

氏名	たなか しんいちろう 田中 慎一郎
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2670号
学位授与の日付	平成15年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	シロイヌナズナの光応答するプロモーター・エンハンサートラップ系統の解析
論文調査委員	(主査) 教授 長谷あきら 教授 西村いくこ 教授 岡田清孝

論文内容の要旨

シロイヌナズナのプロモータートラップ系統をスクリーニングした結果、多くの光応答系統を見いだすことが出来た。そのうちの1系統(N35)では、ダイズの *GH3* 遺伝子のホモログ、*AtGH3a* の近傍にレポーター遺伝子の挿入が見いだされた。*AtGH3a* 遺伝子の RNA ゲルブロット解析の結果、野生株においてこの遺伝子は End-of-Day FR 処理により発現が上昇することが明らかになった。さらに、フィトクロム B 欠損株の解析により、この光応答はフィトクロム B (PhyB) によって制御されていることが分かった。この遺伝子の発現は外部より与えたオーキシンによっても誘導された。一方、オーキシン応答に異常を示すことが知られている *axr2* 変異体において光応答が欠失していた。これらの解析により、PhyB はオーキシンレベルの変化を仲立ちとして、*AtGH3a* 遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。また、*AtGH3a* 遺伝子の発現が異常になったと考えられるプロモータートラップ系統について形態的表現型の解析を行ったが、表現型は観察されなかった。

暗所で長く伸長する胚軸でレポーター遺伝子が発現するプロモーター・エンハンサートラップ系統を新たに3系統(M812, J53, J59)単離した。これらの系統においても、end-of-day FR 処理によりレポーター遺伝子の発現が上昇したことから、フィトクロムによる発現抑制が示唆された。新たに単離された3系統のうち2系統(M812, J53)において、T-DNA 挿入部位の近傍にオーキシン応答性遺伝子、*SAUR* のホモログが存在することが推定された。そこでN35系統と同様の方法を用いて、新たに得られた3系統のオーキシン応答性を調べたところ、J53系統においてオーキシン応答性が見られた。またJ53系統ではオーキシン輸送阻害剤 NPA を与えることによって GUS 発現の光応答性が失われることが示され、この系統においてもレポーター遺伝子の発現のフィトクロムによる制御はオーキシンを介していることが示唆された。一方、M812, J59系統ではレポーター遺伝子の発現はオーキシンによって誘導されず、またNPAはレポーター遺伝子の光応答性に影響を与えなかった。そこで、他の植物ホルモンの影響を調べたところ、J59系統においてはレポーター遺伝子の発現がABAによって誘導されることが明らかとなった。

次に、N35系統を用いて、子葉を切除する実験と芽生えの各部位に部分照射する実験を行い、この光応答の光受容部位が、遺伝子が実際に発現する胚軸下部ではなく子葉であることを明らかにした。さらに、オーキシンに応答しなかったJ59系統でも光受容部位は子葉であることが示唆された。以上の結果から、子葉のPhyBが、オーキシンに依存した経路と非依存的な経路を介して胚軸での遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。

光応答するプロモーター・エンハンサートラップ系統四系統のうち、N35系統においてGUSレポーター遺伝子の発現が変化する突然変異体を単離するため、N35系統に対してEMSを用いた変異原処理を行い、得られたM2世代において、レポーター遺伝子の発現が親株と比べて異常となる個体をスクリーニングした。

得られた変異体のうち新規のものである可能性が最も高いと考えられた097-02, 155系統についてさらに細かい生理学的解析を行った。これらの二系統は暗黒下で5日間生育させた場合、野生型に比べて胚軸が短かった。また、レポーター遺伝

子の発現は、097系統が暗所では発現が見られなくなるのに対し、155系統では亢進していた。明所においては、胚軸が短くなる表現型は軽減された。また、レポーター遺伝子の発現についても、暗所に較べより正常な値に近付いていた。次に、これらの系統のオーキシン感受性を調べたところ、どちらの系統でもほぼ正常なオーキシンによるレポーター遺伝子の発現誘導が見られた。さらに、155系統ではオーキシン輸送阻害剤 NPA を加えた培地で生育させると、部分的に表現型が回復した。一方、097系統の表現型は、低濃度のオーキシン添加により僅かながら回復した。155系統は1番染色体下部にマップされたが、同じく一番染色体上に座乗し、比較的類似した表現型を示す *elp1* 突然変異体に見られるようなリグニンの異常な蓄積は見られなかった。

以上の結果は、097系統と155系統では、暗所において、胚軸におけるオーキシン量またはオーキシン感受性が、前者では減少し後者では増加している可能性を示している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、光に応答するシロイヌナズナのプロモーター／エンハンサー・トラップ系統を用いて、植物が光応答する際にどのようなシグナルが植物体内で伝達されるのかを詳しく調べたものである。論文は、1) フィトクロム B (以下 *phyB* と略) により発現が制御される *AtGH3a* 遺伝子の解析、2) レポーター遺伝子の発現を指標とした器官間シグナル伝達の解析、3) オーキシンに関連する新奇変異体の単離と解析、の3つの部分よりなる。

第1章においては、典型的な *phyB* 応答である *End-of-day far-red* 応答においてレポーター遺伝子の発現が誘導されるプロモーター・トラップ系統、N35 系統を見だし、挿入されたレポーター遺伝子の近傍にオーキシンで誘導される遺伝子である *GH3* 遺伝子と良く似た遺伝子 (*AtGH3a*) を見いだした。さらに、この遺伝子の発現を詳しくしらべ、この遺伝子の発現が *phyB* で制御されていること、その制御にオーキシンが関わることを変異体などを用いて証明した。さらに、この結果をもとに、*GH3* 遺伝子の生理的な役割や、フィトクロム制御におけるオーキシン関与の可能性について詳しい考察を加えた。

第2章においては、上記の N35 系統と良く似たレポーター遺伝子の発現応答を示す系統をさらに3系統単離し、合計4系統について、詳しい光応答の比較解析を進めた。まず、これらの系統でレポーター遺伝子の挿入部位を明らかにし、3系統中2系統でオーキシン応答性遺伝子のホモログの近傍にレポーター遺伝子が挿入されていることを示した。次に、これらの系統の光応答性とオーキシン応答性を調べ、これら4系統が、光応答にオーキシンが関与する系統としない系統に分かれることを示した。さらに、代表的な系統で遠赤色光の部分照射実験を行い、どちらの系統でもレポーター遺伝子の発現は胚軸下部で誘導されるにもかかわらず、子葉が光受容部位であることを示した。これらの結果から、子葉から胚軸への器官間シグナル伝達経路が存在すること、その経路にはオーキシンに依存したものとしらないものがあることが分かった。さらに、これらの結果をもとに、植物の光応答における器官間シグナル伝達について考察を加えた。

第3章においては、レポーター遺伝子の発現を指標に変異体のスクリーニングを行い、暗所での胚軸伸長が阻害される2系統を得た。さらに、これらについてレポーター遺伝子の発現やオーキシン応答性を調べ、一つの変異体ではオーキシンの量またはそれに対する感受性が増加しているのに対して、もう一方では逆に減少している可能性が高いことを示した。これらは新奇の変異体であり、今後の解析が期待される。

以上のように、本論文には多くの新しい知見が含まれており、博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した試問の結果、合格と認めた。