

氏名	伊藤 寿郎
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第1839号
学位授与の日付	平成9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	理学研究科生物物理学専攻
学位論文題目	シロイヌナズナを用いた新規遺伝子単離による花の形態形成機構の分子遺伝学的研究

(主査)
論文調査委員 教授 岡 穆宏 教授 竹市雅俊 教授 岡田清孝

論文内容の要旨

申請論文は、シロイヌナズナの花の形態形成機構を分子レベルで明らかにすることを目的として、花の形態形成過程に関わる未知の遺伝子を単離・解析し、さらに、既に同定されていた花器官形成遺伝子 *AGAMOUS* (*AG*) の役割について詳細に解析したものである。

申請者はまず、花器官形成過程において機能する興味深い遺伝子を新規に単離するために、花芽の mRNA に占める存在比が少なく、かつ花芽に特異的に発現するという指標で cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、花芽特異的に発現する遺伝子を 3 個 (*cp1-3*, *cp26*, *cp1-4*) 同定した。*cp1-3* は分泌タンパク質をコードしていると予想され、雄しべのタペート組織と雌しべの通道組織で発生段階特異的に発現しており、分化途上の花粉の成熟および花粉管の成長に機能している遺伝子と考えられる。*cp26* は成熟花粉特異的に発現しており、そのアミノ酸配列から花粉の乾燥耐性に関与している新しいタイプの遺伝子であることが示唆された。*cp1-4* はアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (ATase) というプリンヌクレオチドの *de novo* 合成系の第 1 ステップに働く酵素であり、植物において始めて単離された。次に、花の形態形成に関与するホメオティック遺伝子の 1 つである *AG* に着目し花発生過程の制御機構の解析を行った。*AG* タンパク質は転写因子であると考えられ、DNA 結合に必要な MADS ドメインとケラチンに相同性のあるコイル構造をつくる K ドメインと呼ばれる 2 つの領域を持つ。それぞれのドメイン領域を欠失した変異型 *ag* 遺伝子産物を異所的に発現する植物を作成したところ、雄しべ及び雌しべの正常な形態形成が阻害されたドミナントネガティブ変異が見られ、K ドメインに未知のコファクターが結合して初めて 3 次元的に正常な形態形成が起こることが示唆された。また、強い変異表現型を示す *ag* 突然変異体 (*ag-1*) において野生型 *AG*-cDNA を構成的プロモーターを用いて発現させると、導入遺伝子の発現量に応じて、*ag* 変異を完全に相補するものから部分的に相補するものまでいろいろな段階のものが得られた。したがって、*AG* にはいろいろな機能に対応した複数のターゲット遺伝子があり、それらの発現制御に要求される *AG* のタンパク質に量的な差があることが分かった。

また、抗 AG 抗体を作製し、発生ステージの異なった花芽サンプルを用いたウエスタンブロット解析から、花発生過程のステージ特異的に分子量のわずかに違う 3 種類の AG 産物が存在することが分かった。弱い変異表現型を示す *ag* 突然変異体 (*ag-4*) では第 6 エクソンが欠損していることが既に報告されているが、本解析から、*ag-4* 遺伝子産物は確かに欠損した領域に相当する分子量が小さくなっているものの、合成されるタンパク質の量は野生型と変わらないことが明らかになった。これらの結果は、予想される AG の複数機能のうちそれぞれのターゲット遺伝子の発現制御に、AG の量的な違いのみではなく質的な違いも存在することを示唆する。

最後に、AG の直接のターゲット遺伝子を同定するために、*in vivo* におけるタンパク質-DNA 複合体を抗 AG 抗体を用いて精製する方法でスクリーニングを行い、AG と特異的に結合する DNA 断片 (クローン 92) を得た。さらに、クローン 92 近傍のゲノム断片をプローブとして、cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、at92-2 および APK2a を得た。クローン 92 は at92-2 の 3' 側のイントロン部分に、また APK2a 遺伝子の 3' 下流に位置していた。発現パターンの解析から、at92-2 は AG によって正に、一方 APK2a は負に制御されていることが伺える。なお at92-2 の産物は既知のタンパク質との類似性は認められなかったが、APK2a はセリン・スレオニン特異的タンパク質キナーゼ遺伝子と考えられる。

以上のように、申請論文は分子遺伝学的手法を駆使して花の形態形成機構の解明にアプローチしたものである。

なお、参考論文 2 編は申請論文の研究成果の一部を共著者とともに公表したものである。

論文審査の結果の要旨

モデル高等植物シロイヌナズナにおける遺伝学的解析より、花器官の分化方向の決定には MADS ボックスと呼ばれる DNA 結合ドメインを持つ転写因子様タンパク質をコードするホメオティック遺伝子群が階層的に相互作用しながら機能していることが示唆されてきた。しかし、これらのホメオティック遺伝子群が花形成過程の遺伝子ネットワークにおいて実際にどのような遺伝子の発現制御に関与しているのか、さらにそれらの遺伝子産物がどのように機能して花の 3 次元的構造を形成するのか、についてはこれまでほとんど何も明らかにされていない。

申請者は花の形態形成機構を分子レベルで明らかにすることを目的として、主に 2 つのアプローチにより、花形態形成に関与する新規遺伝子の単離を行った。その 1 つは、花特異的に発現しており、かつその転写量の少ない遺伝子に注目したものであり、幾つかの新規遺伝子を単離している。2 つは、既知のホメオティック遺伝子である AG に注目し、MADS 及び K ドメインの欠損 *ag* 遺伝子を異所的に高発現するトランスジェニック植物を作製することにより、AG タンパク質の作用機構の解明に迫ろうとしたものである。その結果、雄しべ及び雌しべの正常な形態形成が阻害されたドミナントネガティブ変異が見られ、K ドメインに未知のコファクターが結合して初めて 3 次元的に正常な花形態形成が起こることが示唆された。また、強い変異表現型を示す *ag* 突然変異体 (*ag-1*) において AG-cDNA をウイルスの構成的プロモーターを用いて発現させると、変異を完全に相補するものから部分的に相補するまで種々の表現型の個体が得られ、この差は導入した AG の発現量に対応していた。このことから AG には複数の遺伝的機

能に対応した複数のターゲット遺伝子があり、それらの発現制御に必要な AG タンパク質には量的な差があることが分かる。さらに、花発生過程のステージ特異的に分子量のわずかに違う 3 種類の AG 産物の存在を明らかにしたことは、AG タンパク質による複数のターゲット遺伝子の発現制御において、量的な差のみならず質的な差異も存在することを窺わせる重要な発見である。これは申請者が世界で初めて AG 抗体を作製することに成功したために可能となった実験によるものである。また、この抗体を用いてクロマチン抗体精製法というユニークな方法で AG のターゲット遺伝子を単離している。この方法は動物の系で開発されたものであるが、今回、植物において初めて応用されたものである。単離されたターゲット遺伝子はそのアミノ酸配列からそれぞれ新規の核タンパク質やタンパク質リン酸化酵素であると考えられ、今後の解析が期待される。

本論文によって花のホメオティック遺伝子 AG の花形態形成過程における制御機構の一面が明らかとなった。特に植物においてホメオティック遺伝子のターゲット遺伝子はこれまでに同定された例がなく、花の形態形成研究にとって大きな新展開の一步になると考えられる。これらの研究において、実験系の開発を初めとして、さまざまな創意・工夫が認められ、またその研究方法も緻密で、申請者の植物分子生物学に対する卓越した研究能力が窺える。ここに得られた研究成果は、今後花器官の分化方向の決定機構を分子レベルで明らかにしてゆくための新しい道を切り開いたものとして高く評価される。よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 9 年 1 月 23 日、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。