

(別紙1)

論文の内容の要旨

氏 名	橋本 佳世		
論文題目	マイクロ RNA を介した <i>HD-ZIP III</i> 遺伝子の発現制御による シロイヌナズナ胚珠形態の制御		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	委員長		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
内 容 の 要 旨			
<p>生物の器官形成には様々な遺伝子群の緻密に制御された時空間的発現制御が必須である。被子植物のモデル生物であるシロイヌナズナを用いた研究では器官形成にかかわる遺伝子の解析が広く行われ、多くの機能が解明されつつある。ホメオドメインとロイシンジッパーを併せ持つ転写因子ファミリー <i>HD-ZIP</i> のサブファミリーのひとつである Class III <i>HD-ZIP</i> (<i>HD-ZIP III</i>) は、胚における頂端－基部軸や葉の向背軸の形成、および維管束の放射パターンの確立に必須の因子である。<i>HD-ZIP III</i> の空間的発現制御にはマイクロ RNA165/6 (<i>miR165/6</i>) による転写後抑制が主要な役割を果たすことが知られている。シロイヌナズナにおいては、5 つの <i>HD-ZIP III</i> 遺伝子および9 つの <i>MIR165/6</i> 遺伝子 (<i>MIR165A</i>, <i>165B</i>, <i>166A-G</i>) が存在する。9 つの <i>MIR165/6</i> 遺伝子は機能的に同一の成熟型 <i>miR165/6</i> を産生するため、複数の <i>MIR165/6</i> 遺伝子が存在する意義や機能分化については未解明であった。</p> <p>個々の <i>MIR165/6</i> と <i>HD-ZIP III</i> 間の関係と、その発生学的意義を個別に解析する手段として、GFP を融合させたマイクロ RNA 耐性型 <i>HD-ZIP III</i> 遺伝子 (<i>HD-ZIP III_{mu}-GFP</i>) と、これを標的にできる変異型マイクロ RNA 遺伝子 (<i>MIR165/6_{mu}</i>) を組み合わせて導入した形質転換植物を用いる手法が実践されている。この手法を用いた解析から、<i>HD-ZIP III</i> のひとつである <i>PHABULOSA</i> (<i>PHB</i>) について、<i>PHB_{mu}-GFP</i> 植物がマイクロ RNA 耐性型 <i>phb-1d</i> 変異体とほぼ同一の重篤な異常を示し、かつ変異型の <i>MIR165_A_{mu}</i> の共導入により野生型様の表現型へと回復することが報告されていた。</p> <p>申請者は、<i>PHB_{mu}-GFP/MIR165_A_{mu}</i> 系統の回復が胚珠にまでは及んでいないことに着目した。</p>			

本研究では、シロイヌナズナの *HD-ZIP III* 遺伝子と *MIR165/6* 遺伝子間の抑制関係が、胚珠の複雑な形態形成に果たす役割を解明することを目指した。

まず、*PHBmu-GFP/MIR165Amu* 系統において植物のほとんどの器官で異常が回復しているにも関わらず、胚珠においては外珠皮が発達しない異常が回復しないことを見出した。発現解析を行ったところ、内性のマイクロ RNA による抑制を受けた *PHB* 遺伝子に由来する *PHB* タンパク質の発現が内珠皮の内層に限定されているのに対し、*MIR165A* のみによる抑制を反映した *PHBmu-GFP/MIR165Amu* 系統では、*PHB* の発現が胚珠原基のより広範な領域に拡大していた。これらの形態解析と発現解析の結果から、胚珠における *PHB* の発現制御には *MIR165A* のみでは不十分であり、他の *MIR165/6* 遺伝子に由来する *miR165/6* が機能することが示唆された。

そこで、*MIR165A* 以外の *MIR165/6* 遺伝子のいずれかが *PHB* の分解抑制に機能していると考え、9 つ全ての *MIR165/6* 遺伝子についてレポーター系統を用いた発現解析を行った。その結果、*MIR165A*, *MIR166A*, *MIR166D* と *MIR166G* の 4 遺伝子が胚珠において発現するが、胚珠発生初期から珠皮が分化する段階においては *MIR166D* と *MIR166G* の 2 つの遺伝子が強く発現することを見出した。またこれらに由来する *miRNA166* が、胚珠原基の基部の周縁で局所的に機能していることを *miR165/6* センサー植物の解析により見出した。

上記の結果をもとに、胚珠においては *MIR166D* と *MIR166G* が *PHB* の発現制御に主要な機能を果たすと予想し、変異型の *MIR166Dmu* または *MIR166Gmu* をそれぞれ *PHBmu-GFP/MIR165Amu* 系統に導入した形質転換体を作製した。それぞれについて複数の系統を観察した結果、いずれにおいても胚珠の形成異常が有意に解消されたことから、予想通り、*MIR166D* または *MIR166G* による *PHB* の発現制御が胚珠の正常な発生に必要であることが示された。

また、5 つの *HD-ZIP III* 遺伝子が胚珠において独自の機能を持つかを調べるために、まず 5 つのすべてについて自身のプロモーターの制御下で GFP 融合タンパク質を発現する *HD-ZIP III-GFP* レポーター系統を作製した。これらを観察した結果、それぞれの *HD-ZIP III* 遺伝子の発現は部分的に重複しているものの、局所的な発現部位や強度が異なっており、それぞれが独自の時空間的発現パターンを示すことがわかった。次に *MIR165/6* による制御を解析するために、*PHB* 以外の 4 つの遺伝子についてもマイクロ RNA 耐性変異型の *HD-ZIP IIIImu-GFP* レポーター系統の作製を試みた。胚性致死などの問題から統計精度の高い解析は困難であったものの、胚珠に明瞭な異常が見られたのは *PHAVOLUTA (PHV)* のみであったことから、胚珠の発生には主として *PHB* と *PHV* が関与していると判定された。

以上、シロイヌナズナの変異型 *PHB* と変異型 *MIR165/6* 発現系統の詳細な形態観察や、*PHB* と *MIR165/6* の発現解析を端緒として、9 つの *MIR165/6* 遺伝子と 5 つの *HD-ZIP III* 遺伝子の胚珠における発現解析を行い、2 つの *MIR165/6* 遺伝子すなわち *MIR166D* および *166G* による 2 つの *HD-ZIP III* 遺伝子すなわち *PHB* および *PHV* の空間的発現抑制が、シロイヌナズナの胚珠形成において必須の機能を担うことを明らかにした。さらに、アブラナ科に属する近縁種も含めた *MIR165/6* 遺伝子の分子系統解析をふまえて、*MIR166D* および *MIR166G* が進化の過程で胚珠形成における *HD-ZIP III* の空間的発現制御能を新たに分化させた可能性を論じた。

(別紙2)

論文審査の結果の要旨

氏 名	橋本 佳世		
論文題目	マイクロ RNA を介した <i>HD-ZIP III</i> 遺伝子の発現制御による シロイヌナズナ胚珠形態の制御		
審査委員	区分	職 名	氏 名
	委員長		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
要 旨			
<p>生物の器官形成には様々な遺伝子群の緻密に制御された時空間的発現が必須である。被子植物のモデル生物であるシロイヌナズナを用いた研究では、器官形成にかかわる遺伝子の解析が広く行われ、多くの機能が解明されつつある。ホメオドメインとロイシンジッパーを併せ持つ転写因子ファミリー <i>HD-ZIP</i> のサブファミリーのひとつである Class III <i>HD-ZIP</i> (<i>HD-ZIP III</i>) は、胚における頂端－基部軸や葉の向背軸の形成、および維管束の放射パターン確立に必須の因子である。これらの <i>HD-ZIP III</i> の空間的発現制御にはマイクロ RNA165/6 (<i>miR165/6</i>) による転写後抑制が主要な役割を果たすことが知られている。シロイヌナズナにおいては、5つの <i>HD-ZIP III</i> 遺伝子および9つの <i>MIR165/6</i> 遺伝子 (<i>MIR165A</i>, <i>165B</i>, <i>166A-G</i>) が存在する。9つの <i>MIR165/6</i> 遺伝子は機能的に同一の成熟型 <i>miR165/6</i> を産生するため、複数の <i>MIR165/6</i> 遺伝子が存在する意味や機能分化については未解明であった。</p> <p>本研究において、申請者はシロイヌナズナの <i>HD-ZIP III</i> 遺伝子と <i>MIR165/166</i> 遺伝子の抑制関係が、胚珠の複雑な形態形成に果たす役割を解明することを目指した。個々の <i>MIR165/6</i> と <i>HD-ZIP III</i> 間の関係と、その発生学的意義を個別に解析する手段として、GFP を融合させたマイクロ RNA 耐性型 <i>HD-ZIP III</i> 遺伝子 (<i>HD-ZIP III_{mu}-GFP</i>) と、これを標的にできる変異型マイクロ RNA 遺伝子 (<i>MIR165/6_{mu}</i>) を組み合わせて導入した形質転換植物を用いる手法が実践されている。この手法を用いた解析から、<i>HD-ZIP III</i> のひとつである <i>PHABULOSA (PHB)</i> について、<i>PHB_{mu}-GFP</i> 植物がマイクロ RNA 耐性型 <i>phb-1d</i> 変異体とほぼ同一な重篤な異常を示し、かつ変異型 <i>MIR165_{Amu}</i> の共導入により野生型様の表現型へと回復することが報告されていた。</p>			

申請者は、*PHBmu-GFP/MIR165Amu* 系統での回復が胚珠にまでは及んでいないという興味深い事実に着目し、分子遺伝学的手法を駆使して、胚珠形成での機能解析を行った。まず詳細な形態観察により、*PHBmu-GFP/MIR165Amu* 系統において植物のほとんどの器官で異常が回復しているにも関わらず、胚珠においては外珠皮が発達しない異常が回復されていないことを見出した。さらに内性の *miR165/6* に抑制された正常な *PHB* 遺伝子に由来する *PHB* タンパク質の発現が内珠皮の内層に限定されているのに対し、*MIR165A* のみによる抑制を反映した *PHBmu-GFP/MIR165Amu* 系統では、*PHB* の発現が胚珠原基のより広範な領域に拡大していることを見出し、胚珠発生においては *MIR165A* 以外の *MIR165/6* 遺伝子のいずれかが *PHB* の抑制に機能していることを見出した。この結果を受けて、9つ全ての *MIR165/6* 遺伝子についてレポーター系統を用いた発現解析を行い、さらに *miR165/6* センサー植物の観察から胚珠原基における *miR165/6* 活性領域を解析した。これらの結果をもとに、胚珠発生初期から珠皮が分化する段階においては *MIR166D* と *MIR166G* が *PHB* の発現制御に主要な機能を果たすことを予想した。この仮説に従い、変異型の *MIR166Dmu* または *MIR166Gmu* をそれぞれ *PHBmu-GFP/MIR165Amu* 系統に導入した形質転換体を作製し、これらにおいて胚珠の形成異常が有意に解消された結果を得た。以上より、*MIR166D* または *MIR166G* による *PHB* の発現制御が胚珠の正常な発生に必要であることを実証した。

また、5つの *HD-ZIP III* 遺伝子が胚珠において独自の機能を持つかどうかを調べるために、まず5つすべてについて自身のプロモーターの制御下で発現する *HD-ZIP III-GFP* 融合レポーター系統を作製した。得られた植物を観察した結果、それぞれの *HD-ZIP III* 遺伝子の発現は部分的に重複しているものの、局所的な発現部位や強度が異なっており、それぞれが独自の時空間的発現パターンを示すことを明らかにした。次に *MIR165/6* による制御を解析するために、*PHB* 以外の4つの遺伝子についてもマイクロ RNA 耐性変異型の *HD-ZIP IIIImu-GFP* 融合レポーター系統の作製を試みた。胚性致死などの問題から統計精度の高い解析は困難であったものの、胚珠に明瞭な異常が見られたのは *PHAVOLUTA (PHV)* のみであったことから、胚珠の発生には主として *PHB* と *PHV* が関与していると判定した。以上の研究は、いずれも分子遺伝学的手法と精密な形態観察を駆使した大量かつ精密な実験に基づく成果である点が評価できる。

以上、シロイヌナズナの変異型 *PHB* と変異型 *MIR165/6* 発現系統の詳細な形態観察や、*PHB* と *MIR165/6* の発現解析を端緒として、9つの *MIR165/6* 遺伝子と5つの *HD-ZIP III* 遺伝子の胚珠における発現解析を行い、2つの *MIR165/6* 遺伝子すなわち *MIR166D* および *166G* による、2つの *HD-ZIP III* 遺伝子すなわち *PHB* および *PHV* の空間的抑制制御が、シロイヌナズナの胚珠形成において重要な機能を担うことを初めて明らかにした。これらの成果は、アブラナ科植物のみに留まらず、マイクロ RNA と転写因子を介した形態形成の研究における重要な貢献である。

なお、本研究の内容は申請者を第一著者とした論文として *Plant and Cell Physiology* 誌に受理され、公表されている。

よって、本学位申請論文は、奈良女子大学博士（理学）の学位を授与されるに十分な内容を有していると判断した。