

氏 名	たか はた きみのり 高 畑 公 紀
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 24 号
学位授与の日付	平成 17 年 1 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	生命科学研究科統合生命科学専攻
学位論文題目	ニンジン初期不定胚形成過程において特異的に発現する遺伝子の単離と解析

論文調査委員	(主 査) 教授 佐藤 文彦	教授 河内 孝之	教授 泉井 桂
--------	-------------------	----------	---------

論 文 内 容 の 要 旨

植物細胞の特徴の一つに、体細胞から比較的容易に個体再生を行うことができることがある。特にニンジンの不定胚形成系は体細胞における不定胚形成過程を解析するよい系である。ニンジン細胞を植物ホルモンの1つであるオーキシン存在下で培養することにより、不定胚形成能を有する embryogenic cells (EC) に誘導することができる。しかし、EC 細胞は、合成オーキシン 2,4-D 存在下では、不定胚に発達することはなく、培地から 2,4-D を除去することによって初めて不定胚形成する。本論文は、この不定胚形成の初期過程において不定胚形成を制御する遺伝子の単離を試みた結果である。

第1章では不定胚形成初期過程において特異的発現を示す遺伝子の単離を行なった結果をまとめている。これまでに、シロイヌナズナから不定胚形成への関与が示される *LEC1* 遺伝子が単離されていた。また、そのホモログがニンジンからも単離されていたが、同遺伝子は 2,4-D 除去後、若干の遅れをもって発現誘導されていた。従って、*LEC1* の誘導に先立って不定胚形成を制御する因子があると考え、サブトラクションライブラリー法により 2,4-D 除去後初期の段階特異的に発現上昇する遺伝子を単離することを試みた。サブトラクションライブラリーから独立するクローンを 417 単離するとともに、塩基配列の決定、ノザン解析を行うことにより不定胚形成初期過程特異的に発現すると考えられる遺伝子 *C-ESE1* (*Carrot Early Somatic Embryogenesis1*) を単離することに成功した。*C-ESE1* の発現を詳細に解析した結果、同遺伝子は 2,4-D 除去後の初期不定胚特異的に一過的な発現を示し、後期不定胚、植物個体、あるいは不定胚形成能を喪失した non-embryogenic cells (NC) においては発現していないことを明らかにした。さらに EC 内における *C-ESE1* の発現を *in situ* 法により解析し、その発現が不定胚形成が認められる EC の外縁細胞に特異的であることを明らかにした。これらの結果は、*C-ESE1* の発現が不定胚形成と強く関連していることを示していた。

第2章では、アグルチニン様ドメインを持ち糖タンパク質と予想された *C-ESE1* の機能を形質転換体を作製し、解析している。作製された *C-ESE1* 発現抑制形質転換細胞は 1mm 以下の細胞塊しか形成せず、細胞間隙が増大していることが明らかとなった。また、同形質転換 EC は不定胚形成誘導条件下で、不定胚形成に遅れを示した。しかし、形成された不定胚は正常であり、最終的な不定胚形成の頻度も野生株と同程度であり、*C-ESE1* は不定胚形成に関与するが必須ではないことが明らかとなった。

第3章は *C-ESE1* の発現と細胞微細構造、細胞壁成分の関係を解析した結果である。*C-ESE1*-発現抑制 EC の細胞微細構造を詳細に解析した結果、EC 細胞表面上に観察される多糖類からなる突起状構造が *C-ESE1* の発現抑制によって喪失することを明らかにした。一方、*C-ESE1* の発現抑制によって、培地中にフコース、アラビノース、キシロースを含む多糖類がより多く分泌されていることを明らかにした。

以上、ニンジン初期不定胚形成過程解析のよい指標遺伝子となると考えられる *C-ESE1* 遺伝子を単離するとともに、同遺伝子が初期不定胚における細胞接着の形成に重要な役割を果たすこと、また、細胞接着を介して不定胚形成に影響を及ぼすことを示唆し、不定胚形成過程の初期過程における細胞接着の役割を考察した。

論文審査の結果の要旨

植物細胞は体細胞から比較的容易に個体再生を行うことができる。本研究は植物細胞の特徴の一つである体細胞からの不定胚形成の分子機構を解明すべく、ニンジン不定胚形成系を用いて、その初期不定胚形成に関与すると考えられる遺伝子の単離とその機能の解析を行なったものであり、その評価できる内容は以下の通りである。

- 1) 不定胚形成への関与が示されるニンジン *LEC1* 遺伝子を指標に、合成オーキシシン 2,4-D 除去後誘導される同遺伝子の発現に先立って、特異的に発現上昇する遺伝子を単離することを試み、不定胚形成初期過程特異的に発現する遺伝子 *C-ESE1* (*Carrot Early Somatic Embryogenesis1*) を単離することに成功している。
- 2) *C-ESE1* の発現を詳細に解析し、同遺伝子の発現が不定胚形成と強く相関していることを明らかにしている。すなわち、2,4-D 除去後の初期不定胚特異的に一過的な発現を示すこと、後期不定胚、植物個体、あるいは不定胚形成能を喪失した NC においては発現していないこと、また、EC 内において不定胚形成が認められる外縁細胞特異的に発現していることを明らかとしている。
- 3) *C-ESE1* 遺伝子はアグルチニン様ドメインを持つ糖タンパク質をコードすることを全長 cDNA の塩基配列決定から予想するとともに、同遺伝子の発現抑制 EC の解析から、同遺伝子が細胞接着を介して、細胞集塊形成に関与していることを明らかにしている。さらに、発現抑制 EC が初期不定胚形成の遅れを示すことから、*C-ESE1* は不定胚形成に必須ではないものの、初期形成に関与していることを明らかとしている。
- 4) *C-ESE1*-発現抑制 EC の細胞微細構造を詳細に解析し、EC 細胞表面上に観察される多糖類からなる突起状構造が *C-ESE1* の発現抑制によって喪失することを明らかにするとともに、*C-ESE1* の発現抑制によって、培地中にフコース、アラビノース、キシロースを含む多糖類がより多く分泌されていることを明らかにしている。

以上の結果は、ニンジン初期不定胚形成過程に、よい指標遺伝子を提供するとともに、初期不定胚における細胞接着の形成ならびに細胞接着が不定胚形成に関与する役割に重要な知見を与えるものであり、植物分子細胞生物学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成16年11月5日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（生命科学）の学位を授与される学力が十分にあるものと認めた。