

氏名(国籍)	高 碩 敏 (韓 国)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博乙第1713号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Studies on the Mechanism of the Expression of Embryo-Specific and Abscisic Acid-Inducible Genes in Carrot (ニンジンにおける胚特異的なアブシジン酸誘導型遺伝子の発現制御機構に関する研究)
主査	筑波大学教授 理学博士 鎌田 博
副査	筑波大学教授 理学博士 白岩 善博
副査	筑波大学教授 理学博士 牧岡 俊樹
副査	筑波大学助教授 理学博士 佐藤 忍

論文の内容の要旨

高等植物の胚発生過程で見られる主要な生理現象の一つに乾燥耐性獲得があり、乾燥耐性獲得においてはLEA (Late Embryogenesis Abundant)蛋白質と総称されている種子特異的な貯蔵蛋白質が重要であると考えられている。最近になり、シロイナズナやトウモロコシを用い、乾燥耐性を失った突然変異体の解析から、種子における乾燥耐性獲得においては、種子で生産されるアブシジン酸が必要不可欠であり、胚特異的な転写制御因子であるABI3/VP1因子がアブシジン酸情報伝達を担っていることが明らかにされてきた。しかし、ABI3/VP1因子がどのようにしてLEA蛋白質遺伝子の発現を促しているかについてはほとんど明らかにされていない。その最も大きな原因は、発生途中の胚を取り出して人工的に発生させることが極めて困難なため、発生段階の揃った胚を大量に調整することができず、分子生物学的・生化学的解析ができなかったことである。そこで、本研究では、種子胚発生のモデル系としてよく知られているニンジン体細胞不定胚形成系を活用して発達段階の揃った不定胚を大量に調整し、LEA蛋白質の一種であり、ABI3/VP1因子によってアブシジン酸依存的に発現誘導されることが知られているECP (Embryogenic Cell Protein) 遺伝子のプロモーター解析を行い、プロモーター中に存在するシス配列を決定している。さらに、このシス配列に結合する核蛋白質の存在を明らかにするとともに、その核蛋白質候補遺伝子を単離し、アブシジン酸による胚特異的な転写制御機構について論じている。

本論文では、不定胚形成のモデル植物としてよく知られているニンジンを材料として用い、まず始めに、胚特異的にアブシジン酸で発現誘導されることが知られている数種のDcECP遺伝子について、アブシジン酸によるその発現誘導には新たな蛋白質の合成を必要としないことを明らかにした。この結果は、DcECP遺伝子の発現を制御する転写制御因子が不定胚中に既に存在し、その転写制御因子がDcECP遺伝子のプロモーター中に存在する特定のシス配列に直接結合してDcECP遺伝子の発現を促していることを示唆している。そこで、4種類のECP遺伝子についてそのプロモーター領域をクローニングして全塩基配列を決定し、既に明らかにされている他のLEA蛋白質遺伝子のプロモーターとの比較検討を行い、シス配列と想定される領域を見出した。次に、このシス配列を含むと予想される領域について各種欠失配列を調整してGUS遺伝子と連結し、形質転換ニンジン細胞やプロトプラストを用いた一過的発現系を用いGUS活性を指標とする詳細な発現解析を行い、最終的にECP遺伝子の発現を正に制御するシス配列を決定した。特に、DcECP31遺伝子について、欠失配列や塩基置換配列等を用いて極め

て詳細な解析を行い、少しずつ配列の異なるシス配列が3種類存在すること、このシス配列はいずれも単独では機能しないこと、2種類のシス配列の組み合わせが重要であり、その組み合わせによって発現誘導の強さが異なることを明らかにした。

次に、電気泳動を用いた electrophoretic mobility shift assay 法を活用し、そのシス配列に特異的に結合する転写制御因子が胚形成能を持つニンジン培養細胞 (EC) の核抽出液中に存在することを示し、胚特異的なシス結合因子 (トランス因子) の存在を明らかにした。さらに、ニンジン EC の cDNA ライブラリーを用い、酵母の one hybrid 系を利用して、このシス配列に結合すると予想されるトランス因子遺伝子の断片を単離することに成功した。このような結果をもとに、胚特異的に ABI3/VP1 因子を介してアブシジン酸で発現誘導される LEA 蛋白質遺伝子の発現制御機構のモデルを提唱している。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、ニンジンにおける体細胞不定胚形成系を有効に活用し、胚特異的にアブシジン酸で発現誘導される数種遺伝子のプロモーター解析を行い、そのプロモーター中に存在するシス配列を決定してその特性を明らかにしており、高く評価できる。また、そのシス配列に特異的に結合するトランス因子が核抽出液中に存在することを明らかにするとともに、そのトランス因子候補遺伝子を単利している点でも高く評価できる。その候補遺伝子がどのように胚特異的な遺伝子発現を制御しているかを明らかにすることが今後の課題であるものの、高等植物における胚発生制御機構の一端を明らかにした本研究は、植物発生学分野の今後の発展に多大な貢献をするものと強く期待される。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。