



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | The chromatin remodeling factor CKH2 negatively regulates cytokinin responses in Arabidopsis thaliana                                           |
| Author(s)    | 古田, かおり                                                                                                                                         |
| Citation     | 大阪大学, 2011, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/58615">https://hdl.handle.net/11094/58615</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                              |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 古 田 か お り                                                                                                                                                    |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (理 学)                                                                                                                                                    |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 4 3 4 7 号                                                                                                                                                |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 23 年 3 月 25 日                                                                                                                                            |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>理学研究科生物科学専攻                                                                                                                                  |
| 学 位 論 文 名     | The chromatin remodeling factor CKH2 negatively regulates cytokinin responses in <i>Arabidopsis thaliana</i><br>(クロマチンリモデリング因子CKH2はシロイヌナズナのサイトカイニン応答を負に制御する) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 柿 本 辰 男<br>(副査)<br>教 授 長 谷 俊 治 教 授 田 嶋 正 二 教 授 篠 原 彰                                                                                             |

## 論 文 内 容 の 要 旨

多細胞生物にとって適切な細胞分化は形態形成を正常に行う上で重要である。植物の組織片に植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニン进行处理すると、分化した細胞はカルス（未分化細胞塊）を形成する。このときオーキシシン濃度が高ければカルスから根が形成され、サイトカイニン濃度が高ければカルスは緑化しシュート（葉や茎、芽）が形成される。サイトカイニンは細胞分化の方向性を決定するため、細胞のサイトカイニンに対する応答能は厳密に調節されなければならない。当研究室では、野生型に比べて低濃度のサイトカイニンでカルスが緑化するシロイヌナズナの突然変異体として、サイトカイニン高感受性突然変異体 *ckh* (*cytokinin-hypersensitive*) *1* と *ckh2* が単離されていた。*CKH1* はすでに基本転写因子 TAF12b をコードすることが分かっていたが *ckh2* の原因遺伝子がまだ同定されていなかったため、私はまずマップベースクローニングにより *CKH2* が CHD3 クラスの SWI/SNF クロマチンリモデリング因子をコードする *PICKLE* (*PKL*) であることを明らかにした。動物では CKH2/PKL のホモログは Mi-2/NuRD ヒストン脱アセチル化酵素複合体の構成因子として遺伝子発現を抑制することが知られている。ヒストン脱アセチル化の阻害剤 (TSA) はカルスでサイトカイニン応答を一部代行し、サイトカイニン高感受性を与えたことから、サイトカイニン応答はヒストン脱アセチル化によって制御されることが分かった。*CKH2/PKL* の発現はサイトカイニンで変化せず、また *ckh2* 変異体はサイトカイニン受容非依存的にカルス化し根の原基形成は抑制されたので、*CKH2/PKL* はサイトカイニンとは独立にカルスのサイトカイニン応答を制御していると考えられた。

マイクロアレイ実験により、*ckh1*、*ckh2* 変異によって発現が変化する遺伝子を調べたところ、全体のうち一部の遺伝子しか発現が変化しなかったことから、サイトカイニンや *CKH1/TAF12b*、*CKH2/PKL* による遺伝子発現調節にはターゲット特異性があると考えられた。ただし *ckh1*、*ckh2* 変異で変化する遺伝子のうちサイトカイニン応答遺伝子は一部であったことから、*CKH1/TAF12b* や *CKH2/PKL* はサイトカイニン応答だけを制御しているわけではないと考えられる。*ckh1*、*ckh2* では低濃度のサイトカイニンで野生型よりも多くのサイトカイニン応答遺伝子が誘導されていた。この中にはカルスの緑化に関わると考えられる光合成関連遺伝子が含まれていた。光合成関連遺伝子は核と葉緑体にコードされているが、*ckh1* と *ckh2* 変異では核コードの光合成関連遺伝子だけが誘

導されていたため、核コードの光合成関連遺伝子のサイトカイニン応答能は *CKH1/TAF12* と *CKH2/PKL* によって制御されると考えられた。

*ckh1ckh2* 二重変異体は相乗的な表現型を示し、*CKH1/TAF12b* と *CKH2/PKL* との間には遺伝的な相互作用が示唆された。酵母 two-hybrid 法により *CKH1/TAF12b* と *CKH2/PKL* のタンパク質の相互作用が見られた。また酵母 two-Hybrid 法で *CKH1/TAF12b* はヒストン脱アセチル化酵素 HDA6 と相互作用した。これらの結果から *CKH1/TAF12b* は *CKH2/PKL* または HDA6 と相互作用して、サイトカイニン応答を調節している可能性が考えられた。

本研究によりサイトカイニン応答の制御には基本転写因子 *CKH1/TAF12b* やクロマチンリモデリング因子 *CKH2/PKL*、ヒストン脱アセチル化が、遺伝的、物理的に相互作用し、光合成関連遺伝子などサイトカイニン応答遺伝子においてサイトカイニン応答の閾値を決めるように働く機構があることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

植物ホルモンであるサイトカイニンは、植物の細胞分裂や分化の重要な調節因子である。植物細胞は、動物細胞と比べて技術的に容易に、細胞の脱分化、再分化を引き起こすことができる。組織片に植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニン进行处理すると、分化した細胞は脱分化しカルス（未分化細胞塊）を形成する。このときオーキシン濃度が高ければカルスから根の原基が形成され、サイトカイニン濃度が高ければカルスは緑化しシュート（葉や茎、芽）が形成される。これまでに、サイトカイニン感受性が変化した突然変異体として、*cytokinin hypersensitive (ckh)1* と *ckh2* が分離されていた。古田かおりは、*ckh2* 変異体の原因遺伝子座の染色体上の位置を遺伝学的に決め、マップベースクローニングにより原因遺伝子 *CKH2* を同定した。*CKH2* 遺伝子は、*PKL* 遺伝子と同一であり、CHD3 クラスの SWI/SNF クロマチンリモデリング因子をコードしていた。動物では *CKH2/PKLE* のホモログは Mi-2/NuRD ヒストン脱アセチル化酵素複合体の構成因子であるため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いた実験も行った結果、ヒストン脱アセチル化阻害がサイトカイニン応答の一部を引き起こす事も見いだした。これらの成果は、サイトカイニン応答におけるクロマチンリモデリングの役割を始めて示したものである。

次に、*ckh1* と *ckh2* 変異体での遺伝子発現プロファイリングを行う目的で、マイクロアレイ実験を行った。シロイヌナズナの 25,000 個の遺伝子のうち、*ckh1*、*ckh2* 変異、TSA 処理によって多くても数百個の遺伝子しか発現が変化しなかったことから、*CKH1/TAF12* や *CKH2/PKL*、ヒストン脱アセチル化による遺伝子発現調節にはターゲット特異性があることを示した。*CKH1* と *CKH2* は様々な遺伝子の発現を制御しているが、特に、低濃度のサイトカイニン存在下で、サイトカイニン応答遺伝子の応答性を抑制している事を示した。また *ckh1*、*ckh2* 変異は、低濃度のサイトカイニン存在下にて、特に光合成関係遺伝子のサイトカイニン応答能を上昇させることを示した。さらに、*ckh1* と *ckh2* 変異は、核コードの光合成遺伝子を誘導するが、葉緑体コードの遺伝子を誘導しないことを示した。

また、*CKH2* は、*TAF12* である *CKH1* と遺伝学的、物理的な相互作用をすることを発見した。これまでに見いだされていない組み合わせの転写制御因子による転写調節の仕組みを提唱するものである。

これらの成果は、サイトカイニン応答の分子機構に関する重要な知見をもたらしたものであり、その成果は、Plant Cell Physiology 誌（第 1 著者として 1 報、第 2 著者として 1 報）が公開される予定である (in press)。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。