

氏 名 成田 典之

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 876 号

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 24 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 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Isolation and Analysis of Arabidopsis Mutants with
Altered Leaf Thickness or Leaf Length

論文審査員 主 査 教授 飯田 滋
教授 長谷部 光泰
助教授 塚谷 裕一
教授 西村 幹夫
助教授 松林 嘉克（名古屋大学）

論文内容の要旨

Leaf shape in wild plants has diversely evolved from ancient times. A lot of researchers have challenged to elucidate mechanisms of the evolutionary dynamics in plant leaf shape. Several studies carried out by using genetic model plants, such as *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus* or *Lycopersicon esculentum* revealed a part of the genetic basis of variation in leaf shape. However, to get the general picture of evolutionary dynamics in plant leaf shape, more studies are needed. We can divide things to three dimensions called length, width and height. Thus, he thought that three-dimensional classification of leaves would help to elucidate leaf-shape diversity. In previous studies, two classes of mutants, namely *angustifolia* (*an*) type and *rotundifolia* (*rot*) type with a specific alteration in either width or length of the leaf blade were identified in *Arabidopsis*. In both *an* and *rot3* mutants, the leaf shape alteration is caused by the altered cell shape. However, the leaf dwarfism or the diversity of leaf shape is mainly caused by the variation of the cell number in wild plants. Therefore, he analyzed a dominant mutant, *rotundifolia4-1D* (*rot4-1D*), which possessed short leaves and floral organs caused by reduction of the cell number. On the other hand, variation of leaf thickness is mainly due to alteration of cell volume and/or cell number in wild plants. He have also isolated a mutant, working number N692, which possessed thick leaves caused by unusual cell expansion in the leaf thickness direction in *Arabidopsis*.

In *rot4-1D*, anatomical observations showed that the altered leaf shape is caused by reduced cell proliferation specifically in the longitudinal (proximal-distal) axis of the leaf, suggesting that the *ROT4* gene controls polar cell proliferation in lateral organs. The *ROT4* gene encodes a novel small peptide consisting of 53 amino acid residues. *ROT4* open reading frame had not been identified in the *Arabidopsis* genome annotation. He cloned *ROT4* full-length cDNA and registered it to the GenBank as accession number AB107209. *ROT4* mRNA accumulates at a higher level in *rot4-1D* compared to wild type. Over-expression of a *ROT4-green fluorescence protein* (*GFP*) fusion protein in transgenic plants recapitulated the *rot4-1D* phenotype suggesting that *ROT4* acts to restrict cell proliferation. The *ROT4-GFP* fusion protein localized to the plasma membrane when expressed in transgenic *Arabidopsis* plants. Database search and phylogenetic analysis indicate that *ROT4* defines a novel, seed plant-specific family of small peptides with 22 members in *Arabidopsis*, *ROT FOUR LIKE1-22* (*RTFL1-22*), and all *RTFL* members share a conserved 29 amino acid domain, the *RTF* domain. *ROT4* contains N-terminal region (16 amino acid residues), *RTF* domain and C-terminal region (8 amino acid residues), and over-expression of the *ROT4* truncated N-terminal region or C-terminal region was sufficient to confer a *rot4-1D* phenotype. Loss-of-function mutations in several *RTFL* genes were aphenotypic in *Arabidopsis* or *Oryza sativa* suggesting that there may be some functional redundancy among family members. RT-PCR analysis revealed that *ROT4* is expressed in the shoot apex and young leaves of wild-type plants, consistent with a role for *ROT4* in controlling polarity-dependent cell proliferation during wild-type leaf morphogenesis.

On the other hand, mutants with only changed leaf thickness had not been isolated. Therefore, as the first step to study thickness control in leaves, he developed an instrument, called Leaf Thickness Measurement Instrument (*LTMI*) that can measure the thickness of *Arabidopsis* living leaves reproducibly by a laser displacement sensor. The conventional measurement method requires several complicated and time consuming steps, such as fixation, embedding, slicing of the samples by microtome and finally observation under microscope. These steps can be omitted by using *LTMI*. Thick-leaved mutants were screened from a T-DNA activation-tagged library of C24 by using *LTMI*. By screening more than 2000 lines, he isolated three mutants N692, N865 and N091 with thicker or

thinner leaves than wild type. He mainly analyzed N692 which has the most altered leaf thickness among the three mutants. The thickness of N692 leaves was $158 \pm 10 \mu\text{m}$, while that of wild-type C24 leaves was $126 \pm 6 \mu\text{m}$. In addition, leaves of N692 are tight, while those of wild type are waved and curly. Moreover, the stem of N692 is thicker than that of wild type. Anatomical analysis showed that palisade cells of N692 expand isotropically and number of the cells per leaf is reduced. As a result, the leaf blade area of N692 is equal to that of wild type. It is thought that compensation occurs in leaf area but not occurs in leaf thickness direction. A mutant which has such phenotype is unprecedented.

Recently, movement of an application from outcome of model plants to properties of other wild plants has occurred in morphogenesis and related fields. In addition to *an*-like and *rot*-like mutants, by the isolation of N692, a description with three-dimensional geometry has been possible. It is thought analysis of seed-plant specific *ROT4* and *RTFL* genes is suitable to apply for estimation of leaf shape in wild plants. Building on our previous success in the identification of *AN* and *ROT3* genes, the present study of *rot4-ID* and N692 will possibly help to illustrate the variety of leaf shape in wild plants.

論文審査結果の要旨

本論文は、シロイヌナズナを用いて葉の形態を司るメカニズムの解明に取り組んだものであり、特に、葉身の縦の長さあるいは厚さを決める因子をそれぞれ探索したものである。これまでにシロイヌナズナの葉の二次元形態を決める因子としては、細胞伸長制御を通じて葉の縦の長さを決める *ROTUNDIFOLIA3 (ROT3)* と、同じく細胞伸長制御を通じて葉の横幅を決める *ANGUSTIFOLIA (AN)* とが知られている。また最近、細胞分裂活性を通じて葉の横幅に影響する *AN3* が見付き、それぞれ遺伝子のクローニングとその解析がなされている。しかし葉の細胞分裂制御を通じて縦の長さを制御する因子や、葉の厚さを制御する因子については、まだ知見がない。

申請者の成田典之氏は、上記課題に取り組むに当たり、2つのアプローチをとって解析を行なった。すなわち、(1) 葉の細胞分裂活性の異常により縦の長さに欠損を示すアクティベーションタグライン *rot4-1D* の解析とその原因遺伝子のクローニングと(2) 葉の厚さを正確に測定するシステム *LTMI* の開発と、それを用いた変異体のスクリーニングおよびその解析である。その結果、以下の知見が報告されている。

(1) *rot4-1D* では、葉の縦方向のみに細胞数の減少が認められることを見出し、また、細胞のサイズには異常がほとんどないことを明らかとした。このことは、*ROT4* が葉の縦方向への細胞分裂活性を特異的に制御することを示唆する結果である。

(2) *rot4-1D* はアクティベーションタグラインであることから、T-DNA 挿入部位近傍の解析を行なったところ、ゲノムプロジェクトのアノテーションで見落とされていた短い遺伝子を見出し、これに由来する mRNA が *rot4-1D* で特異的に増加していることを確認した。さらにこの遺伝子領域を構成的に発現するトランスジェニック植物を作成したところ、*rot4-1D* の表現型を再現したことから、この遺伝子が *ROT4* であることを証明した。

(3) ゲノムの解析から、*ROT4* にはアミノ酸レベルでのコンセンサス配列を持つ遺伝子ファミリーがシロイヌナズナゲノム中に 20 以上存在することが判明し、これを *RTFL* ファミリーと命名した。*ROT4* 遺伝子に関し、このコンセンサス配列の N 末側あるいは C 末側を削っても、構成発現が *rot4-1D* の表現型を再現したことから、このコンセンサス配列が *ROT4* の機能に重要と推定された。

(4) 一方、厚さの制御に関しては、シロイヌナズナの脆弱で極めて薄い葉を正確に測定する方法として、レーザー変位測定系を応用したシステムを開発し、*LTMI* と名付けた。

(5) *LTMI* を用いて、シロイヌナズナから葉の厚さの変化した変異体を 3 系統単離し、そのうち最も表現系のはっきりした N692 を解析した結果、細胞の肥大により葉の厚さが増大した変異体であることが判明した。

以上、本研究は、葉身の縦の長さを決める新たな遺伝子ファミリーを同定したほか、葉の厚さを正確に測定するシステムを開発の上、それを用いて実際に変異体の単離ができることを示した点、本研究領域に大きく寄与したと評価できる。そこで審査委員会は、本論文を、学位論文として十分な内容を持つものと判定した。なお本論文の内容は、出願者を筆頭著者とする原著論文 1 本として受理・公刊されている。

学位論文として提出された研究結果について、申請者本人による 30 分程度の口頭発表後、審査員が論文の内容および関連研究分野の一般的知識とその背景となる基礎知識等について、口頭試問を約 1 時間行なった。これらの諮問に対して申請者が行なった応答をもとに、審査委員会は、申請者が学位取得に足るものと判断した。また英語で書かれた学位論文と、すでに公刊されている投稿論文から判断して、

出願者が十分な英語力を有することも認められた。