

| | | | |
|---------|--|------|-------|
| 氏名(国籍) | タン センキー (マレーシア) | | |
| 学位の種類 | 博士(理学) | | |
| 学位記番号 | 博乙第1601号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成12年3月24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 ECPP44, a 44-kDa Phosphoprotein Associating to Carrot Somatic Embryogenesis (ニンジン不定胚形成過程で見られるタンパク質 (ECPP44) のリン酸化に関する研究) | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 鎌田 博 |
| 副査 | 筑波大学客員教授 | 理学博士 | 篠崎 一雄 |
| 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

高等植物では、細胞・組織・器官培養等により、体細胞から種子胚と類似の形態変化を経て植物体が再生する体細胞不定胚形成の現象が知られており、この現象を利用して胚発生の制御因子が明らかにされつつある。不定胚形成は一般的に植物ホルモンの一種であるオーキシンによって誘導されると説明されているが、最近では、高浸透圧や重金属などのストレス処理によっても不定胚が誘導できることが明らかにされている。しかし、体細胞がオーキシンやストレスの処理によって不定胚形成を開始する際の細胞内初期反応についてはほとんど明らかにされていない。一方、生物の示すさまざまな生理反応においては、タンパク質のリン酸化を介した情報伝達が関与していることが良く知られている。そこで、本論文では、さまざまなストレス処理によって体細胞が不定胚形成能を獲得する際に特異的にリン酸化されるタンパク質を見だし、その遺伝子を単離し、タンパク質としての特性解析を行っている。さらに、不定胚形成能誘導と本タンパク質リン酸化の関係を調べ、本タンパク質のリン酸化の意義を論じている。

本論文では、世界で初めて不定胚形成が報告され、さまざまな実験系が開発されてきたことで不定胚形成のモデル植物として広範に利用されているニンジンを用いている。まず始めに、不定胚形成能を持つ細胞、不定胚形成能を消失した細胞、さまざまなストレスで処理した実生頂芽について、「 ^{32}P 」-無機リン酸を *in vivo* で取り込ませ、リン酸化されたタンパク質を2次元電気泳動法を用いて分離し、オートラジオグラフィーによって詳細に比較・検討することで、不定胚形成能誘導時ならびに不定胚形成能を持つ細胞でのみ特異的にリン酸化される44キログルトンのタンパク質を見だし、ECPP44と名付けた。次に、このタンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、本タンパク質が dehydrin ファミリーに属することを明らかにした。さらに、この部分アミノ酸配列と dehydrin の保存アミノ酸配列をもとに、遺伝子の増幅用のプライマーを設計し、PCR法によって ECPP44 タンパク質の cDNA 断片を得、この cDNA 断片をプローブとして全長の cDNA を単離した。この ECPP44 の全長 cDNA の塩基配列を決定し、本タンパク質がニンジンではこれまでに報告のない新しいタイプの dehydrin であることを示した。

さらに、ECPP44 タンパク質を大腸菌を用いて大量に調整し、ECPP44 タンパク質に対する特異抗体を作製し、この抗体を用いたウェスタンブロット解析により、ECPP44 タンパク質の存在場所を詳細に検討した。その結果、ECPP44 タンパク質自身は実生頂芽、実生胚軸、植物個体の葉、塊根、不定胚形成能を持つ細胞等さまざまな細胞・

組織・器官で蓄積しているが、不定胚形成能を消失した細胞ではその蓄積がみられないことを明らかにした。またニンジン種子においては、種子胚が発達中の時期にはECPP44タンパク質が検出されるものの、完熟種子では検出されないことを明らかにした、さらに、ECPP44タンパク質の特異抗体を用いた免疫沈降法により、リン酸化されたECPP44タンパク質は不定胚形成能を持つ細胞および不定胚形成能を誘導できるストレス処理を施した実生頂芽にのみ検出され、ストレス処理をしていない実生頂芽・胚軸・葉・根等の組織・器官では検出されないことを明らかにした。このような結果から、ECPP44タンパク質のリン酸化が不定胚形成能獲得と密接に関連すると結論づけている。

審査の結果の要旨

本論文は、ニンジンを材料として用い、体細胞が不定胚形成能獲得する時に特異的にリン酸化されるタンパク質を新たに発見し、このタンパク質の蓄積ではなく、タンパク質のリン酸化が不定胚形成能獲得に強く関連していることを世界で初めて明らかにしており、極めて高く評価できる。また、このタンパク質の遺伝子を単離し、その解析から、このタンパク質がニンジンではこれまでに報告のない新たな dehydrin ファミリーのタンパク質であり、これまで予想されていた dehydrin ファミリータンパク質とは異なる機能を有する可能性が高いことを明らかにしている点でも高く評価できる。多くの生物において、多様な生理反応がさまざまなタンパク質リン酸化カスケードによって調節されていることはこれまでも多くの事例で明らかにされており、本研究によって明らかにされたリン酸化タンパク質がどのようなリン酸化カスケードを構成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、高等植物の示す特徴的な形態形成反応の代表的な事例である不定胚形成能獲得機構の一端を明らかにした本研究は、植物胚発生機構と分化全能性発現機構の解明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。