

# 論文内容の要旨

申請者氏名 飯村 秀明

被子植物の花の根元には、蜜を分泌する器官である蜜腺がある。この蜜腺を作る遺伝子として *CRABS CLAW (CRC)* 遺伝子が知られている。*CRC* 遺伝子が機能しない *crc* 変異体は、花幹細胞の増殖停止の遅延に加え、蜜腺が形成されなくなるという表現型を示す。*CRC* 遺伝子は YABBY 型の転写因子をコードしており、下流の遺伝子の発現を制御している。しかし、蜜腺において *CRC* がどのような遺伝子の発現を制御し、蜜腺を発達させるかは解明されていなかった。そこで本研究では、蜜腺において *CRC* が直接結合し、発現を制御する下流の遺伝子ネットワークを明らかにし、鍵遺伝子の機能解析から蜜腺発達機構を解明することを目指した。蜜腺で正常に機能する *CRC*-GFP タンパク質を発現する形質転換植物を用いて ChIP-seq を行い、1,881 個の直接標的遺伝子を同定した。シス配列解析の結果、*CRC* の結合個所には YABBY 型の転写因子のシス配列が多く存在することがわかった。さらに、野生型と *crc* 変異体の蜜腺のサンプルを用いて、花発生ステージごとに RNA-seq を行った。ChIP-seq で同定した遺伝子と RNA-seq で発現が変動した遺伝子の重複を調べた結果、*CRC* が直接発現を制御する遺伝子には、花の発達や生合成過程の制御などの GO term が多いことがわかった。花発生ステージ 12 では、*CRC* 遺伝子上流の転写促進因子をコードする *AGAMOUS*、*SHATTERPROOF 1*、*SHATTERPROOF 2* 遺伝子を同定した。このことは、*CRC* が上流の転写因子の発現を正のフィードバックにより制御することを示唆している。また、花発生ステージ 13-14 では、蜜腺の分化を制御する転写因子をコードする *MYB DOMAIN PROTEIN 57* 遺伝子や、蜜の分泌に必要なスクロース輸送体をコードする *SWEET9* 遺伝子などが含まれていた。さらに、花発生ステージ 12 とステージ 13-14 の両方で *CRC* によって発現が制御される遺伝子として、オーキシンの輸送体である PIN-FORMED (PIN) タンパク質の局在制御を介して、オーキシンの輸送を制御すると報告されている *MACCHI-BOU 4 (MAB4)* 遺伝子に注目した。GFP および Venus レポーターを用いて *MAB4* と *PIN1* タンパク質の細胞内局在を観察した結果、花発生ステージ 9 とステージ 11 ではこれらのタンパク質が蜜腺の細胞の細胞膜に偏りをもって局在していることがわかった。次に、*mab4* 変異体の蜜腺を観察したところ、*mab4* 変異体の蜜腺は野生型の蜜腺よりも小さいことがわかった。さらに、*DR5* レポーターを用いて *mab4* 変異体の蜜腺でのオーキシンの蓄積を観察した。野生型では、蜜腺の形成初期から蜜を分泌する時期まで蜜腺の先端と内部にオーキシンが蓄積する。一方、*mab4* 変異体では蜜腺の先端でのみオーキシンが蓄積していた。このことから、*MAB4* は蜜腺の内部へのオーキシン輸送を促進することで、蜜腺の大きさを正に制御すると考えられた。本研究により、蜜腺発達における *CRC* の下流遺伝子ネットワークを明らかにした。

やむを得ない事由[ 図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 飯村 秀明

本研究により、シロイヌナズナの蜜腺発達の新規制御機構が解明された。これまでに遺伝学的な解析から蜜腺形成に鍵となる転写因子 CRABS CLAW (CRC)が同定され、CRC 遺伝子は蜜腺の形成初期から蜜を分泌する時期まで発現していることはわかってきたが、その発現の維持機構および下流の遺伝子ネットワークは未解明であった。本研究ではクロマチン免疫沈降法による CRC のゲノムワイドな結合サイトおよび、蜜腺形成段階の 2 ステージにおける野生型と *crc* 変異体との RNA-seq 法による発現プロファイルの比較により CRC の直接のターゲット遺伝子を同定した。その結果、CRC は蜜腺の形成初期から蜜を分泌する時期において、蜜腺の分化や糖の代謝に関わる遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。また、CRC 遺伝子上流の転写促進因子をコードする *AGAMOUS*、*SHATTERPROOF 1*、*SHATTERPROOF 2* 遺伝子が CRC のターゲット遺伝子として同定された。このことは、CRC が上流の転写因子の発現を正のフィードバックにより制御しており、これが CRC 遺伝子の蜜腺の形成初期から蜜を分泌する時期まで継続的な発現の維持に作用していることが予想された。さらに、蜜腺形成過程に継続的に制御されている遺伝子として、新規に *MACCHI-BOU 4 (MAB4)* 遺伝子を同定した。*mab4* 変異体の蜜腺サイズを定量計測することにより、*mab4* 変異体の蜜腺は野生型の蜜腺よりも小さいことがわかった。さらに MAB4 タンパク質は、蜜腺の細胞の細胞膜に偏りをもって局在しており、メリステムにおいてこれまでに報告されている機能と同様に、蜜腺においてもオーキシンの輸送に関わる PIN1 タンパク質の細胞内局在の制御にかかわることが示唆された。実際に、オーキシンシグナルを可視化することができる DR5 レポーターを用いて *mab4* 変異体の蜜腺でのオーキシンの蓄積を観察したところ、*mab4* 変異体では蜜腺の内部でのオーキシン量が劇的に減少していた。このことから、MAB4 は蜜腺の内部へのオーキシン輸送を促進することで、蜜腺の大きさを正に制御するという蜜腺形成の新規モデルが提唱された。本研究により、CRC が *MAB4* 遺伝子の発現を促進し、MAB4 が蜜腺の内部へのオーキシンの蓄積と蜜腺の大きさの正の制御を行うことがわかった。

本研究は信頼性が高いデータを蓄積することによって、蜜腺形成の遺伝子制御機構を示したものである。蜜腺形成の知見は学術上、および応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】