



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (理学)
報告番号	乙第1928号
学位記番号	論 第16号
氏名	横山 悠理
授与年月日	令和5年9月25日
学位論文の題名	PHD finger を有するシロイヌナズナの PFP は花芽形成を抑制する PHD type zinc finger protein PFP represses flowering in <i>Arabidopsis thaliana</i>
論文審査担当者	主査： 木藤 新一郎 副査： 湯川 泰, 奥津 光晴, 小島 晶子(中部大学)

名古屋市立大学 博士学位論文

PHD finger を有するシロイヌナズナの
PFP は花芽形成を抑制する

PHD type zinc finger protein

PFP represses flowering in *Arabidopsis thaliana*

Graduate School of Science

Nagoya City University

2023 年

横山 悠理

指導教員 木藤 新一郎

名古屋市立大学大学院理学研究科

目次

要旨	1
第1章 諸論	4
第2章 <i>PFP</i> 遺伝子の構造的特徴と系統解析	9
1. 目的	9
2. 方法	9
3. 結果と考察	9
第3章 <i>PFP</i> とヒストンとの結合解析	14
1. 目的	14
2. 方法	14
(1) 大腸菌における <i>PFP</i> タンパク質発現用プラスミドの構築	14
(2) GST 融合 <i>PFP</i> タンパク質の誘導	15
(3) Pull down assay	15
(4) SDS-PAGE 法によるタンパク質の分離	16
(5) Western Blotting 法による解析	16
3. 結果と考察	17
第4章 <i>PFP</i> の細胞内局在解析	19
1. 目的	19
2. 方法	19
(1) <i>PFP</i> タンパク質を植物で発現させるためのプラスミド構築	19
(2) 植物細胞で GFP 融合 <i>PFP</i> タンパク質を一過的に発現させるプラスミドの構築	20
(3) 形質転換アグロバクテリウムの作製及び培養	20
(4) タマネギ表皮細胞を用いた一過性発現	21
3. 結果と考察	22
第5章 <i>PFP</i> の発現様式の解析	24
1. 目的	24
2. 方法	24
(1) シロイヌナズナの生育条件及び成長段階の計測	24

(2)	Total-RNA の抽出.....	24
(3)	Total-RNA の精製.....	25
(4)	cDNA 合成.....	26
(5)	Real-time PCR による発現解析.....	27
(6)	PFP pro :: PFP-GFP タンパク質を発現する植物形質用プラスミドの構築.....	27
(7)	PFP pro :: PFP-GFP タンパク質を発現する植物形質用プラスミドの構築.....	28
(8)	PFP pro :: PFP-GFP 発現シロイヌナズナの作製.....	28
(9)	PFP pro :: GUS 導入シロイヌナズナの作製.....	29
(10)	GUS 染色法.....	30
(11)	植物体の脱色 (TOMEI 法) 及び、PFP 発現組織の観察.....	31
3.	結果と考察.....	31
第 6 章	PFP の発現欠失系統と過剰発現系統を用いたシロイヌナズナの表現型解析	39
1.	目的	39
2.	方法	39
(1)	PFP 発現抑制系統の選抜.....	39
(2)	PFP 過剰発現系統の作製.....	39
(3)	シロイヌナズナの栽培条件と成長段階・開花時期の計測.....	40
3.	結果と考察.....	40
第 7 章	各種花芽形成関連遺伝子の発現に及ぼす PFP の影響	47
1.	目的	47
2.	方法	47
(1)	シロイヌナズナの生育条件	47
(2)	Real-time PCR による発現解析.....	47
3.	結果と考察.....	47
第 8 章	分裂組織制御遺伝子の発現に及ぼす PFP の影響	52
1.	目的	52
2.	方法	52
(1)	植物の生育	52
(2)	PFP 過剰発現系統の作製.....	52
(3)	カルス化及び再分化	52
(4)	TAIL-PCR による PFP 遺伝子導入領域の解析.....	53

(5) Real-time PCR による発現解析	55
3. 結果と考察	56
第9章 総合考察	62
謝辞	70
特記事項	71
参考文献	72
用語説明及び略語一覧	80
関連発表論文一覧	83
関連学会発表一覧	86
解説	87

要旨

本研究では、PHD finger と呼ばれる特異的なドメイン構造を持つシロイヌナズナの PFP (PHD Finger Protein) が、植物に於いてどのような生理的機能を有しているのかについて解析を行った。PHD finger を有するタンパク質は真核生物に広く存在し、クロマチンの構造変化に伴うエピジェネティックな転写制御に関わることが示唆されている。植物では、花芽や配偶子の形成に関与するタンパク質 (MS1, SIZ1) などに PHD finger ドメインが存在することが報告されている。ただし、それらタンパク質と PFP は PHD finger 以外の構造が大きく異なっており、PFP の生理的な役割は推測の域を出ない。

まず、PFP が関わる生理機構を推察するため、シロイヌナズナの生長を追って PFP の遺伝子発現を解析した。その結果、PFP の遺伝子発現は花芽が形成される時期に特異的に低下することが明らかとなった。この結果は、PFP が花芽形成に関与することを示唆した。次に、PFP の発現を人為的に変化させた形質転換シロイヌナズナ (発現抑制系統と過剰発現系統) を作製し、非形質転換体 (コントロール) と共に同一条件下で育成して表現形の違いを観察した。その結果、コントロールと比較して PFP の発現抑制系統では花芽形成が促進され、逆に PFP の過剰発現系統で花芽形成が遅延することが明らかとなった。この結果は、PFP がシロイヌナズナの花芽形成を抑制する働きを持つことを示唆し、発現解析の結果を踏まえると、PFP は栄養生長期に花芽が分化するのを抑制する因子であると考えられる。シロイヌナズナでは花芽形成の抑制因子として FLC (FLOWERING LOCUS C) が同定されているが、PFP は FLC と構造の類似性がなく新規の花成抑制因子である。次に、PFP の機構を知るための解析を実施した。まず、PFP のホモログである分裂酵母の Mlo2 がヒストン H3 に結合することから、PFP とヒストンタンパク質との結合解析をプルダウン法で行った。その結果、シロイヌナズナの PFP もヒストン H3 と結合する能力を持つことが示唆された。さらに

PFP に GFP を融合させたタンパク質をタマネギの表皮細胞で一過的に発現させた結果、PFP は核に局在することが明らかとなった。よって、PFP は核内でヒストン H3 と相互作用することで標的遺伝子の発現を調整し、花芽形成を抑制していることが推察できた。次に、PFP の標的遺伝子を明らかにするため、PFP の発現抑制系統と過剰発現系統を使い、シロイヌナズナの花芽形成で中心的な役割を担っている様々な花成制御因子の遺伝子発現を詳細に調べた。その結果、PFP の発現は花成抑制因子 *FLC* の遺伝子発現を促進させ、逆に花成促進因子 *FT* の発現を抑制することが明らかとなった。*FT* は *FLC* により発現が抑えられることを踏まえると、PFP で *FT* の発現が抑えられたのは PFP により *FLC* の発現が誘導されたためと考えられる。

以上の結果から、本研究では PFP が花成抑制因子である *FLC* の発現を促進することでシロイヌナズナの花芽形成を抑制する因子であることを明らかにした。

Abstract

FLC is an integrative regulator of flowering in *Arabidopsis thaliana*. The expression of *FLC* gene is regulated by epigenetic control via histone modification. Plant homeodomain (PHD) finger is a sequence-specific histone binding motif evolutionary conserved in eukaryotes. It has been known that PHD finger proteins play a significant role as a regulator of epigenetic gene expression. In this study, we investigated the role of an *Arabidopsis* PHD finger protein homolog, named PFP (PHD Finger Protein). Phenotypic analysis using a loss-of-function line of PFP showed early flowering as compared with the control under long-day condition that promotes flowering, suggesting that PFP is essential in the flowering repression of *Arabidopsis*. The analyses of major flowering regulatory gene expressions indicated that the expression of floral repressor *FLC* was decreased, while the one of floral inducer *FT* was increased in the loss-of-function line. On the contrary, in the transgenic *Arabidopsis* overexpressing PFP, the flowering time was delayed and the expression pattern of flowering regulatory genes was reversed in which *FLC* was upregulated and *FT* was downregulated, suggesting that PFP is sufficient to regulate flowering regulatory genes. Based on these results, we conclude that PFP controls flowering time by suppressing the upstream of major flowering regulatory genes via *FLC* expression in *Arabidopsis*.

第1章 諸論

現在地球上には、同定されているだけで約 175 万種の生物が生息しており、その内の約 27 万種が植物であると言われている。植物は根を張って生長するため、基本的には芽吹いた場所から移動することができない。よって、周りの環境に適応して生活する必要がある、成長を左右する生理機構（発芽、光合成、細胞増殖・伸長、花芽形成、老化、ストレス応答など）の多くが、光や温度などの環境因子に影響を受けている。また、それらの生理現象は、環境変化に伴うタンパク質の構造変化や環境をシグナルとする特定遺伝子の発現制御で調整されていることも、明らかになりつつある。特定遺伝子の発現制御については、遺伝子の上流域に存在する転写調節領域のシスエレメントとそこに結合する転写因子（転写誘導型と抑制型）により制御されていることが古くから知られている。しかし、近年では、特定遺伝子の転写に、クロマチン構造が関わるエピジェネティックな転写制御が関わっている事も明らかになっている。

植物におけるエピジェネティックな転写制御については、モデル植物のシロイヌナズナで研究が進んでおり、胚発生後の表現型の可塑性や環境応答などに深く関わっていることが報告されている（Kooke et al. 2015）。また、花芽形成も、エピジェネティックな転写制御により調節されていることが明らかになっている。シロイヌナズナの花芽形成は、光周期、ジベレリン依存性、春化、自律の4つの独立した経路によって調節されている（Levy 1998）（図1）。

FLOWERING LOCUS C (FLC) は、これらの経路で花芽形成抑制因子として機能する MADS-box 転写因子であり（Michaels and Amasino 1999）、光周期およびジベレリン経路で中心的な役割を果たす FLOWERING LOCUS T (FT) および SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1) の発現を抑制することによって花芽形成を抑制することが知られている（Hepworth et al. 2002, Searle et

al. 2006)。一方、春化および自律の経路は、*FLC* の発現を抑制することによって花芽形成を促進する。したがって、*FLC* は、シロイヌナズナにおいて花期の運命を決定する重要な役割を果たしている。この *FLC* の発現調節機構については解析が進んでおり、栄養生長期においては *FRIGIDA* (*FRI*) によって発現が促進され、結果として花芽形成が抑制されていることが知られている (Lee and Amasino 1995)。*FRI* は、*COMPASS* 様複合体と協調して *FLC* の遺伝子領域にあるヒストン H3 の 4 番目のリジン残基をトリメチル化 ($H3K4me3$) し、それが引き金となり *FLC* の遺伝子発現が誘導されていることが報告されている (Jiang et al. 2009)。一方、春化経路では、*VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*) および *VERNALIZATION 2* (*VRN2*) を含む Polycomb 複合体 2 (*PRC2*) がヒストン H3 リジン 27 番目のトリメチル化 ($H3K27me3$) を誘導し、*FLC* の発現を抑制していることが報告されている (Wood et al. 2006; De Lucia et al. 2008; Kim and Sung 2013)。なお、 $H3K27me3$ は温度上昇に伴って脱メチル化され、Jumonji-C ドメインを含むタンパク質 (*JMJ30* および *JMJ32*) を介して *FLC* の発現を誘導することも報告されている (Gan et al. 2014)。また自律経路では、RNA 結合タンパク質複合体 *FCA/FY* がクロマチンサイレンシングによって *FLC* の発現を抑制している (Liu et al. 2007)。よって、*FLC* が位置する遺伝子領域のヘテロクロマチン化が、*FLC* の発現抑制を誘導することが示唆されている (Henderson et al. 2005)。また、自律性経路調節因子である *WD-40* リピート含有タンパク質 *FVE* は、ヒストン脱アセチル化酵素と協調して *FLC* の発現を抑制することも明らかにされている (Ausín et al. 2004)。以上の報告を踏まえると、*FLC* 遺伝子の発現はヒストンの修飾を介したエピジェネティック転写制御によって調節されることが考えられる。上記以外にも、シロイヌナズナではエピジェネティックな転写調節に関わる因子が 130 以上同定されてい

るが (Pikaard and Scheid 2014)、未だ植物におけるエピジェネティックな転写制御の全容は明らかになっていない。

エピジェネティックな転写調節に関わる因子として、Mlo2 が知られている。Mlo2 は分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) で過剰に発現させると染色体の有糸分裂が阻害される因子として発見され (Javerzat et al., 1996)、ヒストン H3 に結合することが報告されている (田上ら未発表, Ji et al., 2015)。よって、Mlo2 はヒストンとの結合を介したクロマチン構造の変化 (エピジェネティックな転写制御) に関わっていることが示唆されている。Mlo2 は、内部に PHD type Zinc finger ドメイン (PHD finger) と UBR type Zinc Finger ドメイン (UBR) と呼ばれる特徴的な構造を有している。2つのドメインは、共に zinc finger と呼ばれる α ヘリックスの His 残基 2 個と β シートの Cys 残基 2 個が亜鉛に配位結合することで形成される指状の構造をとり、標的 DNA や標的タンパク質と特異的に結合するのに役立っていると考えられている。Zinc finger ドメインには複数のタイプが存在するが、PHD finger はシロイヌナズナの HAT3.1 タンパク質で発見された Cys4-His-Cys3 型の構造を取る。そして、RING type zinc finger (ユビキチンを標的タンパク質に転移させる RING 型ユビキチンリガーゼが持つドメイン) と似た構造を持つことも知られている。この PHD finger ドメインを持つタンパク質は、メチル化されたヒストン H3 (H3K4me3) を特異的に認識して結合し、分子内に存在する他のドメイン (クロモドメインやプロモドメイン) と協調して特定遺伝子の転写調節を行っている例が報告されており (Pena et al. 2006, Shi et al. 2006, Wysocka et al. 2006)、クロマチンの構造変化を介する転写調節に関与すると考えられている。現時点では、PHD finger ドメインを持つタンパク質の中で機能が明らかにされているものは少ないが、植物では SIZ1 が胚発生に関与すること (Ling et al. 2012) や

MS1 が雄性発達に関与すること (Yang et al. 2007) が報告されている。一方、UBR は ユビキチン分解系に関わる UBR1 などの UBR family に見られる zinc finger 型のドメインであり、N-degron と呼ばれるタンパク質を認識して特異的に結合することが分かっている。マウスでは、この UBR ドメインを持つ UBR1 や UBR2 の遺伝子を破壊したトランスジェニックマウスが作製・解析されており、未熟胚の段階で致死になることが報告されている (An et al. 2006)。そのため、UBR を持つタンパク質は真核生物の発生や分化の過程で重要な役割を担っていると考えられるが、植物では UBR を持つタンパク質の研究が進んでおらず、現時点で報告例はない。

以上の事から、Mlo2 やそのホモログは、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな転写制御を行うことで真核生物の分化や発生に重要な役割を担っていると期待できる。そこで本研究では、シロイヌナズナが持つ Mlo2 ホモログ (PFP と命名) に着目し、その機能解析に挑んだ。

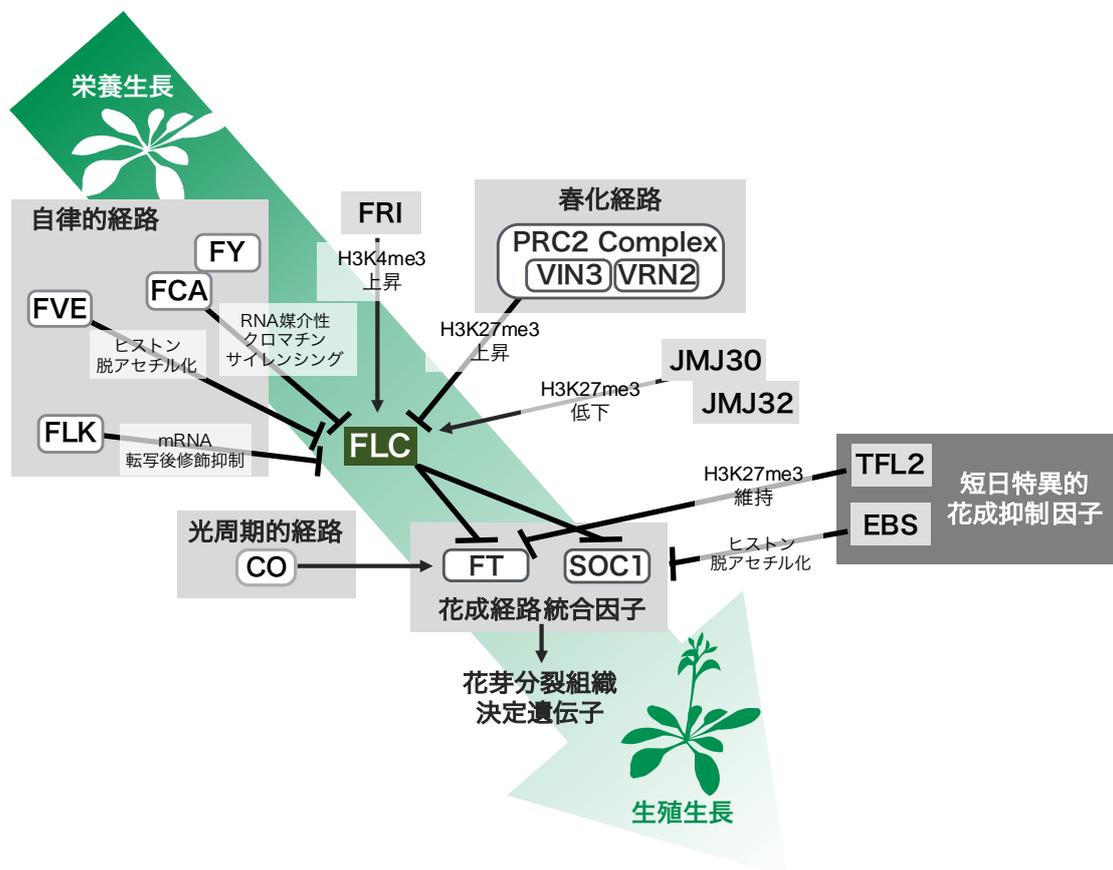


図 1.シロイヌナズナの花芽形成機構

花芽形成抑制因子 (FLC) や花芽形成経路統合因子 (FT 及び SOC1) の発現制御に関わる花芽形成の情報伝達経路を示した。発現維持や発現上昇する経路は矢印で、発現抑制を行う経路は丁字で示した。

第2章 PFP 遺伝子の構造的特徴と系統解析

1. 目的

PFP 遺伝子の構造的特徴から機能を推測するために、推定アミノ酸配列を用いてドメイン検索を行った。加えて、データベースに登録されている PFP ホモログの配列を利用して分子系統解析を行い、各生物種間の類似性を検証した。

2. 方法

解析に使用した酵母 *HiTAP* 遺伝子 (*Mlo2*) の塩基配列 (NM_001021389) と推定アミノ酸配列 (NP_595478) は、Genbank

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) より入手した。そして、遺伝子やタンパク質のホモロジー検索は、Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) の BLAST を使用して実施した (Apweiler 2004)。また、タンパク質のドメイン検索は、InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を使用した (Finn et al. 2017)。なお、アミノ酸配列のアライメント解析には T-COFFEE (<http://tcoffee.vital-it.ch/apps/tcoffee/index.html>) を利用し、デフォルトのパラメータで使用した (Notredame et al. 2000)。そして、系統解析は JTT 行列ベースモデル (Jones et al. 1992) に基づく最尤法で計算する MEGA バージョン 7 (Kumar et al. 2016) を用いた。

3. 結果と考察

データベースで酵母 *HiTAP1* との相同性があるシロイヌナズナの遺伝子を検索したところ、*At4g23860* 遺伝子が確認できた。本解析では、この遺伝子を *PHD Finger Protein (PFP)* と名づけ、解析を進めた。図 2-1 には *PFP* がコード

する推定アミノ酸配列と、酵母 *HiTAP1* やその他の生物種で単離・同定されたホモログのアミノ酸配列を比較した結果を示した。*PFP* の塩基配列より推定されたアミノ酸配列は 452 残基から構成されており、PHD 型 Zinc Finger ドメイン及び UBR 型 Zinc Finger ドメインを持つことが明らかになった。この 2 種類のドメイン構造は、酵母からヒトに至るすべての真核生物に保存されていた。一方で、C 末端側のアミノ酸配列には相同性が見られなかった。この結果から、*PFP* の N 末端側に存在する 2 種類の Zinc Finger ドメインが生物共通の機構に関わっており、C 末端側は植物（シロイヌナズナ）特有の機能発現に重要な領域であると推察した。

続いて、図 2-1 で使用したアライメントデータをもとに、12 種の動植物における *PFP* ホモログの分子系統樹を作製した（図 2-2）。分岐は、既知の真核生物における分類や進化の位置付けと一致する結果となった。また、アライメント及び系統樹の結果から、ホモログの配列は植物でもアブラナ科 (*A. thaliana*, *Capsella rubella*, *Brassica rapa*)、イネ科 (*Oryza sativa*)、マメ科 (*Glycine max*) の間で異なっており、同じ植物でも *PFP* と他のホモログは異なる機能を担っている可能性が示唆された。

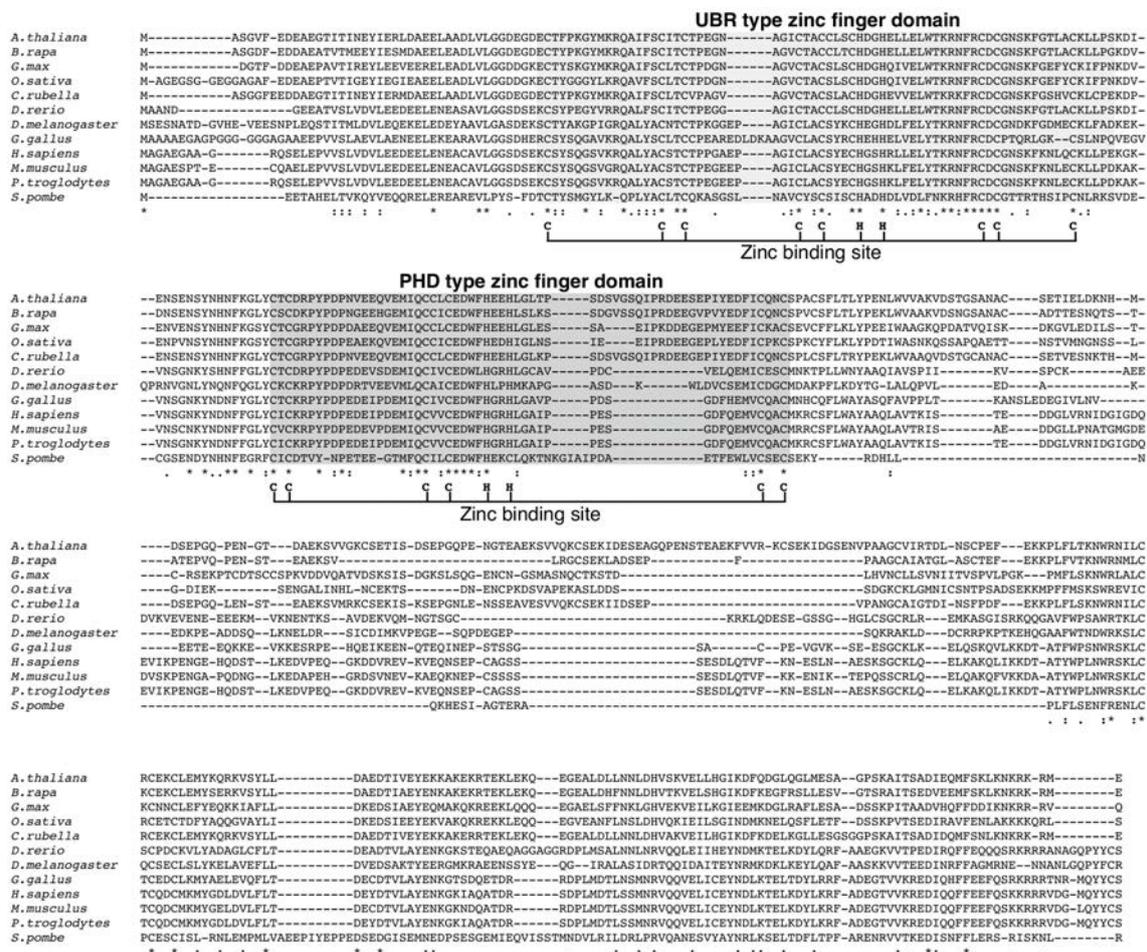


図 2-1. PFP と他の生物が持つ PFP ホモログのアミノ酸配列の相同性

解析には、以下の遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を使用した。

A. thaliana (シロイヌナズナ) : LC339519、*B. rapa* (アブラナ) :

XM_009139196、*G. max* (ダイズ) : XM_003538084、*O. sativa* (イネ) :

XM_015788961、*C. rubella* (ルベラナズナ) : XM_006283712、*D. rerio* (ゼブラ

フィッシュ) : NM_212629、*D. melanogaster* (キイロシヨウジョウバエ) :

NM_135993、*G. gallus* (セキショクヤケイ) : NM_001318461、*H. sapiens* (ヒ

ト) : NM_175748、*M. Musculus* (ハツカネズミ) : NM_025666、*P. troglodytes*

(チンパンジー) : NM_026861、*S. pombe* (分裂酵母) : NM_001021389。アス

タリスク、コロン、ピリオドは保存の程度が異なる保存残基を示している。濃い灰色の枠は PHD 型 Zinc Finger ドメインを示す。薄い灰色の枠は UBR 型 Zinc Finger ドメインを示す。アライメントの下部に書き出したアミノ酸は、PHD 型あるいは UBR 型 Zinc Finger ドメインの形成に重要な亜鉛配位システイン (C) およびヒスチジン (H) 残基を示す。

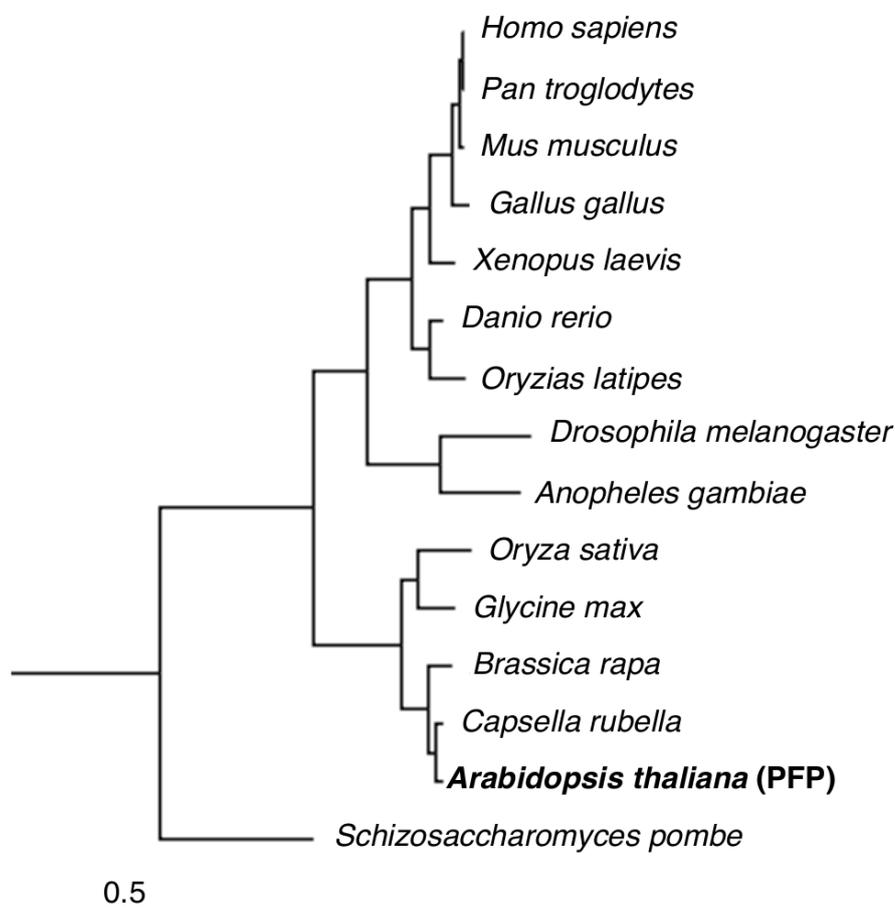


図 2-2. PFP タンパク質とその他のホモログの分子進化系統樹

図 2-1 で用いた 12 種と *Xenopus laevis* (アフリカツメガエル: BC045250) 、
Oryzias latipes (ミナミメダカ: XM_020714630) 、*Anopheles gambiae* (ガンビ
エハマダラカ : XM_310183) から推定したアミノ酸配列に基づいて最尤法によ
って作製した。ギャップや欠損データを含む位置はすべて削除され、最終的な
データセットに含まれる配列は合計 299 残基であった。スケールバーはアミノ
酸置換の割合を示す。

第3章 PFP とヒストンとの結合解析

1. 目的

PFP は PHD 型 Zinc Finger ドメインを有している。そして、この PHD 型 Zinc Finger ドメインは、植物を含めた多くの生物種においてヒストン H3 と相互作用することが報告されている (Miura et al. 2020)。そこで PFP とヒストン H3 との結合を解析した。また、仮に PFP がヒストン H3 と結合している場合は核に局在している可能性があることから、タマネギ表皮細胞を用いた一過性の発現系を構築し、PFP の細胞内局在を解析した。

2. 方法

(1) 大腸菌における PFP タンパク質発現用プラスミドの構築

発現ベクターには pCold GST (TAKARA) を使用した。制限酵素 *NdeI* と *SalI* で開環させた発現ベクター 1 μ L に、同じ制限酵素の認識配列を付加した PFP_ORF を 3 μ L 加え、4 μ L の Ligation mix を加えて 16 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。同法を用いて、末端に *BamHI/SalI* の認識配列を付加した PFP_N 末端断片と *EcoRI/SalI* の認識配列を付加した PFP_C 断片も発現ベクターに連結させた。得られた各ライゲーション産物 8 μ L を 100 μ L の大腸菌 XL1-blue のコンピテントセルと混合した後、全量を LB 培地 (アンピシリン 終濃度 50 μ g/mL) に播き、生育したコロニーからアルカリ法によってプラスミドを抽出した。PFP_ORF、PFP_N 断片と PFP_C 断片のインサートが挿入されたプラスミドはシーケンスによって塩基配列を確認し、変異が入っていないクローンを選択して以下の実験に使用した。

(2) GST 融合 PFP タンパク質の誘導

前項で作製したプラスミド 1 μ L を大腸菌 BL21 株のコンピテントセルと混合し、形質転換した。また、コントロールには、空の発現ベクターで形質転換した大腸菌 BL21 株を用いた。

少量の種菌を 4mL の LB 培地（アンピシリン終濃度 50 μ g/mL）に植菌して 37 $^{\circ}$ C で一晩振盪培養した後、100 μ L の培養液を 30mL の液体 LB 培地（アンピシリン終濃度 50 μ g/mL）に植菌して 37 $^{\circ}$ C で OD600=0.5 になるまで振盪培養した。次に、培養液を氷上で 30 分ほど冷やした後、培地に終濃度 0.1mM の isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して 15 $^{\circ}$ C で 72 時間振盪培養し、タンパク質の発現を誘導した。誘導後の菌体は、遠心分離（15,000rpm、10 $^{\circ}$ C、5 分）で集菌し、100 μ L の 1 \times リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を加えてソニケーターで細胞を破碎した。その後、遠心分離（15,000rpm、10 $^{\circ}$ C、10 分）を行い、上清を可溶性分画、そして沈殿を不溶性分画として回収した。

(3) Pull down assay

500 μ L の Glutathione Sepharose4B（GE Healthcare）にフィルターで濾過した可溶性 GST 融合 PFP タンパク質の抽出液を添加した。その後、子牛胸腺由来ヒストン精製タンパク質（H9250; Sigma-Aldrich）またはシロイヌナズナから抽出した全タンパク質溶液をカラムに加え、30 分静置した。続けて 2.5mL の溶解 buffer（1 \times PBS, 0.5% TritonX-100, pH7.3）と 2.5mL の洗浄 buffer（1 \times PBS, pH7.3）をカラムに順次添加して樹脂を洗浄した。樹脂に結合した GST 融合 PFP タンパク質の回収は、1mL の溶出 buffer（50 mM Tris-HCl, 10mM reduced glutathione, pH 8.0）を添加することで行った。溶出液は 100 μ L ずつマイクロチューブに回収し、タンパク質濃度の高い画分を集めて実験に使用した。使用後

のカラムは 3M NaCl 溶液と結合 buffer で洗浄し、最後に保存 buffer (1×PBS、20% EtOH) を添加して 5°C で保存した。

(4) SDS-PAGE 法によるタンパク質の分離

前述の溶出液に対して等量の 2×SDS Sample buffer (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 0.0014 mM Bromophenol blue, 20 % Glycerol) と 1/10 量の 2-Mercaptoethanol を加え、100 °C で 5 分間熱処理した。そして、2 組の 12 % ポリアクリルアミドゲルを作製し、1×SDS 泳動 buffer (25 mM Tris-HCl, 0.2 % Glycine, 0.1 % SDS) を用いて電気泳動を行った。電気泳動後は 1 組のゲルを CBB 染色し、もう 1 組のゲルは後述の Western Blotting に使用した。

(5) Western Blotting 法による解析

Hybond-P PVDF メンブラン (Amersham 社) をメタノールに浸した後、前項で電気泳動したゲルと共に転写 buffer (25 mM Tris, 0.2 M Glycine, 0.1 % SDS, 20 % メタノール) に 30 分間浸漬し、セミドライブロットティング装置に濾紙 3 枚、ゲル、メンブラン、濾紙 3 枚の順で重ねた。そして、ガラス棒で空気を完全に抜いてから通電し、タンパク質をメンブランに転写した。転写後の PVDF メンブランはブロッキング液に浸して室温で 1 時間振盪した後、TBS-T で 2 回リンスし、新しい TBS-T で 15 分間、さらに液を交換して 5 分間の振盪洗浄を 2 回行った。そして、メンブランを TBS-T で 5,000 倍に希釈した抗ヒストン H3 抗体(田上研究室より供与)の溶液に移して 1 時間振盪した。その後、メンブランを TBS-T に移して 15 分間浸透することで洗浄し、さらに 5 分間の洗浄を 3 回行った。次に TBS-T で 20,000 倍に希釈した HRP 標識 2 次抗体の溶液にメンブランを移して 1 時間振盪した後、TBS-T で 15 分間の洗浄

と、5 分間の洗浄をあわせて 4 回行った。洗浄後、PVDF メンブランに ECL plus (Amersham 社) をかけて均一に塗布した後、暗室で X 線フィルムを重ねてカセットに収納し、数分から数時間露光した。

3. 結果と考察

PFP の全長及び、N 末端断片、C 末端断片に GST を融合したタンパク質 (GST 融合 PFP タンパク質) を大腸菌で合成した。はじめに、これら GST 融合 PFP タンパク質と仔牛胸腺より精製されたコアヒストンタンパク質による Pull down assay を行った (図 3-1 a)。この結果から、PFP 全長タンパク質及び PFP N 末端断片はヒストン H3 と結合することが明らかになった。また、図 3-1b では、*Arabidopsis thaliana* から抽出した全タンパク質溶液と GST 融合 PFP タンパク質溶液を用いて Pull down assay を行った後に、ヒストン H3 の抗体を用いて Western blot 解析を行った結果を示している。こちらの結果でも、PFP の全長タンパク質とヒストン H3 との強い結合が確認できた。また、N 末端断片では全長と比較して弱いヒストン H3 との結合が確認できた。PFP はヒストン H3 への結合能を示すことから、シロイヌナズナではクロマチン構造の変化を介した転写制御に関与することが示唆された。

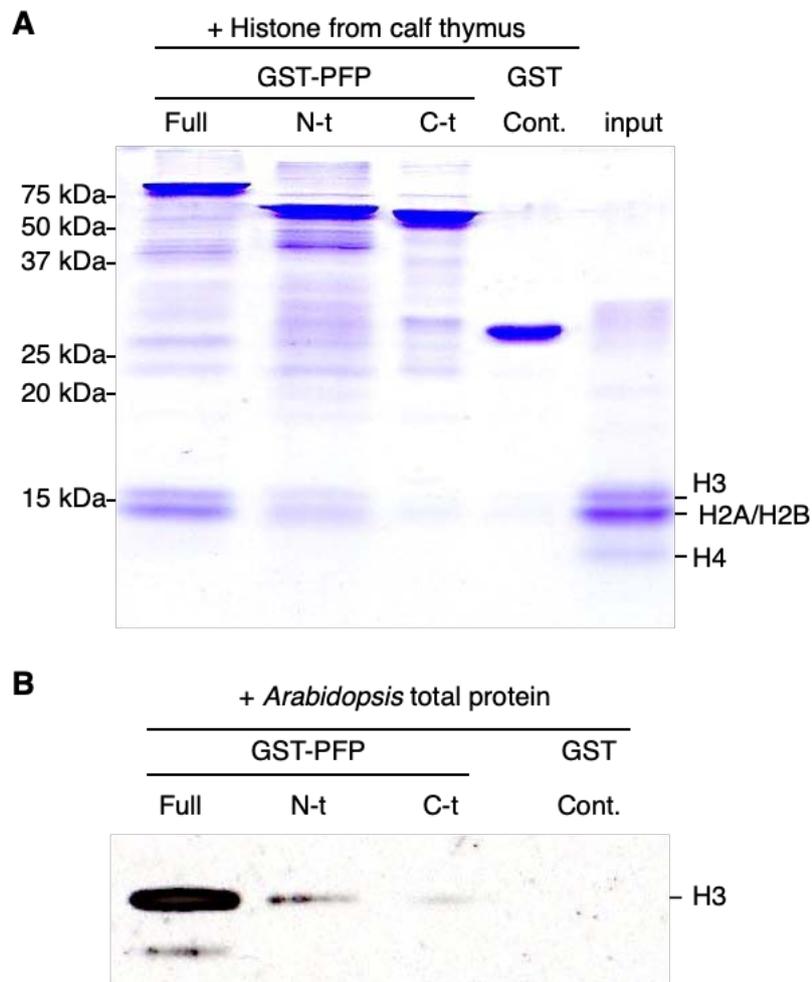


図 3-1. 各種 GST 融合 PFP タンパク質 (GST-PFP) を用いたヒストンとの結合解析

A. GST と融合した PFP 断片 (全長、N 末端 [アミノ酸残基 1~222]、C 末端 [アミノ酸残基 194~452]) とヒストンとの Pull down assay によって得られた結合タンパク質を CBB 染色によって可視化したものを示す。Input には使用した胸腺由来ヒストン精製タンパク質を用いた。B. シロイヌナズナの全抽出タンパク質を用いたプルダウンアッセイで GST-PFP カラムに結合したタンパク質を、抗ヒストン H3 抗体を用いて検出したイムノブロットの結果を示す。

第4章 PFP の細胞内局在解析

1. 目的

前章の結果から PFP はヒストンと結合することが明らかになった。よって、PFP は核に局在しクロマチンの構造変化に関わっている可能性が示唆された。そこで、その可能性を確かめるために植物細胞における一過性発現系を構築し、PFP の細胞内局在を解析した。

2. 方法

(1) PFP タンパク質を植物で発現させるためのプラスミド構築

発現ベクターには、タカラ社の pRI 101-AN にビアラホス耐性遺伝子 *Bar* を付与したプラスミド（研究室保管番号 P_11031）を使用した。ベクターに連結する PFP の ORF は、PFP を pMD20 に組み込んだプラスミド（研究室保管番号 P_11018）から切り出して使用した。制限酵素 *NdeI* と *SalI* で開環させた発現ベクター 1 μ L と、同様の制限酵素によって P_11018 から切り出した PFP_ORF を 3 μ L を混合し、4 μ L の Ligation mix を加えて 16°C で 30 分間反応させた。得られた各ライゲーション産物 8 μ L を 100 μ L の大腸菌 XL1-blue のコンピテントセルと混合し、氷中に 30 分放置した後、42°C で 40 秒処理をして全量を LB 寒天培地（アンピシリン 終濃度 50 μ g/mL）に播いた。翌日、生育したコロニーから常法によってプラスミドを抽出した。PFP_ORF のインサートが挿入されたプラスミドを選抜して塩基配列を確認し、変異が入っていないプラスミドに、プラスミド番号（P_11036）を付して後の実験に使用した。

(2) 植物細胞で GFP 融合 PFP タンパク質を一過的に発現させるプラスミドの構築

研究室所蔵のプラスミドベクター GFP in pRI-101-AN_Bar (P_11053) に、P_16018 より PFP-ORF を切り出し、連結した。具体的には、制限酵素 *Bam*HI で開環させた発現ベクター 1 μ L に、対応する制限酵素の認識配列を付加した GFP_ORF を 3 μ L 加え、4 μ L の Ligation mix を加えて 16°C で 30 分間反応させた。得られた各ライゲーション産物 8 μ L を 100 μ L の大腸菌 XL1-blue のコンピテントセルと混合し氷中に 30 分放置した後、42°C で 40 秒処理をして全量を LB 寒天培地 (アンピシリン 終濃度 50 μ g/mL) に播き、生育したコロニーから常法によってプラスミドを抽出した。PFP-GFP_ORF のインサートが挿入されたプラスミドを選抜して塩基配列を確認し、変異が入っていないプラスミドを以下の実験に使用した。

(3) 形質転換アグロバクテリウムの作製及び培養

500 mL のアグロバクテリウム用培地 (Bacto tryptone 2%, Bacto yeast extract 0.5%, MgSO₄·7H₂O 1%, [pH 7.2]) にアグロバクテリウム LBA4404 株を接種して 28°C で激しく振盪し、濁度 (OD 600) が 1 になるまで培養を続けた。その後、培養液を遠心分離 (6,000×g, 5 min, 10°C) で集菌し、菌体に 100 mL のアグロバクテリウム用培地を加えて懸濁した後、再度遠心分離 (6,000×g, 5 min, 10°C) を行い集菌した。次に、菌体を 25 mL のアグロバクテリウム用培地に懸濁し、200 μ L ずつマイクロチューブに分注して液体窒素で急速凍結して遺伝子導入に使用するコンピテントセルとした。作製したアグロバクテリウムのコンピテントセルは使用時まで -80°C で保存した。

アグロバクテリウムの形質転換は、200 μ L のコンピテントセルに 100 μ L のアグロバクテリウム用培地と前項で作製したプラスミドを加えて混合し、50 mL チューブに移し替えて液体窒素中で5分間処理することで行った。その後、チューブを 37 $^{\circ}$ C に移して 25 分間放置し、混合液に 15 mL のアグロバクテリウム用培地を加えて穏やかに混ぜ、28 $^{\circ}$ C で一晩培養した。培養後、遠心分離 (1,000 \times g, 5 min, 10 $^{\circ}$ C) で集菌し、菌体を 100 μ L のアグロバクテリウム用培地に懸濁してアグロバクテリウム用プレート培地 (終濃度 50 μ g/mL のカナマイシン、50 μ g/mL のリファンピシリン、30 μ g/mL のストレプトマイシンを含む) にプレーティングし、28 $^{\circ}$ C で数日間培養した。そして、出現したアグロバクテリウムのコロニー (形質転換アグロバクテリウム) を回収した。

導入した形質転換アグロバクテリウムを 4 mL の終濃度 50 μ g/mL のカナマイシンを含む YEP 培地 (Bacto pepton 1%, Bacto yeast extract 1%, NaCl 0.5%, [pH 7.2]) に植菌し、28 $^{\circ}$ C で 2 日間培養することで種菌を作製した。そして 0.3 mL の種菌を新しい YEP 培地 (終濃度 50 μ g/mL のカナマイシンを含む) に加えて 28 $^{\circ}$ C で 24 時間振盪培養し、後の実験に使用した。

(4) タマネギ表皮細胞を用いた一過性発現

Xu et al. (2014) の方法を用いて、タマネギ表皮細胞における GFP 融合 PFP タンパク質の発現系を構築した。前項で作製した P_1 導入アグロバクテリウムの培養液を、注射器を用いてタマネギ球根鱗茎の表皮と中膜の界面に注入した。アグロバクテリウムを感染させたタマネギ表皮を 28 $^{\circ}$ C で 5 日間培養し、表皮薄片を DAPI で染色し、標本のウェットマウントスライドを作製した。DAPI 及び GFP の発現は蛍光顕微鏡を用いて観察した。

3. 結果と考察

細胞内局在解析では、緑色蛍光タンパク質（GFP）と PFP を融合した GFP 融合 PFP（PFP-GFP）を用いた。PFP-GFP を発現するプラスミドをアグロバクテリウムに形質転換を行い、タマネギ球根の表皮細胞へ形質転換アグロバクテリウムを感染させることで一過的に発現させ、細胞内における PFP の局在を観察した（図 4-2）。結果として、PFP-GFP は核に局在することが明らかになった。図 4-2 の上段に示すように、DAPI による核を示す蛍光と、PFP-GFP による PFP の局在を示す部位が一致していた。一方で、コントロール実験に用いた GFP は細胞質全体に蛍光が観察され、GFP 単独では核に局在しないことが示された。

前述の Pull down assay の結果と本項での結果から、PFP は核に局在し、ヒストン H3 に結合することで機能するタンパク質であることが示唆された。

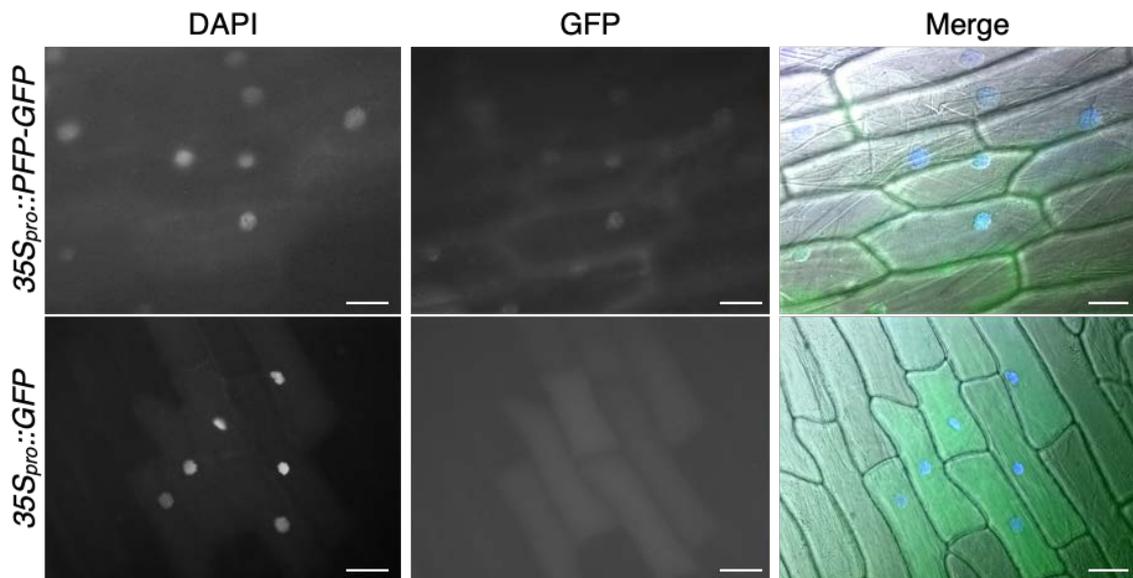


図 4. タマネギ表皮細胞を用いた GFP 融合 PFP タンパク質の細胞内局在解析
 上段は GFP 融合 PFP タンパク質 (PFP-GFP) を発現させたタマネギ球根の鱗片
 における位相差顕微鏡像と蛍光顕微鏡像である。下段は GFP コントロールの代
 表的な画像。

Scale Bar = 50 μ m

第5章 *PFP* の発現様式の解析

1. 目的

PFP の機能の一端を明らかにするために、各種手法を用いてシロイヌナズナにおける *PFP* の発現様式を調べた。

2. 方法

(1) シロイヌナズナの生育条件及び成長段階の計測

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0) の種子を、70% エタノールで30秒程処理した後、1% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウムで10分間表面殺菌した。そして、滅菌水で3回ほど洗浄した後に、MS培地 (Murashige and Skoog 1962) のプレートに種子を播種した。そして、発芽を誘導するため、遮光状態で4°Cにて3日間低温処理を行なった。その後、23°C長日条件下 (16時間明期/8時間暗期、光強度 $300\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) に移して日々観察しながら生育させた。成長段階の計測は、形成されたロゼット葉 (本葉) の枚数を基準に計測した。

(2) Total-RNA の抽出

Total-RNA の抽出には、植物体の全体を用いた。採取の基準は、子葉及び本葉の数を元に、子葉2枚が展開した段階をL0、本葉が2枚展開した段階をL2として、以降は2枚展開された毎にL4-L10とした。各生長段階の植物体を、乳鉢と乳棒を使って液体窒素で粉末にし、そこに、RNA Elution buffer (4 M Guanidinium thiocyanate, 0.1 M Tris-HCl [pH 7.5], 1% 2-mercaptoethanol) 1 mL と 10% Sodium lauroyl sarcosinate 溶液 50 μL を加え、液状になるまで破碎した。

その後、1.5 mL チューブ 2 本に破碎物の混合溶液を 700 μ L ずつ移して、等量の水飽和フェノール・クロロホルム (1:1) を加え、1 分間激しくボルテックスした。次に、遠心分離 (12,000 rpm 10 min 4 °C) を行い、核酸を含んだ上清を新しい 1.5 mL チューブに回収し、そこに等量のクロロホルムを加えて再度攪拌と遠心分離を行った。そして、最終的に得られた上清に対して 1/10 容量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液と 2.5 倍量のエタノールを加えて攪拌し、遠心分離 (12,000 rpm 10 min 4 °C) で核酸を沈殿させた。その後、70 % エタノールで沈殿した核酸を洗浄して乾燥させた。回収した核酸は 100 μ L の TE Buffer に懸濁し、分光光度計で濃度を測定するとともにアガロース電気泳動法で分解の有無を確認した。

(3) Total-RNA の精製

抽出した核酸溶液に混入する DNA を完全に除去させるため、DNase I (ニッポンジーン) を用いて核酸溶液の処理を行なった。反応溶液 (表 5-1) を作製し、37 °C 15 分 反応を行なった。その後、反応液に 150 μ L の MQ 水と 200 μ L のフェノール・クロロホルム溶液を加えて激しく攪拌し、遠心分離 (12000 rpm 5 min 4 °C) で分離させた後に上清を回収した。次に、上清に 200 μ L のクロロホルムを加えて同様の処理を行った後、常法通りにエタノール沈殿を行い Total-RNA を回収した。回収した Total-RNA は 20 μ L の TE Buffer に溶かし、分光光度計で濃度を確認するとともに、アガロース電気泳動で分解の有無を確認し、使用時まで冷凍保存した。

表 5-1 DNase I 反応溶液

Total RNA(10 µg)	x µL
10X DNase I Buffer	5 µL
DNase I (RNase free)	1 µL
Water (RNase free)	up to 50 µL
Total Volume	50 µL

(4) cDNA 合成

cDNA の合成には、逆転写酵素 Rever Tra Ace (TOYOBO) を用いた。マイクロチューブに表 5-2 に記した試薬を入れ、95 °C で 2 分間処理した後に水中に移して急冷させ、30 °C 10 分間の処理を行なった。続いて、表 5-3 に記載した酵素反応液を加えて攪拌し、42 °C で 1 時間反応させて cDNA を合成した。最後に、99 °C で 5 分間熱処理することで酵素を失活させ、水中に移して急冷させた。

表 5-2 ReverTra Ace 反応溶液-1

Total-RNA(1 µg/µL)	2.5 µL
5 pmol/µL Oligo(dT) ₁₅	0.5 µL
5 × RT buffer	2.0 µL
10 mM dNTPs	1.0 µL
Water (RNase free)	2.0 µL
Total Volume	8.0 µL

表 5-3 ReverTra Ace 反応溶液-2

反応溶液-1	8.0 µL
100 mM DTT	1.0 µL
RNase inhibitor	0.5 µL
ReverTra Ace	0.5 µL
Total Volume	10.0 µL

(5) Real-time PCR による発現解析

Real-time PCR 法による発現解析は、イルミナ社製のサーマルサイクラー (Eco Real-Time PCR System) を用いた。発現解析の内部コントロールには ハウスキーピング遺伝子である *TiP41-like* (Hong et al., 2010) を使い、 $\Delta\Delta Cq$ 法により PFP 遺伝子の発現量を比較した。表 5-4 には反応液の組成を、表 5-5 には使用した Primer の配列を記載した。

表 5-4 Real-time PCR 反応溶液

cDNA	0.5 μ L
Water	1.0 μ L
Forward Primer	0.5 μ L
Reverse Primer	0.5 μ L
SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix	2.5 μ L
Total Volume	5.0 μ L

表 5-5 使用したPrimer配列

遺伝子名	Primer 配列
<i>TiP41-like</i>	Forward Primer 5'-GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA-3'
	Reverse Primer 5' TCAACTGGATACCCCTTTCGCA-3'
<i>PFP</i>	Forward Primer 5'-TATGCAGATGCGAAAAGTGC-3'
	Reverse Primer 5'-TTCCGTGAAGGAGCTCAACT-3'

(6) PFP pro :: PFP-GFP タンパク質を発現する植物形質用プラスミドの構築

はじめに、PFP promoter 領域を増幅する Primer (At4g23860_F2: CGTTCTCGTTCTCTTCTCTCTATCTGT, At4g23860_R2: CTTAAATGCGAGAAAATTTATGTATGTTAT) を用いて PCR で目的の断片を増幅し、TA クローニングによってベクター pMD20 に導入した (P_15009) 。そして、P_15009 より、PFP Promoter を含んだ領域を *Hind*III 及び *Bam*HI による制限酵素処理により切り出した。続いて、研究室所有のプラスミド 35S pro ::

GFP in pRI-101-AN_Bar (P_11053) を、*Hind*III及び *Bam*HIで処理し、35S pro :: Bar :: 35S pro の領域を切り出し回収した。次に PFP Promoter 領域とベクター GFP in pRI-101-AN をライゲーションし、PFP Pro :: GFP in pRI-101-AN (P_17001) を作製した。その後、Bar 遺伝子を導入するため、P_17001 を *Hind*IIIで処理を行い、35S pro :: Bar in pRI-101-AN (P_11031) より *Hind*IIIによる処理によって切り出した断片 (35S pro :: Bar :: 35S pro) を、ベクターにライゲーションし、PFP Pro :: GFP in pRI-101-AN_Bar (P_17002) を作製した。最後に、P_16018 (PFP_ORF in pBulescript SK-) を *Bam*HI処理して PFP_ORF 領域を切り出し、同様の処理を行った P_17002 にライゲーションし、PFP Pro :: PFP-GFP in pRI-101-AN_Bar (P_17003) を作製した。

(7) PFP pro :: PFP-GFP タンパク質を発現する植物形質用プラスミドの構築

前述の P_15009 を *Hind*IIIと *Bam*HIで処理して PFP の Promoter 領域を切り出し回収した。続いて、GUS 染色用のベクター pBI-101 も同様の処理を行い、これらをライゲーションして、プラスミド PFP promoter in pBI-101 (P_15013) を作製した。

(8) PFP pro :: PFP-GFP 発現シロイヌナズナの作製

シロイヌナズナの形質転換は Valvekens et al. (1988) の方法に従って行なった。形質転換に使用するカルスを作製の為、MS 培地プレートで 1-2 週間栽培したシロイヌナズナの根を、カルス誘導プレート (CIM; 1×MS medium, 0.5 mg/L 2,4-D, 0.05 mg/L kinetin, 0.3 % (w/v) gellan gum) に移植した。CIM で 3 日間培養を行なった後、前項で作製した P_17003 を導入したアグロバクテリウムの菌液に形成されたカルスを振盪及び浸漬処理し、アグロバクテリウムの感

染を行なった。そして、菌液を拭き取ったのち、CIM 上でアグロバクテリウムと 3 日間共培養した。その後、培養したカルスを最終濃度 0.1mg/L クラフオランと 100mg/L カナマイシンを添加した MS 液体培地でアグロバクテリウムを除菌した。その後カルスを再生培地 (1×B5 培地、5 mg/L 2-iP, 0.15 mg/L IAA, 100 mg/L kanamycin, 0.3 % (w/v) gellan gum) で 4 週間培養後、形成したシュートを MS 培地に移植して発根を誘導した。発根したシュートは土壌、もしくは、棒ビンなどの広い生育空間を有する MS 培地上に移植し、第 1 世代の種子を得た。そして、最終濃度 100 mg/L のカナマイシンを添加した MS 培地プレート上で選抜と自家交配を繰り返すことにより、ホモ接合型 PFP 過剰発現シロイヌナズナを、後の実験に使用した。

(9) PFP pro :: GUS 導入シロイヌナズナの作製

前項に記載した生育条件に従い、シロイヌナズナを栽培した。播種後 7 日目に小型のポットに移植し、22°C の長日条件下 (16h Light/ 8h Dark) で 2 週間抽臺するまで栽培した。抽臺後のシロイヌナズナは側芽を誘導するため花茎の主軸を切断し、さらに 10 日間栽培することで大量の花茎を形成させた。花茎から開花した花や種子 (長角果) を切除し、蕾のみを残してアグロバクテリウムの感染に用いた。

P₁₅₀₁₃ を導入した形質転換アグロバクテリウムを 4 mL の終濃度 50 µg/mL のカナマイシンを含む YEP 培地 (Bacto pepton 1%, Bacto yeast extract 1%, NaCl 0.5%, [pH 7.2]) に植菌し、28°C で 2 日間培養することで種菌を作製した。そして 0.3 mL の種菌を新しい YEP 培地 (終濃度 50 µg/mL のカナマイシンを含む) に加えて 28°C で 24 時間振盪培養した後、遠心分離 (4,800 rpm, 10 min, 10°C) で集菌して菌体表面を少量の 10% Sucrose 溶液で洗浄した。次に、洗浄

した菌体に 3 mL のアグロバクテリウム懸濁液を加え、OD₆₀₀ の測定値が 1 となる様に希釈した。調節したアグロバクテリウム菌液をオートクレーブの可能な容器に移し替え、シロイヌナズナの花茎を 7 分間浸した。その後、余分な懸濁液をペーパータオルで取り除き、容器にシロイヌナズナを寝かせて密閉し、暗所で 1 日放置した。続けて、長日条件下で水を与えず（乾燥がひどい場合には極少量の水を与え）栽培し、長角果が黄色く変化するまで放置した。長角果が変色してきたシロイヌナズナにビニールをかけて種子を回収した。形質転換の選抜には、終濃度 100mg/L カナマイシンを含んだ MS 培地を使用した。

(10) GUS 染色法

PFP pro :: GUS 導入シロイヌナズナについて、GUS 染色を行った。植物体を 15mL コーニングに入れ、90% Cold Acetone 3mL 程度に浸漬し、氷水中で 15 分間静置した。その後、アセトン捨て、GUS buffer (表 5-5) で数回洗浄した。さらに、GUS staining buffer (表 5-6) に植物体を完全に浸漬した後、真空ポンプを用いて脱気した。植物体が完全に沈んだ後、37°Cで一晩静置した。最後に、70% エタノールで数回洗浄を行い、観察した。なお、クロロフィルが残っている組織については、さらなる脱色を行った。

表 5-5 GUS buffer

50mM Phosphate buffer (pH 7.2)	
0.5 mM K ₃ Fe(CN) ₆	
0.5 mM K ₄ Fe(CN) ₆	

表 5-6 GUS staining buffer

20 mg/mL X-Gluc in DMF	25 µL
GUS Buffer	1 mL

(11)植物体の脱色（TOMEI 法）及び、PFP 発現組織の観察

PFP-GFP 発現植物体及び GUS 染色サンプルは、TOMEI 法（Hasegawa et al., 2016）により植物体を脱色させた。植物体を、25°C で1時間 固定液（4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.0）につけて脱水した後、1×PBS で10分 2回程度洗浄を行った。その後、2,2'-チオジエタノール（TDE）溶液に浸漬して観察した。植物体全体など、比較的体積が大きい組織を処理する際には、10-30-50-70-97% TDE 溶液で、順次 25°C 10分間処理し、最後に 97% TDE を用いて 25°C で1時間処理を行った後に、観察した。

3. 結果と考察

はじめに、Real-time PCR 法を用いて *PFP* の発現様式を調べた。図 5-1 は、*PFP* の発現をシロイヌナズナの生育段階別（本葉の枚数を基準）に調べた結果を示した。*PFP* は成長に伴って発現量は増加しており、成長期から生殖期に切り替わると考えられる本葉が 8 枚展開した時期を境として減少していた。また、発現量が最も高くなる本葉が 8 枚展開している時期に、*PFP* の発現を組織別に調べたところ（図 5-2）、葉や基部と比較して根で最も発現していることが明らかになった。

次に、シロイヌナズナにおける *PFP* の発現部位を詳細に解析するため、*PFP* プロモーターの下流に *GUS* 遺伝子を連結したプラスミドを用いて GUS 染色を行った（図 5-3）。その結果、先の Real-time PCR の結果と同様に、根で顕著な GUS 染色が確認できた。さらに、未熟な葯と胚珠のカラザ胚乳と呼ばれる組織で発現していることが示された（図 5-3 F-K）。

また、*PFP* プロモーターの下流に *PFP* と *GFP* の遺伝子をつなげたプラスミドを作製し、*PFP* タンパク質のシロイヌナズナにおける局在解析を行った。そ

の結果、GFP の蛍光シグナルが根で観察された (図 5-4 E,F) 。この結果は、qPCR 法による RNA の発現解析や GUS 染色の結果と一致していた。また、根の中でも維管束周辺部分において高い蛍光が示された (図 5-4 G) 。さらに、基部や葉の維管束でも GFP の蛍光が見られた。また、GUS 染色と同様に葯における蛍光も観察された。

これらの結果から、PFP は成長に伴って発現が上昇し、個体が成熟するとともに発現が急速に減少していることが明らかとなった。よって、PFP は栄養成長期から生殖成長期への切り替りに関与している可能性が示唆された。また、維管束で GFP の蛍光が観察されたことから、根で発現した PFP の mRNAs がタンパク質に翻訳されたのちに維管束を經由して輸送されている可能性が示された。さらに、生殖期以降に形成される葯や胚珠における特異的な発現も見られることから、PFP はシロイヌナズナの一生を通して多様な生理機構に関与している可能性も示唆された。

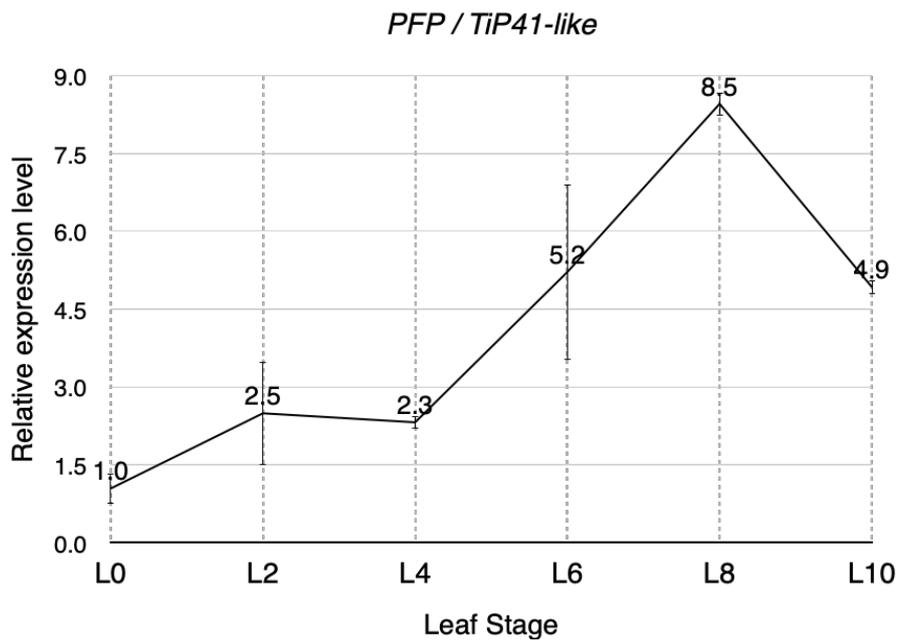


図 5-1 植物の成長段階における *PFP* の発現様式

シロイヌナズナの子葉及び本葉の枚数を基準とした成長段階における *PFP* の発現様式。子葉及び本葉の数を元に、子葉 2 枚が展開した段階を L0、本葉が 2 枚展開した段階を L2 として、以降本葉 2 枚が展開された毎に L4-L10 とした。全 RNA は、各生長段階から生物的反復のため 4 個体以上の全株を用いて抽出した。各値は 3 回以上の技術的反復の平均値±SEM で示した。

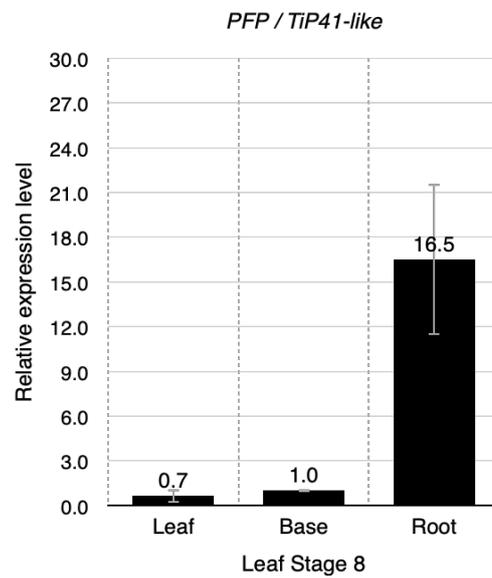


図 5-2 植物の各部位における *PFP* の発現様式

シロイヌナズナにおける本葉 8 枚が展開された生長段階における、各部位(葉、基部、根)における *PFP* の発現様式。全 RNA は、各生長段階から生物的反復のため 4 個体以上の全株を用いて抽出した。各値は 3 回以上の技術的反復の平均値 \pm SEM で示した。

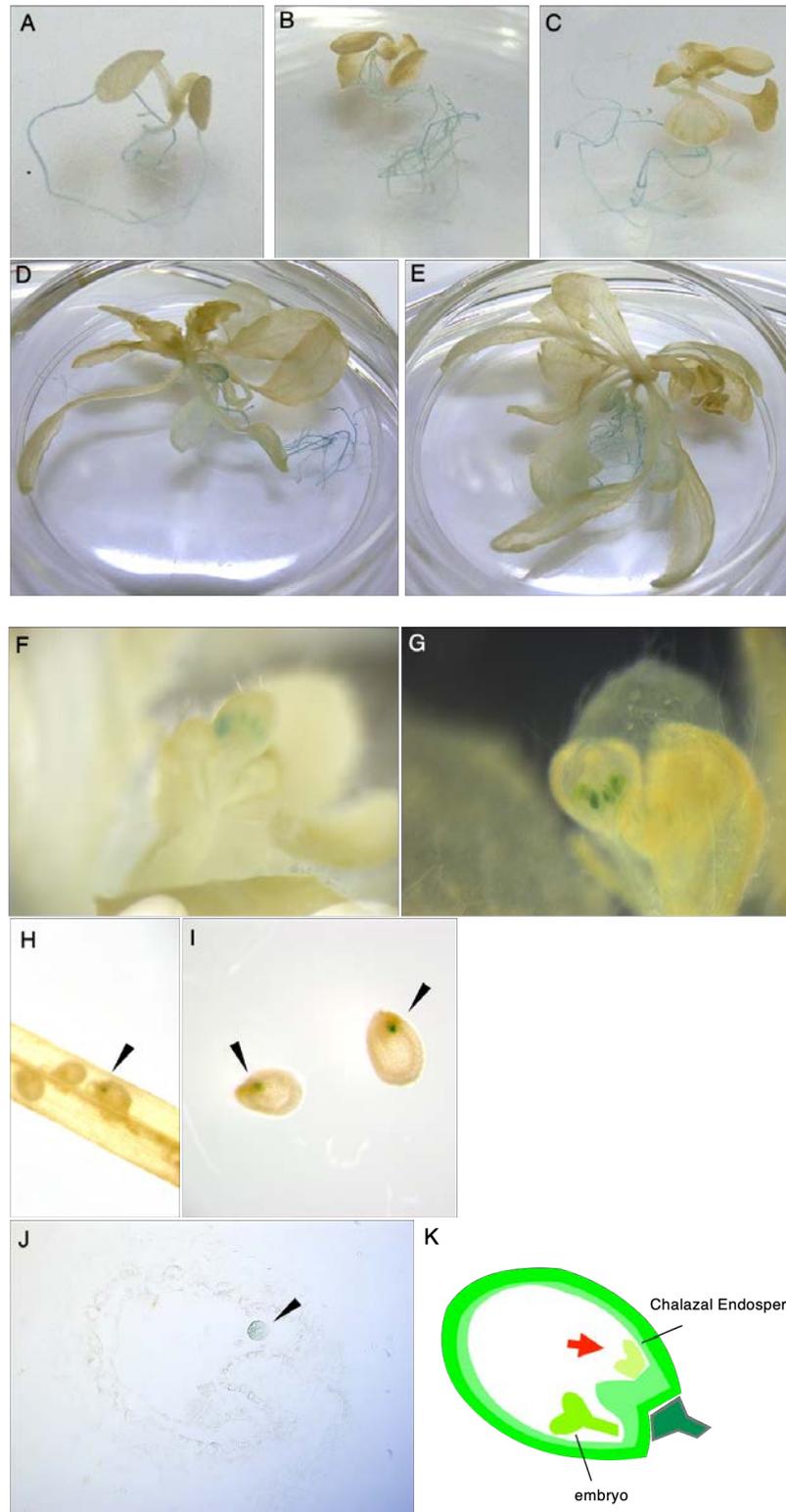


図 5-3 GUS 染色法による *PFP* mRNAs の発現局在解析

A 実生（シードリング）。B 本葉2枚。C 本葉4枚。D 本葉10枚（成熟個体）。E 花芽形成が始まった成熟個体。F 成熟個体における花芽（通常の脱色/白背景）。G 成熟個体における花芽（TOMEI化/黒背景）。H 種子。I 種子拡大。J 種子切片。K 切片組織部位。矢尻は、染色されたカラザ胚乳の部位を示す。

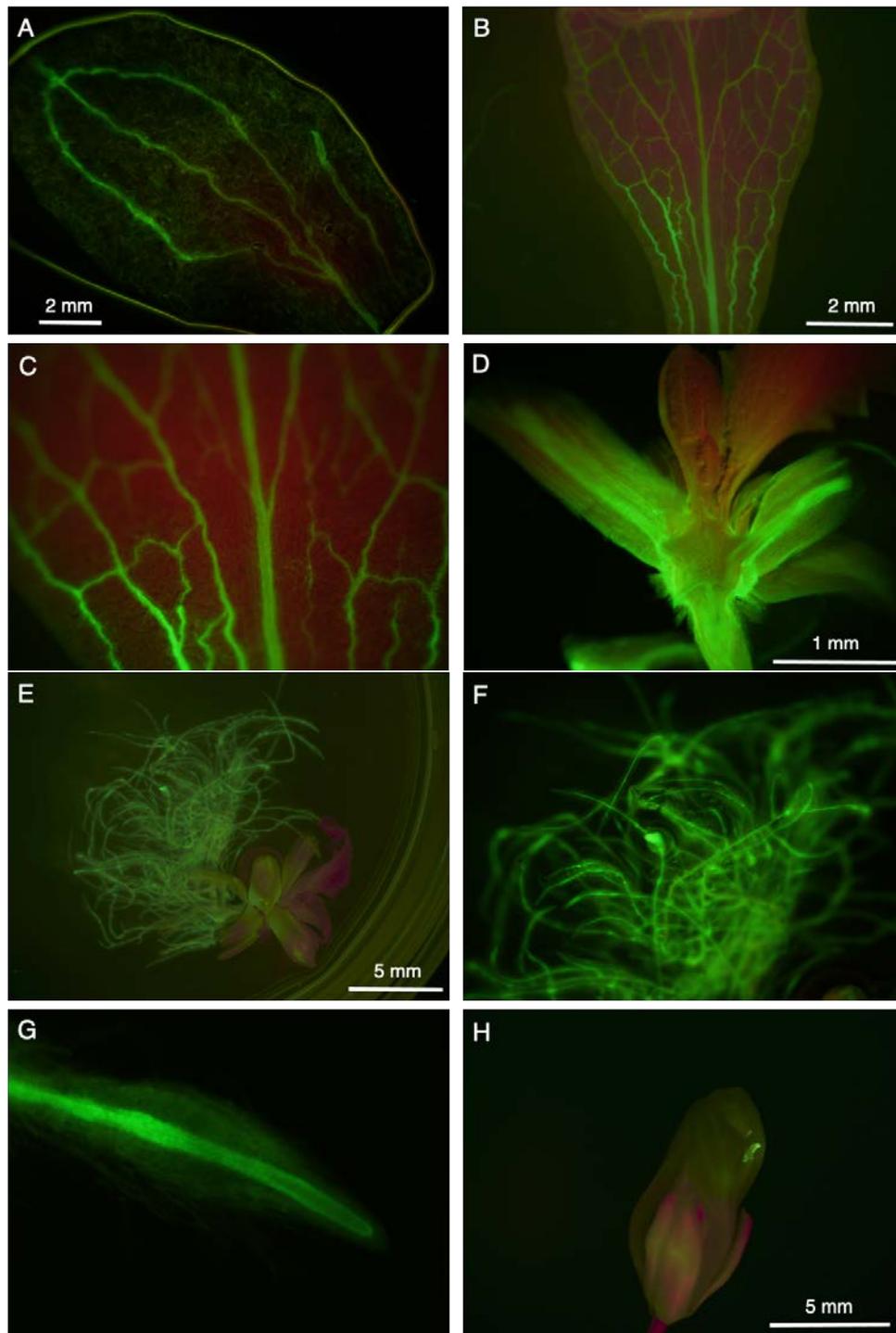


図 5-4 PFP-GFP を用いた PFP の発現局在解析

A 成熟個体の第 3-4 葉。B 成熟個体の第 7-8 葉。C 成熟個体の第 7-8 葉の拡大。D 成熟個体の基部。E 成熟個体における基部から根。F 成熟個体における根全体。G 成熟個体における根の拡大。H 成熟個体の花

第6章 PFP の発現欠失系統と過剰発現系統を用いたシロイヌナズナの表現型解析

1. 目的

シロイヌナズナにおける PFP の生理的機能を明らかにするために、PFP の発現を人為的に変化させた形質転換シロイヌナズナ（過剰発現系統及び発現抑制系統）を作製し、PFP 遺伝子の発現が生長などの形質に及ぼす影響を調べた。

2. 方法

(1) PFP 発現抑制系統の選抜

米国ソーク研究所が保有するシロイヌナズナの遺伝子破壊系統群である SALK-Line より PFP の遺伝子領域に T-DNA が挿入された系統を複数入手した。入手した各系統の T-DNA 挿入領域を確認すると共に、PFP の発現量の比較を行い PFP の発現が欠失した系統を選択して解析に用いた。

(2) PFP 過剰発現系統の作製

シロイヌナズナの形質転換は Valvekens et al. (1988) に記載の方法に従って行なった。形質転換に使用するカルスを作製する為、MS 培地のプレートで 1-2 週間栽培したシロイヌナズナの根をカルス誘導培地のプレート（CIM; 1×MS medium, 0.5 mg/L 2,4-D, 0.05 mg/L kinetin, 0.3 % (w/v) gellan gum）に移植し、3 日間培養した。その後、4 章で作製したプラスミド（35Spro::PFP in pRI-101-AN）で形質転換したアグロバクテリウムの培養液にカルスを浸した。そして、カルスについてアグロバクテリウムの培養液を可能な限り除去し、CIM 培地に置いて 3 日間共培養した。その後、培養したカルスを最終濃度 0.1mg/L ク

ラフォーランと 100mg/L カナマイシンを添加した MS 液体培地のプレートに移し、アグロバクテリウムを除菌した。アグロバクテリウムを除去したカルスは、再分化培地のプレート（1×B5 培地、5 mg/L 2-iP, 0.15 mg/L IAA, 100 mg/L kanamycin, 0.3 % (w/v) gellan gum）に移して 4 週間培養し、形成したシュートは MS 培地に移植して根を誘導した。発根したシュートは、土壌、もしくは、棒ビンなどの広い生育空間を有する MS 培地のプレートに移植し、第 1 世代の種子を得た。そして、最終濃度 100 mg/L のカナマイシンを添加した MS 培地のプレート上で選抜と自家交配を繰り返すことにより、ホモ接合型 PFP 過剰発現シロイヌナズナを得て、後の実験に使用した。

(3) シロイヌナズナの栽培条件と成長段階・開花時期の計測

シロイヌナズナの発芽は第 5 章に記載した条件に従って行った。シロイヌナズナは発芽後 7 日目に土壌に移植し、以下の日長条件で栽培した。長日条件は 16 時間明期（光強度 $300\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）／8 時間暗期、短日条件下は 5 時間明期（光強度 $300\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）／19 時間暗期とした。また、日長条件を途中で変更する場合は、前述の日長条件で本葉 4 枚展開時に長日条件から短日条件に移して栽培した。成長段階は、第 5 章の計測方法に従って決めた。また、開花時期は、花芽形成時に展開していた本葉の枚数で計測した。

3. 結果と考察

まず、PFP 発現抑制系統については、PFP 遺伝子領域に Transferred DNA (T-DNA) が挿入されている形質転換体を SALK 研究所より複数株取り寄せた。それらの、PFP 遺伝子の発現量を解析した。そして、SALK_034619 (PFP の第 4 イントロンに T-DNA が挿入) が最も PFP の発現が低下していることが

明らかになったため、以降の実験では PFP 発現抑制系統 (pfp-1) として用いた。なお、PFP 過剰発現系統については Floral Dip 法による形質転換効率が悪く、作出された形質転換体についても異常な形態を示した (図 9-1)。そこで、カルスを用いたアグロバクテリウムによる形質転換を行ない、PFP 過剰発現系統を 4 系統作製した。これらの PFP 過剰発現系統と発現抑制系統を用いて *PFP* の発現量を調べた結果 (図 6-1 A)、発現抑制系統では野生型と比較して発現量が 0 に近い値を示していた。また、過剰発現系統は野生型と比較して 30 倍以上の発現を示した。図 6-1B-D はそれら形質転換系統の表現型を示している。長日条件では、個体の大きさや葉の形状など、形態的な変化は見られなかった。しかし、発現抑制系統では野生型と比較してわずかに開花時期が早くなる傾向が見られた。具体的には、本葉が展開してから開花するまでの平均期間は野生型と比較して有意に早かった (野生型:24.5±1.1 日, PFP 発現抑制系統 23.2±1.5 日, 図 6-1 B)。また、開花時の本葉の枚数は野生型と PFP 発現抑制系統では変化がなかった (野生型:平均 10.3 枚, PFP 発現抑制系統:平均 10.2 枚)。また、PFP 過剰発現系統では、野生型と比較して開花が遅くなっていることが明らかになった (25.5±1.1 日, 平均 11.3 枚)。図 6-1 C に、本葉の枚数を基準としたステージ別の各系統における開花時期を示した。開花時期の最頻値は、野生型 (Leaf stage 11) と比較して PFP 発現抑制系統 (Leaf stage 10) の方がより小さいことが明らかになった。加えて、PFP 過剰発現系統 (Leaf stage 12) では野生型 (Leaf stage 11) と比較して中央値が遅くなった。

以上の結果から、*PFP* の発現量は Leaf stage 4 から 6 にかけて増加し始め、8 枚目が展開するまで増加し続けることが示された。このことから、*PFP* の働きを最大限に発揮できる生理的なタイミングは、Leaf stage 4 から 8 であることが考えられる。

シロイヌナズナは、光周期に応答して開花する長日植物である。開花時期を遅らせる PFP の役割が光周期に依存するかどうかを調べるために、短日条件下での開花に対する PFP の影響についても解析を行った (図 6-1 D)。開花時期は野生型ではロゼット葉 30 枚、pfp-1 では 20 枚で、PFP-ox6 では 60 枚を過ぎても開花しなかった。PFP を導入したシロイヌナズナは、短日条件下で開花時期に顕著な表現型を示したことから、PFP が短日条件下で機能していることが示唆された。さらに、形質転換系統を 4 葉が展開するまで長日条件下で栽培し、PFP の発現が増加し始める直前に短日条件下に移した (図 6-2 A)。その結果、PFP 発現抑制系統では開花時期が野生型よりも早く (pfp-1 : 10.2 葉で開花、野生型 : 11.6 葉)、PFP-ox6 では遅れて (13.2 葉) いることが明確に観察された (図 6-2 C-E)。これらの結果は、PFP が光周期非依存的に開花を遅らせることを示唆しており、PFP は長日および短日の両方の条件下で開花を抑制するのに重要な役割を果たしていると考えられる。

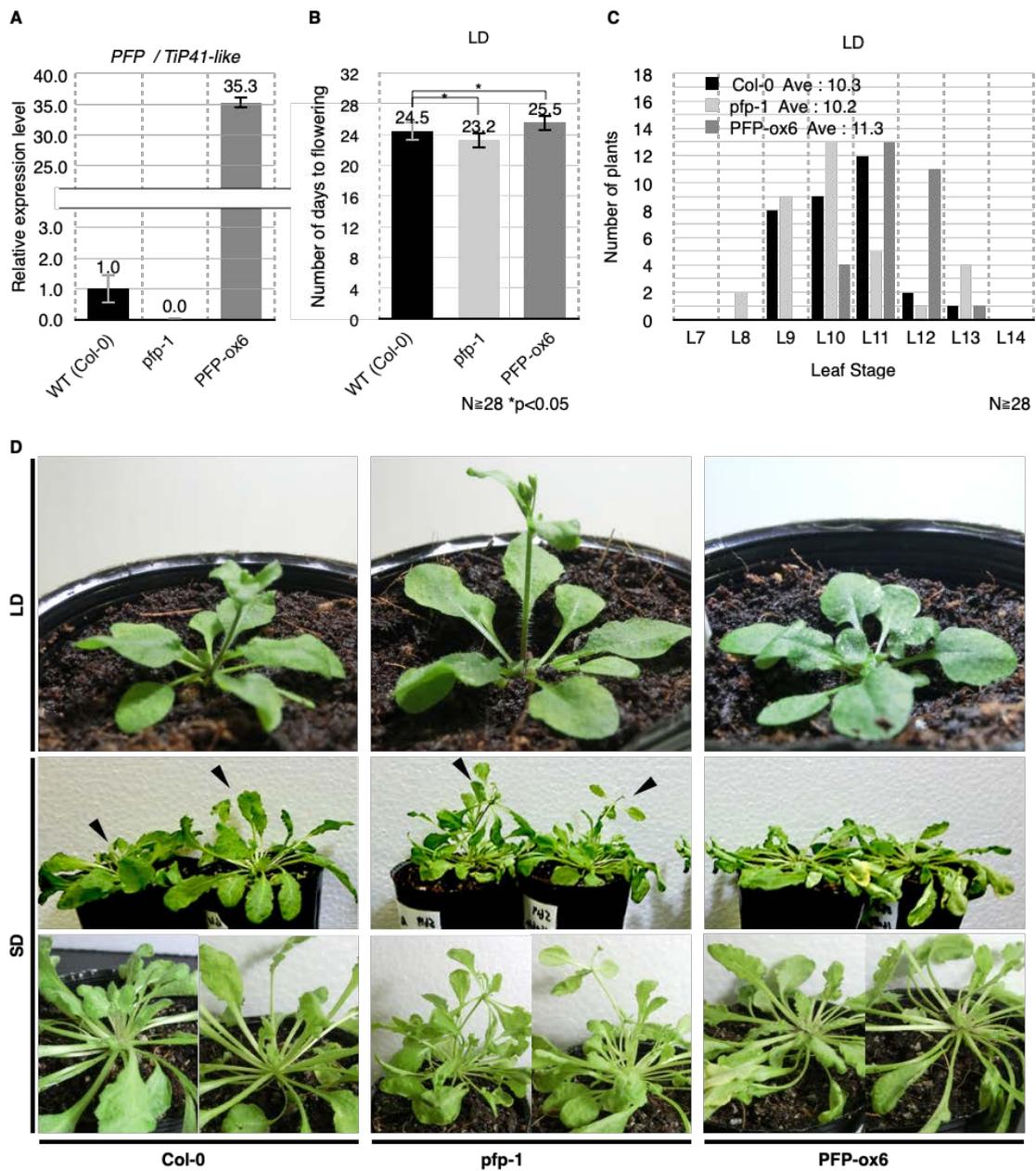


図 6-1. シロイヌナズナの開花時期に及ぼす PFP 発現の影響

野生型及び PFP 発現抑制系統と過剰発現系統を異なる光条件下で生育させた。

A 長日条件下における各シロイヌナズナの PFP 発現量。データは 28~34 サンプルの平均値±SEM で表した。t 検定により WT と各シロイヌナズナを比較し

た。B 長日条件下における花芽形成が起きるまでの日数。C 長日条件下における花芽形成が始まった時点の本葉の枚数。D 長日条件下で 22 日間生育した各種植物体の表現型（上段）。短日条件下で 75 日間生育した表現型（下段）。短日条件下における形成された花芽を黒鏃で示した。

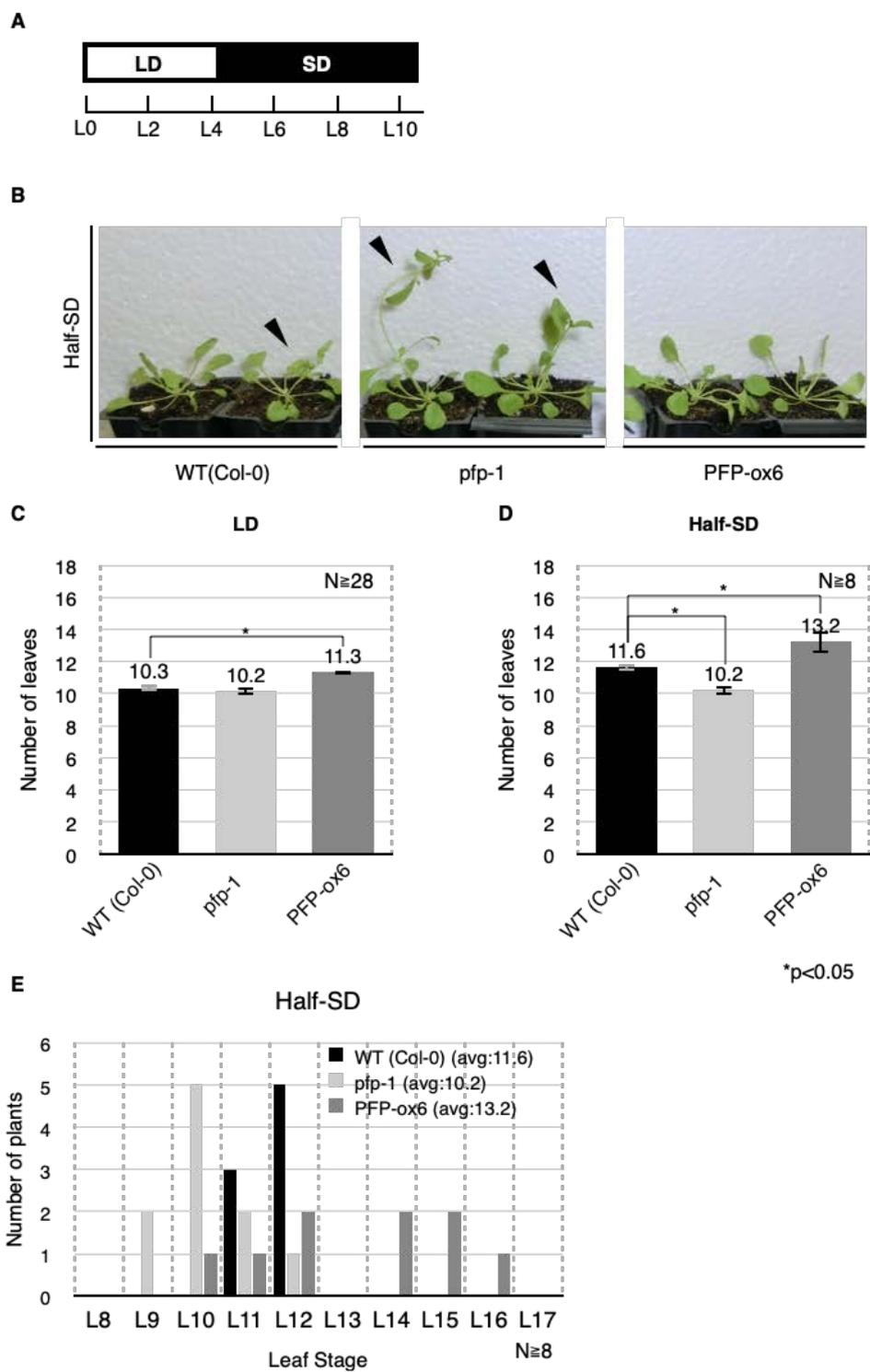


図 6-2. 長日条件から短日条件下への移行がシロイヌナズナの表現型に及ぼす影響

A 日長条件の模式図。本葉4枚が展開した時期に短日へ移行した。B 日長を移行した条件下で35日間生育させた各種植物体の代表的な表現型。矢印は花を示した。C 長日条件下での花芽形成時における本葉枚数の平均値の比較。D 日長を移行した条件下での花芽形成時における本葉枚数の平均値の比較。E 日長を移行した条件下での PFP 発現抑制系統と過剰発現系統の花芽形成時期の比較。

第7章 各種花芽形成関連遺伝子の発現に及ぼす PFP の影響

1. 目的

発現抑制体や過剰発現系統から、PFP は開花時期へ影響することが示唆されている。そこで、PFP が制御する花芽形成関連遺伝子の探索を行った。

2. 方法

(1) シロイヌナズナの生育条件

第6章に記載した成長段階及び長日条件下における生育条件に準じて生育を行った。

(2) Real-time PCR による発現解析

第5章に記載した方法に準じて、RNA 抽出及び、cDNA 合成、Real-time PCR を行った。使用した Primer は表 7-1 に記載した。

表 7-1 使用したPrimer配列

遺伝子名	Forward Primer 配列	Reverse Primer配列
<i>FLC</i>	5'-CCGAACTCATGTTGAAGCTTGTTGAG-3'	5'-CGGAGATTTGTCCAGCAGGTG-3'
<i>FT</i>	5'-CAAACAGTGTATGCACCAGG-3'	5'-CTCGCGAGTGTGAAGTTCTG-3'
<i>CO</i>	5'-TGCAGCGTACCACAGACGAG-3'	5'-TGTTGGTTATGGCACTGGTG-3'
<i>EBS</i>	5'-AACCCCTAGCTTCCATGGCGAAA-3'	5'-CACACAATCTCCCGCTCTCAC-3'
<i>TFL2</i>	5'-AAGGCCAAAGCTTGATGAAGGGT-3'	5'-TGGAGATTCTCTAAAGGCTCCCATGT-3'
<i>FLK</i>	5'-TGCCGTGCAGCTTATTCAGAAC-3'	5'-TGGTGCTACAGTTTGAGGCTGTG-3'
<i>FCA</i>	5'-TGGTCTAACGGGTGAAAGCAAGTG-3'	5'-TGCTGTTTCTGTTGCTCTCGTTC-3'
<i>FVE</i>	5'-AGCTGCTGTTCTTTGTGTTCAAGT-3'	5'-GCTGCACGATCAGACTTCTTACTG-3'

3. 結果と考察

PFP が花芽形成制御へ関与していることが期待されたことから、PFP の発現がシロイヌナズナの花成経路に関する遺伝子（表 7-2-2 に記載）の発現に及ぼす影響を解析した。

シロイヌナズナでは、長日条件下では *CO* と *FT* が花芽形成を誘導し、短日条件下では *FLC* によって花芽形成が抑制されることが知られている (Michaels and Amasino 1999)。そこで、*PFP* の発現が花芽形成調節因子の発現調節に関与している可能性を検討した。Real-time PCR 解析の結果、各 Leaf stage において、*FLC* の発現量は *PFP* 発現抑制系統 (*pfp-1*) では野生型に比べて低く、*PFP* 過剰発現系統 (*PFP-ox6*) では高くなった (図 7-1 A) ことから、*PFP* が *FLC* の発現を制御していると考えられる。また、*pfp-1* では、*PFP* の発現が増加するステージにおいて *FT* の発現量が野生型よりも高いことがわかった。*PFP-ox6* では、植物体成長初期に *FT* の発現が著しく低下していることが示された (図 7-1 B)。一方、*CO* と *SOCI* の発現量は *PFP* の発現に反応しなかった (図 7-1 C-D)。このことから、*PFP* は *SOCI* を調節することなく、*FLC* の発現を促進し、*FT* の発現を抑制することが示唆された。

前述の結果から *PFP* は *FLC* の発現促進や *FT* の発現抑制を介して花芽形成を阻害していた。そこで、これらの遺伝子に対して直接的に発現制御を行っているのか、他の花芽形成関連遺伝子の発現制御を介しているのか調べた (図 7-2 A)。はじめに、短日条件下では花成抑制因子 (*EBS*、*TFL2*) の発現が花芽形成を制御することが報告されていることからこれらについて解析を行った (図 7-2 A)。その結果、*pfp-1* では *FLC* の発現が減少し、*PFP-ox6* では長日条件と同様に増加したが、短日特異的花成阻害遺伝子 *EBS* および *TFL2* の発現レベルは変化しなかった。次に、*PFP* が自律経路因子 (*FLK*、*FCA*、*FVE*) の発現を調節して *FLC* の発現を抑制しているかどうかを調べた (図 7-2 B-D)。結果、*PFP* の発現抑制または過剰発現に対応する自律経路因子の発現量に変化は見られず、*PFP* は自律経路に関与していないことが示唆された。

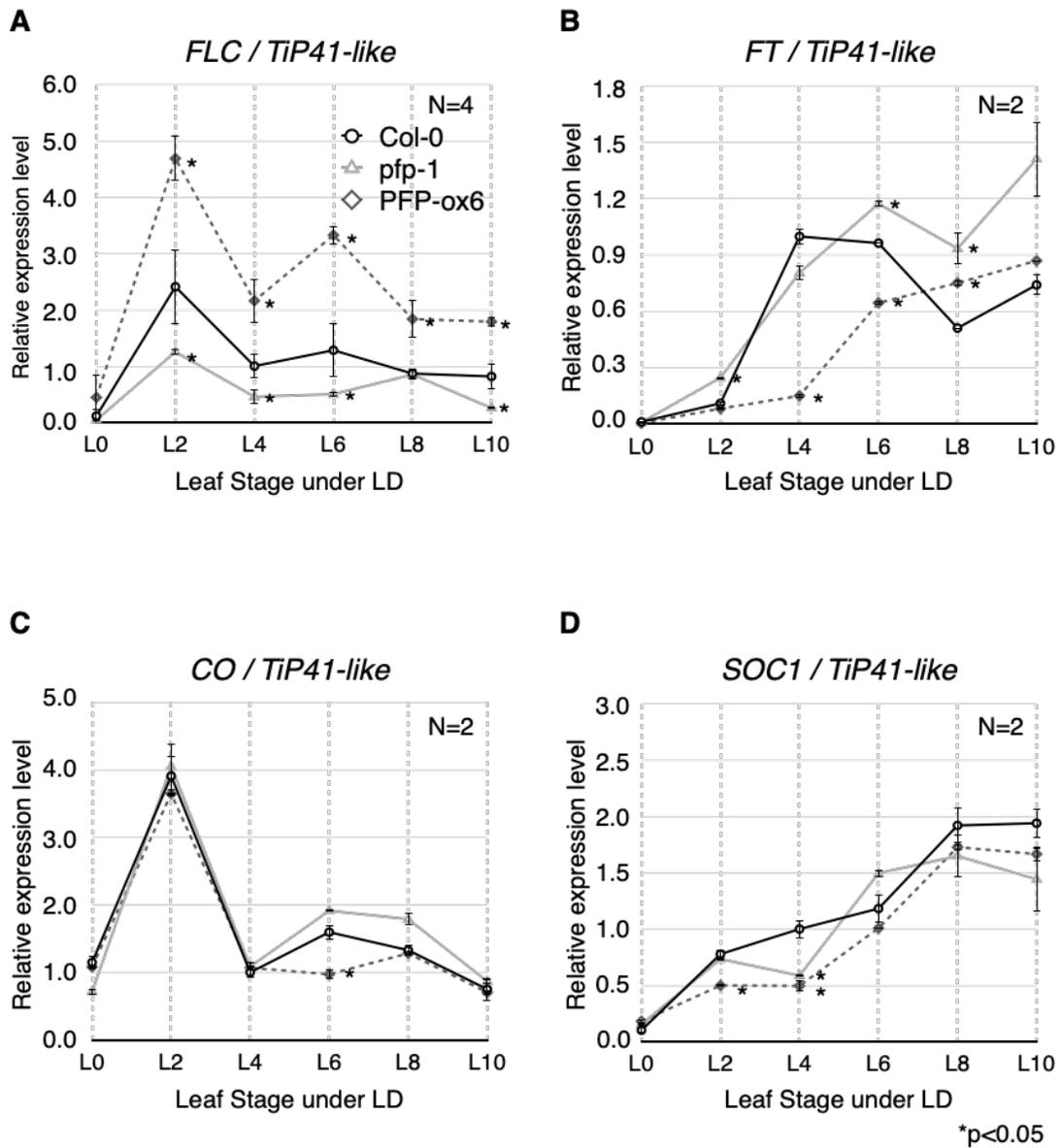


図 7-1 PFP 発現抑制系統及び過剰発現系統と野生型における花芽形成関連遺伝子の発現様式

花芽形成関連遺伝子 *FLC* (A)、*FT* (B)、*CO* (C)、*SOC1* (D) の遺伝子発現を qRT-PCR で測定し、*TiP41-like* 遺伝子を標準遺伝子とした。各エラーバーの値は 2~4 個体の平均値±SEM で示した。全 RNA は、示したステージ (苗か

ら 10 葉期まで) の長期生育株から、生物的反復のため 4 個体以上の全株を用いて抽出した。各値は 2 回以上の技術的反復の平均値 \pm SEM で示した。野生株と PFP 形質転換シロイヌナズナの遺伝子発現の差は、t 検定で比較した。

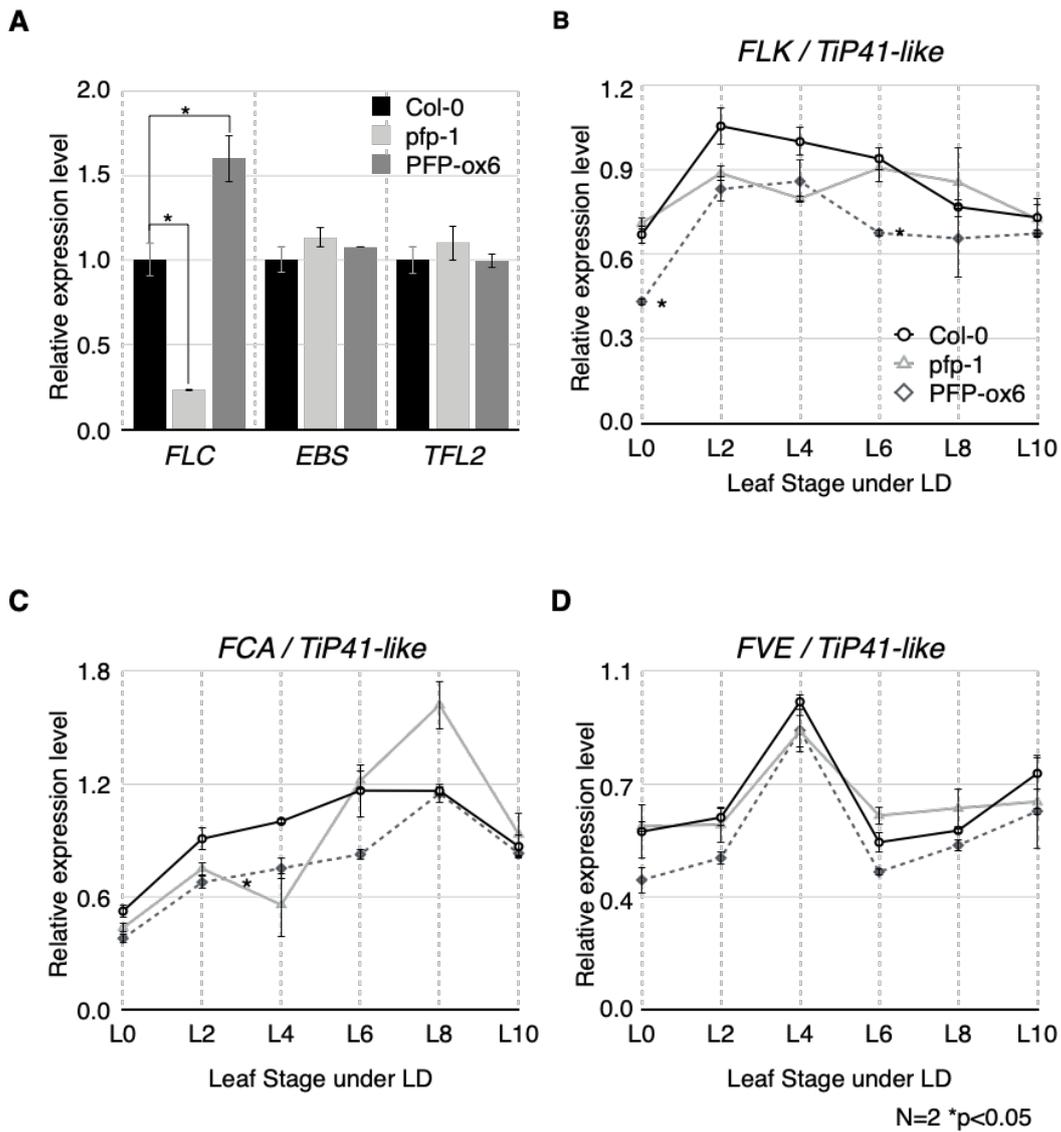


図 7-2 PFP 発現抑制系統及び過剰発現系統と野生型における、短日特異的な花芽形成関連遺伝子および自律的花芽形成経路関連遺伝子の発現様式

A *FLC* および短日花芽形成特異的遺伝子の発現様式。自律的花芽形成関連遺伝子 *FLK* (B)、*FCA* (C) および *FVE* (D) の相対的遺伝子発現を qRT-PCR で比較した。全 RNA は、示したステージ（苗から 10 葉期まで）の長期生育株から、生物的反復のため 4 個体以上の全株を用いて抽出した。各値は 2 回以上の技術的反復の平均値 \pm SEM で示した。WT と PFP 形質転換シロイヌナズナの遺伝子発現の差は、t 検定で比較した。

第 8 章 分裂組織制御遺伝子の発現に及ぼす PFP の影響

1. 目的

PFP は、ヒストンを介した発現制御やその発現様式などの結果から、多様な機能を有することが考えられる。また、PFP 過剰発現系統を作製している中で、1 系統ではあるが、分裂組織が多発的に形成される異常な表現型を示す個体が得られた。そこで、異常な表現型を示す過剰発現系統 (PFP-ox1) の解析を行った。

2. 方法

(1) 植物の生育

5 章に記載の方法に従って行った。

(2) PFP 過剰発現系統の作製

PFP 過剰発現系統の作製には、第 6 章で作製したプラスミド (35S pro :: PFP in pRI 101-AN_Bar) を導入したアグロバクテリウムを用いた。形質転換の手法には、第 5 章に示した Floral Dip 法を用いた。得られた F1 種子は、カナマイシン (終濃度 100mg/L) を添加した MS 培地上で選抜した。本章で使用した PFP-ox1 は、この選抜時に得られた個体である。

(3) カルス化及び再分化

作製した PFP-ox1 の葉の一部を、カルス誘導プレート (CIM; 1×MS medium, 0.5 mg/L 2,4-D, 0.05 mg/L kinetin, 0.3 % (w/v) gellan gum) に移植し、14 日間培養した。増幅したカルスは、14 日に一度新しい CIM 培地のプレートに移植

し、継代した。そして、継代したカルスの一部を再生培地のプレート（1×B5 培地、5 mg/L 2-iP, 0.15 mg/L IAA, 100 mg/L kanamycin, 0.3 % (w/v) gellan gum）に移して4週間培養し、シュートの誘導を行った。形成されたシュートをMS培地のプレートに移植して発根を誘導した。そして、発根したシュートは土壤に、また発根しないシュートは棒ビンなどの広い生育空間を有するMS培地上に移植し、花芽形成及び種子形成を誘導した。

(4) TAIL-PCR による *PFP* 遺伝子導入領域の解析

PFP-ox1 より第5章に記載した方法に準じて、抽出した核酸溶液をRNase A（ニッポンジーン）により37°Cで30分処理を行った。処理を行ったサンプルをテンプレートDNAとして用いた。このDNAを用いて表8-1及び表8-2に示したPrimerを用いて、3回のNested PCRを行った。各PCRの条件は、表8-3から表8-8に示した。さらに、3rd PCR産物を1µLと3µLのT-vectorを加え、4µLのLigation mixを加えて16°Cで30分間反応させた。得られた産物8µLを100µLの大腸菌XL1-blueのコンピテントセルと混合した後、全量をLB培地（アンピシリン 終濃度50µg/mL）に播き、生育したコロニーからアルカリ法によってプラスミドを抽出した。3rd PCR産物のインサートが挿入されたプラスミドをシーケンスによって塩基配列を確認し、PFP-ox1における遺伝子導入領域を明らかにした。

表 8-1 使用したDegenerate Primer配列

Degenerate Primers	Primer 配列
A1	5'-NGTCGASWGANAWGAA -3'
A2	5'-GTNGGASWCANAWGTT-3'
A3	5'-WGTGNAGWANCANAGA-3'

表 8-2 使用した導入遺伝子領域Insert Primer配列

Insert Primer	Primer 配列
NTPII-CtF	5'-TTAATGGAGTCTGCTGGGCCATCAAAGGCG -3'
LB_N1	5'-CTATGTTACTAGATCGGAATTTGGGCCAT-3'
LBb1	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'

表 8-3 1st PCR反応溶液

DNA (0.3 µg/µL)	0.5 µL
10 × Ex-Taq buffer	1.0 µL
2.5 mM dNTPs	0.8 µL
NTPII-CtF	0.4 µL
Degenerate Primers	0.5 µL
Ex-Taq	0.1 µL
Water (RNase free)	6.7 µL
Total Volume	10.0 µL

表 8-4 1st PCR反応条件

94 °C 1 min → 94 °C 1 min
 94 °C 1 min → 65 °C 1 min → 68 °C 1 min × 5 cycle
 94 °C 1 min → 30 °C 1 min → 68 °C 1 min
 94 °C 1 min → 68 °C 1 min → 68 °C 3 min ▽
 94 °C 1 min → 68 °C 1 min → 68 °C 3 min | 13 cycle
 94 °C 1 min → 44 °C 1 min → 68 °C 3 min ⊥
 68 °C 5 min
 4 °C

表 8-5 2nd PCR反応溶液

1st PCR Product	0.5 µL
10 × Ex-Taq buffer	1.0 µL
2.5 mM dNTPs	0.8 µL
LB_N1	0.8 µL
Degenerate Primers	0.8 µL
Ex-Taq	0.08 µL
Water (RNase free)	6.02 µL
Total Volume	10.0 µL

表 8-6 2nd PCR反応条件

94 °C 1 min → 94 °C 1 min
 94 °C 1 min → 68 °C 1 min → 68 °C 3 min ∟
 94 °C 1 min → 68 °C 1 min → 68 °C 3 min | 13 cycle
 94 °C 1 min → 44 °C 1 min → 68 °C 3 min ∟
 68 °C 5 min
 4 °C

表 8-7 3rd PCR反応溶液

2nd PCR Product	0.5 μL
10 × Ex-Taq buffer	1.0 μL
2.5 mM dNTPs	0.8 μL
LBb1	0.6 μL
Degenerate Primers	0.3 μL
Ex-Taq	0.05 μL
Water (RNase free)	6.75 μL
Total Volume	10.0 μL

表 8-8 3rd PCR反応条件

94 °C °C 1 min → 94 °C 1 min
 94 °C °C 1 min → 68 °C 1 min → 68 °C 3 min ∟
 94 °C °C 1 min → 68 °C 1 min → 68 °C 3 min | 13 cycle
 94 °C °C 1 min → 44 °C 1 min → 68 °C 3 min ∟
 68 °C °C 5 min
 4 °C °C

(5) Real-time PCR による発現解析

第5章に記載した方法に準じて、RNA 抽出及び、cDNA 合成、Real-time PCR を行った。使用した Primer は表 8-9 に記載した。

表 8-9 使用したPrimer配列

遺伝子名	Forward Primer 配列	Reverse Primer 配列
WUS	5'-AACCAAGACCATCATCTCTATCATC-3'	5'-TCAGTACCTGAGCTTGCATGA-3'
STM	5'-CTCCTCCCAAGGAAGTAAGAAC-3'	5'-TCCTCCTGCAACGATTTTCG-3'
AUX	5'-ATATCATCCCATCTCTCGCTCACA-3'	5'-CCACGAAAGCATTCAACACGTACA-3'

3. 結果と考察

第5章で示したように PFP 過剰発現系統は Flora Dip 法による形質転換体の作製効率が非常に悪かったが、その中で唯一作製できたのが PFP-ox1 であった。しかし、PFP-ox1 は葉の分化が異所的かつ過剰に引き起こされる顕著な形態形成異常を示した。(図 8-1)。さらに、通常長日条件下であればシロイヌナズナは 30 日程度で生殖成長期に移行し、40 日程度で花芽が形成されるが、PFP-ox1 では 50 日を越えても葉の形成が続いて花芽形成が起こらなかった。よって種子による系統の保存ができなかったため、カルス誘導を介した継代を試みた。PFP-ox1 の葉の一部からカルスを誘導し、形成されたカルスから植物体の再分化を行った(図 8-2 A)。再分化個体の PFP-ox1 においても、異常な葉の形成が見られた。組織切片により葉の断面図を観察したところ、野生型では基部にのみ見られる分裂組織(図 8-2 E)が、分裂組織様の細胞が密集した構造が異所的に様々な場所に見られた(図 8-2 F)。また、再分化個体では長期間に渡り継代及び生育を続けたところ花芽形成が見られた(図 8-2 D)。しかし、これら花茎に長果角は形成されるが種子形成には至らなかった。形成された長果角を比較すると、胚珠が成長していないことが明らかになった(野生型：図 8-2G,I PFP-ox1：図 8-2 H,J)。

そこで、PFP-ox1 の異常な表現型について、他の PFP 過剰発現系統ではこの様な顕著な表現型は見られていないことから、PFP-ox1 における T-DNA の挿入により何らかの遺伝子破壊が起きている可能性が考えられた。そこで TAIL-

PCR による T-DNA 挿入領域の解析を行った (図 8-3)。その結果、At5g05030 の遺伝子の第 2 エクソンに T-DNA が挿入されていた。データベース等の情報から、At5g05030 はシロイヌナズナにおいては恒常的に発現しており、特に種子で高い発現が見られる一方で、先の表現型に見られる様な分裂組織に関わる様な報告はされていなかった。これらのことから、PFP-ox における異常な表現型は PFP 過剰発現による影響である可能性が高いと考えられる。

そこで、PFP-ox1 に見られた表現型の原因として、いくつかの可能性を探索した。分裂組織維持に関連する遺伝子 (*WUS*, *STM*)、植物の様々な形態形成に関与する植物ホルモンの一つであるオーキシンの応答に関連する遺伝子 (*AUX*) などがあげられる。そこで、これらの遺伝子について第 6 章で使用した PFP 過剰発現系統及び発現抑制系統を使用して Real-time PCR による発現解析を行った (図 8-4)。その結果、*STM* や *AUX* では顕著な変化は見られなかったが、*WUS* については、PFP-ox6 のみ顕著な発現上昇が見られた。PFP-ox2 に比べ PFP-ox6 における PFP の発現が高いことから、PFP の発現量に依存して *WUS* の発現が上昇している可能性が示唆された。

これらの結果から、PFP は分裂組織維持遺伝子である *WUS* の発現制御にも関与している可能性が示唆された。ただし、PFP-ox6 などの過剰発現系統では分裂組織に異常を示す表現型は確認されておらず、*WUS* と PFP の関連については、より詳細な解析が必要であると考えられる。

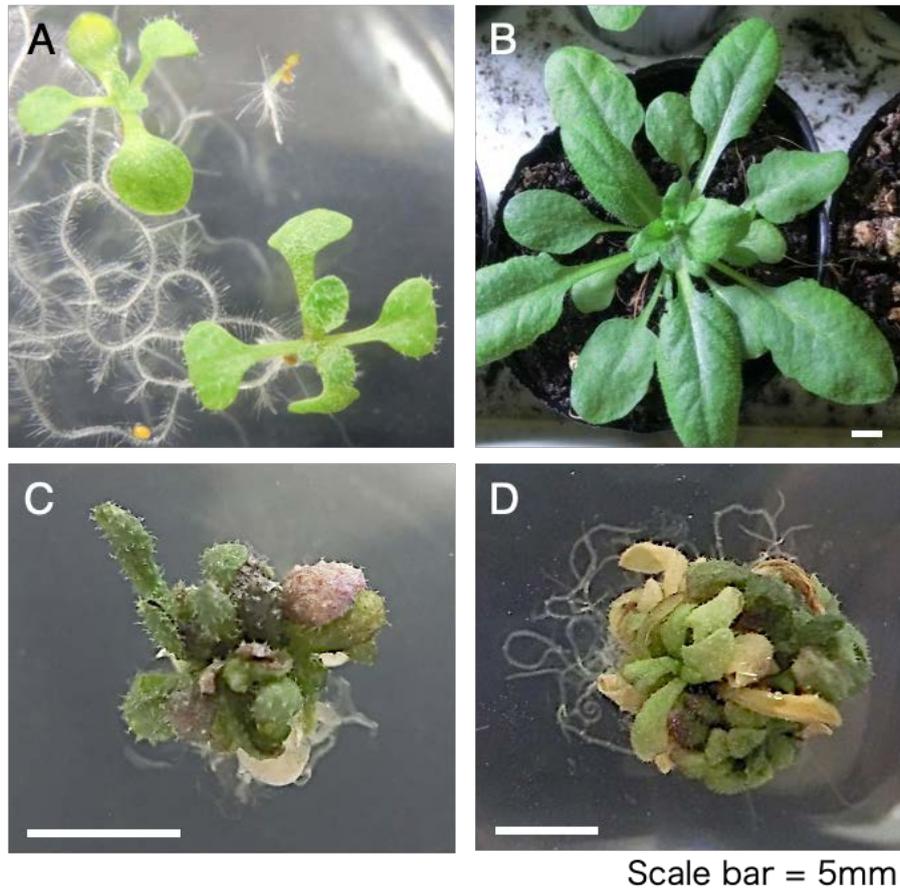


図 8-1 野生型と比較した PFP-ox1 の表現型

A シロイヌナズナ野生型の播種後 10 日。B 播種後 10 日目。C PFP-ox1 の播種後 30 日目。D 播種後 50 日目

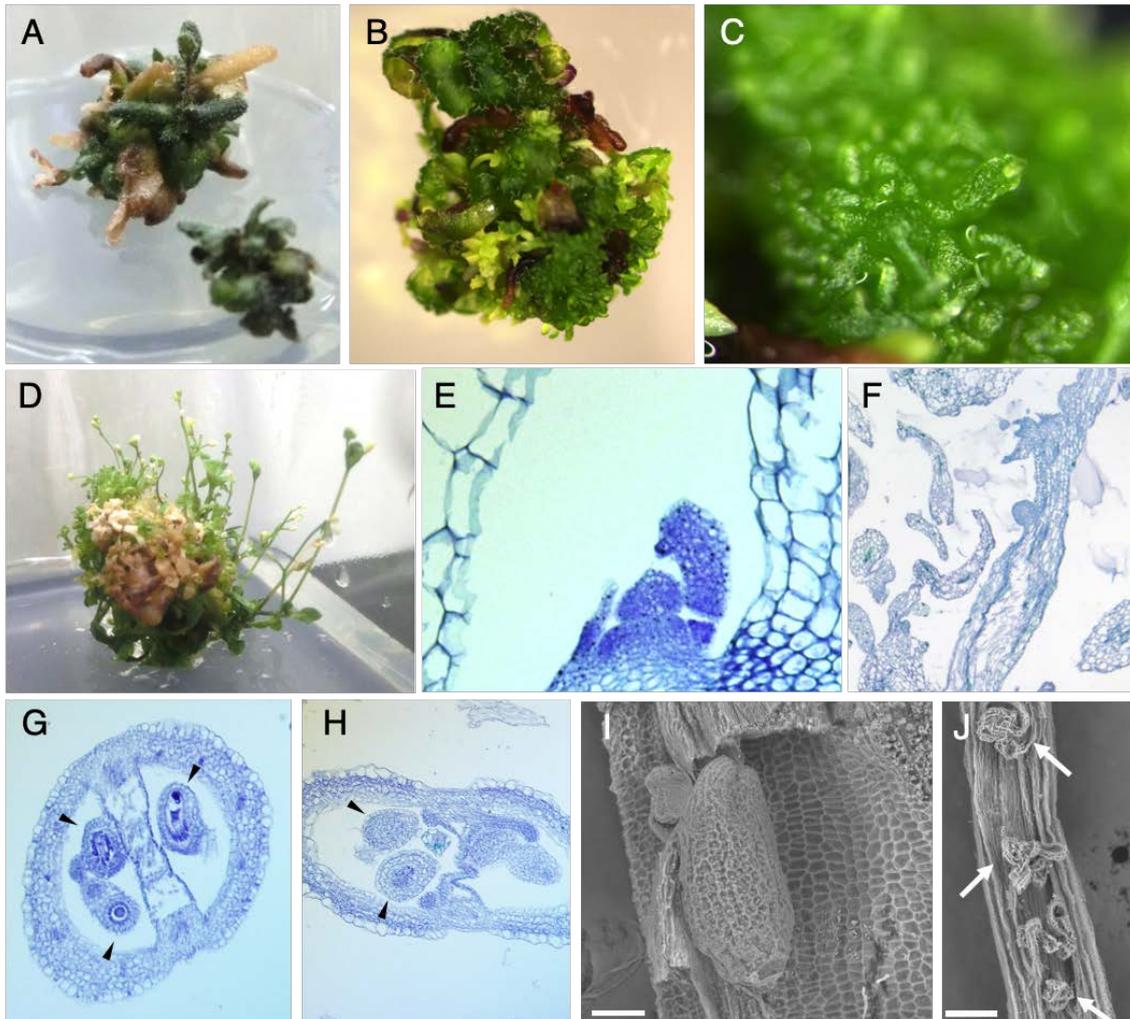


図 8-2 カルス化を介して継代した PFP-ox1 の表現型

A カルス化を介して再度不定芽誘導を行った PFP-ox1。B 異常な分裂組織を形成する PFP-ox1。C 異常な発達をした成長点。D 長期間生育した PFP-ox1。E 野生型の基部にある成長点（染色切片）。F PFP-ox1 の異常な発達をした成長点（染色切片）。G 野生型における長果角内の胚珠。H PFP-ox1 における長果角内の胚珠。I 野生型における胚珠（走査型電子顕微鏡 Scale bar = 100 μ m）。J PFP-ox1 における胚珠（操作型電子顕微鏡 Scale bar = 100 μ m）。

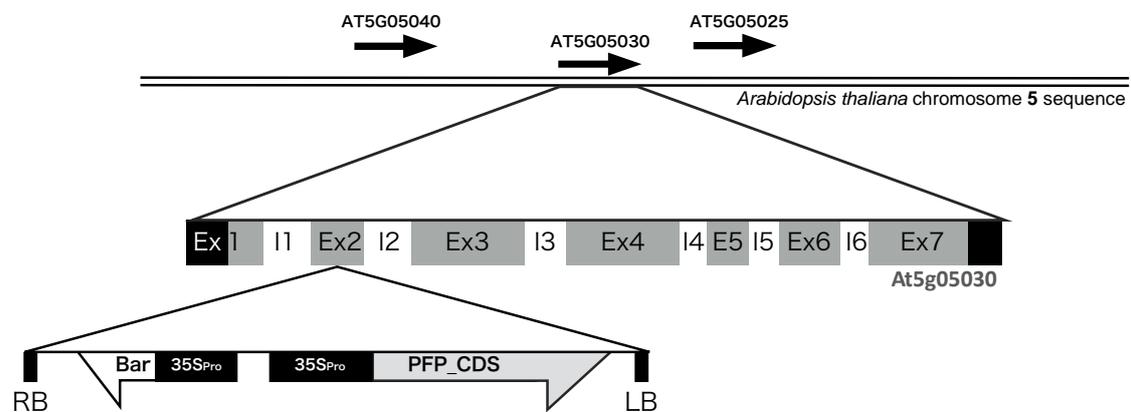


図 8-3 PFP-ox1 における遺伝子導入領域

PFP-ox1 における遺伝子導入領域を示した。シロイヌナズナの第 5 染色体の At5g05030 のエクソン (Ex) 及びイントロン (I) を示した。導入した遺伝子はエクソン 2 の領域に挿入されている。

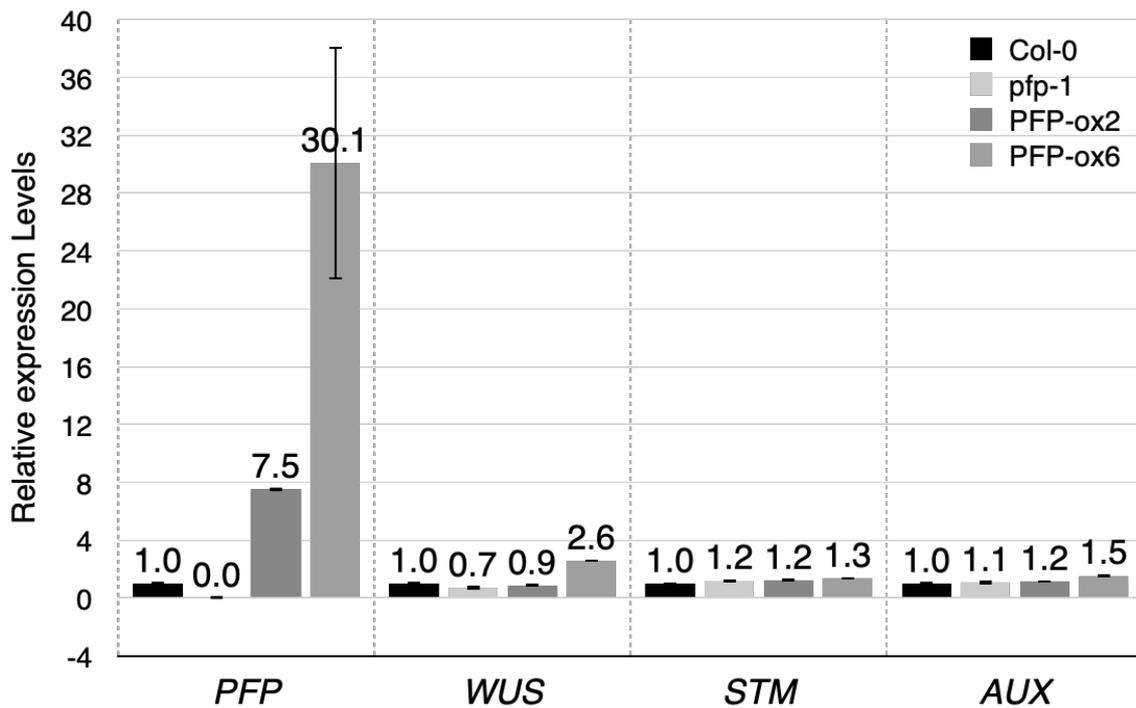


図 8-4 PFP 発現抑制系統及び過剰発現系統における蕾を用いた、分裂組織関連遺伝子 (*WUS*, *STM*) 及びオーキシン関連遺伝子 (*AUX*) の発現比較

qRT-PCR で測定し、*TiP41-like* 遺伝子を標準遺伝子とした。生物的反復のため 4 個体以上の蕾を用いて抽出した。各値は 2 回以上の技術的反復の平均値 \pm SEM で示した。

第9章 総合考察

本研究は、酵母 Mlo2 のシロイヌナズナにおけるホモログ遺伝子である PFP (PHD Finger Protein) の役割を明らかにすることを目的として解析を行なった。酵母 Mlo2 のホモログは、魚類、爬虫類、哺乳類、植物などの広範な真核生物に見られることから、真核生物において重要な役割を果たすことが示唆されている。しかし、ゲノム中に遺伝子の重複がなく、生存に必須ではないと予想される (図 2-1)。また、PFP ホモログの推定アミノ酸配列でアライメントを作製すると、生物種を超えて強く保存された特徴的な領域があることが示された (図 2-2)。その一つが N 末端側に存在する 2 つのドメインである (UBR type Zinc Finger ドメインと PHD type Zinc Finger ドメイン)。PHD type Zinc Finger ドメインは、メチル化されたヒストン H3 (H3K27me3) が存在する特定の遺伝子領域でヘテロクロマチン化を誘導し、エピジェネティックな遺伝子制御に貢献することが示唆されている (Wood et al., 2006; De Lucia et al., 2008; Kim and Sung, 2013)。よって、PFP もヒストン H3 と結合してエピジェネティックな遺伝子発現の制御に関わっている可能性が示唆される。

そこで、PFP タンパク質のヒストン結合能を確認するため、GST 融合 PFP を用いたプルダウンアッセイを行った (図 3-1)。その結果、PFP がシロイヌナズナにおいてもヒストン H3 に結合することが確認された。加えて、細胞内局在解析からも PFP が核内に局在していることが示され、この結論を支持している (図 4-1)。このように、PFP はヒストン H3 との結合能を持つことから、シロイヌナズナにおいてクロマチンリモデリングを介する特定遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしている可能性がある。また、C 末端領域も一部がヒストン H3 の結合に寄与することが確認できたが、C 末端領域のアミノ酸配列は生

物種を超えた相同性が高いとは言えない。よって、C末端領域はシロイヌナズナ特異的な機能に関与することが予想される。

シロイヌナズナにおける PFP の生理機能を予測するために、PFP の発現を、成長段階を追って解析した (図 5-1)。その結果、PFP の発現は栄養成長期の間は成長が進むのに伴い増加し、生殖成長期に移行すると急速に減少することが明らかとなった。よって、PFP は成長段階の切り替えに重要な役割を果たしている可能性が考えられる。一方、PFP の発現欠失系統 (pfp-1) と PFP 過剰発現系統 (PFP-ox6) を用いた表現型解析では、PFP の発現が減少すると花芽形成が促進され、発現が増加すると花芽形成が抑制されることが示された (図 7 および 8)。この結果は、他の過剰発現系統でも確認できた。したがって、PFP 過剰発現系統での観察結果が非特異的な位置効果の結果である可能性は除外される。これらの結果から、PFP はシロイヌナズナにおいて花芽形成を抑制する効果を持つことが示唆される。そこで、花芽形成制御遺伝子 (*FLC*、*FT*、*CO*) の発現に及ぼす影響を確認した結果、PFP 発現の低下によって花芽形成抑制遺伝子 *FLC* の発現が抑制され、PFP の発現上昇によって *FLC* の発現が増加することが明らかになった (図 7-1 A)。また、*FT* の発現は PFP の発現が低下すると増加し、逆に PFP の発現が増加すると有意に減少した (図 7-1 B)。しかし、*CO* 遺伝子の発現には影響を与えず、*FT* の発現を誘導することが分かった (図 7-1 C)。これらの結果は、図 6-1 の表現型と一致しており、PFP が *FLC* の発現を誘導することでシロイヌナズナの花芽形成を抑制する機能を持つことを示唆している。*FLC* 遺伝子領域に存在するヒストン H3K4me2、me3 は、脱メチル化酵素 JMJ15 および JMJ18 によって脱メチル化され、*FLC* の発現が抑制されることが報告されている (Yang et al., 2012; Shen et al., 2014)。PFP は、ヒストン H3K4 メチル化に結合して JMJ15 および JMJ18 による脱メチル化を妨げ

ることで *FLC* の発現を維持する可能性がある。また、春化経路と自律経路はシロイヌナズナの *FLC* 発現を抑制することが知られており、この両者が相互作用することが報告されている。本研究で使用されたシロイヌナズナのエコタイプ Col-0 株は *FRI* が変異しており、春化のないため、自律経路を介して *FLC* 発現を抑制することが予想される (Johanson et al., 2000)。また、*FCA* (Simpson et al., 2003)、*FVE* (Ausín et al., 2004)、*FLK* (Lim et al., 2004) など、自律経路の上流調節因子が *FLC* 発現を調節することが報告されている。図 7-2 の結果から、*PFP* の発現レベルに対応する変化は見られず、*PFP* が自律経路を抑制することによって *FLC* の発現を調節することはないと考えられる。また、*pdf-1* は、短日条件下での花形成促進効果を増強させた。*EBS* (Piñeiro et al., 2003) および *TFL2* (Kotake et al., 2003) は、遺伝子の欠失により短日条件下で花成が促進されることが報告されている。また、*EBS* と *TFL2* の両方が、*FT* 遺伝子領域のヒストンに作用して発現を抑制することが知られている (Kotake et al., 2003; Piñeiro et al., 2003)。これらの因子が欠損している場合、*FT* の発現が増加し、短日条件下でも花成が促進される。したがって、*PFP* が *EBS* および *TFL2* 発現を調節する可能性を調べた (図 7-2 A)。その結果、*PFP* の発現レベルの上昇または低下が *EBS* または *TFL2* の発現レベルに影響を与えなかったことが示された。これらのことから、*PFP* による制御は日長には左右されない独立した経路であると考えられる。まず、短日条件下では光周期経路は活性化されず、短日特異的な花芽形成抑制因子の影響などから *FT* の発現量は低下した状態である。そのため、花芽形成時期は主に *SOC1* の発現によって決定される。*SOC1* は、ジベレリン依存性の花成インテグレーターであり、*FT* 依存性の光周期花成経路も仲介することが知られている (Wilson et al., 1992)。したがって、短日条件下において、*SOC1* の活性化を中心として花芽形成が進む

と考えられる。しかし、日長に関わらず、これら花芽形成制御遺伝子は FLC によって発現が抑制されることで花芽形成時期が調節される。よって、コントロール (Col-0) と pfp-1 の間により顕著な差が観察されたのは、短日条件下という花芽形成が抑制される環境下で FLC という日長に関わらない花芽形成抑制遺伝子を欠いたことによる表現型の差であると考えられる。一方、長日条件下では FT の誘導が PFP 依存性の抑制を克服するため、野生型コントロールと pfp-1 の間に花成時期に有意差がなかった。PFP の発現低下による花成促進が短日条件下でより顕著になるメカニズムについては、今後の研究で取り組む必要がある。

また、PFP は根でも高い発現していることが示された (図 5-2,5-3,5-4)。さらに、根で発現したタンパク質は植物体全体へ輸送されている可能性も示された。花芽形成の際には、SOC1 は成長点 (基部) で発現・機能しており、FT は葉でタンパク質に翻訳され、師管を通り成長点に移動することが知られている (Yoo et al., 2013)。さらに、FLC は葉や成長点において、これら SOC1 や FT の発現を抑制している。これらのことから、PFP はタンパク質として植物体全体へ輸送されることで、葉や基部における FLC の発現調節を行っている可能性が示された。また、PFP が根で重要な役割を果たす可能性があることも考えられる。発現量全体の 10%程度ではあるが、FLC が根でも発現することが報告されている (Bouché F et al., 2016)。さらに、FLC と複合体を形成する ATX7 および SVP のアクチベーターも根で発現している。これらのことから、PFP が根での FLC の発現制御を介して何らかの機能を持つ可能性もあると予測される。

以上のことから、シロイヌナズナにおける PFP は、核に局在するタンパク質でヒストンとの結合能を有しており、ヒストン媒介性の転写制御を行っている

と考えられる。さらに、PFPは成長に伴って発現が増加し、生殖期に移行すると共に発現量は減少する。主な発現部位は根であり、タンパク質レベルで維管束経由での植物体全体へと輸送されている。このような機能を通じて、PFPは花成抑制遺伝子 *FLC* の発現を促進することで花芽形成を抑制する、新しい花芽形成調節因子であることを明らかにすることができた。

PFPはクロマチンを介した発現制御を行っていることが示唆された。クロマチン媒介性の発現制御因子は、時として多面的な機能を有していることがある。PFPにおいても、花芽形成制御とは異なる生理機能の発現制御を行っている可能性が示唆されている。図 8-1 で示したように、PFPの過剰発現系統 (PFP-ox1) では、分裂組織における異常を示す表現型が観察されている。さらに、PFP-ox1 よりカルス誘導を行い、再度、不定芽誘導を行った組織は、異常な分裂組織の形成が見られた。これらの結果から、PFPは分裂制御遺伝子の制御にも関与している可能性が考えられた。そこで、いくつかの発現制御遺伝子の発現様式を解析したところ、PFPの発現上昇に伴って *WUS* 遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。*WUS* は、分裂制御維持に関わる遺伝子であり、シロイヌナズナにおける主に基部で機能している他に、花粉形成や胚珠形成にも重要な役割を果たしていることが知られている (Yamada et al., 2016)。これらの発現している組織は、PFPの発現部位とも重複している部分があり、PFPが *WUS* の組織特異的な発現や制御に関与している可能性が考えられる。

PFPの機能についての総括を図 10-2 に示した。本研究ではPFPがヒストン媒介性の転写制御によって、花成抑制因子である *FLC* の発現を促進することでシロイヌナズナの花芽形成を抑制する因子であることを明らかにした。さらに、PFPは複数の生理機構に関与する可能性として、組織形成制御や分裂組織

制御などにも関与する証跡を得ることができた。今後さらに PFP の詳細な分子機構などの研究を進めることで、植物生理学における重要な知見を得ることができると期待できる。本研究ではその一端を明らかにした。

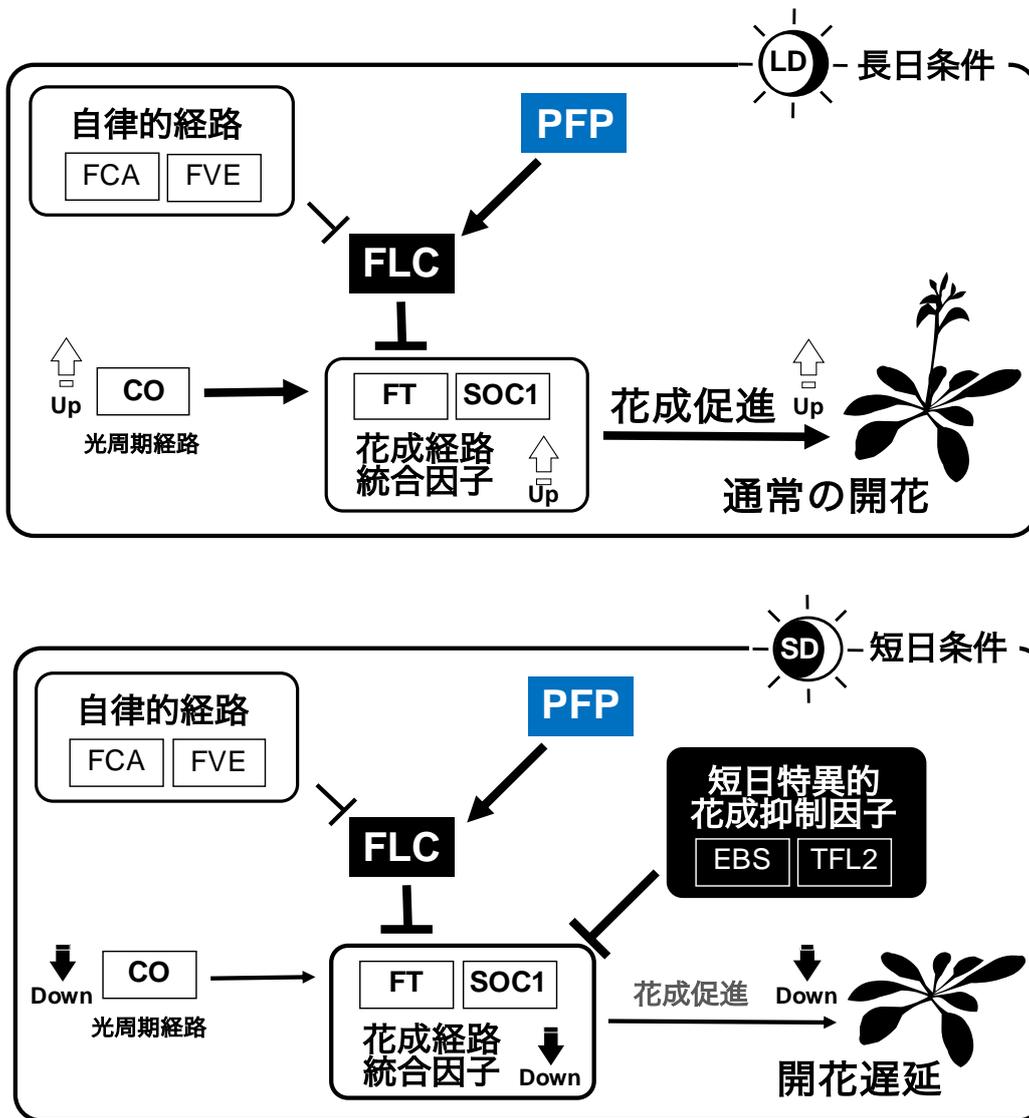


図 9-1 シロイヌナズナの花芽形成制御経路における PFP の推定機能

シロイヌナズナにおける代表的な花芽形成制御経路と PFP が関与する制御経路を示した。発現上昇や発現維持を行う経路を矢印で、発現を抑制する経路を丁字で示した。

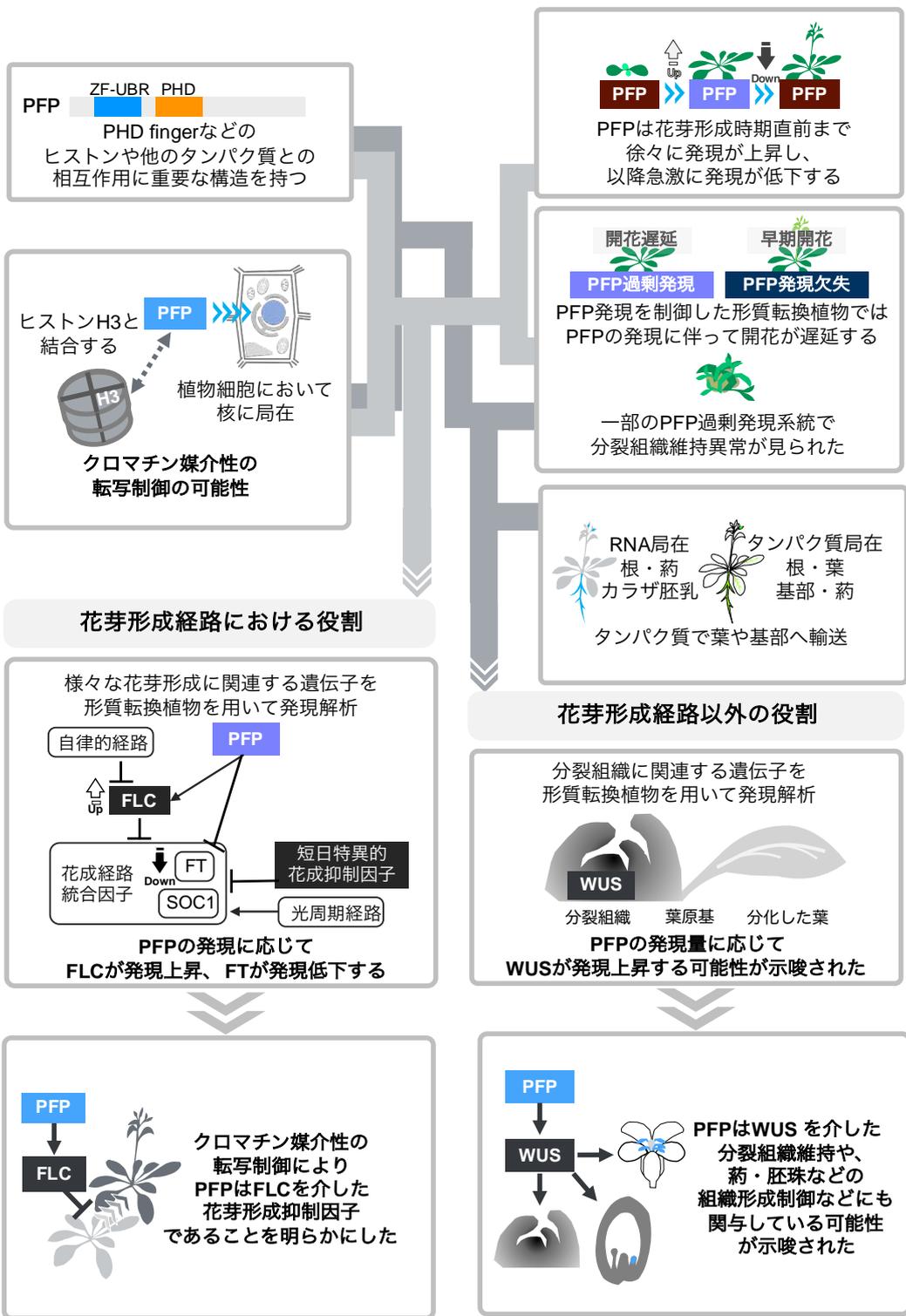


図 9-2 総括

本研究で明らかにした植物生理機構における PFP の機能についてまとめた。

謝辞

本論文の執筆にあたり、多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました。

指導教員である名古屋市立大学理学研究科の木藤新一郎先生には、終始丁寧かつ熱心にご指導を賜り深く感謝致します。同研究科の田上英明先生には、本研究の契機を頂くと共に、抗体の供与や実験手法に関するご指導を賜り、感謝申し上げます。同研究科の湯川泰先生、並びに、奥津光晴先生には、本論文の執筆にあたり、副査として適切にご指導を賜り、感謝申し上げます。同研究科の熊澤慶伯先生には、学位研究遂行にあたり、多くのご支援とご指導を賜り、厚く御礼申し上げます。

ニューヨーク工科大学の小林覚先生には、論文執筆にあたりご指導を賜り、感謝申し上げます。

中部大学応用生物学部の町田千代子先生には、植物生理学の研究の契機をいただき、学部卒業研究でご指導賜り、深く感謝申し上げます。また、同学部の小島晶子先生には、本論文の執筆にあたり、外部審査員として適切にご指導を賜り、感謝申し上げます。

名古屋市立大学理学研究科研究支援室の河野良典様、松原みな子様、田中美恵子様には、研究遂行における様々な面において援助を賜り感謝申し上げます。また、同大学産学官共創イノベーションセンターの服部浩二先生、並びに、奥津佐恵子先生には、学位研究遂行にあたり、多くのご支援を賜り感謝申し上げます。そして、應夢超様、タオダビリゲ様を初めとした木藤研究室の皆様には、本研究の遂行にあたり多大なご助言、ご協力頂き感謝申し上げます。

最後に、日頃より援助、激励して下さった名古屋市立大学理学研究科の皆様には深く御礼申し上げるとともに、ここまで私を支え続けて頂いた友人、家族に感謝致します。

特記事項

本研究で行った遺伝子組換え実験は、名古屋市立大学遺伝子組換え実験等安全委員会の承認(承認番号 15-301)を経て適切に行われた。

参考文献

Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF (1995) The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 20:56-59.

An JY, Seo JW, Tasaki T, Lee MJ, Varshavsky A, Kwon YT(2006) Impaired neurogenesis and cardiovascular development in mice lacking the E3 ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 of the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6212–6217. doi: 10.1073/pnas.0601700103

Apweiler R (2004) UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 32:115-119.

Ausín I, Alonso-Blanco C, Jarillo JA, Ruiz-García L, Martínez-Zapater JM (2004) Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat Genet* 36:162–166.

Bouché F, Aloia MD, Tocquin P, Lobet G, Detry N, Périlleux C (2016) Integrating roots into a whole plant network of flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* 6:1-12.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.

- De Lucia F, Crevillen P, Jones AM, Greb T, Dean C (2008) A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16831-16836.
- Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC et al (2017) InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res* 45:190-199.
- Gan ES, Xu Y, Wong JY, Goh JG, Sun B, Wee WY, Huang J, Ito T (2014) Jumonji demethylases moderate precocious flowering at elevated temperature via regulation of FLC in Arabidopsis. *Nat Commun* 5:5098. doi: 10.1038/ncomms6098.
- Hasegawa J, Sakamoto Y, Nakagami S, Aida M, Sawa S, Matsunaga S (2016) Three-dimensional imaging of plant organs using a simple and rapid transparency technique. *Plant and Cell Physiology*, 57:462-472
- Henderson IR, Liu F, Drea S, Simpson GG, Dean C (2005) An allelic series reveals essential roles for FY in plant development in addition to flowering-time control. *Development* 132:3597-3607.
- Hepworth SR, Valverde F, Ravenscroft D, Mouradov A, Coupland G (2002) Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J* 21:4327-4337.

Hong SM, Bahn SC, Lyu A, Jung HS, Ahn JH(2010) Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 51:1694-1706.

Javerzat JP, Cranston G, Allshire RC (1996) Fission yeast genes which disrupt mitotic chromosome segregation when overexpressed. *Nucleic Acids Res* 24:4676-4683.

Ji X, Dadon DB, Abraham BJ, Lee TI, Jaenisch R, Bradner JE, Young RA (2015) Chromatin proteomic profiling reveals novel proteins associated with histone-marked genomic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:3841-3846.

Jiang D, Gu X, He Y (2009) Establishment of the winter-annual growth habit via FRIGIDA-mediated histone methylation at FLOWERING LOCUS C in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:1733-1746.

Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, Dean C (2000) Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* 290:344-347.

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci.* 1992 8:275-82.

Kim DH, Sung S (2013) Coordination of the vernalization response through a VIN3 and FLC gene family regulatory network in Arabidopsis. *Plant Cell* 25:454-469.

Kooke R, Johannes F, Wardenaar R, Becker F, Etcheverry M, Colot V, Keurentjes JJ (2015) Epigenetic basis of morphological variation and phenotypic plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 27:337-348.

Kotake T, Takada S, Nakahigashi K, Ohto M, Goto K (2003) *Arabidopsis* Terminal Flower 2 gene encodes a heterochromatin protein 1 homolog and represses both FLOWERING LOCUS T to regulate flowering time and several floral homeotic genes. *Plant Cell Physiol* 44:555-564.

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-1874.

Lee I, Amasino, RM (1995) Effect of Vernalization, Photoperiod, and Light Quality on the Flowering Phenotype of *Arabidopsis* Plants Containing the FRIGIDA Gene. *Plant Physiol* 108:157–162.

Levy YY (1998) The Transition to Flowering. *PLANT CELL ONLINE* 10:1973-1990.

Lim MH, Kim J, Kim YS et al (2004) A new *Arabidopsis* gene, FLK, encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering time via FLOWERING LOCUS C. *Plant Cell* 16:731-740.

Ling Y Zhang C, Chen T, Hao H, Liu P, Bressan RA, Hasegawa PM, Jin JB, Lin J (2012) Mutation in SUMO E3 ligase, SIZ1, disrupts the mature female gametophyte in Arabidopsis. PLoS One 7:e29470.

Liu F, Quesada V, Crevillén P, Bäurle I, Swiezewski S, Dean C (2007) The Arabidopsis RNA-Binding Protein FCA Requires a Lysine-Specific Demethylase 1 Homolog to Downregulate FLC. Mol Cell 28:398-407.

Michaels SD, Amasino RM (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. Plant Cell 11:949-956.

Miura K, Renhu N, Suzaki T (2020) The PHD finger of Arabidopsis SIZ1 recognizes trimethylated histone H3K4 mediating SIZ1 function and abiotic stress response. Commun Biol 3(1):1-10

Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol Plant 15:473-497.

Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. J Mol Biol 302:205-217.

Pena PV, Davrazou F, Shi X, Walter KL, Verkhusha VV, Gozani O, Zhao R, Kutateladze TG (2006) Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. Nature 442:100-103.

Pikaard CS, Mittelsten Scheid O (2014) Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Dec 1;6(12):a019315.

Piñeiro M, Gómez-Mena C, Schaffer R, Martínez-zapater JM, Coupland G (2003) EARLY BOLTING IN SHORT DAYS is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in *Arabidopsis* by repressing FT. *Plant Cell* 15:1552-1562.

Sanchez R, Zhou MM (2011) The PHD finger: A versatile epigenome reader. *Trends Biochem Sci* 36:364-372.

Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Kröber S, Amasino RA, Coupland G (2006) The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 20:898-912.

Shen Y, Conde E, Silva N, Audonnet L, Servet C, Wei W, Zhou DX (2014) Over-expression of histone H3K4 demethylase gene JMJ15 enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 5:290. doi: 10.3389/fpls.2014.00290. eCollection 2014.

Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Cote J, Chua KF, Gozani O (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442:96-99.

Simpson GG, Dijkwel PP, Quesada V, Henderson I, Dean C (2003) FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the Arabidopsis floral transition. *Cell* 113:777-787.

Valvekens, D., Montagu, M. Van and Lijsebettens, M. Van (1988) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5536-5540.

Wilson, R.N., Heckman, J.W. and Somerville, C.R. (1992) Gibberellin Is Required for Flowering in Arabidopsis thaliana under Short Days. *Plant Physiol* 100:403-408.

Wood CC, Robertson M, Tanner G, Peacock WJ, Dennis ES, Helliwell CA (2006) The Arabidopsis thaliana vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:14631-14636.

Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhorst P, Wu C, Allis CD (2006) A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442:86-90.

Xu K, Huang X, Wu M, Wang Y, Chang Y, Liu K, Zhang J, Zhang Y, Zhang F, Yi L, Li T, Wang R, Tan G, Li C (2014) A rapid, highly efficient and economical method of

Agrobacterium-mediated in planta transient transformation in living onion epidermis.

PLoS One 9:1-7.

Yang C, Vizcay-Barrena G, Conner K, Wilson ZA(2007) MALE STERILITY1 Is Required for Tapetal Development and Pollen Wall Biosynthesis. *Plant Cell*. 19(11): 3530-3548.

Yang H, Han Z, Cao Y, Fan D, Li H, Mo H, Feng Y, Liu L, Wang Z, Yue Y, Cui S, Chen S, Chai J, Ma L (2012) A companion cell-dominant and developmentally regulated H3K4 demethylase controls flowering time in Arabidopsis via the repression of FLC expression. *PLoS Genet* 8:e1002664.

Yamada T, Sasaki Y, Hashimoto K, Nakajima K, Gasser CS(2016) CORONA, PHABULOSA and PHAVOLUTA collaborate with BELL1 to confine WUSCHEL expression to the nucellus in Arabidopsis ovules. *Development* 143(3):422-6

用語説明及び略語一覧

シロイヌナズナ: 学名 *Arabidopsis thaliana* と呼ばれる植物。植物におけるモデル生物として、よく実験に用いられる。

Col-0: Columbia と呼ばれるエコタイプ（生態型）の一種。シロイヌナズナを用いた実験で一般的に使用される。

WT: 野生型のこと。正常な状態で本来の機能を有している状態。本研究では、Col-0 を野生型として扱っている。

Genbank: 国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information、NCBI）が提供している DNA 塩基配列のデータベース。

アライメント: 2つ以上の塩基配列やアミノ酸配列を、それらの相同性に基づいて整列させる手法。

分子系統樹: 塩基配列やアミノ酸配列から進化的な分岐関係を表した図。

Total-RNA: 総 RNA のこと。細胞内で転写されているすべての RNA。

mRNA: DNA の遺伝情報を基に合成される RNA のうち、アミノ酸配列の設計図となる RNA。

転写: RNA ポリメラーゼによって DNA 遺伝情報から RNA が合成される過程。

cDNAs: mRNA から逆転写酵素を用いて合成された DNA。

翻訳: リボソーム上で mRNA の配列情報に基づきタンパク質合成される過程。

プロモーター領域: 遺伝子の転写調節領域。この領域に RNA ポリメラーゼが結合することでタンパク質をコードする下流の遺伝子が転写される。

イントロン: 非翻訳配列や介在配列と呼ばれ、DNA の塩基配列のうち、転写後のスプライシングで除去される領域。

エキソン: 翻訳配列と呼ばれ、転写後のスプライシングで除去されず連結する領域。

PCR: ポリメラーゼ連鎖反応、短時間で特定領域の DNA を増幅する手法。

Primer: PCR において増幅領域を定め、合成の開始に必要な短い DNA 断片。

RT-PCR: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応。mRNA を鋳型に合成した cDNAs を元に PCR で DNA を増幅し、mRNA の転写量を調べる方法。

qRT-PCR: Real time PCR とも呼ばれる。蛍光色素を用いて PCR による増幅をリアルタイムで測定することで、増幅率に基づいて鋳型に用いた DNA を定量

することができる手法。さらに、RT-PCRと同様に cDNAs を鋳型に用いることで、mRNA の転写量を調べる方法として利用されている。

GST:グルタチオン-S-トランスフェラーゼ。可溶性で精製が容易なため、大腸菌の細胞内で特定のタンパク質を人工合成する際のタグとして利用される。

Pull down assay: 特定タンパク質にタグと呼ばれるタンパク質を融合させ、タグと特異的に結合する物質を利用して特定タンパク質が形成する複合体を回収・検出する手法。本研究では GST をタグとして利用している。

GFP: 緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein)。分子量約 27kDa の蛍光タンパク質で緑色の蛍光を発する。特定タンパク質にタグとして付加することで、その細胞や組織的なタンパク質の局在を調べることができる。

GUS: β -グルクロニダーゼと呼ばれるグルクロニド結合を加水分解する酵素。植物細胞内では、この酵素活性がほぼ認められないことから、植物におけるレポーター遺伝子として用いられる。

GUS 染色: 解析対象の遺伝子のプロモーター下流に GUS 遺伝子を配置し、植物に当該配列を導入する。当該のプロモーターが活動する部位では GUS 活性が見られる。X-Gluc と呼ばれる化合物を用いることで、GUS 活性のある部位で青色に呈色され、当該のプロモーター活動部位が明らかにできるのが GUS 染色と呼ばれる手法。

関連発表論文一覧

副論文

Yuri Yokoyama, Satoru Kobayashi, Shin-ichiro Kidou; PHD type zinc finger protein PFP represses flowering by modulating *FLC* expression in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Growth Regulation*, volume 88, pages 49–59, 2019 [査読有り]

参考論文

Simon Vial-Pradel, Sumie Keta, Mika Nomoto, Lilan Luo, Hiro Takahashi, Masataka Suzuki, Yuri Yokoyama, Michiko Sasabe, Shoko Kojima, Yasuomi Tada, Yasunori Machida, Chiyoko Machida; Arabidopsis Zinc-Finger-Like Protein ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2) and Two Nucleolar Proteins Maintain Gene Body DNA Methylation in the Leaf Polarity Gene ETTIN (ARF3), *Plant and Cell Physiology*, Volume 59, pages 1385–1397, 2018 [査読有り]

熊澤慶伯, 松原美恵子, 横山悠理, 寺本匡寛, 村瀬幸雄, 那須健一郎, 孫 垚, 森山昭彦, 川瀬基弘; 名古屋市産淡水貝類の DNA バーコーディング, *なごやの生物多様性*, 第 6 巻, pages1-14, 2019 [査読有り]

横山悠理, 中島京也, 陸田径典, 熊澤慶伯; 名古屋周辺ワシタカ類の DNA バーコーディングと集団遺伝解析, *なごやの生物多様性*, 第 7 巻, pages1-14, 2020 [査読有り]

Kenichiro Nasu, Yuri Yokoyama, Yao Sun, Mieko Suzuki-Matsubara, Tadahiro Teramoto, Akihiko Moriyama, Motohiro Kawase, Yoshinori Kumazawa;

Mitochondrial genome of *Cipangopaludina japonica* (Gastropoda: Viviparidae) with a tRNA gene rearrangement., Mitochondrial DNA Part B, Volume 5, Issue 2, pages 1340-1341, 2020 [査読有り]

川瀬基弘, 村松正雄, 横山悠理, 横井敦史, 熊澤慶伯; 愛知県奥三河地域で発見された日本初記録の *Buldowskia shadini*, 瀬木学園紀要, 17 号, pages 3-8, 2020

川瀬基弘, 横山悠理, 松原美恵子, 横井敦史, 森山昭彦, 熊澤慶伯; 岐阜市に棲息するナミギセルの分布と系統関係, 瀬木学園紀要, 17 号, pages 9-16, 2020

川瀬基弘, 横山悠理, 松原和純, 市原俊, 松原美恵子, 横井敦史, 森山昭彦; 愛知県に棲息するキセルガイ類, なごやの生物多様性, 第 8 巻, pages 113-125, 2021 [査読有り]

川瀬基弘, 横山悠理, 西尾和久, 松原美恵子, 横井敦史, 熊澤慶伯; 名古屋市に棲息するニッポンマイマイ *Satsuma japonica* の COI 遺伝子からみた分子系統学的位置付け, なごやの生物多様性, 第 8 巻, pages 127-132, 2021 [報告]

川瀬基弘, 横山悠理, 横井敦史, 熊澤慶伯; 愛知県名古屋市, 豊橋市, 山梨県北杜市で発見された *Buldowskia shadini* ヤハズヌマガイ(新称), 瀬木学園紀要, 18 号, pages 3-9, 2021

川瀬基弘, 横山悠理, 吉村卓也, 茅原田一, 熊澤慶伯; 岐阜県初記録の湿地性稀少種ミズコハクガイ, 瀬木学園紀要, 18 号, pages 10-14, 2021

寺本匡寛, 横山悠理, 島田知彦, 熊澤慶伯; ミトコンドリア DNA 塩基配列を用いた名古屋圏のツチガエルの遺伝的解析: 近年の生息地分断と遺伝的分化度の上昇, 爬虫両棲類学会報, 第 2022 巻 第 2 号, 2022 [査読有り] (共同筆頭著者)

川瀬基弘, 横山悠理, 横井敦史, 熊澤慶伯; 名古屋市に棲息する Cristariini カラスガイ族(ドブガイ類)の種多様性, なごやの生物多様性, 第 10 巻, pages 125-133, 2023[報告]

小汐晃平, 横山悠理, 戸田尚希, 熊澤慶伯; 名古屋市産バツタ類の DNA バーコーディングと集団遺伝解析, なごやの生物多様性, 第 10 巻, pages 13-26, 2023 [査読有り]

川瀬基弘, 横山悠理, 山本大輔, 熊澤慶伯; 矢作第二ダム湛水池のミナミタガイ, 矢作川研究, 第 27 号, pages 43-48, 2023 [査読有り]

関連学会発表一覧

横山悠理, 木藤新一郎; PHD finger をコードするシロイヌナズナの遺伝子 *At4g23860* の機能解析, 第 36 回日本分子生物学会年会,神戸, 2013 年 12 月 [国内学会/ポスター発表]

横山悠理, 木藤新一郎; シロイヌナズナの PHD finger 型タンパク質 aHiTAP1 とヒストンタンパク質との相互作用, 第 37 回日本分子生物学会年会,神戸, 2014 年 11 月[国内学会/ポスター発表]

横山悠理, 木藤新一郎; PHD finger ドメインを持つシロイヌナズナ aHiTAP1 の機能解析, 第 57 回日本植物生理学会年会,岩手,2016 年 3 月 [国内学会/ポスター発表]

横山悠理, 木藤新一郎; PHD finger 構造を有するシロイヌナズナの aHiTAP1 は花成を抑制する, 第 39 回日本分子生物学会年会,神戸, 2016 年 12 月[国内学会/ポスター発表]

Yuri Yokoyama, Shin-ichiro Kidou; PHD finger protein aHiTAP1 is a novel flowering regulator of Arabidopsis, Taiwan-Japan Plant Biology 2017, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, 2017 年 11 月[国際学会/ポスター発表]

横山悠理, 木藤新一郎; PHD finger ドメインを持つ aHiTAP1 はカラザ胚乳で発現する, 第 40 回日本分子生物学会年会,神戸, 2017 年 12 月[国内学会/ポスター発表]

解説

「PHD fingerを有するシロイヌナズナのPFPは花芽形成を抑制する」解説

研究背景・目的



HiTAP1(Mio2):分裂酵母におけるヒストンH3複合体の主要構成因子の一つとして本学の田上研究室で発見
 大量発現で染色体の分配異常を引き起こす
 PHD fingerと呼ばれるヒストンなどの結合に重要な構造を持つ

HiTAP1はクロマチン形成維持に重要な機能を有している可能性が高い

一方で、植物などにおける生理的な役割は不明

PHD fingerを有するシロイヌナズナのHiTAP1ホモログをPFPと名付け植物生理機構におけるPFPの機能解明を進めた

研究手法

PFPの機能推定
 組織・生育ステージ別の発現パターンから機能推定する
 形質転換植物を用いてPFPの発現を変動させた際、形態や生育状態への影響を解析する

PFPの機能探索
 ヒストンとの相互作用解析や細胞内局在解析から機能の一端を探る
 RNA/タンパク質の組織的な局在を明らかにすることで機能を探る

PFPが関わる生理機構の解明
 花芽形成機構や他の生理機構における役割を明らかにする

研究成果



PFPは花芽形成時期直前まで徐々に発現が上昇する

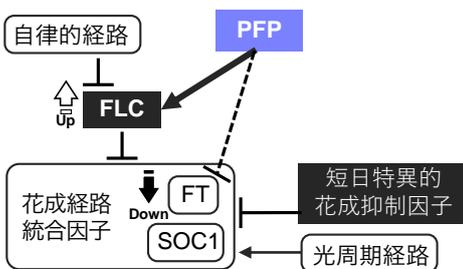
開花遅延 早期開花

PFP過剰発現 PFP発現欠失

PFP発現を制御した形質転換植物ではPFPの発現に伴って開花が遅延する

PFPと花芽形成に関連性が示唆

様々な花芽形成に関連する遺伝子を形質転換植物を用いて発現解析



自律的経路

↑ PFP ↓ FLC ↑ FT ↓ SOC1 ↓ FLC

短日特異的花成抑制因子

光周期経路

PFPの発現に応じてFLCが発現上昇



ヒストンH3と結合する

植物細胞において核に局在

PFPもHiTAP1と同様にクロマチン媒介性の転写制御の可能性



PFP ↓ FLC

クロマチン媒介性の転写制御によりPFPはFLCを介した花芽形成抑制因子であることを明らかに