

氏名	いけ だ よう こ 池 田 陽 子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 3169 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 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 学 専 攻
学位論文題目	シロイヌナズナ GL2 型 HD-ZIP 蛋白質 FWA による花成阻害機構

論文調査委員 (主査) 講師 井上 敬 教授 岡田 清孝 教授 荒木 崇

論 文 内 容 の 要 旨

高等植物が栄養成長から生殖成長へと移行する過程を花成といい、日長や温度等の環境要因と齢などの内生要因からの情報が花成経路統合遺伝子と呼ばれる少数の遺伝子の転写制御の段階で統合されることにより進行すると考えられている。花成経路統合遺伝子の一つである *FT* 遺伝子は、葉の維管束篩部で発現が誘導された後、遺伝子産物が篩管を通じて輸送され、茎頂において花成を促進することが示唆されている。しかし、*FT* 遺伝子の発現誘導から花成に至る経路にはまだ不明な点が多い。半優性の花成遅延変異 *fwa* は *FWA* 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化レベルの低下により GL2 型 HD-ZIP 蛋白質が異所発現するエピジェネティックな変化（エピアルル）であるが、表現型と遺伝学的相互作用の両面で *ft* 機能欠損変異体とよく似ている。学位申請者は、*fwa* 変異体の解析が *FT* 遺伝子の発現誘導から花成に至る経路の解明につながると考え、異所発現した GL2 型ホメオドメイン-ジッパー（HD-ZIP）蛋白質 FWA が花成を阻害する分子機構の研究をおこなった。その結果、FWA 蛋白質は FT 蛋白質と特異的に結合することで、FT 蛋白質機能を阻害し、花成を遅らせることを明らかにした。また、従来の研究によっては結論が得られていなかった野生型植物の花成制御における *FWA* 遺伝子の役割に関して、これを否定する明確な結論を得た。さらに、FWA 蛋白質を FT 蛋白質の特異的な阻害因子として利用し、FT 蛋白質の機能が必要とされる植物体内の部位が茎頂であることを明らかにした。

申請者はまず、*FT* 遺伝子の過剰発現体の早熟花成表現型を抑圧する変異として *fwa* の新規エピアルルを単離し、その遺伝学的解析から、異所発現した *FWA* 遺伝子が *FT* 遺伝子の下流の経路を特異的に阻害することを明確に示した。

野生型植物において *FWA* 遺伝子が花成の制御に何らかの役割を果たしているかについては、これまで明確な結論が得られていなかった。そこで申請者は、この点を明らかにするために、RT-PCR 解析および発現レポーターを用いた解析により野生型植物における *FWA* 遺伝子の発現を詳細に調べた。その結果、以前に報告されていた吸水種子における *FWA* 遺伝子の発現は胚・芽生え本体における発現ではないこと、短日条件のような花成に阻害的な生育条件においても *FWA* 遺伝子の発現は見られないことを明らかにし、発現の不在という観点から、*FWA* 遺伝子が花成の制御において何らかの役割を果たしている可能性は否定できるという結論を得た。このことは、申請者の研究の過程で報告された、インプリンティングによる発現制御や機能欠損変異体では花成の異常が見られないという事実などもよく合致する。

ついで、申請者は *FWA* 蛋白質による花成阻害の分子機構に関する解析を進めた。まず、*FWA* 蛋白質と同じクラスに属する HD-ZIP 蛋白質の中に転写制御因子としての活性が報告されているものを含むことから、異所発現した *FWA* 蛋白質が転写制御因子として標的遺伝子の発現の誤制御を介して花成を阻害している可能性を検討した。*FWA* 蛋白質を異所・過剰発現する 2 系統の独立のエピアルルと 1 系統の形質転換植物における遺伝子発現プロファイルを、*FWA* 蛋白質を発現しない野生型のそれと比較し、*FWA* 蛋白質を異所・過剰発現する 3 つの系統で共通して発現が変化している遺伝子を探索した。その結果、これらの 3 系統のすべてで共通して発現が変化する遺伝子は見いだされず、*FWA* 蛋白質がその制御標的となり得る遺伝子の発現の誤制御を介して花成を阻害している可能性は低いと結論した。これを受けて、申請者は次に *FWA*

蛋白質が蛋白質間相互作用によって花成を阻害している可能性について検討した。酵母2ハイブリッド法を用いてFT蛋白質およびFT蛋白質と茎頂で相互作用して花成を促進するbZIP型転写因子FDなどの花成制御因子とFWA蛋白質の間の相互作用を調べ、FWA蛋白質はFT蛋白質のみと特異的に相互作用することを明らかにした。また、試験管内においてもFWA蛋白質とFT蛋白質の結合を確認した。さらに部分欠失蛋白質を用いた解析から、ホメオドメインを含むN末領域はFT蛋白質との結合には必要ないこと、STARTドメインよりC末側のGL2型HD-ZIP蛋白質間で保存性が低い領域がFT蛋白質との結合に必須であることを示した。このことから、異所発現したFWA蛋白質はFT蛋白質の相互作用を介して花成遅延を引き起こすと考え、形質転換植物による検証をおこなった。全長FWA蛋白質、FWAのN末からホメオドメインまでを欠いたFWA Δ N、およびSTARTドメインよりC末側を欠いたFWA Δ Cをそれぞれ過剰発現させ、全長FWA蛋白質およびFT蛋白質と相互作用能のあるFWA Δ Nの過剰発現により花成の遅延がみられること、FT蛋白質との相互作用能を失ったFWA Δ Cの断片の過剰発現では花成遅延がおこらないことを見いだした。これらの結果は、FWAの異所発現による花成遅延表現型がFT蛋白質とFWA蛋白質の間の相互作用によって引き起されるという仮説を支持するものであり、DNA結合ドメインであるホメオドメインを欠いたFWA Δ Nが花成遅延を引き起こすことから、FWA蛋白質は転写制御の攪乱を介して作用する可能性は低いという以前の結論を再確認するものである。

以上の結果から、申請者は、FWA蛋白質はFT蛋白質と相互作用することでFT蛋白質の機能を特異的に阻害すると結論した。申請者は、FWA蛋白質がFT蛋白質と高い相同性を持つTSF蛋白質とは結合しないことを見だし、FWA蛋白質をFT蛋白質の特異的阻害因子として利用することでFT蛋白質の機能が必要とされる植物体の部位（組織）を検討した。これまでに、機能獲得型の実験により、FT蛋白質は茎頂で作用することが示唆されていた。しかしながら、FT蛋白質の機能喪失型の実験による機能部位の報告はされていなかった。申請者は、FWA蛋白質を維管束節部で特異的に発現させた場合には花成が遅延しないのに対し、FWA蛋白質を茎頂で発現させると花成が遅延することを見だし、FT蛋白質の作用部位が茎頂であるという現行の見解に強固な支持を与えた。

論文審査の結果の要旨

申請者の研究は、まず、これまで結論が得られていなかったFWA遺伝子が花成の制御に何らかの役割を果たしているかという問題に明確な結論を与えた。これは、FWA遺伝子の役割を巡ってこれまでになされてきたまちまちな解釈をひとつに収束させる意義を持つものとして評価できる。次に、異所発現したFWA蛋白質が、転写因子として遺伝子発現制御の攪乱を介して作用するのではなく、FT蛋白質との結合によるFT蛋白質機能の阻害を介してはたらくという発見は、長く知られながらこれまで全くの謎であった半優性の*fwa*変異が花成遅延を示す原因を解明したものとして評価される。さらに、FWA蛋白質がFT蛋白質と特異的に結合することに着目し、FWA蛋白質をFT蛋白質の特異的阻害因子として用いてFT蛋白質の機能が必要とされる植物体の部位を検討した研究は、ユニークな発想によるものであり、得られた結果とともに、今後の研究への応用も期待できる点で高く評価できる。

以上の観点から、本申請論文は優れた内容を持つものであり、博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項についての口頭試問をおこなった結果、合格と認めた。