

氏 名(本籍)	かわ 川	なべ 邊	たか 隆	ひろ 大
学位の種類	博 士 ( 農 学 )			
学位記番号	農 博 第 9 2 8 号			
学位授与年月日	平 成 2 0 年 3 月 2 5 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	シロイヌナズナの生殖過程において機能する遺伝子の分子遺伝学的研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	鳥 山 欽 哉	
	(副 査)	教 授	西 尾 剛	
		准教授	高 橋 英 樹	

# 論文内容要旨

## 緒言

被子植物の多くは一つの花の中に雌蕊と雄蕊をもつ両性花であり、それらはそれぞれの器官において配偶体を形成し、有性生殖を行っている。この有性生殖の過程における雌雄の分化・発達機構や受精過程の解明には多くの興味を持たれている。近年、シロイヌナズナの突然変異体を用いた解析により、これらの分子機構の一部が明らかとなってきている。

本研究ではシロイヌナズナを材料として、生殖過程における分子機構の更なる解明を目指し、雄性生殖器官発達における細胞死の解析を形質転換体を用いて行った（第1章）。また、不稔性を示す変異体のスクリーニングを行い、得られた変異体の解析を行った（第2章）。T-DNA タグラインや薬特異的に発現を示すジーン/エンハンサートラップラインなどで、雄性不稔個体のスクリーニングを行った。また、その過程において得られた変異体についての解析を行った（第3章）。

## 第1章 *Bax*, *AtBI-1* を発現させたシロイヌナズナの解析

葯のタペート組織は、花粉の発達において重要な組織であり、その発達過程において細胞死(PCD)を起こすことが知られている。そこで、人為的にタペート組織の細胞死を操作して花粉発達に及ぼす影響を調査した。動物においてPCDのアクチベーターとして働く *Bax* と、それに拮抗的に働く *AtBI-1* を、葯のタペート組織での発現誘導時期の異なる二種類のプロモーターに連結し、シロイヌナズナに導入して形質転換体を作製した(Fig. 1-1, Table 1-1)。異なる発達ステージにおいて葯の切片を作成し、光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いてタペート組織の細胞を観察した(Figs. 1-2~1-5)。 *Osg6B::Bax*, *Osg6B::AtBI-1* および *LTP12::AtBI-1* を導入した植物では雄性不稔体を得られた。 *Bax* 導入によりタペート組織の細胞死が時期尚早に起こるか、あるいは、 *AtBI-1* 導入により、細胞死が遅延することにより、花粉形成が阻害されたと考えられた。 *LTP12::AtBI-1* を導入した植物の稔性は低下しなかった。1細胞期から発現誘導する *LTP12* プロモーターを用いた場合には、本来タペート組織が起こすPCDのシグナル伝達開始後に *AtBI-1* が発現し、その結果、タペート組織の細胞死が通常通りに起こり、花粉発達に影響せず正常な花粉が形成されたと考えられた。四分子期から発現誘導する *Osg6B* プロモーターを用いた場合、本来タペート組織が持つPCD始動前に *AtBI-1* が発現し、PCDが抑制され、タペート組織が崩壊しなかったため花粉不稔となったと考えられる。これらのことより、正常な花粉発達にはタペート組織の細胞死が必須であり、タペート組織の細胞死の時期が重要であることを明らかとした。また、PCDの始動シグナルが四分子期に存在することが示唆された。

## 第2章 不稔性を示す変異体の解析

### 第1節 シロイヌナズナ *transient defective exine 1 (tde1)* 変異体の解析

*tde1* 変異体は、花糸の伸長異常により自家受粉ができず、その結果、雄性不稔性を示す変異体である。球状のスポロポレニンが不均一に小胞子の細胞膜に蓄積するが、この異常は発達が進むに連れ消失することが明らかにされていた。この表現型から *transient defective exine1 (tde1)* と名付けられている。この変異は、劣性単一因子

により引き起こされることが明らかとなっているが、その原因遺伝子は不明であった。本研究では、マッピングによる原因遺伝子の同定を行った。(Fig. 2-1) その結果、第二染色体のマーカーCER449022 と CER449589 の間に同定することができた。塩基配列を比較した結果、*DET2* (*de-etiolated-2*)に変異が生じていた。さらに相補性実験により *tde1/det2* 遺伝子が原因遺伝子であることが分かった。*TDE1/DET2* 遺伝子は steroid 5  $\alpha$  reductase をコードしており、ブラシノステロイド合成に関わっている。これらのことより、ブラシノステロイドの花粉壁形成の関与が示唆された。

## 第2節 シロイヌナズナ *endan-butikowashi* (*ebi*) 雌性不稔変異体の解析

T-DNA タグラインより不稔性を示す変異体を同定した(Fig. 2-2)。 *ebi* 変異体と野生株との交配の結果から、雌性側の原因により不稔性を示すことが分かった。この変異体を *endan-butikowashi*(*ebi*)と名付けた。

PCR により原因候補遺伝子を単離した結果、T-DNA が *EBI* 遺伝子の開始コドンから 78bp 上流に挿入されていることが分かった(Figs.2-3, 2-4)。モチーフ検索の結果、251 から 425 残基までの領域には機能未知のドメイン DUF231 が保存されていた(Fig. 2-5)。このドメインを持つタンパク質は高等植物にだけみられ、シロイヌナズナのゲノムには DUF231 ドメインをもつ遺伝子は 46 個含まれていたが、機能欠損変異体の解析が報告されているものは *EBI* 遺伝子と相同性の低い 1 遺伝子のみであった (Fig. 2-6)。後代を展開した結果、その表現型の分離比が野生株型 : 変異株型 = 3 : 1 に分離したことから、劣性で引き起こされる変異であることが分かった (Table 2-1)。発現解析の結果、根、茎、ロゼット葉、カウリン葉、花序、開花直後の花、莢において発現しており、*EBI* 遺伝子は全身で発現していることが分かった (Fig. 2-7)。*EBI* 遺伝子の cDNA と Green Fluorescent protein(GFP)の cDNA を連結し、その融合タンパク質を一過的に発現させ、細胞内局在を調べた。GFP の蛍光は細胞全体で点状に観察されたことより、*EBI* タンパク質は細胞質内のオルガネラにおいて働いている可能性が考えられた (Fig. 2-8)。

## 第3章 シロイヌナズナ *atclp1* 変異体の解析

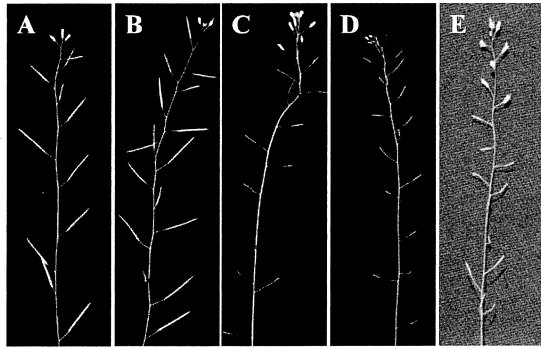
薬特異的に GUS 発現を示すジーン/エンハンサートラップラインにおいて稔性の調査を行ったが、稔性の低下がみられた系統は得られなかった。そこで、Table 3-1 で示すようにトラップされた遺伝子と相同性の高い遺伝子が破壊された場合に不稔性を示すか調査した。これらの系統で T-DNA がホモになっている系統の稔性を調査したが、不稔性を示した系統は得られなかった。しかし、T-DNA 挿入系統でホモ接合体が得られない系統が得られた。その系統は、At3g04680 に T-DNA が挿入されており、この遺伝子は酵母で明らかにされた pre-mRNA cleavage complex family protein (CLP1)と相同性を示したため、この遺伝子を *AtCLP1* と名付けた (Fig. 3-1)。自殖系統、及び T-DNA 挿入をもつ系統と野生型との相互交配による遺伝分析を行った。自殖系統後代における分離比は *AtCLP1/AtCLP1* : *AtCLP1/atclp1* : *atclp1/atclp1*=45:78:0 となり (Table 3-2)、相互交配において、雌性側からのミュータントアレルの伝達率低下が観られたが、雄性側に異常は観察されなかった (Table

3-3, Fig. 3-2)。微分干渉顕微鏡を用いて胚の発生過程を調べたところ、球状胚期において発生が停止している胚が観察され、これら異常の胚は発生後期のステージにおいて枯死することが観察された (Figs.3-3, 3-4)。

AtCLP1 は 448 アミノ酸残基からなり、C 末に CLP1 ドメインと呼ばれる配列が保存されていた。このドメインを持つタンパク質は真核生物において広くみられ (Figs. 3-5, 3-6)、機能としては pre-mRNA の 3' 末端切断とポリアダデニル化に関わっているとされている。シロイヌナズナには類似の遺伝子が 3 個存在していたが、これまで機能欠損変異体の解析はされていない (Figs. 3-7, 3-8)。発現解析の結果、*AtCLP1* 遺伝子は根、茎、ロゼット葉、カウリン葉、花序、開花直後の花、莢において発現しており、様々な器官で発現していることが分かった (Fig. 3-9)。*AtCLP1* 遺伝子の cDNA と GFP を連結し、その融合タンパク質を一過的に発現させ、細胞内局在を調べた。GFP の蛍光は核において観察されたことより、AtCLP1 は核において機能していることが推察された (Fig. 3-10)。他のミュータントアレルも同様の表現型を示したことから、本研究で見いだした変異体の原因は *AtCLP1* 遺伝子の機能欠損であることが分かった。これらのことより、AtCLP1 タンパク質は胚発生において重要であり、遺伝子の転写後制御に関わっていることが推察された。

#### 結語

シロイヌナズナを材料とし、細胞死と雄性生殖器官発達の関わりについて解析を行い、花粉発達には四分子期から起こるタペト組織の細胞死が必須であることを示した。3 系統の変異体を解析することにより、花粉壁構築に関わる *TDE1* 遺伝子、雌性生殖器官で機能する *EBI* 遺伝子、胚発生初期において必須な *AtCLP1* 遺伝子を明らかにした。本研究により、生殖機構における分子機構について新たな知見を得ることができた。

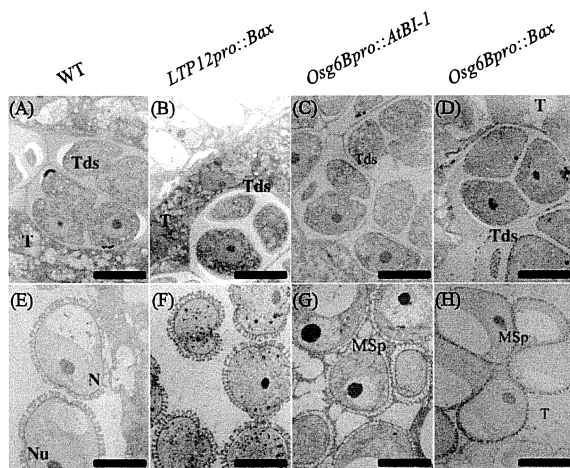


**Fig 1-1. Comparison of seed sets of the wild-type and transgenic plants.**  
 (A) A wild-type plant showing normal siliques.  
 (B) A *LTP12pro::AtBI-1* transgenic plant showing full seed sets.  
 (C) A *LTP12pro::Bax* transgenic plant with small siliques with no developing seeds.  
 (D) A *Osg6Bpro::AtBI-1* transgenic plant with small siliques with no developing seeds.  
 (E) A *Osg6Bpro::Bax* transgenic plant with small siliques with no developing seeds.

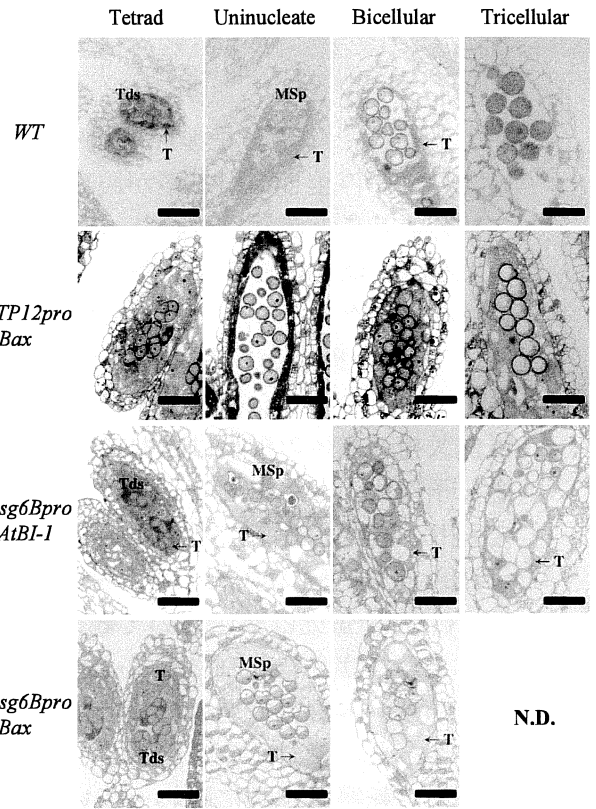
**Table 1-1. Sterile and fertile plants were obtained depending on the active stage of the promoter.**

Promoter (active stage in anther)	<i>Bax</i>	<i>AtBI-1</i>
<i>LTP12</i> (uninucleate to bicellular)	6/6	0/15
<i>Osg6B</i> (tetrad to bicellular)	4/4	8/11

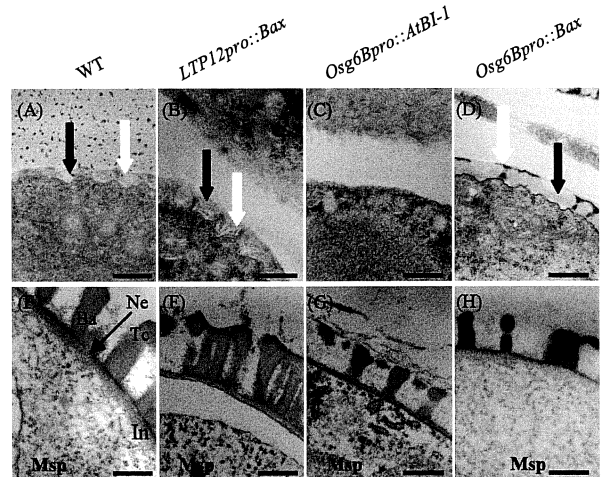
The number of male-sterile plant lines/total number of kanamycin-resistant transgenic *A. thaliana* lines with *LTP12::Bax*, *LTP12::AtBI-1*, *Osg6B::Bax* and *Osg6B::AtBI-1* are presented.



**Fig. 1-3. Analysis of pollen development in wild type and transgenic plants.** TEM images of the tetrad stage (A-D) and the uninucleate microspore stage (E-H). MSp, microspore; N, nucleus; Nu, nucleolus; T, tapetum; Tds, tetrads. Bars = 5 μm



**Fig. 1-2. Anther development in the wild-type, *LTP12pro::Bax*, *Osg6Bpro::AtBI-1* and *Osg6Bpro::Bax* plants.** Tapetal cells are killed by *Bax* or sustained by *AtBI-1*, whereas PCD induces degeneration of tapetum in the wild-type. MSp, microspore; T, tapetum; Tds, tetrads; N.D., not determinant. Bars=20 μm.



**Fig. 1-4. Tapetal development in the wild-type and the transgenic plants.** TEM images of the tetrad stage (A-D) and the uninucleate microspore stage (E-H). MSp, microspore; P, plastid; T, tapetum; Tds, tetrads. Bars = 1.5 μm

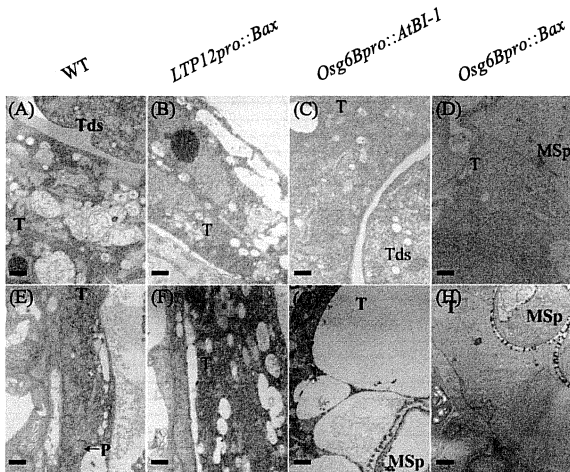


Fig. 1-5. Tapetal development in the wild-type and the transgenic plants. TEM images of the tetrad stage (A-D) and the uninucleate microspore stage (E-H). MSp, microspore; P, plastid; T, tapetum; Tds, tetrads. Bars = 1.5  $\mu$ m

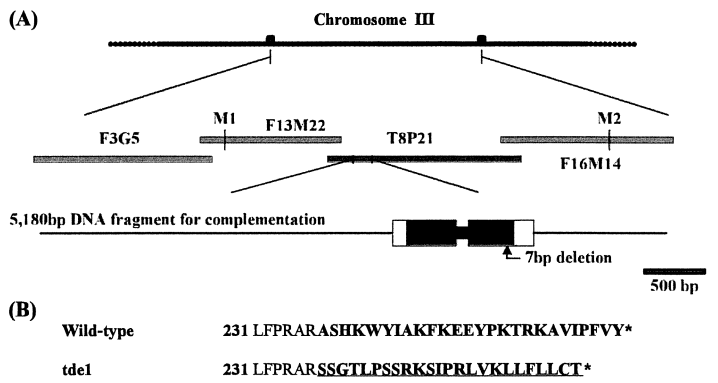


Fig. 2-1. Identification of *TDE1/DET2* by positional cloning.

(A) Schematic representation of the molecular identification of *TDE1* by positional cloning; 168 F<sub>2</sub> plants derived from a *tde/tde* x *Ler* cross (the *tde* mutation was in a Col-0 genetic background) were employed to delimit *TDE1* to a region of 223 kb between DNA markers CER449022 (M1) and CER449589 (M2). Open and filled boxes indicate untranslated regions and protein coding regions, respectively. (B) C-terminal sequences of wild-type and *tde1*.

Table 2-1. Segregation ratio of sterility in the *ebi* mutant.

Generation	Fertile : Sterile
F <sub>2</sub>	93 : 23*
F <sub>3</sub>	49 : 19*
F <sub>4</sub>	70 : 26*

The ratio fits a theoretical ratio 3:1 in all generations of the *ebi* mutant. (Probability <0.05)

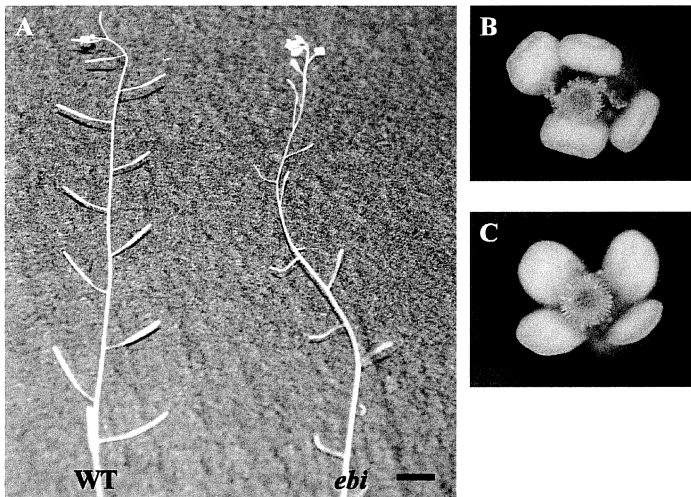


Fig. 2-2. Comparison of the wild-type and the *ebi* mutant.

(A) *EBI* loss-of-function mutant exhibit sterility. (B, C) A flower of the wild-type (B) and the *ebi* mutant (C) showing normal floral organs. Bar = 1cm.

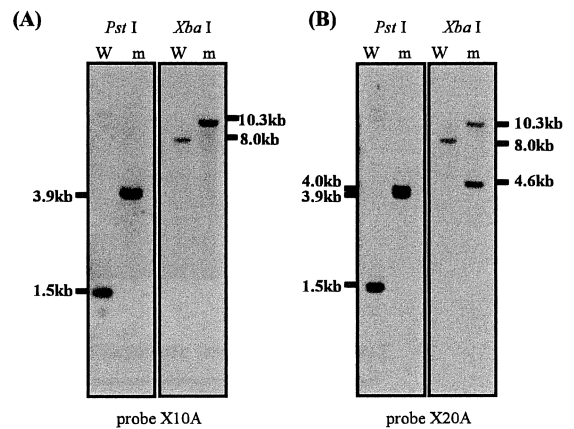


Fig. 2-4. Detection of the T-DNA within the *EBI* gene by DNA Blot analysis using probe X10A (A) and probe X20A (B). W, wild-type; m, *ebi* mutant.

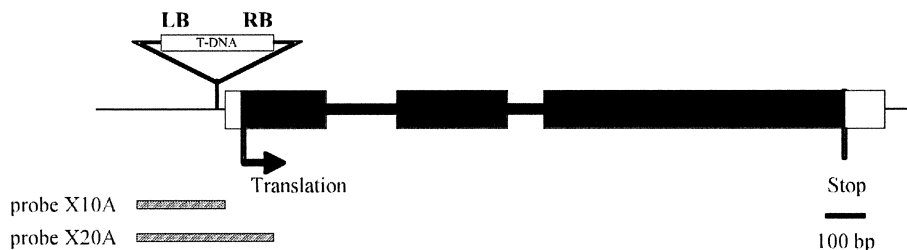


Fig. 2-3. Structure of the *EBI* gene and position of the T-DNA insertion.

Schematic drawing of *EBI* locus. Open and filled boxes indicate untranslated regions and protein coding regions, respectively.

(A)

MKLLKWEISNLQQNTYLKLVAAATLITCLAFRFFVFRFGQFSPVQVSVTGN  
 NSQISPTS VILSDNEDQIPVDIEVEKCDLFTGK WIKDPLGPIYTNE SCGIVVD  
 AHQNCITNGRPDSGFLNWKWKPNDCLPRFDSLRLQLMRNKS WAIIGDSI  
 ARNHVESLLCMLSTVEKPVVEVYHDENYRSKRWHFSPYNFTVSNIWSPFLV  
 QADIFEDSNGVSSAAVQLHLDKLDNTWTDLPFSLDYAISSGEWELKTAVY  
HENANPVGCHGCPSSNMTDLGFDYA YNTSLRHVMDFIAKSKTKGMIFFR  
TSIPDHFEDGEWHNGGTCKKTEPVGEEAVEMKVLNKILRDVEINQFERVVT  
EMGQESENLKLDFAGMLLTRPDGHPGYPYREFRPFDKDKNATVQNDCLH  
WCLPGPIDHLNDVILEIIVNGRTGK\*

(B)



Fig. 2-5. Sequence analysis of EBI.

(A) Deduced amino-acid sequence of EBI protein. The conserved domain of unknown function, DUF231 is underlined.

(B) Structure of EBI protein. DUF231 domain is shown.

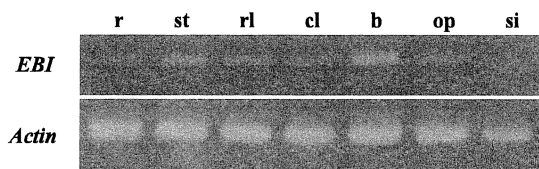


Fig. 2-7. Detection of EBI transcripts in the wild-type.

RT-PCR detection of the expression of the EBI gene in different tissues. The actin gene serves as a control. r, roots; st, stems; rl, rosette leaves; cl, cauline leaves; b, buds; op, opened flowers; si, siliques.

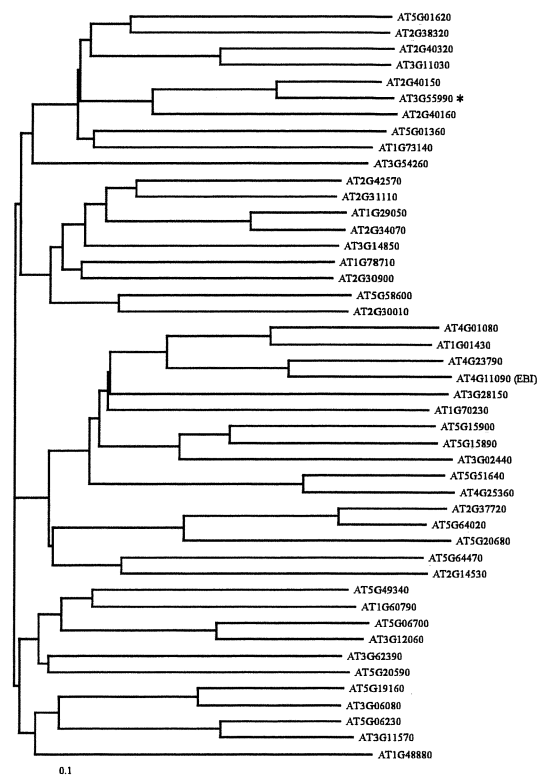


Fig. 2-6. Phylogenetic analysis of the EBI superfamily.

The Arabidopsis genome has 46 genes that shares significant homology with EBI (At4g11090). Loss of function analysis has been reported for a gene indicated by an asterisk.

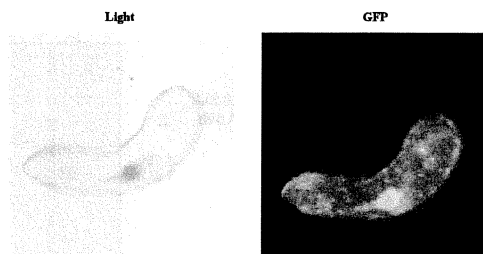


Fig. 2-8. Sublocalization of EBI protein.

The GFP fusion vector including EBI cDNA and GFP was delivered into tobacco BY-2 cells.

Table 3-1. Locus of gene with highly similar to the trapped gene in gene/enhancer trap lines and seed sets of each tag line.

ID of gene trap line	Locus of trapped gene (A)	Locus of gene with highly similar to trapped gene (B)	Annotation	Amino acid identity between (A) and (B)	Seed sets	
					Gene trap line of (A)	T-DNA tag line of (B)
#1299	At5g23160	At5g08240	Expressed protein	45%	normal	normal
#2126	At3g45240	At5g60550	Serine/threonine protein kinase	67%	normal	normal
#10659	At2g31985	At1g05510	Expressed protein	93%	normal	normal
#18257	At5g39930	At3g04680	Pre-mRNA cleavage complex family	65%	normal	*

\* ; homozygous plant not obtained.

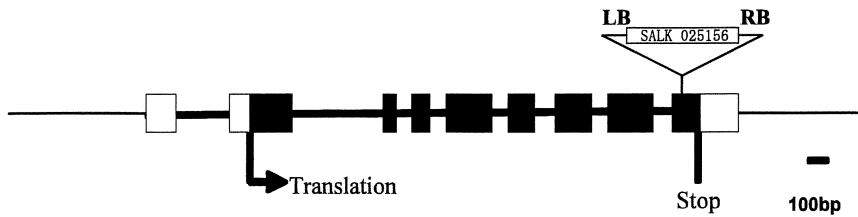


Fig. 3-1. Schematic representation of the structure of the *AtCLP1* gene and position of the T-DNA insertion. Open and filled boxes indicate untranslated regions and protein coding regions, respectively.

Table 3-2. PCR genotyping of progeny of a plant heterozygous for *atclp1*.

Parent genotype	Progeny genotype		
	<i>AtCLP1</i> / <i>AtCLP1</i>	<i>AtCLP1</i> / <i>atclp1</i>	<i>atclp1</i> / <i>atclp1</i>
<i>AtCLP1</i> / <i>atclp1</i>	45(36.6)	78(63.4)	0

The number of plants is shown with the percentage in parenthesis.  
The ratio fits to 1:2:0 segregation based on  $\chi^2$  test. ( $\chi^2=0.585$ ,  $P<0.05$ )

Table 3-3. Transmission efficiency of the *atclp1* allele.

Female parent genotype	Male parent genotype	Genotype of F1 plants	
		<i>AtCLP1</i> / <i>AtCLP1</i>	<i>AtCLP1</i> / <i>atclp1</i>
<i>AtCLP1</i> / <i>atclp1</i>	<i>AtCLP1</i> / <i>AtCLP1</i>	55(61.1)	35(38.9)
<i>AtCLP1</i> / <i>AtCLP1</i>	<i>AtCLP1</i> / <i>atclp1</i>	95(57.2)	71(42.8)

The number of plants is shown with the percentage in parenthesis.  
The ratio of female transmission efficiency is significantly different from the expected ratio of 1:1.

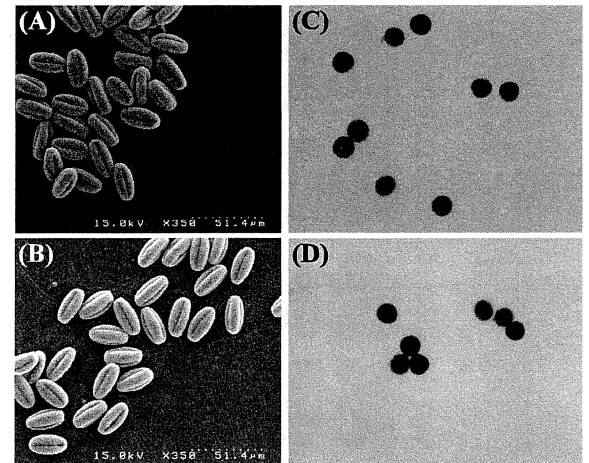


Fig. 3-2. Pollen grains from the wild-type (A,C) and the heterozygous *atclp1* plant (B,D) anthers. SEM images (A and B) and Alexander stain of pollen grains (C and D).

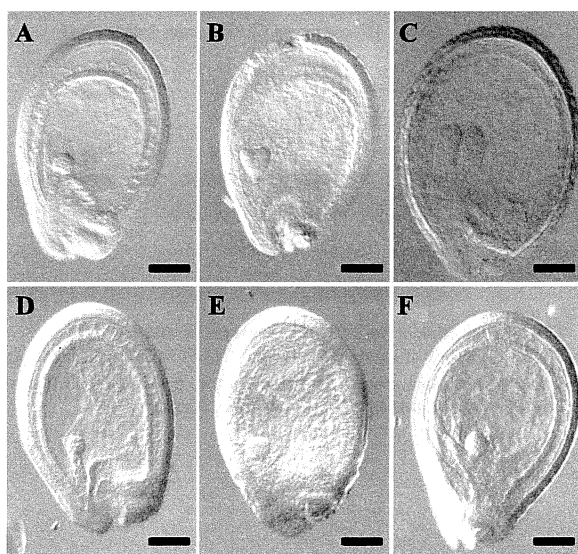


Fig. 3-3. Nomarski microscopic images of the wild-type embryos (A-C) and the homozygous *atclp1* embryos (D-F) removed from self-pollinated siliques of the heterozygous *atclp1* plant. The embryos are observed at globular (A and D), heart (B and E) and torpedo (C and F) stages. Bars=40µm

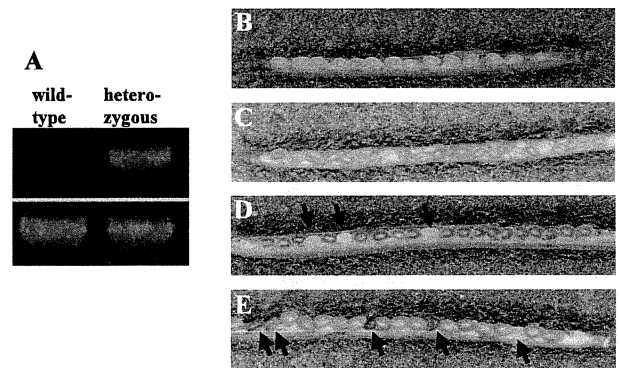


Fig. 3-4. Phenotype of the wild-type and the heterozygous *atclp1* plant. (A) PCR analysis to detect T-DNA insertion in the WT and the heterozygous *atclp1* plant. (Upper) Amplified bands representing the sequence between the left end of the T-DNA and the fifth exon of *AtCLP1*. (Lower) Amplified bands representing the sequence between the fifth exon and the ninth exon of *AtCLP1*. (B-E) Phenotype of the wild-type (B and C) and the heterozygous *atclp1* plant (D and E). Stereo microscopic images of immature silique (B and D) and mature silique (C and E). Arrow heads indicate aborted seeds.



At3g04680 1 MAYGGSPMP PALGGAVP SANLKWVLE EDELREDFP --EPIHLEW VGTAFAPG  
 O.s. 1 MAAGAAQ EP-----RQYKA EDELREDFP P-DLVRVRI EGTAFAPG  
 A.g. 1 -----ND MNAV-----RDKYLE EDELREDFP NNRVPTVLI EGTAFAPG  
 C.e. 1 -----NSB ENVG-----EFVTK EDELREDFP RQDVCLEI EGTAFAPG  
 D.m. 1 -----NSL EAGK-----EDELREDFP EDELREDFP EGTAFAPG  
 H.s. 1 -----NSG ENVG-----EDELREDFP EDELREDFP EGTAFAPG  
 S.c. 1 --RGTETLE HTSEELLITG DNEVHSLVIP KGDWQIDLK A-EGLILKV NSGTAFAPG

At3g04680 58 GHRFPEVY DNRKLAEP VIKATLEAD ---TIDVY EGTAFAPG NUIAIDARF  
 O.s. 47 GHRFPEVY DNRKLAEP VIKATLEAD ---TIDVY EGTAFAPG NUIAIDARF  
 A.g. 46 GUVVKKPEL VTSKAVIPI VHGCTEIR ---KQVAVY AKETDQVLI NNSALEHLR  
 C.e. 42 GLLDKKPEL DAKSKVAEPI VIKATLEAD ---TTSAYV SSTFRVYLI NPHAMBEVR  
 D.m. 43 BLWKKKPEL GSKAVIPI YGCVLHVS ---DMVGLI SKETPNVYI EHAALDQGR  
 H.s. 46 BLWKKKPEL GSKAVIPI YGCVLHVS ---DMVGLI SKETPNVYI EHAALDQGR  
 S.c. 59 GHRFPEVY QN-KAPPIA VEETELLWK PDLENTVYI KPWVTKVYI EHPMLKTI

At3g04680 115 GKAFTSN--DPSSQGRP VLVGPTDS KSTLDMLIS WAKKLNK EVDLIDVGG  
 O.s. 104 ARARFAAQG ALPSSQGRP VLVGPTDS KSTLDMLIS WAKKLNK EVDLIDVGG  
 A.g. 103 NAGGEDA--GPI VLVGPTDVA KTLVRIELI YAVLGRSP IFVLDLVGG  
 C.e. 99 GFAEGLG--NSNKAQSP VLVGPTDVA KTLVRIELI YAVLGRSP IFVLDLVGG  
 D.m. 100 NAGGEDA--GPI VLVGPTDVA KTLVRIELI YAVLGRSP IFVLDLVGG  
 H.s. 105 GFAEGLG--GPI VLVGPTDVA KTLVRIELI YAVLGRSP IFVLDLVGG  
 S.c. 118 KSN-----FEGGR VLVGGSQTG KTSSTRLCS YALKFNAYG EMINIDQAP

At3g04680 172 SITIPGSA ARIEMLDPI EG-----EADNA DUVYIATST NNVNLSVA  
 O.s. 143 SITIPGSA ARIEMLDPI EG-----EADNA DUVYIATST NNVNLSVA  
 A.g. 154 ALRPPGSA LLVSRDPIA EG-----EADNA DUVYIATST NNVNLSVA  
 C.e. 156 GVSVPQVAA VLVKQADVI EG-----EADNA DUVYIATST NNVNLSVA  
 D.m. 151 SIAIISGVA ELERPAQV EG-----EADNA DUVYIATST NNVNLSVA  
 H.s. 156 GVSVPQVAA VLVKQADVI EG-----EADNA DUVYIATST NNVNLSVA  
 S.c. 166 ITVPPGSA ELISDIIAG LPTVGSQTS GATLHNKQI MKNVLEKRI NMLNLSVCC

At3g04680 213 MRLAAGVEK RQVNRPSRA ANVINTM W IRIHVELL LHAIDTNAS VLVVIGP--  
 O.s. 211 MRLAAGVEK RQVNRPSRA ANVINTM W IRIHVELL LHAIDTNAS VLVVIGP--  
 A.g. 202 MRLAAGVEK RQVNRPSRA ANVINTM W IRIHVELL LHAIDTNAS VLVVIGP--  
 C.e. 204 MRLAAGVEK RQVNRPSRA ANVINTM W IRIHVELL LHAIDTNAS VLVVIGP--  
 D.m. 199 MRLAAGVEK RQVNRPSRA ANVINTM W IRIHVELL LHAIDTNAS VLVVIGP--  
 H.s. 204 MRLAAGVEK RQVNRPSRA ANVINTM W IRIHVELL LHAIDTNAS VLVVIGP--  
 S.c. 226 MRLAAGVEK RQVNRPSRA ANVINTM W IRIHVELL LHAIDTNAS VLVVIGP--

At3g04680 277 KFSRSDVY RSK-SVDVY VLRKGRVVA SVKQVRSR NEDICVYFG --SKELSRVA  
 O.s. 266 KFSRSDVY RSK-SVDVY VLRKGRVVA SVKQVRSR NEDICVYFG --SKELSRVA  
 A.g. 263 KFSRSDVY RSK-SVDVY VLRKGRVVA SVKQVRSR NEDICVYFG --SKELSRVA  
 C.e. 261 KFSRSDVY RSK-SVDVY VLRKGRVVA SVKQVRSR NEDICVYFG --SKELSRVA  
 D.m. 256 KFSRSDVY RSK-SVDVY VLRKGRVVA SVKQVRSR NEDICVYFG --SKELSRVA  
 H.s. 261 KFSRSDVY RSK-SVDVY VLRKGRVVA SVKQVRSR NEDICVYFG --SKELSRVA  
 S.c. 286 KFSRSDVY RSK-SVDVY VLRKGRVVA SVKQVRSR NEDICVYFG --SKELSRVA

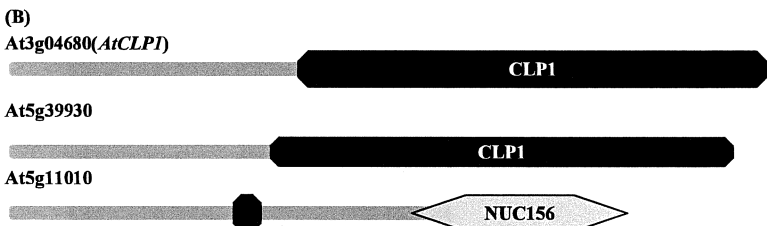
At3g04680 335 NTSSPGLQV FRNIGGDAI KSLALPSTI VSHSRVTVV NIDDDLLS VLAVSAGE-  
 O.s. 326 NTSSPGLQV FRNIGGDAI KSLALPSTI VSHSRVTVV NIDDDLLS VLAVSAGE-  
 A.g. 315 NTSSPGLQV FRNIGGDAI KSLALPSTI VSHSRVTVV NIDDDLLS VLAVSAGE-  
 C.e. 318 NTSSPGLQV FRNIGGDAI KSLALPSTI VSHSRVTVV NIDDDLLS VLAVSAGE-  
 D.m. 313 NTSSPGLQV FRNIGGDAI KSLALPSTI VSHSRVTVV NIDDDLLS VLAVSAGE-  
 H.s. 317 NTSSPGLQV FRNIGGDAI KSLALPSTI VSHSRVTVV NIDDDLLS VLAVSAGE-  
 S.c. 346 IGVYEDLIT VPS-----NVFDN GVRGVEIDV ITFSPNDA IITTEARR

At3g04680 394 RIG-ILSS VSGVYVTE VVQKPIHYI AFSGTLPS KIVVAGSLW LSSV...:445  
 O.s. 383 RIG-ILSS VSGVYVTE VVQKPIHYI AFSGTLPS KIVVAGSLW LSSV...:442  
 A.g. 372 RPHVYVOT VAGP-VYNI RQKQGLVLI SPORPEL-G Q-TLISGLQI NDSI...:423  
 C.e. 375 -RBNVYVOT VAGP-VYTE VLERVMSLI GPC-RI-L G-VLSEIHL LNDIKR...:428  
 D.m. 370 -VEDVYVOT VAGP-VYTE VMERQVMI SPORPELFP ALLKSGEQL MDNRI...:423  
 H.s. 374 -RBNVYVOT VAGP-VYNI RQKQGLVLI AFSGTLPS KIVVAGSLW LSSV...:425  
 S.c. 395 ADQAVYVOT VAGP-VYNI RQKQGLVLI AFSGTLPS KIVVAGSLW LSSV...:445

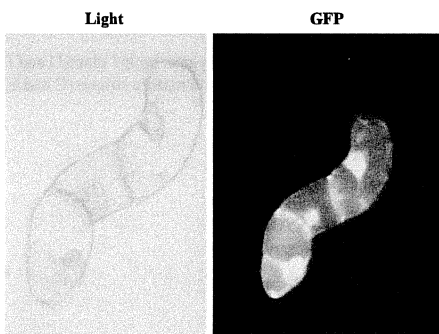
**Fig. 3-5. AtCLP1 is evolutionarily conserved and has CLP1 domain (Pfam PF06807).** The alignment of *A. thaliana* (At3g04680), *O. sativa* (O. s.), *A. gambiae* (A. g.), *C. elegans* (C. e.), *D. melanogaster* (D. m.), *H. sapiens* (H. s.), *S. cerevisiae* (S. c.) CLP1 sequences are generated using ClustalX.

(A)  
 MAYGGSPMPALSGAVPGSANLKQVKLESESELIEVSEPLSLRVVNG  
 TAEIFGSELPEMWRFTFPPRMKFAVFTWYGATIEMDGVITETDYTADETPM  
 VSYINVHAMDASSRFKASTNDPSSSQGRVIVVGPTDSGKSTLTKML  
 LSWAAKQGWSPTFVDLDVGGQGSITMPGSIAAAPIEMPLDPVEFPLDMAL  
 VYYYGHASPNMNVELYKALYKELAVLEKQFYGNPESRAAGMVINTMG  
 WIEGIGYELLHAMDTFNASVVLVLGQEKLFSSLLKDVLSKSNVDVVKL  
 HKSGGVVAVSVEVRSKSSNFKIQFYFYGLSKELSPYANTSFSDLQVFR  
 IGGGPOAPKSALPAGSTSVSNPLRVTPVNIIDDRDLLHSVLA VSYAEPPDQ  
 IISSNVSGFVYVTEVNVQKKMITYLAPSPGTLPSKLLVAGSLAWLESVW

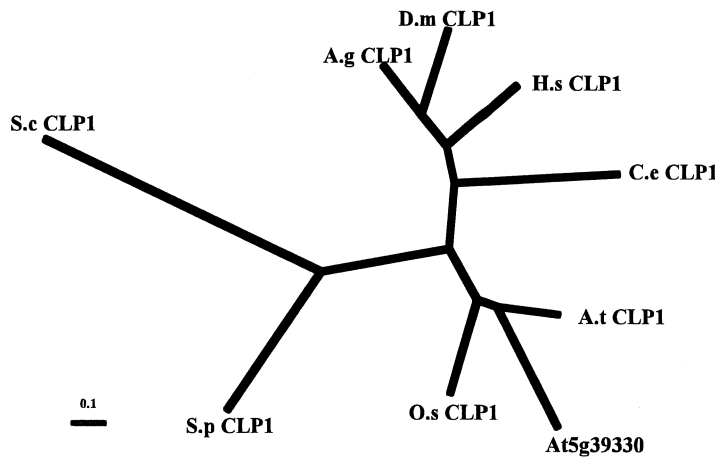
(B)  
 At3g04680(*AtCLP1*)  
 At5g39930  
 At5g11010



**Fig. 3-7. Deduced amino acid sequence of AtCLP1(At3g04680).** (A) The conserved CLP1 domain (amino acids 168-444) is under-lined. (B) Schematic representation of AtCLP1 and similar proteins.



**Fig. 3-10. Nuclear localization of AtCLP1.** The GFP fusion vector including AtCLP1 cDNA and GFP was delivered into tobacco BY-2 cells.



**Fig. 3-6. Phylogenetic tree of the CLP1 family members generated by a neighbor-joining method.** See Fig. 3-5 for abbreviations.

At3g04680 1 MAYGGSPMP PALGGAVPS ANLKWVLE EDELREDFP --EPIHLEW VGTAFAPG  
 At5g39930 1 -----RPG RQV-----RDKYLE EDELREDFP P-DLVRVRI EGTAFAPG  
 At5g11010 1 -----ND MNAV-----RDKYLE EDELREDFP NNRVPTVLI EGTAFAPG

At3g04680 50 GHRFPEVY DNRKLAEP VIKATLEAD ---TIDVY EGTAFAPG NUIAIDARF  
 At5g39930 34 GKAEIIFGPEL VTSKAVIPI VHGCTEIR ---KQVAVY AKETDQVLI NNSALEHLR  
 At5g11010 18 AASSVCSGLI DAKSKVAEPI VIKATLEAD ---TTSAYV SSTFRVYLI NPHAMBEVR

At3g04680 99 GHRFPEVY DNRKLAEP VIKATLEAD ---TIDVY EGTAFAPG NUIAIDARF  
 At5g39930 83 RHWVPTVLI VTSKAVIPI VHGCTEIR ---KQVAVY AKETDQVLI NNSALEHLR  
 At5g11010 68 GQPEFTAPGF LSTIVDKSI LBSQWVSCV KTFPEGFYV ESHSKRDFKA

**A-motif**

At3g04680 148 KNLLNVAQK GSPVYVLI VSGSITMPG SIAAAPIEM PLDPVEGFPDI  
 At5g39930 132 KNLLNVAQK GSPVYVLI VSGSITMPG SIAAAPIEM PLDPVEGFPDI  
 At5g11010 118 YLRYVYTLF YYQLHCKS --SENKTELE VNTFPGWVK LG-----Y

At3g04680 198 MALVYVHA RNNVLEK ALVKEACV EKVQVNSP RAGVNIIN  
 At5g39930 182 MALVYVHA RNNVLEK ALVKEACV EKVQVNSP RAGVNIIN  
 At5g11010 159 ELLVQVLRV ESHVVKINI SAYNKNLPAQ LFWLDEHDE TSHLIDQSA

At3g04680 248 MRLAAGVEK RQVNRPSRA ANVINTM W IRIHVELL LHAIDTNAS VLVVIGP--  
 At5g39930 232 MRLAAGVEK RQVNRPSRA ANVINTM W IRIHVELL LHAIDTNAS VLVVIGP--  
 At5g11010 209 MRLAAGVEK RQVNRPSRA ANVINTM W IRIHVELL LHAIDTNAS VLVVIGP--

**B-motif**

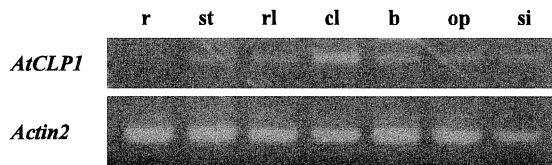
At3g04680 297 HKKSGGVVAVSVEVRSKSSNFKIQFYFYGLSKELSPYANTSFSDLQVFR  
 At5g39930 282 HKKSGGVVAVSVEVRSKSSNFKIQFYFYGLSKELSPYANTSFSDLQVFR  
 At5g11010 247 IKELTEVLAH HIVEVPIES LTNHLICQI PSESVYSS-- --LNASTVG

At3g04680 347 IGGGPOAPKSALPAGSTSVSNPLRVTPVNIIDDRDLLHSVLA VSYAEPPDQ  
 At5g39930 332 IGGGPOAPKSALPAGSTSVSNPLRVTPVNIIDDRDLLHSVLA VSYAEPPDQ  
 At5g11010 292 IGGGPOAPKSALPAGSTSVSNPLRVTPVNIIDDRDLLHSVLA VSYAEPPDQ

At3g04680 397 IISSNVSGFVYVTEVNVQKKMITYLAPSPGTLPSKLLVAGSLAWLESVW  
 At5g39930 378 IISSNVSGFVYVTEVNVQKKMITYLAPSPGTLPSKLLVAGSLAWLESVW  
 At5g11010 334 IISSNVSGFVYVTEVNVQKKMITYLAPSPGTLPSKLLVAGSLAWLESVW

At3g04680 445 W...:445  
 At5g39930 451 .....:424  
 At5g11010 451 .....:368

**Fig. 3-8. Sequence alignment of CLP1-predicted proteins encoded in the Arabidopsis genome.** The conserved CLP1 domain is underlined.



**Fig. 3-9. Detection of AtCLP1 transcripts in the wild-type.** RT-PCR detection of the expression of the *AtCLP1* in different tissues. *Actin2* transcripts were analyzed as a control. r, roots; st, stems; rl, rosette leaves; cl, cauline leaves; b, buds; op, opened flowers; si, siliques.

# 論文審査結果要旨

植物の生殖は種子・果実・切り花生産等に直結する形質であることから、古くから農学的な研究対象となってきた。近年、有性生殖の過程における雌雄の分化や胚発生過程は、シロイヌナズナの突然変異体を用いた解析から、その分子機構の一端が明らかにされつつある。

本研究では、シロイヌナズナを材料として、生殖過程における分子機構の更なる解明を自指したものである。第1章では雄性生殖器官発達における細胞死の解析を形質転換体を用いて行った。発現誘導時期の異なるプロモーターを2種類用い、さらに、細胞死を誘導する遺伝子 BAX とそれと拮抗的に働く遺伝子 AtBI-I を用いたユニークな研究である。その結果、正常な花粉発達にはタペート組織の細胞死が必須であり、タペート組織の細胞死の時期が重要であることを明らかにした。また、プログラム細胞死の始動シグナルが四分子期に存在することを始めて示唆した。

第2章ではシロイヌナズナの突然変異体を解析し、雄性不稔を示す *tde1* 変異体と雌性不稔を示す *ebi* 変異体を同定し、それぞれの原因遺伝子をクローニングした。TDEI 遺伝子はプラシノステロイド合成に関わる遺伝子であり、花糸伸長と花粉壁合成にプラシノステロイドが関与することを示唆した。EBI 遺伝子は機能未知の DUF231 ドメインを持つ遺伝子であることを示した。EBI 変異体は、雌性器官の形態に異常がみられないが、孢子体型の雌性不稔を示すことを明らかにした。このような雌性不稔を示す変異体はこれまでほとんど報告されていないユニークなものである。

第3章では胚発生致死を示す変異体 *atclp1* を発見し、その原因遺伝子のクローニングを行った。ATCLP1 は C 末に CLP1 ドメインが保存されていた。このドメインを持つタンパク質は pre-mRNA の 3' 末端切断とポリアダニル化に関わる複合体のサブユニットを構成している。植物においてこの複合体を構成する遺伝子の機能欠損変異体の解析はこれまで報告されておらず、本研究が初めての報告である。ATCLP1 タンパク質が胚発生において重要であることを示すと同時に、普遍的な遺伝子の転写後制御の研究に貢献するものである。

以上のように本研究はシロイヌナズナの生殖機構における分子機構について新たな知見を与えるものである。これらの知見は、生殖を通じた農学的研究の発展に多いに貢献するものである。また、バイオテクノロジーを用いた農作物の品種改良にも応用できる。よって審査員一同は、本論文は博士（農学）の学位を授与するに値するものと判断した。