

氏名(本籍)	いわい いけだ みほ 岩井(池田)美穂(京都市)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第3070号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1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 for Regulation of Expression of Carrot Embryo Specific Gene, <i>C-ABI3</i> (ニンジンの胚特異的遺伝子 <i>C-ABI3</i> の発現制御機構の解析)
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 沼田 治
副査	筑波大学助教授 理学博士 佐藤 忍

### 論文の内容の要旨

高等植物の胚発生は、厳格な遺伝的プログラムに基づき、胚でのみ発現する多数の遺伝子が段階的に発現することによって実行されると考えられている。このような胚特異的遺伝子の段階的発現を制御する転写制御因子として、高等植物分子遺伝学のモデル植物であるシロイヌナズナから、*ABI3*、*LEC1*、*FUS3*が単離されてきた。しかし、高等植物の胚発生は種子内の極めて限定された部域で進行し、発生初期の胚を単離することも困難なため、初期胚発生機構、特に、その遺伝子発現制御機構についてはほとんど明らかにされていない。一方、高等植物では、一度特定の機能を持つように分化した体細胞であっても、特定の条件下においては、再度細胞分裂を開始し、種子胚と類似の形態変化を経て植物個体へと発達することができ、この現象は体細胞不定胚形成と呼ばれている。体細胞不定胚形成研究のモデル植物であるニンジンから、最近、シロイヌナズナ*ABI3*の相同遺伝子である*C-ABI3*が単離され、その特性解析が進められている。本研究では、胚発生初期の遺伝子発現制御機構の一端を明らかにすることを目的とし、ニンジン*C-ABI3*遺伝子の発現を制御している分子機構に関する解析が行われている。

まず始めに、ニンジンゲノムライブラリーより、*C-ABI3*遺伝子の5'プロモーター領域約3kbpが単離され、その塩基配列が決定された。さらに、このうち約1kbpについて、GUS遺伝子をレポーター遺伝子とし、ニンジンおよびシロイヌナズナに導入してその発現誘導特性が解析された。その結果、この約1kbpの中に、ニンジンにおける不定胚特異的発現およびシロイヌナズナにおける種子胚特異的な発現を誘導できるシス配列が存在することが明らかにされた。次に、この約1kbpについて、一部領域を欠失させた多数のクローンについてその発現誘導特性が解析され、胚特異的発現を誘導する約40bpの配列が決定された。さらに、核タンパク質を用いたゲルシフトアッセイ法により、この約40bp中の10bpが胚の核抽出物と特異的に結合する能力を有していることが示された。また、この10bp配列の発現誘導特性がニンジンおよびシロイヌナズナで解析され、この配列が実際に植物中で胚特異的発現を誘導することが確認された。この10bpの塩基配列は、胚特異的遺伝子発現を制御する新規なプロモーターシス配列であったことから、Carrot Embryonic Element 1 (ECE1) と名付けられた。

次に、酵母のワンハイブリッド法を用い、このECE1に結合するトランス因子がニンジンのcDNAライブラリーから単離された。単離された7種類のECE1結合因子 (ECE1BF) について、その塩基配列および推定アミノ酸配列が決定され、7種類のECE1BFがいずれもAP2/EREBP領域を1つのみ有する遺伝子をコードするものであるこ

とが明らかとなった。AP2/EREBP領域は植物特有のDNA結合領域として知られており、この領域を有する遺伝子は大きなファミリーを構成していることが知られている。そこで、本研究で単離された7種類のCEE1BFについて、ゲノム中でのコピー数の確認およびその発現解析が行われた。その結果、7種類のCEE1BFのいずれもがニンジン胚の不定胚で発現していることが確認され、さらに、その種類毎に発現時期や他の組織・器官での発現特性が少しずつ異なることが明らかとなった。このような結果から、本実験で単離された7種類のCEE1BFはいずれも種子胚や不定胚の発生に関与する転写制御因子であり、各々特有の機能を持つ可能性が示唆された。

さらに、単離した7種類のCEE1BFのうち、酵母のワンハイブリッドスクリーニングにおいてメジャーであったCEE1BF-Cについて、大腸菌を用いて調製したCEE1BF-Cタンパク質がCEE1と実際に結合することがゲルシフトアッセイによって確認された。さらに、CEE1BF-C遺伝子をニンジン胚中で過剰発現させた結果、その形質転換ニンジンは、2次不定胚の形成頻度が極めて高くなることが示された。このような結果から、CEE1BF-C遺伝子は植物の胚発生プログラムにおいて重要な転写制御因子として機能し、*C-ABI3*をはじめとする多くの胚特異的遺伝子の発現制御を行っていることが示唆された。

本研究によりニンジン胚特異的遺伝子*C-ABI3*の発現制御を担っているプロモーターシス配列(CEE1)とその配列に結合するトランス因子(CEE1BF)が世界で初めて明らかにされた。さらに、このトランス因子の1つを過剰発現させることで、不定胚形成頻度が高まったことから、このトランス因子が胚発生を直接制御する因子である可能性が強く示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、ニンジンにおいて胚発生初期から胚特異的に発現する*C-ABI3*遺伝子のプロモーター解析を行い、胚特異的遺伝子発現を決定するシス配列(CEE1と命名)を世界に先駆けて決定するとともに、CEE1配列に結合するトランス因子として複数のCEE1BFを単離・同定したものである。さらに、CEE1BF遺伝子の発現解析および遺伝子過剰発現体の解析により、CEE1BFが胚特異的転写制御因子であり、胚発生を直接起動させる因子である可能性を強く示唆できた点は特に高く評価される。胚発生を直接起動させる因子であることを直接的に証明することが今後の課題として残されているものの、これまでほとんど解明されてこなかった植物における初期胚発生の分子機構の一端を明らかにした本研究は、植物の発生・分化に関する研究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。