

氏 名	たけ だ せい じ 武 田 征 士
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2807 号
学位授与の日付	平 成 16 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 科 学 専 攻
学位論文題目	シロイヌナズナ突然変異体を用いた花卉形成機構の解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 岡 田 清 孝 助教授 荒 木 崇 教 授 長 谷 あ き ら

論 文 内 容 の 要 旨

花が成長するにはがく片、花卉、雄しべ、雌しべが外側から順に形成される。これらの花器官のアイデンティティは、ホメオティック遺伝子群により同心円状に決められることが示されているが、器官原基の形成に関わる遺伝子や器官の伸長を担う遺伝子はこれまでに全く報告されていなかった。

申請者は花器官の中でも花卉の発生機構に着目し、花卉の形態が異常になったシロイヌナズナの2つの突然変異体を用いて解析を行った。花卉が小さくなったり未熟になったりする *rabbit ears (rbe)* 突然変異体の表現型解析を行った結果、*rbe* 突然変異体では花卉原基の形成という早い段階から異常があることが明らかになった。原因遺伝子を同定するためにマッピングを行い、*RBE* 遺伝子は5番染色体に位置すること、核局在性を示すジンクフィンガータンパク質をコードすることを明らかにした。*in situ* ハイブリダイゼーション、プロモーターとレポーター遺伝子を用いた発現解析を行った結果、*RBE* 遺伝子は将来花卉になると予想される花卉予定領域、及び形成された花卉原基で特異的に発現していることを見いだした。さらにジフテリア毒素を用いた実験から、*RBE* 遺伝子の発現しているこれらの細胞が花卉形成に必要であることを示した。

RBE 遺伝子が器官原基形成に十分な機能を持つかどうかを検証するため、*RBE* 遺伝子を異所的に発現させる *35S::RBE* 形質転換体、*AP3p::RBE* 形質転換体を作製したが、器官形成に異常は見られなかった。このことから *RBE* タンパク質が他のタンパク質と相互作用することを予想し、*RBE* と転写活性化因子である *VP16* の融合タンパク質を発現させたが、やはり器官形成は正常に行われた。一方、*RBE* と転写抑制因子である *Engrailed* との融合タンパク質を発現させたところ、*rbe* 突然変異体と同じ表現型を持つ花が形成されたことから、*RBE* は他のタンパク質と相互作用し、転写を活性化する機能を持つことが示唆された。

器官のアイデンティティが異常になる突然変異や、花卉形成に異常を示す突然変異体との関係から、*RBE* 遺伝子の機能は器官のアイデンティティではなく花芽の場所に依存していること、またその機能は遺伝子の *API* や *PTL* 遺伝子の下流にあることを見出した。さらに、花器官形成に関わる数多くの遺伝子と *RBE* 遺伝子とは独立した機能を持つことも示した。

以上の解析から、*RBE* 遺伝子は花卉原基が形成される前の段階で、将来花卉になる細胞群の分化や分裂を制御することによって、花卉原基の形成を促進する機能を持つことが示唆された。また、その機能は器官のアイデンティティではなく、花芽の中の位置に依存したものであることを示した。

folded petals (fop) 突然変異体では、花卉が屈曲する表現型が見られる。切片や走査型電子顕微鏡による詳細な観察の結果、*fop* 突然変異体では花卉原基形成や初期の伸長には野生型との差が見られないが、伸長を続けて花卉が葯の高さに達することから屈曲が始まることを見出した。また、屈曲箇所の細胞の大きさや形態に異常はなく、アイデンティティも正常であることを確認した。これらの解析から、*FOP* 遺伝子は花卉が急速な伸長を始める後期課程で機能し、花卉をまっすぐ伸長させるような機能を持つことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

花器官の形成機構については、これまでに器官のアイデンティティが同心円状に決まるとされるABCモデルが提唱されており、その他の研究もアイデンティティ決定に関するものがほとんどであった。申請者はアイデンティティ決定以外の形成機構を明らかにすることを目的とし、シロイヌナズナの突然変異体を用いた解析を行った。

その結果、*RBE* 遺伝子が器官のアイデンティティとは関係なく、花芽の中の位置に依存して器官原基の形成を担うことを示した。このような機能を持つ遺伝子は他には知られておらず、花器官形成における新たな因子の関与を示した非常に価値のある研究となっている。

申請者は突然変異体の表現型解析を様々な手法を用いて行っている。実体顕微鏡による花卉の形態異常の頻度の測定、走査型電子顕微鏡による表皮細胞の詳細な観察、切片を用いた時期別の詳細な観察などである。さらに、*rbe* 突然変異体については花卉以外にも胚珠の表現型解析も行っており、突然変異体を多面的な角度から詳細に解析している。また、*RBE* 遺伝子の発現解析についても *in situ* ハイブリダイゼーション、プロモーターとレポーター遺伝子を用いた解析、RT-PCR など様々な手法で確認しており、結果を確実なものにしている点で高く評価できる。

申請者は *RBE* 遺伝子の機能を詳細に調べるために、ジフテリア毒素、VP16 タンパク質、Engrailed タンパク質などを用いている。これらは植物由来の遺伝子ではなく、申請者が独創性にすぐれた着眼点を持って実験を行っていることを示している。さらに、花器官形成を理解するために、既知の多くの遺伝子との関連を二重突然変異体の作製によって調べており、これまでの知見における *RBE* 遺伝子の機能の位置づけを的確に行っている。

さらに、花卉発生の後期課程に異常のある *fop* 突然変異体についても詳細な表現型解析を行っている。これらのことから、花卉発生の初期発生と後期成長過程に関わる2つの遺伝子の役割を示しており、花卉形成の機構を全体的に理解しようとする積極的な姿勢が伺える。また、得られた結果から考えられる可能性や事象を冷静に考察し、的確なモデルを提示していることも高く評価できる。

以上のような点で、本論文は博士（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試問の結果合格と認めた。