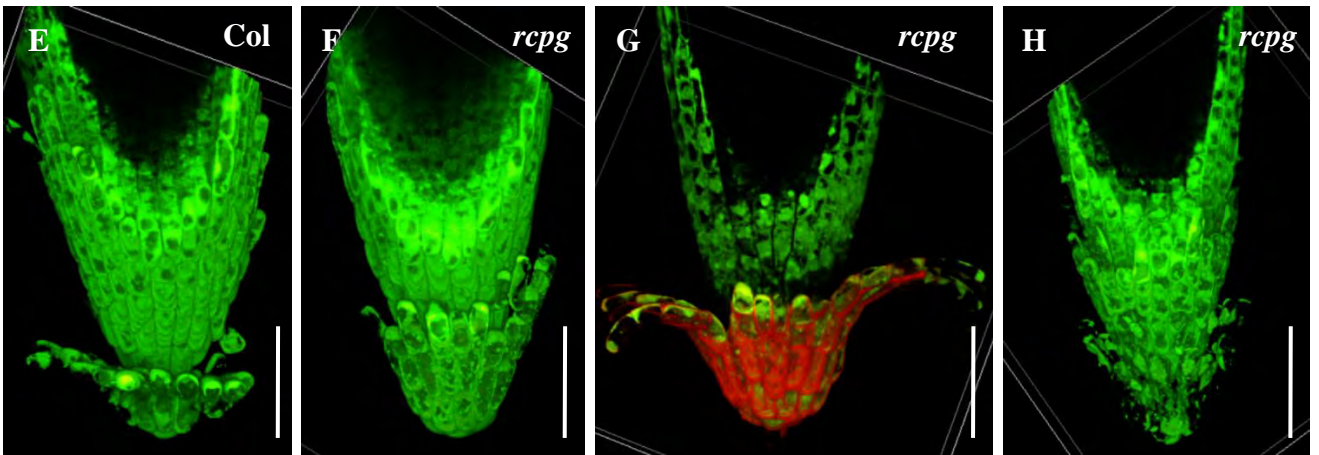


赤 : PI

赤 : PI

赤 : PIとRFP

赤 : RFP
緑 : FDA

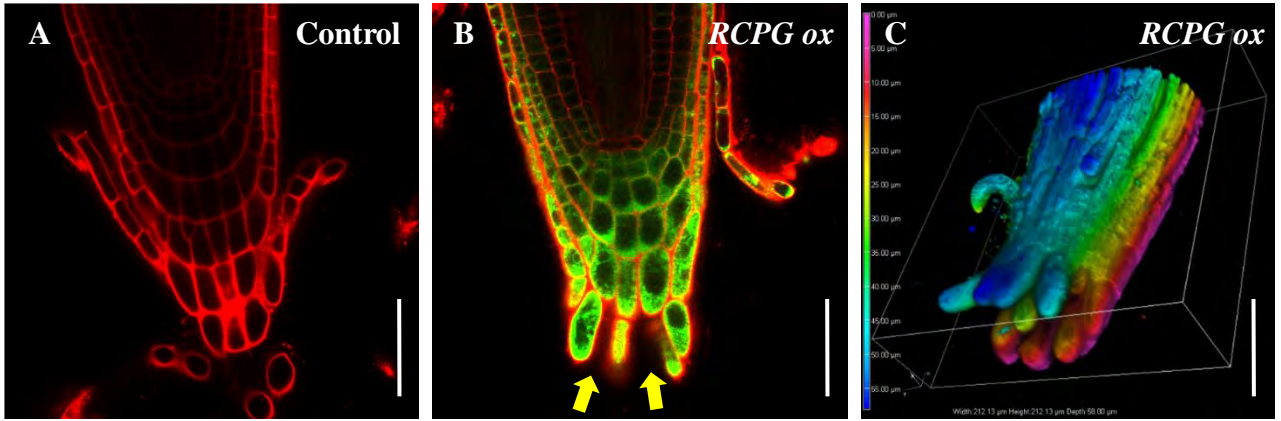


赤 : RFP
緑 : FDA

pRCPG-RCPG-RFP hemizygoteから分離した次世代

図18. *rcpg*機能欠損変異体の剥離する根冠最外層は外向きに湾曲しない

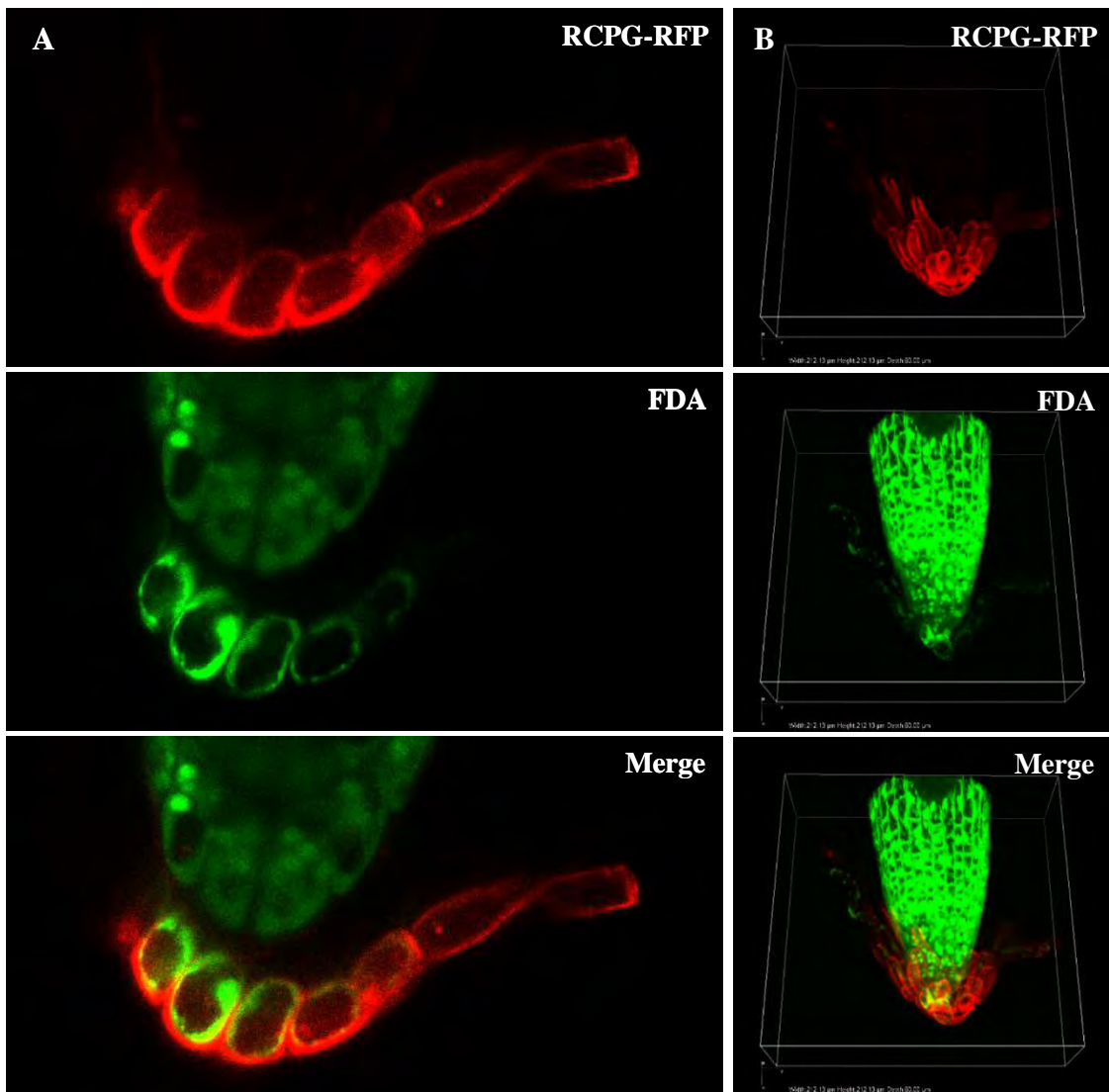
(A-H) 発芽後4日目の根の根端部の3Dイメージ。(A,E) 野生型 (n=12)。
(B,F) *rcpg*変異体 (n=16)。(C,D,G,H) *pRCPG-gRCPG-tagRFP/rcpg* (n=13)。
(A,B) 赤はPI染色。(C) 赤はPI染色とRFP。(D-H) 赤はRFP。緑はFDA染色。スケールバー : 50 μ m。



赤 : PI
 緑 : GFP

図19. *RCPG*過剰発現体の根冠最外層は歯抜け状に細胞剥離が進む

(A-C) *35S:erGFP-UAS-GVG/UAS-gRCPG*の植物体。(A,B) 縦断面。赤 : PI染色。緑 : GFP。(C) 3Dイメージ。色は3Dイメージにした際の根の深度を示す。
 (A) コントロール。ハイグロマイシンプレート。(B,C) DEX誘導。10 μM DEXプレート。スケールバー : 50 μm



赤 : RFP
 緑 : FDA

図20. RCPCGタンパク質は根冠の剥離する最外層細胞の細胞外に局在する

(A,B) *pRCPCG-gRCPCG-tagRFP/rcpg*。FDAで可視化したRCPCGタンパク質の発現パターン。(A) 縦断面。(B) 3Dイメージ。スケールバー : 50 μ m。

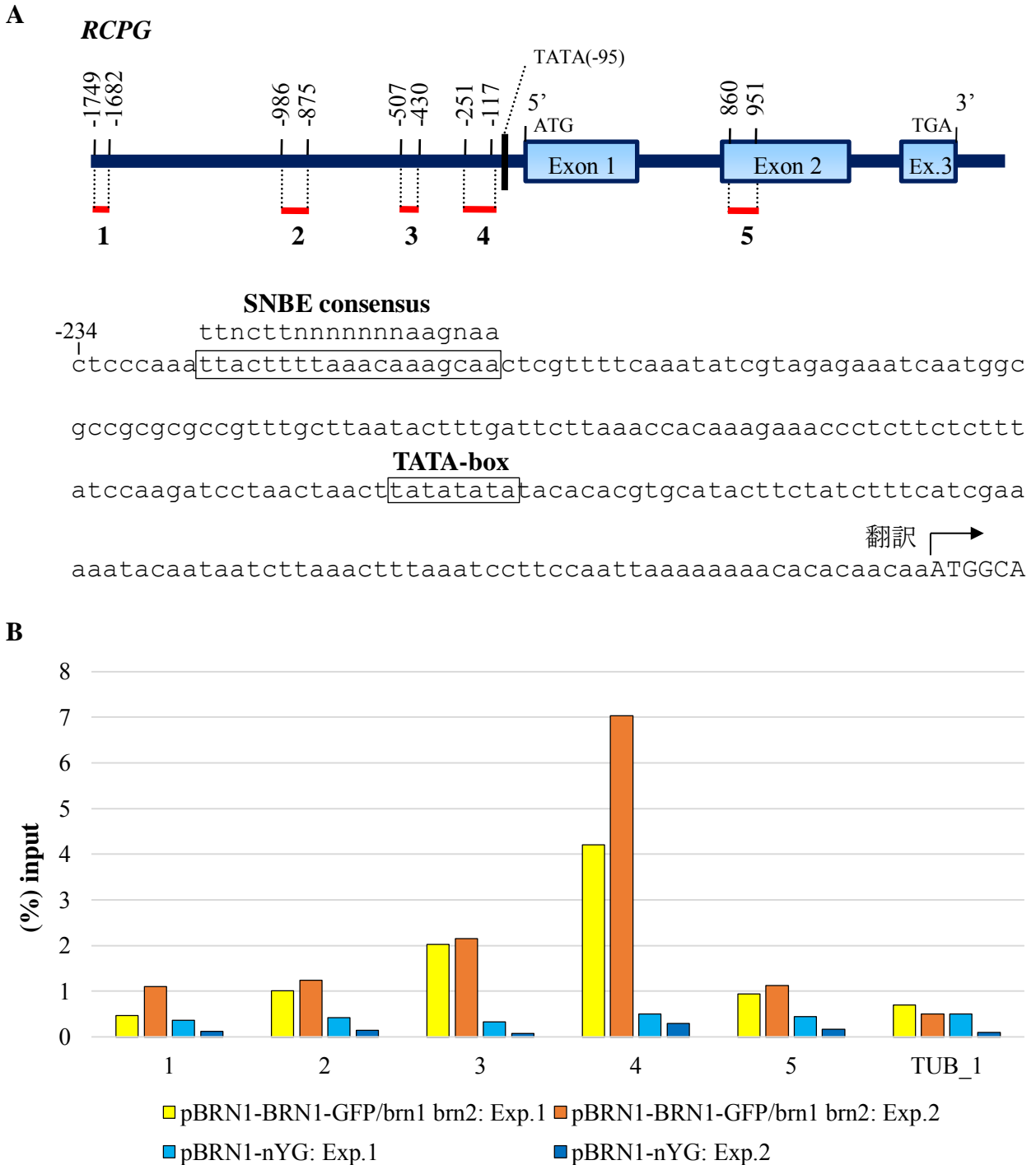


図21. BRN1はRCPGの発現を直接制御する

(A) RCPG遺伝子とそのプロモーター領域の模式図。赤線とその下の数字は、ChIP-qPCR解析で用いた増幅領域。(B) 抗GFP抗体を用いたBRN1のRCPG遺伝子プロモーター領域におけるChIP-qPCR解析。解析に用いた領域と番号を(A)に示す。ChIPは独立に2回行い(Exp.1とExp.2)、それぞれの実験でbiological replicates (n=3) 用いた。TUB4をコントロールに用いた。

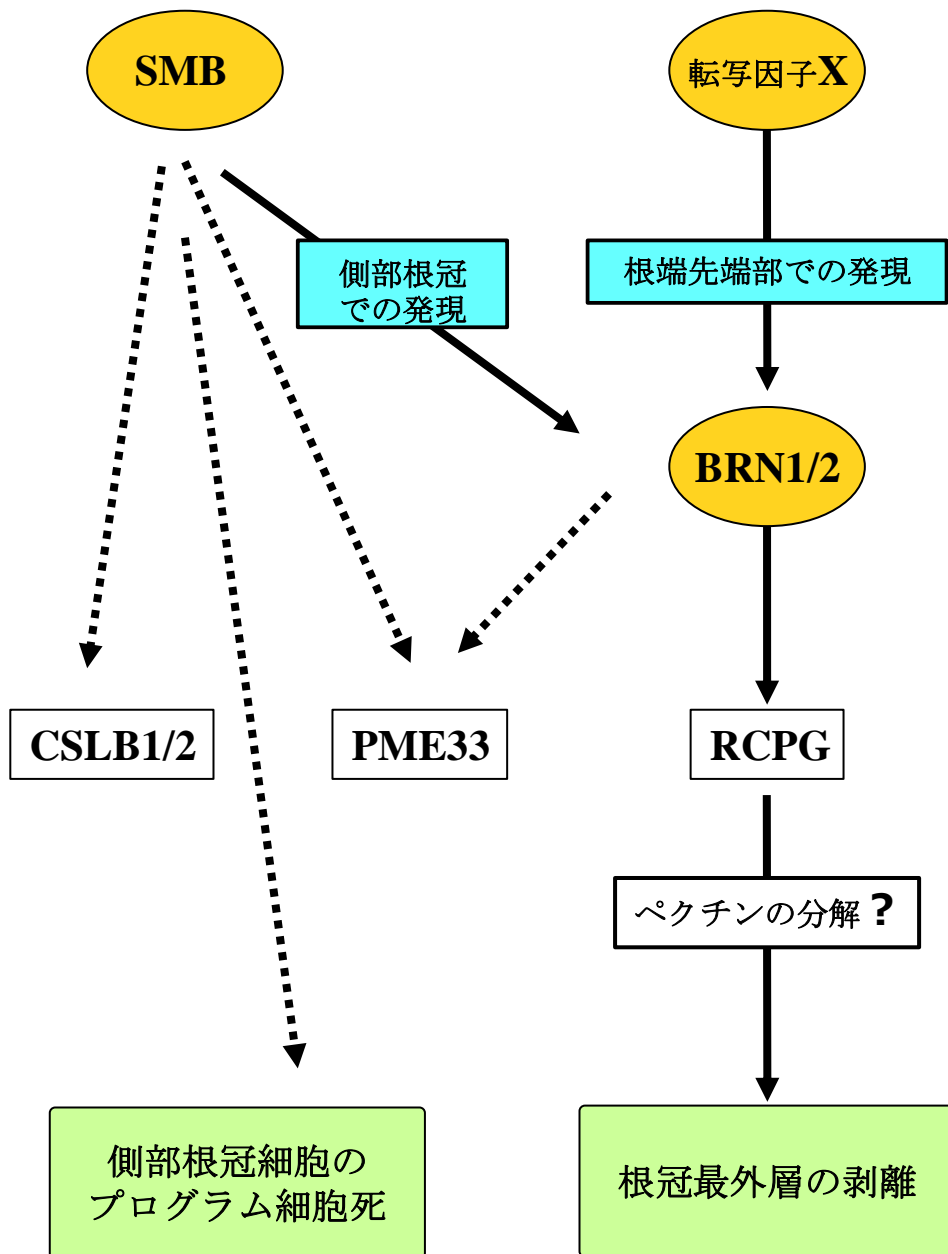


図22. 本研究のまとめ

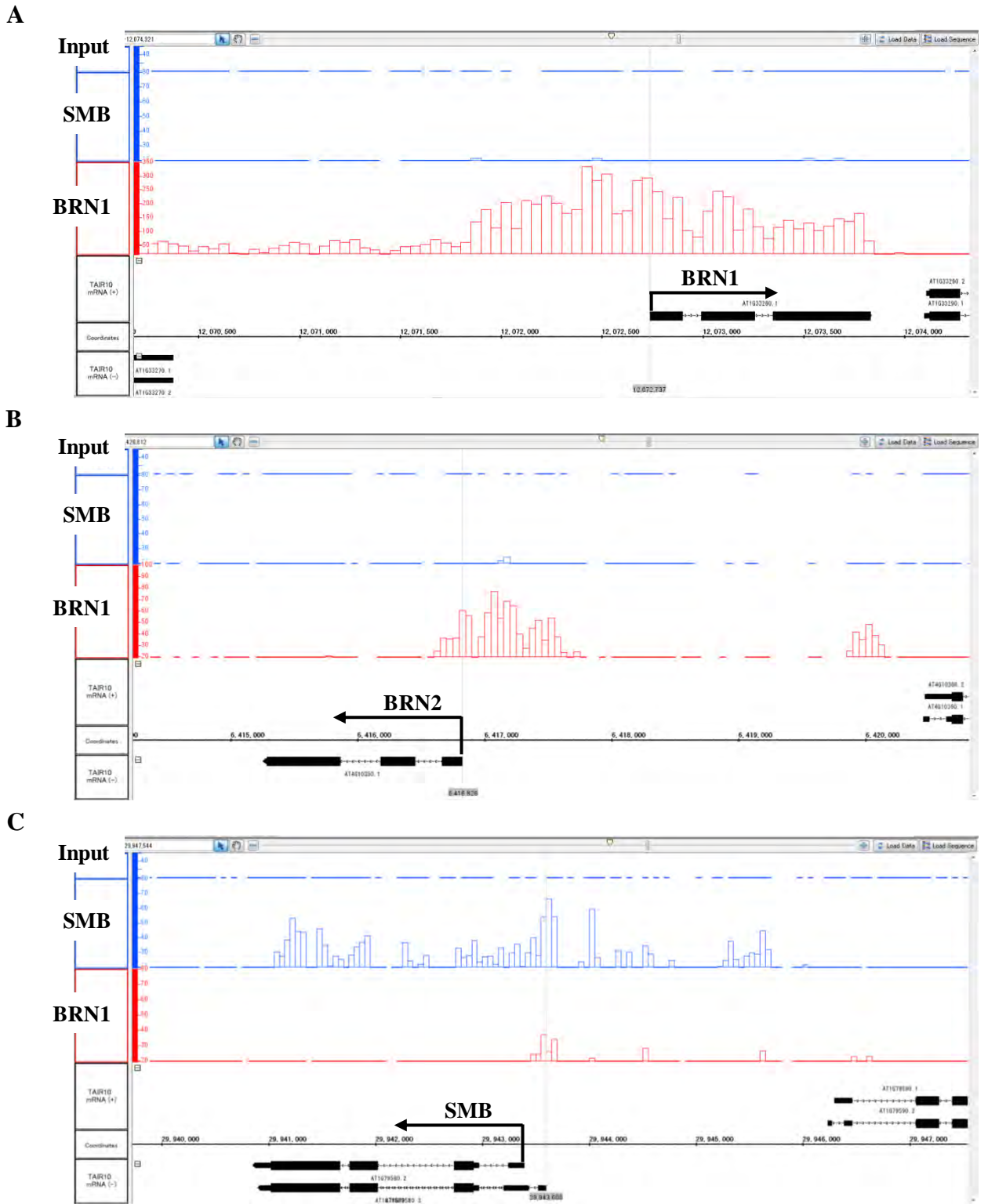


図23. BRN1は自身のプロモーターおよびBRN2のプロモーター領域に、SMBは自身のプロモーター領域に直接結合する

(A-C) 抗GFP抗体を用いたSMB-GFPおよびBRN1-GFPの各遺伝子プロモーター領域におけるChIP-seq解析。(A) *BRN1*。(B) *BRN2*。(C) *SMB*。上からInput、SMB-GFP、BRN1-GFPにおけるChIP-seqの結果。

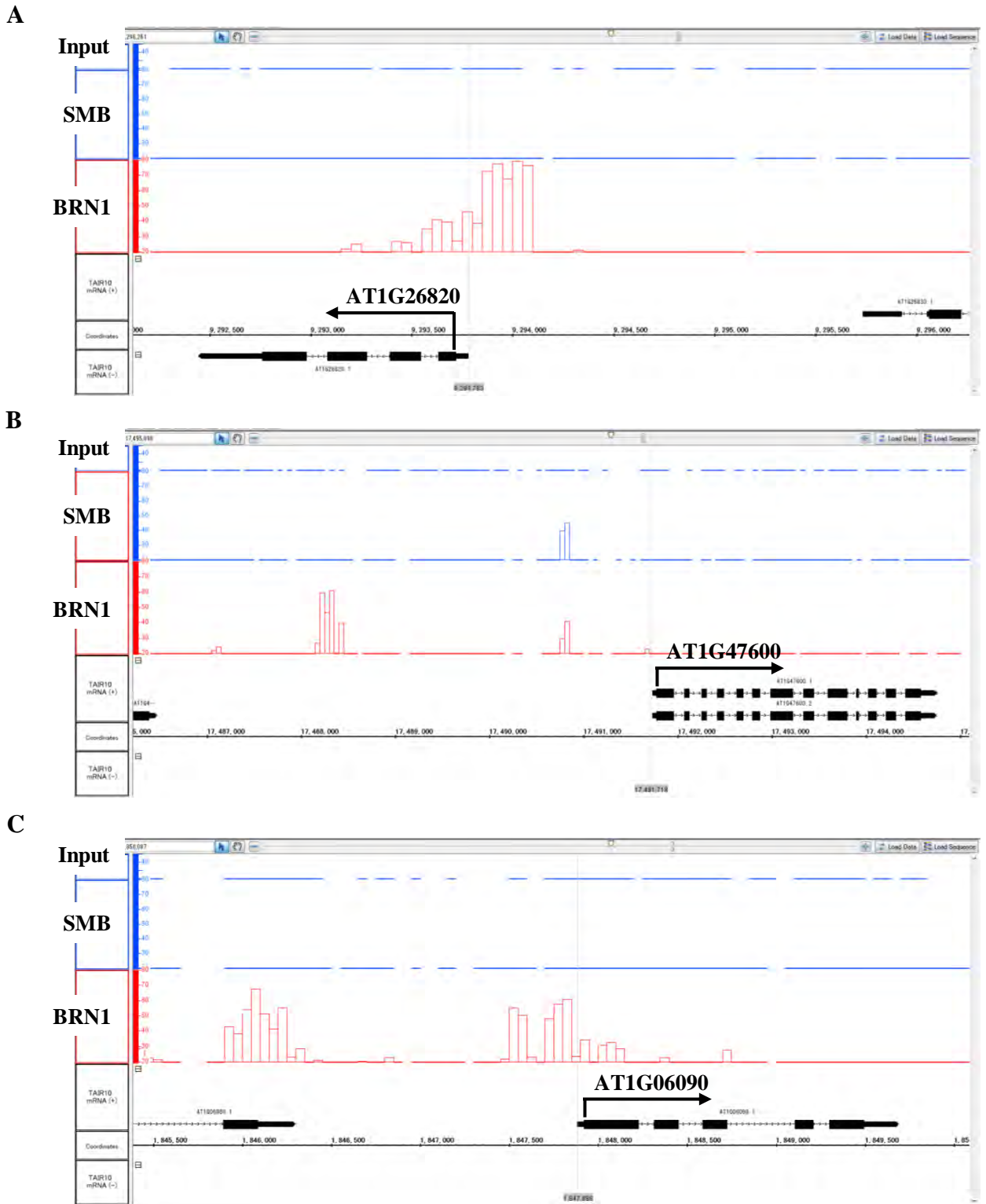


図24. BRN1の直接結合が見られる下流遺伝子

(A-C) 抗GFP抗体を用いたSMB-GFPおよびBRN1-GFPの各遺伝子プロモーター領域におけるChIP-seq解析。(A) AT1G26820。(B) AT1G47600。(C) AT1G06090。上からInput、SMB-GFP、BRN1-GFPにおけるChIP-seqの結果。

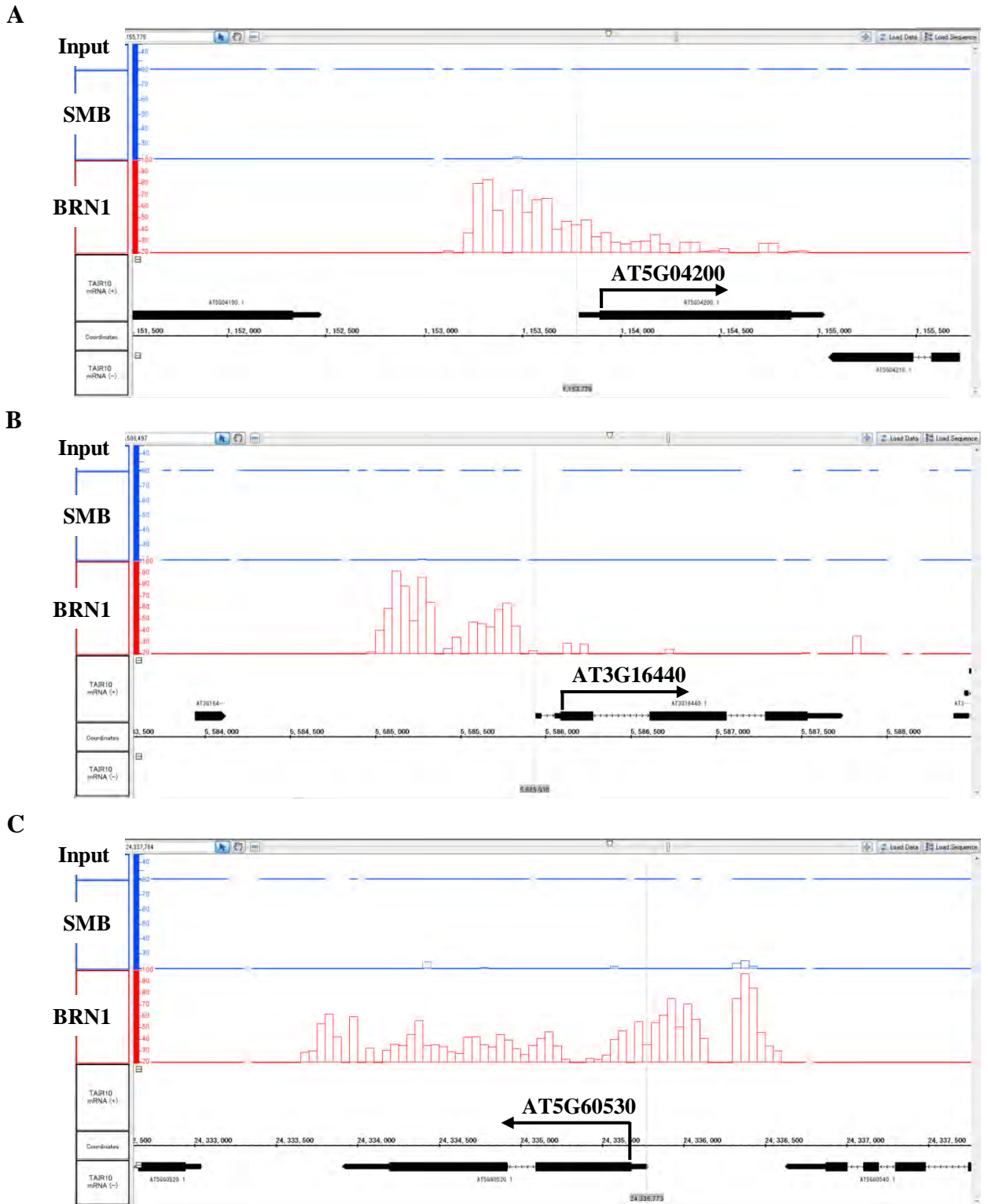


図25. BRN1の直接結合が見られる下流遺伝子

(A-C) 抗GFP抗体を用いたSMB-GFPおよびBRN1-GFPの各遺伝子プロモーター領域におけるChIP-seq解析。(A) AT5G04200。(B) AT3G16440。(C) AT5G60530。上からInput、SMB-GFP、BRN1-GFPにおけるChIP-seqの結果。

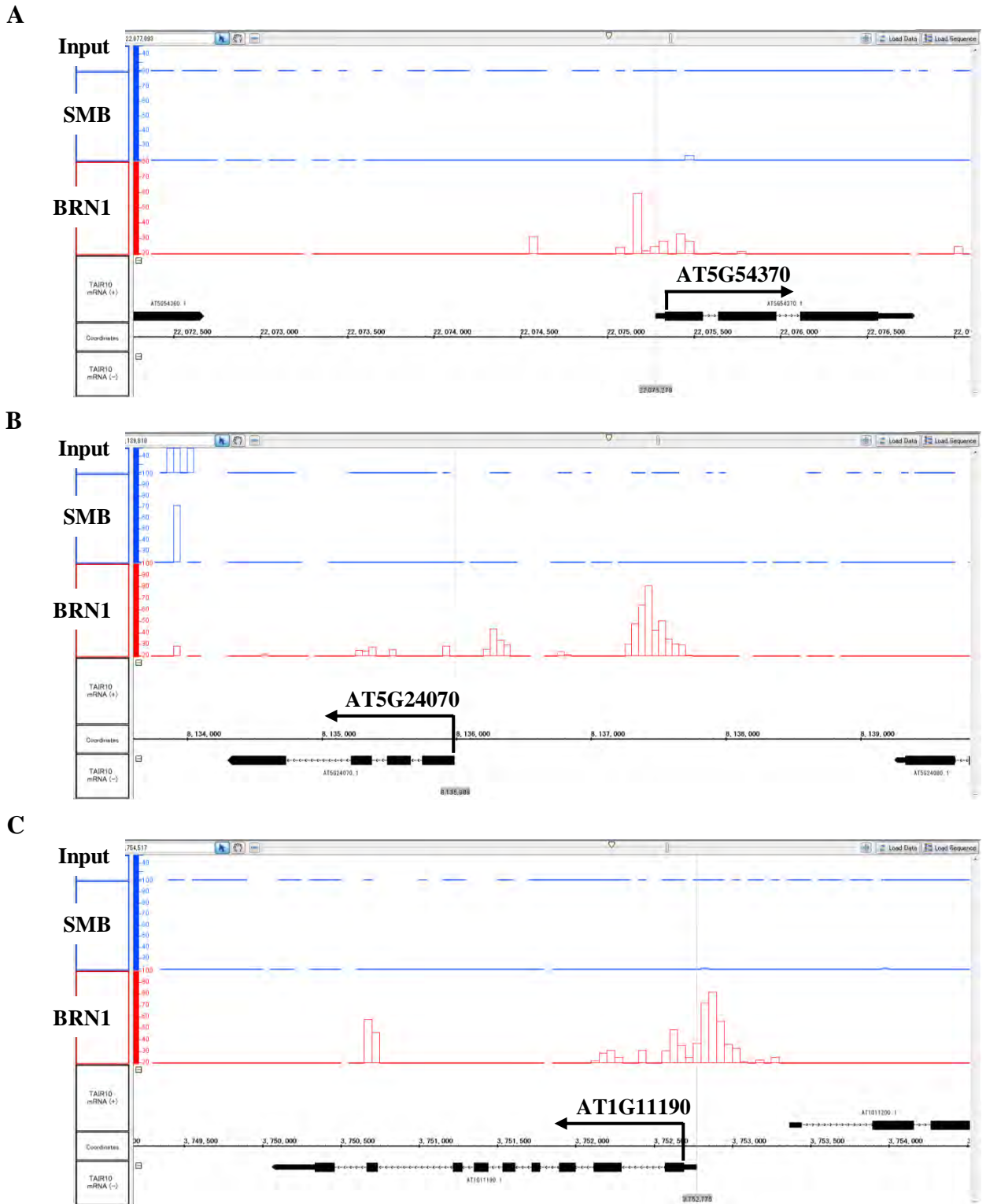


図26. BRN1の直接結合が見られる下流候補遺伝子群

(A-C) 抗GFP抗体を用いたSMB-GFPおよびBRN1-GFPの各遺伝子プロモーター領域におけるChIP-seq解析。(A) AT5G54370。(B) AT5G24070。(C) AT1G11190。上からInput、SMB-GFP、BRN1-GFPにおけるChIP-seqの結果。

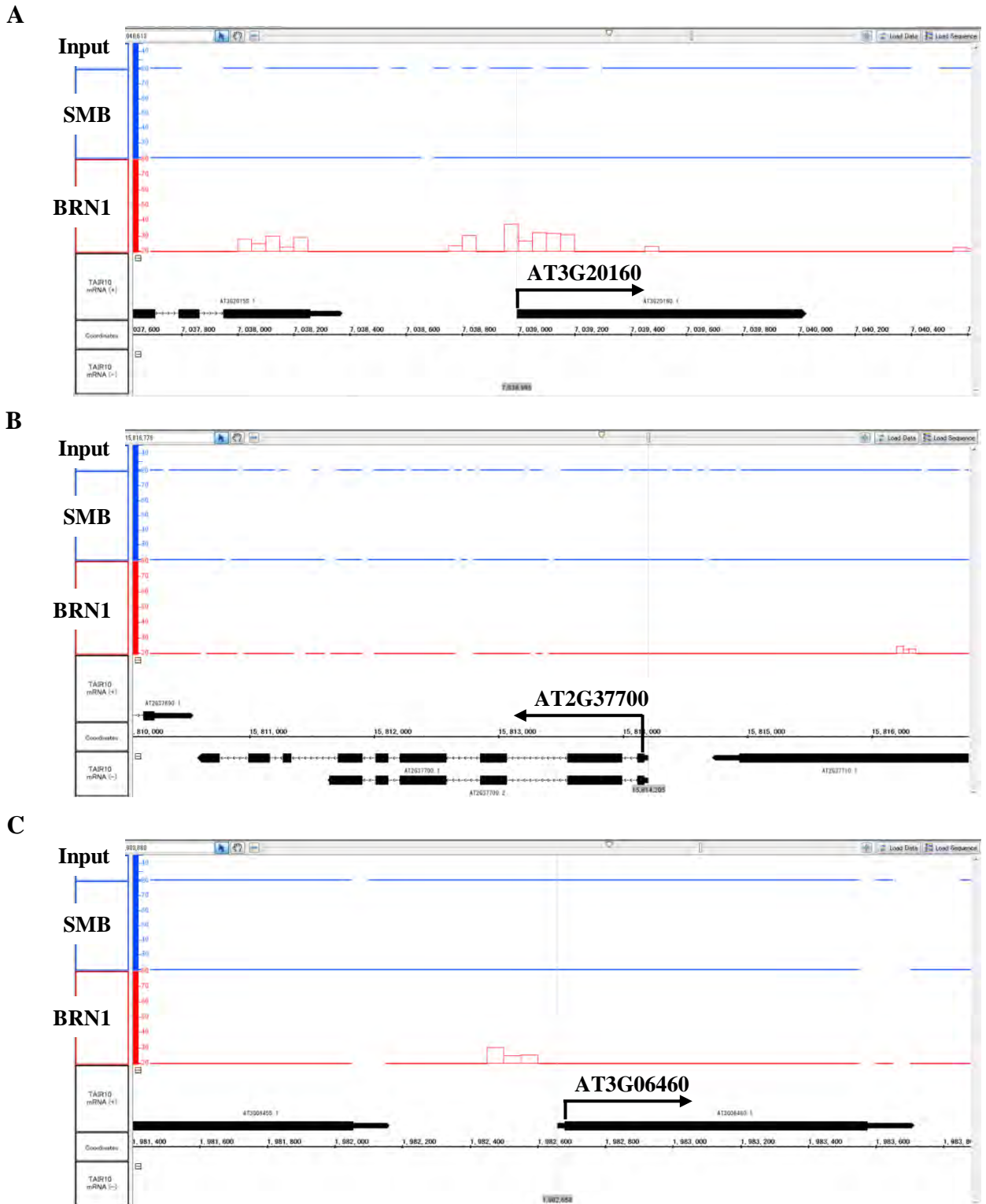


図27. SMBおよびBRN1の直接結合がほとんど検出されない下流遺伝子

(A-C) 抗GFP抗体を用いたSMB-GFPおよびBRN1-GFPの各遺伝子プロモーター領域におけるChIP-seq解析。(A) AT3G20160。(B) AT2G37700。(C) AT3G06460。上からInput、SMB-GFP、BRN1-GFPにおけるChIP-seqの結果。

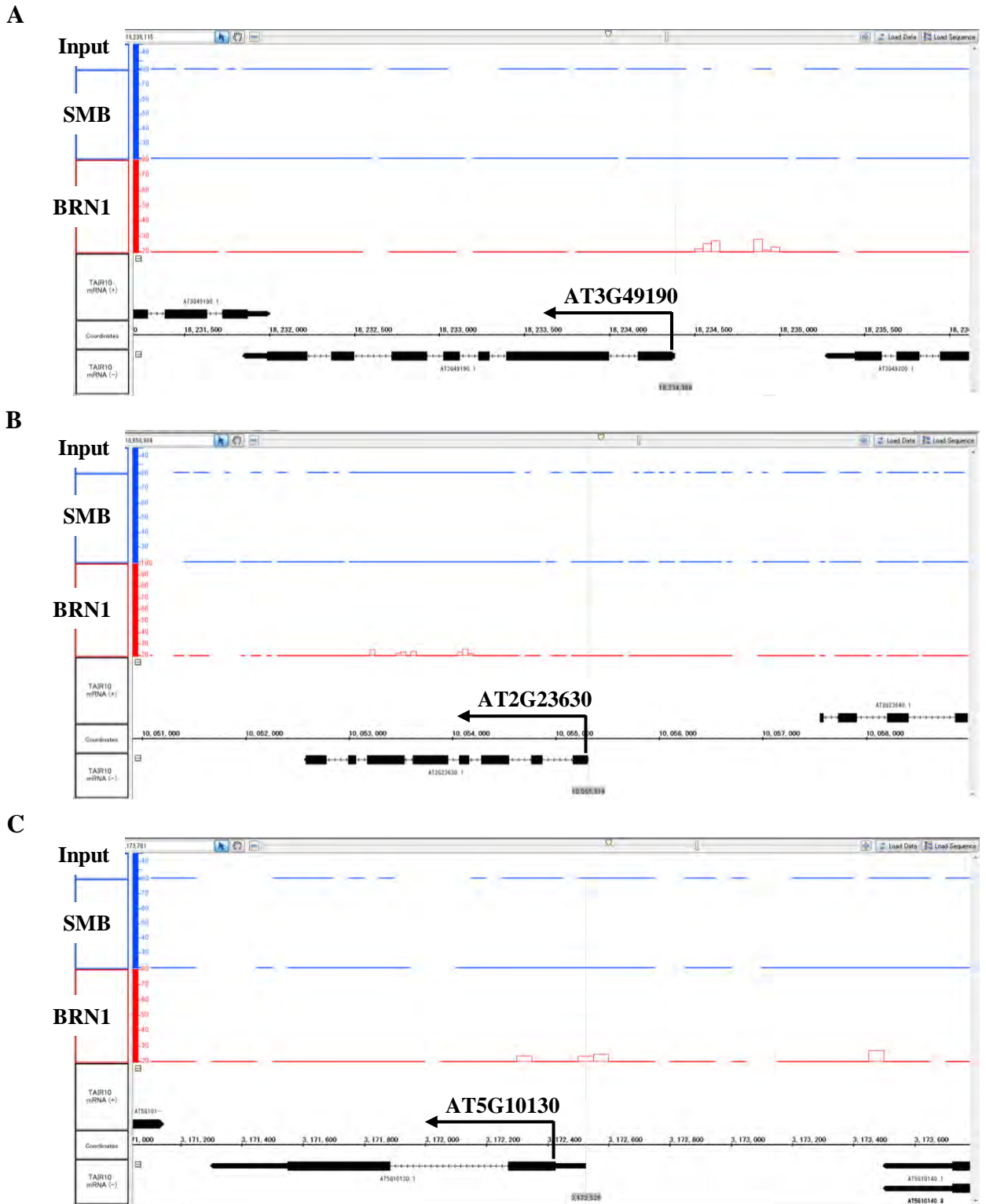


図28. SMBおよびBRN1の直接結合がほとんど検出されない下流遺伝子

(A-C) 抗GFP抗体を用いたSMB-GFPおよびBRN1-GFPの各遺伝子プロモーター領域におけるChIP-seq解析。(A) AT3G49190。(B) AT2G23630。(C) AT5G10130。上からInput、SMB-GFP、BRN1-GFPにおけるChIP-seqの結果。

A

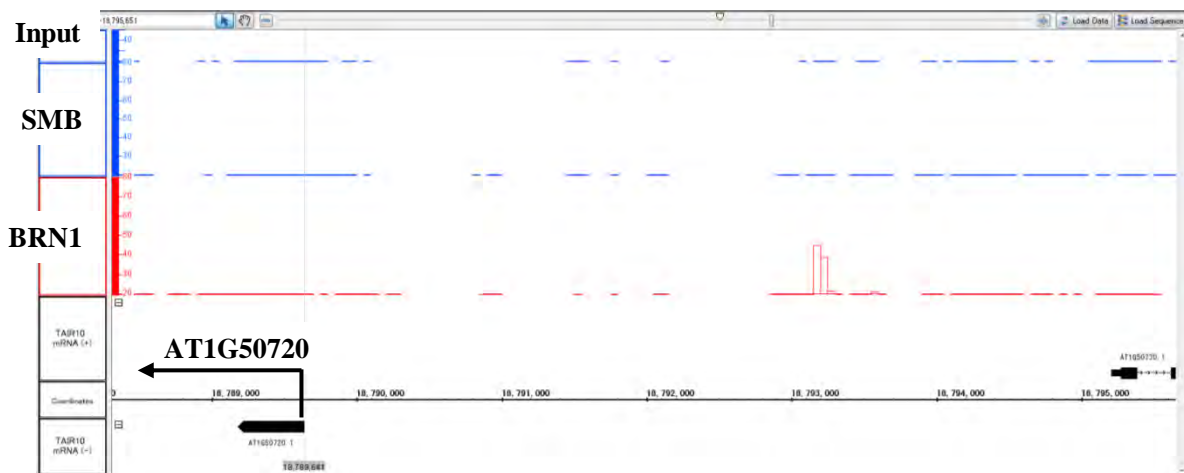


図29. SMBおよびBRN1の直接結合がほとんど検出されない下流遺伝子

(A) 抗GFP抗体を用いたSMB-GFPおよびBRN1-GFPのAT1G50720遺伝子プロモーター領域におけるChIP-seq解析。上からInput、SMB-GFP、BRN1-GFPにおけるChIP-seqの結果。

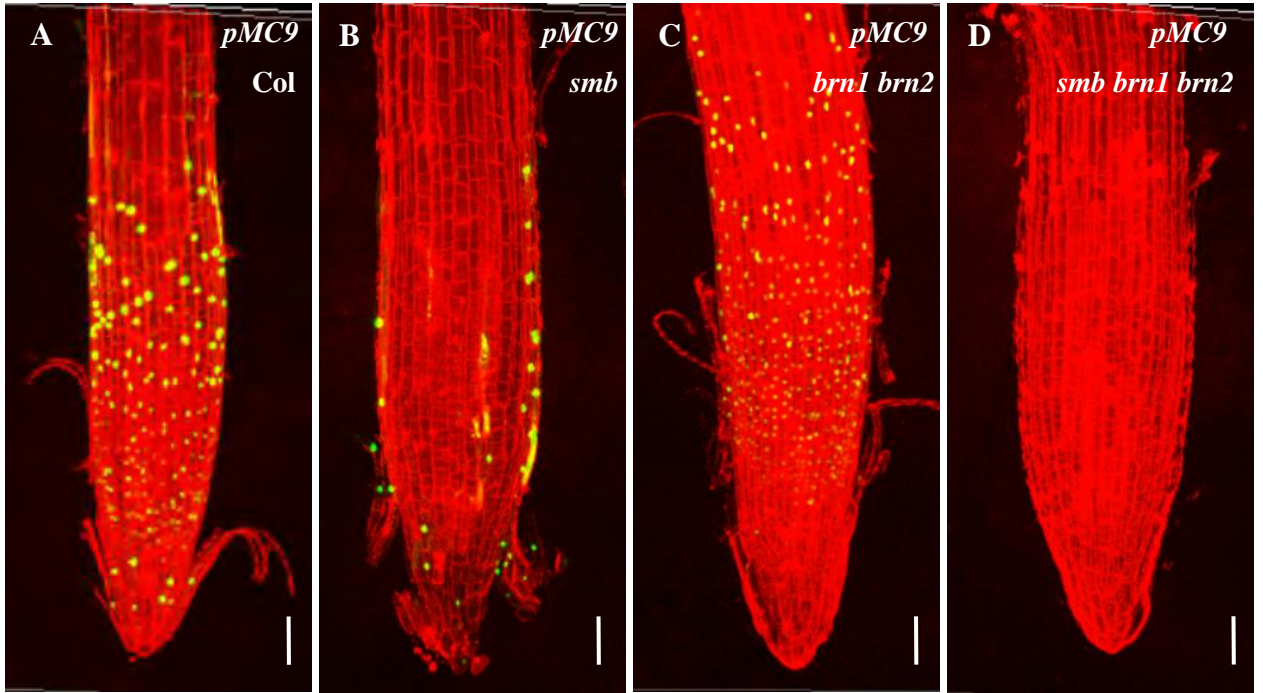


図30. *MC9*の発現は主にSMBに依存し、*smb brn1 brn2*三重変異体背景でほとんど消失する

(A-D) *pMC9-nYFP*の発現。3Dイメージ。(A) 野生型背景。(B) *smb*単独変異体背景。(C) *brn1 brn2*二重変異体背景。(D) *smb brn1 brn2*三重変異体背景。緑はYFPシグナル。赤はPI染色。スケールバー：50 μm 。

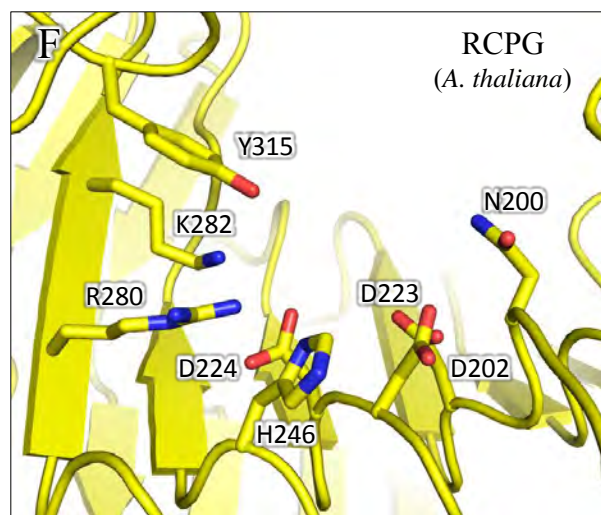
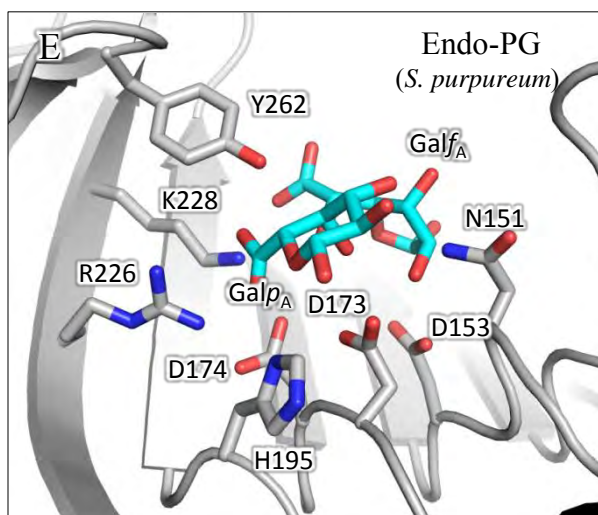
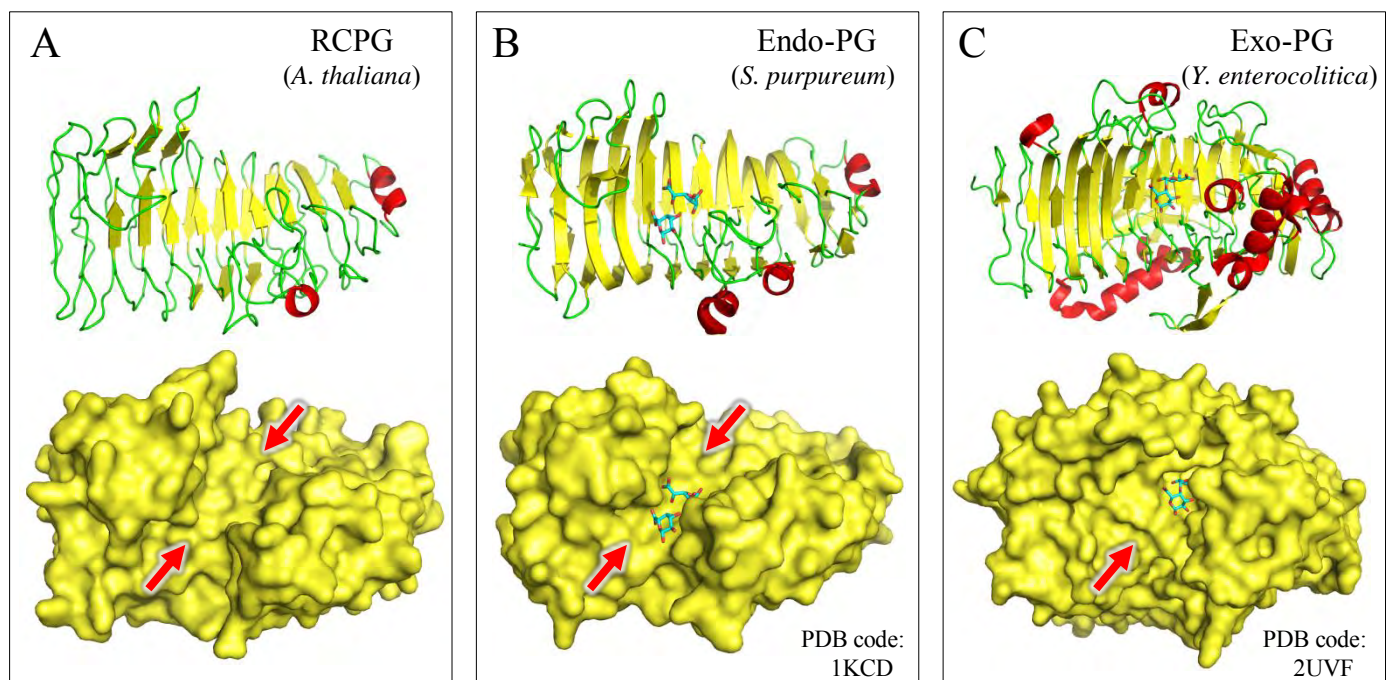


図31. RCPGタンパク質の構造はendo-PGsと高い相同性を示す

(A-C) RCPGの構造モデルと *S. purpureum* のendo-PGおよび *Y. enterocolitica* のexo-PGの結晶構造の比較。(D) GH28 family proteinの基質結合領域のアミノ酸残基のシーケンスアライメント。赤色三角は触媒活性に必須の3つのAsp残基を示す。青色三角は基質結合に重要な既知の残基を示す。(E,F) 基質結合部位の拡大図。(E) RCPG。(F) *Y. enterocolitica* のexo-PG。水色の分子は *S. purpureum* のendo-PGに共結晶された2つのガラクトuron酸 (GalpAとGalpA) を示す。

表1. SMB過剰発現体および*smb brn1 brn2*三重変異体を用いたマイクロアレイ解析から得られたSMBおよびBRN1/2下流候補遺伝子

No.	Locus (in the TAIR list)	TAIR annotation	SMBox/ 35S-GVG	P-value	Col/ Triple mut	P-value
1	AT3G20160	Terpenoid synthases superfamily protein	17.78	0.0433	95.25	0.0499
2	AT2G37700	Fatty acid hydroxylase superfamily	12.25	0.0011	2.59	0.0932
3	AT3G06460	GNS1/SUR4 membrane protein family	11.89	0.0365	266.83	0.0112
4	AT1G26820	Ribonuclease 3	11.25	0.0298	2.28	0.205
5	AT2G32610	Cellulose synthase-like B1	10.85	0.0488	2.41	0.0685
6	AT3G47400	Pectin methylesterase inhibitor superfamily	10.55	0.002	1.79	0.0996
7	AT1G47600	Beta glucosidase 34	9.93	0.0229	214.59	0.0504
8	AT3G49190	O-acyltransferase (WSD1-like) family protein	9.7	0.0097	152.67	0.0352
9	AT1G06090	Fatty acid desaturase family protein	9.56	0.0665	6.58	0.044
10	AT5G04200	Metacaspase 9	9.48	0.0581	1.66	0.3563
11	AT3G16440	myrosinase-binding protein-like protein-300B	8.99	0.0454	11.8	0.056
12	AT2G23630	SKU5 similar 16	7.58	0.0016	0.86	0.5536
13	AT4G10350	NAC domain containing protein 70 (BRN2)	7.35	0.0343	144.51	0.047
14	AT2G32620	Cellulose synthase-like B2	6.73	0.0706	2.96	0.0138
15	AT5G60530	Late embryogenesis abundant protein-related / LEA protein-related	5.17	0.0206	21.5	0.0569
16	AT5G54370	Late embryogenesis abundant (LEA) protein-related	5.09	0.0335	5.46	0.0516
17	AT5G10130	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	3.98	0.047	0.51	0.0268
18	AT1G33280	NAC domain containing protein 15 (BRN1)	3.74	0.0726	70.66	0.0216
19	AT5G24070	Peroxidase superfamily protein	3.15	0.0657	1.37	0.4171
20	AT1G11190	Endonuclease 1	2.83	0.0461	0.68	0.306
21	AT1G65570	Pectin lyase-like superfamily protein	2.65	0.1315	46.77	0.0692
22	AT1G50720	Stigma-specific Stig1 family protein	2.08	0.1196	0.5	0.0131

表2. 本研究のgenotypingで用いたプライマーの配列

Primer sequences for genotyping

		Primer name	Sequence
genotyping smb	WT	SOB-(-)246	GACTATATGCATGCATTG
		SOB-398c	CAGGCCAACGACATAATTCCC
	smb	SOB-(-)246	GACTATATGCATGCATTG
		pROK-RB1	GGTTTCTGACGTATGTGCTTAGCTC
genotyping brn1	WT	SBL2-606	GGAAGATGGATGGGTGTTTGTAG
		SBL2-1246c	TTGAAGAGGAAGGGAGACG
	brn1	LBc1	GTGAAAAGAAAAACCACCCC
		SBL2-1246c	TTGAAGAGGAAGGGAGACG
genotyping brn2	WT	SBL1-140	ACAAGCTTGAGCCTTGGGATTTGCAAGGT ACTC
		SBL1-468c	TAGCACGGTTGGTCCTTGAC
	brn2	SBL1-140	ACAAGCTTGAGCCTTGGGATTTGCAAGGT ACTC
		LBc1	GTGAAAAGAAAAACCACCCC
genotyping pl	WT	At1g65570 LP	TCATAGCACCCGATGAGAGTC
		At1g65570 RP	CTTCTTGCGTGAAATTGTTGG
	pl	GABI-o8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC
		At1g65570 RP	CTTCTTGCGTGAAATTGTTGG

表3. 本研究の発現解析で用いたプライマーの一覧とその配列

配列上の小文字は制限酵素サイト又はGATEWAYシステムの組み換え用配列、大文字はプロモーター領域およびコード領域を含む塩基配列を示す。

Primer sequences for cloning

Primer name	Sequence
Bam-At1g65570-ProEnd-R	aaggatccTTGTTGTGTGTTTTTTTTTAATTGGAAGG
Xho-At1g65570-(-)1752	ccctcgagCCATTTTTAACTGTACAGTGAGACG
Bam-At5g60530-ProEnd-R	CGGGATCCCTCTCAAGTTCAAGTCTTCTTCT
Xho-At5g60530-(-)1225	GTCTCGAGCCAGCTAAGCCTGATCT
Bam-At2g32620-ProEnd-R	tcggatccGGGAGGAGCTTTCTTGCGATTTTTG
Xho-At2g32620-(-)1229	tgctcgagTGTAGTATGGTGATATGTGTTTGTTG
Spe-Pectin-lyase-CtR	atactagtCATAGACATCCACTAGGTGTAAC
Apa-Pectin-Lyase-Nt	atgggccACGTGCATACTTCTATCTTTCATCG
ProAt1g65570 For	GGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGccattttaactgtacagtgagacg
ProAt1g65570 Rev	gggACTGCTTTTTTGTACAAACTTGttgtgtgtgttttttaattggaagg
At1g65570 For	ggggacaagtgtgtacaaaaagcaggcttcATGGCATTGTTTCTAAGCTTTGTTCAGG
At1g65570 Rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcTAGACATCCACTAGGTGTAACC

Primer sequences for RT-PCR

Primer name	Sequence
At1g65570 RT For	ATGGCATTGTTTCTAAGCTTTG
At1g65570 RT Rev	TCATAGACATCCACTAGGTGT
PL F12 (+)56	TGTCCCCTTTGGTCAGTTG
PL R (+)836	TCTTCACGTTGTTTGAGTCC
PL qRT F2	ATTCTTCTTGCCCTTCTCAG
PL qRT R2	GGACTTTCTCACTGCAATCC
PL qRT F3	GGATTGCAGTGAGAAAGTCC
TUB4 Fw	TTCATATCCAAGGCGGTCAATGTGG
TUB4 Rv	CGAGCTTGAGGGTACGGAAACAG

Primer sequences for qRT-PCR

Primer name	Sequence
PL qRT F2	ATTCTTCTTGCCCTTCTCAG
PL qRT R2	GGACTTTCTCACTGCAATCC
ACT2-qPCR-Fw	CTGGATCGGTGGTTCCATTC
ACT2-qPCR-Rv	CCTGGACCTGCCTCATCATCA

表4. 本研究のChIP-qPCR解析で用いたプライマーの配列
配列上の小文字は非コード領域、大文字はコード領域を示す。

Target領域	Primer name	Sequence
PL_1	PL_F8 (-)1749	ccattttaactgtacagtgagacg
	PL_R8 (-)1682	acaattacttaacacggcaacgag
PL_4	PL_F4 (-)986	aatatgattccccgaggcag
	PL_R4 (-)875	tacagtttctcgggcagac
PL_7	PL_F6 (-)507	aaccatacgttgaacatgg
	PL_R6 (-)430	aaccatctccagctccaaac
PL_11	PL_F16 (-)251	aacgttacctacggaggctc
	PL_R18 (-)117	agagaagagggttctttgtgg
PL_13	PL_F19_860	AGCCAATTGTTCCACATAGC
	PL_R19_951	TCAGTGTTAGGACTCTCATCG
TUB4_1	TUB4_F1 (-)83	tctctaagctctttggtcgc
	TUB4_R1 (-)188	acaacgaacgagtctctagg

謝辞

本研究を行うにあたり、中島敬二教授には、博士後期課程の3年を経過したタイミングにも関わらず、私を研究室の一員として受け入れて頂き、主指導教官としてご指導を賜りまして誠にありがとうございました。また、副指導教官としてご指導頂きました橋本隆教授および出村拓教授には、研究を深く考察する機会を頂き誠にありがとうございました。さらに、理化学研究所の金鍾明博士と遠藤高帆博士には、本研究で重要なデータとなった ChIP-seq 解析を行って頂き誠にありがとうございました。

その他にも、研究室のメンバーであった宮島俊介博士や久永哲也博士には材料の提供だけでなく、日々の実験手法やデータ解釈など様々なディスカッションをさせて頂きありがとうございました。

さらに、現在勤めさせて頂いております株式会社ネモト・サイエンスの富澤宏樹社長には、勤務の傍ら本研究を最後まで続けさせて頂くご理解とご支援を頂きありがとうございました。

最後に、博士課程を通して出会った方々や家族にはいつも励まして頂き、最後まで諦めずに頑張ることができました。温かく見守って下さり本当にありがとうございました。

参考文献

- Bennett, T., van den Toorn, A., Sanchez-Perez, G.F., Campilho, A., Willemsen, V., Snel, B., and Scheres, B. (2010). SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 Regulate Root Cap Maturation in Arabidopsis. *Plant Cell* 22, 640-654.
- Bollhoner, B., Zhang, B., Stael, S., Denance, N., Overmyer, K., Goffner, D., Van Breusegem, F., and Tuominen, H. (2013). Post mortem function of AtMC9 in xylem vessel elements. *New Phytologist* 200, 498-510.
- Cao, J. (2012). The Pectin Lyases in Arabidopsis thaliana: Evolution, Selection and Expression Profiles. *Plos One* 7.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* 16, 735-743.
- del Campillo, E., Abdel-Aziz, A., Crawford, D., and Patterson, S.E. (2004). Root cap specific expression of an endo-beta-1,4-D-glucanase (cellulase): a new marker to study root development in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 56, 309-323.
- Demura, T., Tashiro, G., Horiguchi, G., Kishimoto, N., Kubo, M., Matsuoka, N., Minami, A., Nagata-Hiwatashi, M., Nakamura, K., Okamura, Y., *et al.* (2002). Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15794-15799.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B. (1993). Cellular-organization of the Arabidopsis thaliana root. *Development* 119, 71-84.
- Driouich, A., Durand, C., and Vicre-Gibouin, M. (2007). Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science* 12, 14-19.
- Durand, C., Vicre-Gibouin, M., Follet-Gueye, M.L., Duponchel, L., Moreau, M., Lerouge, P., and Driouich, A. (2009). The Organization Pattern of Root Border-Like

Cells of Arabidopsis Is Dependent on Cell Wall Homogalacturonan. *Plant Physiology* 150, 1411-1421.

Fendrych, M., Van Hautegeem, T., Van Durme, M., Olvera-Carrillo, Y., Huysmans, M., Karimi, M., Lippens, S., Guerin, C.J., Krebs, M., Schumacher, K., *et al.* (2014). Programmed Cell Death Controlled by ANAC033/SOMBRERO Determines Root Cap Organ Size in Arabidopsis. *Current Biology* 24, 931-940.

Fischer, R.L., and Bennett, A.B. (1991). Role of cell-wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 675-703.

Francis, K.E., Lam, S.Y., and Copenhaver, G.P. (2006). Separation of Arabidopsis pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methylesterase gene. *Plant Physiology* 142, 1004-1013.

Hawes, M.C., and Lin, H.J. (1990). Correlation of pectolytic enzyme-activity with the programmed release of cells from root caps of pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiology* 94, 1855-1859.

Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H., and Demura, T. (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes & Development* 19, 1855-1860.

Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., and Ohme-Takagi, M. (2005). The NAC transcription factors NST1 and NST2 of Arabidopsis regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *The Plant Cell*, 17, 2993-3006.

Mitsuda, N., Iwase, A., Yamamoto, H., Yoshida, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Ohme-Takagi, M. (2007). NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19, 270-280.

Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 266-277.

Ogawa, M., Kay, P., Wilson, S., and Swain, S.M. (2009). ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and

QUARTET2 Are Polygalacturonases Required for Cell Separation during Reproductive Development in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 216-233.

Ohashi-Ito, K., Oda, Y., and Fukuda, H. (2010). Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 Directly Regulates the Genes That Govern Programmed Cell Death and Secondary Wall Formation during Xylem Differentiation. *Plant Cell* 22, 3461-3473.

Okada, K., and Shimura, Y. (1992). Mutational analysis of root gravitropism and phototropism of Arabidopsis thaliana seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology* 19, 439-448.

Pereira-Santana, A., Alcaraz, LD., Castano, E., Sanchez-Calderon, L., Sanchez-Teyer, F., and Rodriguez-Zapata, L. (2015). Comparative genomics of NAC transcriptional factors in angiosperms: implications for the adaptation and diversification of flowering plants. *Plos One*, 10, e0141866.

Preuss, D., Rhee, S.Y., and Davis, R.W. (1994). Tetrad analysis possible in Arabidopsis with mutation of the quartet (qrt) genes. *Science* 264, 1458-1460.

Rhee, S.Y., Osborne, E., Poindexter, P.D., and Somerville, C.R. (2003). Microspore separation in the quartet 3 mutants of Arabidopsis is impaired by a defect in a developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell wall degradation. *Plant Physiology* 133, 1170-1180.

Rhee, S.Y., and Somerville, C.R. (1998). Tetrad pollen formation in quartet mutants of Arabidopsis thaliana is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *Plant Journal* 15, 79-88.

Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., and Laux, T. (2007). Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446, 811-814.

Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., and Weisbeek, P. (1994). Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root-meristem initials. *Development* 120, 2475-2487.

- Stephenson, M.B., and Hawes, M.C. (1994). Correlation of pectin methylesterase activity in root caps of pea with root border cell-separation. *Plant Physiology* *106*, 739-745.
- Tyler, L., Bragg, J.N., Wu, J., Yang, X., Tuskan, G.A., and Vogel, J.P. (2010). Annotation and comparative analysis of the glycoside hydrolase genes in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics* *11*:600.
- van Hautegeem, T., Waters, A.J., Goodrich, J., and Nowack, M.K. (2015). Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends in Plant Science* *20*, 102-113.
- vandenBerg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* *390*, 287-289.
- Verbelen, J.-P., De Cnodder, T., Le, J., Vissenberg, K., and Baluska, F. (2006). The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant signaling & behavior* *1*, 296-304.
- Vicré, M., Santaella, C., Blanchet, S., Gateau, A., and Driouich, A. (2005). Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiology* *138*, 998-1008.
- Waki, T., Miyashima, S., Nakanishi, M., Ikeda, Y., Hashimoto, T., and Nakajima, K. (2013). A GAL4-based targeted activation tagging system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* *73*, 357-367.
- Wen, F.S., Zhu, Y.M., and Hawes, M.C. (1999). Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell* *11*, 1129-1140.
- Wenzel, C.L., and Rost, T.L. (2001). Cell division patterns of the protoderm and root cap in the "closed" root apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* *218*, 203-213.
- Willemsen, V., Bauch, M., Bennett, T., Campilho, A., Wolkenfelt, H., Xu, J., Haseloff, J., and Scheres, B. (2008). The NAC Domain Transcription Factors FEZ and

SOMBRERO Control the Orientation of Cell Division Plane in Arabidopsis Root Stem Cells. *Developmental Cell* 15, 913-922.

Xu, B., Ohtani, M., Yamaguchi, M., Toyooka, K., Wakazaki, M., Sato, M., Kubo, M., Nakano, Y., Sano, R., Hiwatashi, Y., Murata, T., Kurata, T., Yoneda, A., Kato, K., Hasebe, M., and Demura, T. (2014). Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land. *Science* 343, 1505-1508.

Zhong, R., Lee, C., and Ye, Z. (2010). Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in Arabidopsis. *Molecular Plant* 3, 1087-1103.

中西 美耶子 (2009) 根冠細胞分化における URP7/SMB 遺伝子の機能解析 (修士論文)

磯本 淳志 (2011) シロイヌナズナ根冠細胞で機能する SOMBRERO 転写因子ファミリーの下流候補遺伝子の探索 (修士論文)

東尾 真哉 (2012) シロイヌナズナの根冠分化に関与する遺伝子の発現解析 (修士論文)

安藤 隆之介 (2016) シロイヌナズナ根冠の最外層における遺伝子発現制御機構の解析 (修士論文)