

【325】

氏 名（本籍）	矢 澤 克 美（新潟県）		
学 位 の 種 類	博 士（理 学）		
学 位 記 番 号	博 乙 第 2071 号		
学位授与年月日	平成 16 年 11 月 30 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	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Studies on the Isolation and Characterization of <i>Carrot-LEC1</i>, an Embryogenesis Regulating Factor, and Its Complex Formation (胚発生制御因子 <i>Carrot-LEC1</i> の単離・解析とその複合体形成に関する研究)		
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	沼 田 治
副 査	筑波大学教授	理学博士	佐 藤 忍

論 文 の 内 容 の 要 旨

種子植物は一般に、雌雄生殖細胞の接合によってできた受精卵が、球状胚・心臓型胚・魚雷型胚といった形態変化を示しながら発生・分化し、貯蔵物質の蓄積・乾燥耐性の獲得といった過程を経た後、成熟した種子胚を形成する。モデル植物であるシロイヌナズナを用いた近年の研究により、このような胚発生過程には複数の転写制御因子が関与し、複雑なネットワークを形成していることが明らかにされつつある。それらの転写制御因子の中でも *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* は特に重要な機能を担っていると考えられているが、具体的な機能についてはほとんど解明されていない。解析が遅れている主要な原因の一つとして、シロイヌナズナ種子胚は非常に小さく、胚乳や種皮等に覆われているため、解析が極めて困難である点が挙げられる。一方、ニンジン¹⁾は、種子胚形成のモデル系である不定胚を誘導するための優れた実験系が確立されており、胚形成機構を解析する上で非常に優れた実験材料である。そこで、本研究では、ニンジンを材料とし、ニンジン *LEC1* 遺伝子を単離・解析し、どのような蛋白質複合体を形成して転写制御を行っているのかを解明することを目的としている。

まず、シロイヌナズナ *LEC1* 遺伝子をプローブとし、ニンジン不定胚 cDNA ライブラリーから *LEC1* と相同性のある遺伝子 *Carrot-LEC1 (C-LEC1)* を単離した。*C-LEC1* はシロイヌナズナの *LEC1* 欠損変異株 (*lec1*) の表現型を相補したことから、*LEC1* の ortholog と判断された。*C-LEC1* は、発達中の胚や Embryogenic Cells のような胚的な性質を持つ細胞においてのみその発現が確認され、魚雷型胚期をピークに発現量は減少していた。また、胚の外層で特異的に発現していることも明らかとなった。

次に、不定胚形成時における C-LEC1 の機能について解析を行った。C-LEC1 は、酵母やラットの転写制御複合体 CCAAT-box binding factor (CBF) の構成要素 HAP3 と高い相同性を示したことから、植物における HAP3 として働くことが予想された。一般に、CBF は HAP2・HAP3・HAP5 の三者から構成されているため、ニンジン不定胚に HAP2 や HAP5 様の因子が存在することが予想された。そこで、酵母 two hybrid 法を用い、ニンジン不定胚 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、C-LEC1 と結合する因子を探索したところ、

HAP5 の保存領域と高い相同性を示す 2 種類の因子 C-HAP5A・C-HAP5B が得られた。一方、HAP2 も生物間で高度に保存された領域を持つことが知られており、その保存領域を参考に degenerate primer を設計して PCR を行い、HAP2 の保存領域と高い相同性を示す因子 C-HAP2B を単離した。

さらに、得られた因子の各々が相互に結合するか否かを調べるため、各々の蛋白質を大腸菌で発現させて調製し、免疫沈降実験を行った。C-HAP2B は単体ではどの因子とも結合せず、C-LEC1 は C-HAP5A あるいは C-HAP5B とヘテロダイマーを形成した。一方、C-HAP5A と C-HAP5B は C-LEC1 と結合する以外にも、互いにホモダイマーやヘテロダイマーを形成できることも明らかとなった。

次に、これらの因子が CCAAT 配列を持つ DNA 断片に結合する複合体を形成しうるか否かを調査するため、CCAAT 配列を持つ DNA 断片を用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、C-HAP2B/C-LEC1/C-HAP5A または C-HAP2B/C-LEC1/C-HAP5B が反応系に存在する場合にのみシフトしたバンドが検出された。一方、CCAAT 配列を持たない DNA 断片を用いた場合にはシフトしたバンドは検出されず、この複合体が CCAAT 配列を特異的に認識して結合していることが明らかとなった。

また、ニンジン、シロイヌナズナにおいて、胚形成時に発現する遺伝子の数種においては、そのプロモーター上に CCAAT 配列が存在することが確認され、LEC1/C-LEC1 を含む蛋白質複合体が直接これらの部位に結合する可能性が示唆された。

以上の結果より、C-LEC1 は胚発生の初期に発現し、C-HAP2B、C-HAP5A/C-HAP5B と複合体を形成し、胚形成関連遺伝子のプロモーター上の CCAAT 配列を認識して結合し、下流の遺伝子の発現を制御しているものと考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、ニンジンという実験材料のもつ利点を最大限に活用し、他の植物種では解析が困難な胚発生初期過程における LEC1 因子の動態について解析したものである。C-LEC1 は LEC1 の機能的な ortholog として報告された初めての因子であり、胚の発達に伴う発現変動や発現部位を詳細に解明した点で意義深い。また、他の植物種においては LEC1 様の遺伝子の存在は確認されているものの、実際の複合体形成や機能について明らかにされている報告は全く無く、特異的な配列を持つ DNA を認識して結合する機能的な複合体を形成し得ることを植物において初めて明らかにした点は極めて高く評価できる。C-LEC1、C-HAP2、C-HAP5 様の因子はニンジンには複数存在し、さまざまな組み合わせによって機能の異なる複合体が形成されるものと予想されるが、4 種の因子は全て発達中の不定胚から単離されており、胚形成に関与する遺伝子の発現を制御する複合体を形成している可能性が高く、胚形成において LEC1 因子を研究する上で、非常に重要な知見を与えるものと考えられる。

以上のように、胚形成時における C-LEC1 の作用機構の一端を解明した本研究は、ニンジンのみならず、種子植物の胚形成機構を明らかにする上で重要な基礎的知見を提供するものであり、植物の発生・分化に関する研究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。