

氏 名 藤倉 潮

学位 (専攻分野) 博士 (理学)

学位記番号 総研大甲第 1068 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Genetic Analyses of Mechanisms of Compensation in
Leaf Organogenesis

論文審査委員	主 査 教授	高田 慎治
	教授	長谷部 光泰
	教授	上野 直人
	教授	塚谷 裕一 (東京大学)
	助教授	伊藤 正樹 (名古屋大学)

Leaf development relies on cell proliferation, post-mitotic cell expansion and the coordination of these processes. In several mutants of *Arabidopsis thaliana* impaired in cell proliferation, such as *angustifolia3 (an3)*, leaf cells at their maturity are larger than those in wild-type leaves. Similar phenotypes have been reported in several mutants or transgenic plants in *Oryza sativa* and *Nicotiana tabacum*. These reports have suggested that magnitude of cell expansion is affected by cell proliferation activity during leaf development. This phenomenon, compensation, suggests the presence of coordination between cell proliferation and post-mitotic cell expansion during leaf development. However, knowledge about the compensation was superficial and the mechanism(s) underlying compensation was unclear. The aim of his Ph.D. thesis is to elucidate the genetic framework that mediates compensation. To this end, he focused on *an3* as a model case of compensation, since *an3* is one of the best characterized compensation-exhibiting mutants.

Since compensation consists of two different events, namely, the reduction in cell number and the increase in cell size, he hypothesized that compensation can be theoretically separated into two distinct processes based on developmental processes; the induction process, which involves the reduction of cell proliferation; and the response process, during which cell expansion is enhanced. The originality in his Ph.D. thesis is that he investigated separately these two processes: induction and response of compensation. He adopted a strategy to genetically dissect the compensation syndrome using knowledge on anatomy of leaf development. Namely, to address how aberrant cell enlargement is *induced* and how cell expansion system *responds* to the inductive condition during compensation, he planned to combine mutants which have a specific defect in each process. However, in many reports about dwarf mutants, histological analysis revealing number and size of cells within the leaves has been insufficient. Thus, the primary defect(s) contributing to changes in organ size in those dwarf mutants remained unclear. Therefore, he analyzed the cell number and size within leaves in several known dwarf mutants. As a result, unexpectedly, most of the well-known dwarf mutants had defects in both cell proliferation and cell expansion and they were wrongly reported from very limited, fragmental observations. Thus, he found that it is necessary to newly isolate cell-number or -size specific mutants to analyze the induction and response processes of compensation. From a large collection of leaf-size mutants established in the laboratory he belongs, he successfully isolated several mutant lines with a specific defect in leaf cell number or size.

Then, he utilized these mutants to analyze the induction or response process of compensation. In the analysis of "induction" process of compensation, he selected six lines of mutants from the above-mentioned mutants isolated, named *oligocellula (oli)*, which had a specific decrease in cell number. Although the induction of compensation is thought to be closely linked to a decrease in cell number, *oli* mutants did not exhibit compensation. Thus, he thought that the induction of compensation requires not only a decrease in cell number but also some special conditions. But before this study, nothing was known for the condition required for

induction of compensation. To clarify conditions, he produced double mutants among *oli* mutants in which the extent of decrease in cell number is variable. As a result, when the leaf cell number in *oli* double mutant was significantly decreased than each parental single *oli* mutant, the leaf cell size was strongly increased. This result indicates a possibility that the induction of compensation depends on a decrease in cell number in a threshold-dependent manner.

To further address whether a further decrease in cell number affects cell size, next, he constructed double mutants between the *an3* and the *oli* mutants. As a result, most of *oli an3* double mutants had much fewer and significantly larger leaf cells than the *an3*. Exceptionally, *oli1 an3* double mutant had a similar number and size of leaf cells to *an3*. These results indicated that the further decrease in cell number induces an additional and proportional cell enlargement, when cell number fall below a threshold level. It also revealed that the *OLI1* and *AN3* genes have a function in cell proliferation in the same genetic pathway.

Some researchers have regarded compensation as a result of uncoupling of cell division from cell growth. If compensation results from an uncoupling of cell growth and cell division, cell size should be larger in proportion to any decreases in cell number. However, identification of threshold ruled out this possibility. These findings demonstrate that compensation is not a mere uncoupling of cell cycling and cell enlargement and suggest the existence of yet unknown genetic network between cell proliferation and cell expansion in leaf organogenesis.

For the analysis of "response" process of compensation, he isolated and utilized ten lines of mutant, that he named *extra-small sisters (xs)*, which have a specific defect in cell expansion but have normal cell numbers in leaves. In the *xs* single mutants, the palisade cell sizes in mature leaves are about 20 to 50% smaller than wild-type cells. Then, he produced double mutants between *xs* mutants and *an3* to genetically dissect the cell expansion system(s) underlying compensation in the *an3* mutant. As a result, phenotypes of the palisade cell sizes in all combinations of *xs an3* double mutants fall into three classes. In the first class, the compensation was significantly suppressed. Conversely, in the second class, the defective cell expansion conferred by the *xs* mutations was significantly suppressed by the *an3* mutation, and the cell sizes were close to that in the *an3* single mutant. The residual *xs* mutations had effects additive to those of the *an3* mutation on cell expansion. The endopolyploidy levels in the first class of mutants were decreased, unaffected, or increased, as compared to those in wild type, suggesting that the abnormally enhanced cell expansion observed in *an3* is mediated, at least in part, by ploidy-independent mechanisms. Altogether, these results suggest that a defect in cell proliferation in leaf primordia enhances a part of the cell expansion system required for normal cell expansion.

Taken all together, the present study has revealed important clues of leaf size control: the induction process of compensation depends on a decrease in cell number in a threshold-dependent manner; the response process of compensation depends on a specific enhancement of normal processes of cell expansion control; and component of genetic networks for the control of leaf cell proliferation and cell expansion.

申請者は、補償作用という近年、注目されるに至った奇妙な現象の背景を、遺伝学的に解明するという試みを行ない、その結果を論文として申請した。

補償作用とは、種子植物の葉の形態形成に付随してみられる現象で、葉を構成する細胞の細胞分裂回数が、何らかの遺伝的異常によって減少した場合、あたかもその減少を補うかのように、個々の細胞の体積の異常肥大が引き起こされるというものである。不思議なことに、細胞数が増加する異常に対しては、細胞体積は何らの変動も示さない。一方向性の相関である。この現象そのものは、古くから少数の事例が知られており、植物における器官形成の基本単位が、細胞にある（細胞説）のか器官にある（オルガニズマル説）のかといった議論の元ともなった経緯があるが、さまざまな証拠が細胞説を支持して久しくなつてからは、顧みられることが少なくなつていた。しかし近年、シロイヌナズナやタバコ等の実験植物において、細胞周期の制御系に異常を与えた場合、あるいは細胞増殖の正の制御因子を破壊した場合、普遍的に補償作用が引き起こされるということが見いだされ、これが、器官形成における何らかの基本原則に基づくものの反映ではないかという見方が広まり始めた。

申請者は、この、現象論的にしか記載されてこなかった補償作用の、その実体の解明に向けて、シロイヌナズナの変異体を用いた遺伝学的解析を計画した。申請者の計画の特筆すべき点は、この遺伝学的解析に必要となるタイプの変異体が備えているべき特性をよく吟味した上で、既存の変異体にはそうした特性を満足するものがほとんどないことに気づいた点、またそこで自ら、この解析に必要とされる変異体を新たに単離・同定するところから始めた点である。

申請者は、補償作用という現象を、細胞数の減少という側面（誘導過程と称する）と、細胞の異常肥大（反応過程と称する）とに分けて解析しようと試みた。そのため、申請者は細胞数の減少のみを示す変異体と、細胞サイズの減少のみを示す変異体を揃えようとしたのである。上述の通り、そうした条件を満たす変異体は既存のものとしてほとんどないことが判明したため、申請者は前者のタイプの変異体として新たに *oligocellula (oli)* 変異体、後者のタイプとして *extra small sisters (xs)* 変異体をそれぞれ複数単離した。これら変異体の存在そのものが、葉の形態形成に対する細胞数および細胞サイズの寄与の吟味に大きく貢献する材料である。

申請者はまず、細胞数が実際に減少していながら補償作用を示さない *oli* 変異体の存在から、補償作用の誘導は、細胞数の減少だけでは十分ではないことを見いだした。これはすなわち、補償作用という現象が、細胞数の減少に伴う単純な反作用的細胞肥大ではないことを意味する。また、細胞分裂と細胞肥大との単純な非共役が原因でもないことも意味するものである。このことは、補償作用という現象が、細胞分裂過程と細胞伸長過程との間のネットワークにおける、何らかの連関によって引き起こされるものだということを示唆する大きな発見である。さらに申請者は、二重変異体を用いた解析から、補償作用はある閾値を越えて細胞数が減少しない限り、誘発されないこと、またその閾値を越えた後は、細胞数の減少に比例して細胞肥大が著しくなることを示した。これは補償作用という現象の理解の上で重要な手がかりであると評価される。

次に申請者は、補償作用でみられる異常な細胞肥大が、通常用いられている細胞伸長過程の延長線上にあるものなのか、あるいは細胞数の著しい減少に伴い、特別に誘発される特異な細胞伸長制御系によるものなのかを知るため、再び独自の変異体を単離した。細胞サイズに特異的な欠損のある *extra small sisters (xs)* 変異体である。これを、補償作用を示す典型的な変異体 *an3* と重ねた解析から申請者は、補償作用によって働く細胞伸長制御系は、通常の葉の展開時に用いられている伸長制御系であることを明らかにした。さらに、補償作用によって強められる伸長制御は、通常用いられている伸長制御系の一部の経路の、さらに素のある過程よりも下流の経路に限られていることを明らかにした。これは予期せぬ結果であり、補償作用の理解に重要な手がかりといえる。

以上の諸成果は、本研究領域の進展に大きく貢献していると考えられる。よって、申請者の論文は学位論文として十分ふさわしい内容であるものという判定に、審査委員会で一致した。