

氏 名 日 渡 祐 二

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第557号

学位授与の日付 平成13年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Identification of Genes Expressed in Apical Cells  
of the Moss *Physcomitrella patens* Using Gene-trap  
and Enhancer-trap Systems

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	飯 田 滋
	教授	長 谷 部 光 泰
	教授	西 村 幹 夫
	教授	大 隅 良 典

## 論文内容の要旨

Postembryonic growth in land plants occurs from the meristem, a localized region that gives rise to all adult structures, such as a stem and leaves. Meristems control the continuous development of plant organs by balancing the maintenance and proliferation of undifferentiated stem cells, and directing their differentiation. Meristem establishment and maintenance is a fundamental question in plant development research.

Mosses have two types of meristems: a protonema apical cell and a gametophore apical cell. The gametophore apical cell is a single meristematic cell that is maintained through self-renewal, and gives rise to such organs as the stem and leaves. In the moss *Physcomitrella patens*, the developmental process of the apical cell is well defined at the cellular level, and gene targeting based on homologous recombination is feasible. Thus, apical cell differentiation in *P. patens* is used as a model system for studies of meristem development in land plants.

This study investigated apical cell differentiation of gametophores in *P. patens* by identifying the genes expressed during this differentiation. First, gene-trap and enhancer-trap systems were established in *P. patens*. These techniques are useful for cloning genes and enhancers that function in specific tissues or cells. In addition, the systems are convenient for obtaining molecular markers specific to certain developmental processes. Elements for the two systems were constructed using a *uidA* reporter gene with a splice acceptor in the case of the gene-trap system, and a minimal promoter for the enhancer-trap system. The homologous recombination method allowed a high rate of transformation, finding 235 gene-trap and 1073 enhancer-trap lines with variable expression patterns from a total of 5637 gene-trap and 3726 enhancer-trap transgenic lines.

To assess the feasibility of isolating a trapped gene, one gene-trap line, YH209 with rhizoid-specific GUS expression, was characterized. *Uida*-fused fragments were amplified by the 5' RACE method using *uidA*-specific primers. One of the amplified fragments was used to screen the mini-transposon-tagged genomic DNA library that was used to generate the *P. patens* gene-trap lines. A genomic fragment containing the sequence of 5' RACE fragments was obtained. This fragment was re-integrated into the *P. patens* genome by homologous recombination, confirming that the fragment-integrated transformants exhibited rhizoid-specific expression patterns observed in the YH209 line. In addition, a full-length cDNA was isolated by the 3' RACE method, and the gene was named *PpGLU*. *PpGLU* forms a clade with the acidic alpha-glucosidase genes of plants. The gene-trap and enhancer-trap systems should be useful for identifying cell-type and tissue-specific genes in *P. patens*.

From the 235 gene-trap lines and the 1073 enhancer-trap lines, three and four lines, respectively, were isolated. The isolated lines were exhibiting GUS activity preferentially in the apical cells of buds. One gene-trap line, *Apicar1*, showing GUS activity predominantly in the apical cell of caulonemata, rhizoids, and gametophores, was further characterized. The candidate trapped gene was isolated by both the 5' and 3' RACE methods, using the same approach as used with the YH209 line. A sequence analysis of the isolated cDNA revealed that

the trapped gene encoded a kinesin-like protein, *APII* (*Apicar1*). According to a phylogenetic analysis of *APII* and kinesin superfamily genes, the *APII* gene formed a new family of kinesin-like proteins with one of the *Arabidopsis* kinesin-like genes. This suggests that *APII* may have a novel function that is different from those of kinesins of other subfamilies. *APII* will also be useful as a molecular marker in studies of the establishment and maintenance of the apical cell.

## 論文の審査結果の要旨

植物の地上部は頂端分裂組織が継続的に細胞分裂・細胞分化を繰り返すことによって形成される。この組織の形成維持機構の解明は植物の発生過程を解明することに他ならない。しかし、頂端分裂組織形成維持に関わる遺伝子はまだ十分に単離されておらず不明な点が多い。ヒメツリガネゴケは、外部に向きだしになった頂端分裂組織を持ち形態観察が行いやすいこと、遺伝子ターゲティングが高効率でできることから頂端分裂組織の分子機構を解明するうえで良い材料であると考えられている。そこで申請者はヒメツリガネゴケを用いて茎頂分裂組織形成維持に関わる遺伝子を単離する系を確立しようとした。

先ず申請者はヒメツリガネゴケの頂端分裂組織特異的に発現している遺伝子を単離するために、ジーントラップ、エンハンサートラップ系を確立した。非相同的組換えによって遺伝子を導入する方法、相同組換えを用いる方法の両方法に適したトラップエレメントを作成し、そのヒメツリガネゴケプロトプラストへの導入効率を調べた。その結果、相同組換えを用いる方法の方の効率が 10 倍以上良いことを明らかにした。そこで、相同組換え法によって 5637 ジーントラップライン、3726 エンハンサートラップラインを作成し、GUS 染色を行った結果、組織特異的発現を示す 235 ジーントラップラインと 1073 エンハンサートラップラインを得ることに成功した。この系においてトラップした遺伝子を実際に単離することができるかどうか調べるために仮根特異的発現を示す YH209 ジーントラップラインから 5'RACE 法などを組み合わせてトラップされていた遺伝子の単離を試み、実際にトラップ遺伝子が容易に単離できることを示した。この内容は The Plant Journal 誌に印刷中とのことである。

さらに申請者は組織特異的発現をする 235 ジーントラップラインと 1073 エンハンサートラップラインを発生過程を追って詳細に解析し、茎頂分裂組織特異的に発現する 3 ジーントラップ、4 エンハンサートラップラインを単離した。さらに、これらのうち最も頂端分裂組織特異的発現が見られた *Apical1* ラインのトラップ遺伝子を単離した。申請者はこの遺伝子がキネシン様タンパク質をコードしており、遺伝子系統樹からシロイヌナズナのオーソログとともに新しいグループを構成することを明らかにした。

本研究は、ヒメツリガネゴケを用いて茎頂分裂組織形成に関わる遺伝子を探るために必須なジーントラップ、エンハンサートラップ系を始めて開発し、多くのトラップラインを確立するとともに、そのうちで茎頂分裂組織特異的発現を示す一つのトラップ遺伝子を単離したもので、申請者の研究の意義は極めて大きく、今後の当該分野の研究を拓くものであり、審査委員会は全員一致で学位論文として十分な内容を持つものと判定した。

学位論文として提出された研究結果について申請者による口頭発表後、審査員が論文の内容、次いで関連研究分野の一般的知識とその背景となる基礎的知識について口頭試問により審査を行った。これらの試問に対し申請者は的確な応答を行った。これらの結果をもとに、審査委員会は申請者が学位取得に足りうる学識と研究遂行能力を持つものと判定した。

英語の能力に関しても、英文で書かれた学位論文及び、その内容の一部が国際専門誌に受理されていることなどから博士の学位に足る十分な能力を有するものと判定した。