

|             |   |      |         |
|-------------|---|------|---------|
| 氏 名 (本 籍)   | 小 <sup>お</sup> 野 <sup>の</sup> 公 <sup>きみ</sup> 代 <sup>よ</sup> (愛 知 県)  |      |         |
| 学 位 の 種 類   | 博 士 (理 学)   |      |         |
| 学 位 記 番 号   | 博 乙 第 1,435 号   |      |         |
| 学位授与年月日     | 平 成 10 年 7 月 24 日   |      |         |
| 学位授与の要件     | 学位規則第 4 条第 2 項該当  |      |         |
| 学 位 論 文 題 目 | Cloning and Characterization of the Genes Showing Circadian Expression in Relation to Photoperiodic Induction of Flowering<br>(光周性花成誘導に関連してサーカディアン発現を示す遺伝子の単離と発現解析) |      |         |
| 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 | 高 橋 三保子 |
| 副 査         | 筑波大学教授  | 農学博士 | 田 仲 可 昌 |
| 副 査         | 筑波大学助教授   | 理学博士 | 佐 藤 忍   |

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

高等植物の示す花成誘導については、一日のうちの暗期の長さに依存して花芽を分化する花成誘導、すなわち光周性花成誘導が良く研究されており、花芽分化に好適な日長が葉で感受されると葉で花成誘導物質が生産され、これが莖頂に移動して花芽を分化させると考えられている。この過程の中で、葉における日長の感受から花成誘導物質の生産に至る過程では新たな遺伝子の発現が必要であることが転写阻害剤を用いた研究によって示されているものの、花成誘導暗期に特異的に発現する遺伝子や光周性花成誘導に関連する遺伝子は単離されていなかった。そこで、本論文では、光周性花成誘導機構の一端を明らかにする目的で、光周性花成誘導時に特異的に発現する遺伝子を単離し、その発現解析を行っている。

本論文では、まずはじめに、光周期に最も鋭敏に反応する典型的な短日植物であるアサガオ品種ムラサキを用い、花成誘導暗期中に特異的に発現する遺伝子を単離して発現特性を詳細に解析した後、その遺伝子のホモローグを長日植物であるシロイヌナズナから単離して発現解析を行い、両者を比較・検討することで光周性花成誘導における役割を論じている。

アサガオからの遺伝子単離においては、最近開発された遺伝子単離法である subtracted differential screening (S-DS) 法と differential display (DD) 法を用い、花成誘導条件 (10時間以上の連続した暗期) に発現し、花成非誘導条件 (連続明期あるいは暗期 8 時間目の 10 分間の光中断処理) には発現が全く見られないかあるいは発現量が少ない遺伝子を単離した。単離された遺伝子について、暗期中での発現変動や発現部位等を詳細に調査し、これまでの生理学的研究によって予想されている光周性花成誘導機構に合致する発現特性を示す遺伝子を同定した。S-DS 法によって単離された 16 種類の遺伝子は予想される発現特性とは若干異なった特性を示し、DD 法によって単離された 1 種類の遺伝子が予想される発現特性と完全に一致する特性を示した。そこで、DD 法によって単離された遺伝子を *PnC401* と名付け、さらに詳細な解析を行った。

*PnC401* 遺伝子の全長 cDNA をクローン化し、定法に従って全塩基配列を決定したところ、本遺伝子は 665 アミノ酸をコードしており、既知遺伝子との相同性は全く見られなかったことから、新規な遺伝子であると考えられた。次に、発現特性を詳細に検討し、本遺伝子は花成誘導能を持つ子葉と若い葉でのみ強く発現しているが、花成誘導能力を持たない器官 (根、莖、葉柄) では発現は見られないことが明らかとなった。興味深いことに、本遺伝子は連続暗期の 12-16 時間目にピークを持つ発現特性を示し、さらに連続した暗期においては、約 24 時間を

サイクルとするサーカディアンリズムを持って発現変動することが明らかとなった。そこで、この光周性発現変動をさらに詳細に検討した結果、16時間暗期処理後の連続明期下では、2回目の発現ピークが4時間遅れ、発現量も低下すること、および、連続暗期の途中で光中断処理や暗期処理直前の近赤外光照射処理のような花成誘導阻害条件下では発現量が低下すること等が明らかとなった。さらに、花成誘導に必要な暗期の長さ（限界暗期）が品種ムラサキより1時間短い別な品種キダチにおいては、本遺伝子の発現が約4時間早くピークを迎えることも明らかにされた。このような結果は、本遺伝子が光周性花成誘導に密接に関与していることを強く示唆している。そこで、アサガオ（短日植物）とは光周期に対する反応が正反対の材料である長日植物のシロイヌナズナを用い、本遺伝子のホモログを単離して発現特性の解析を行った。

長日植物であるシロイヌナズナから、PCR法によって *PnC401* 遺伝子ホモログを単離し、*AtC401* と名付けた。次に、この *AtC401* 遺伝子の発現特性を検討した結果、アサガオと同様に、この遺伝子は暗期中にピークを持つ発現を示し、サーカディアン変動することが明らかとなった。しかし、光に対する反応はアサガオの *PnC401* 遺伝子とは全く正反対の特性を示し、*AtC401* 遺伝子は連続明期下でサーカディアン変動が維持され、連続暗期下では2回目以降の発現が見られなくなった。この結果は、本実験で単離された *C401* 遺伝子が短日植物であるアサガオと長日植物であるシロイヌナズナにおいて光周性反応上は全く正反対の発現特性を示しており、光周性に極めて密接に関与することを示唆すると同時に、本遺伝子産物が光周性における計時機構とも密接に関与することを示唆している。本論文では、さらに、シロイヌナズナから単離された *AtC401* 遺伝子の染色体上での座乗位置をRFLPマッピングによって決定し、第5染色体 *mil38*座近傍であることが明らかとなった。この遺伝子座近傍には、花成時期に関する突然変異体が既に複数マップされており、このような突然変異体と本遺伝子の関係を今後明らかにすることで光周性花成誘導の分子機構が明らかにされるであろうと予測している。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、短日植物であるアサガオを用い、分子生物学的手法を活用して、光周性花成誘導時に特異的に発現する多数の遺伝子を単離し、その特性解析を行うことで、光周性花成誘導に密接に関与するこれまでに報告のない新規な遺伝子を同定し、さらに、長日植物であるシロイヌナズナを利用することで、この遺伝子が光周性花成誘導における計時機構と密接に関与することを明らかにしたものである。花成誘導は高等植物が示す重要な生理反応であり、これまでも多くの研究者がアサガオを中心とする光周性花成誘導反応の解析を進めてきたが、光周性花成誘導に関与することを明確に示す遺伝子の単離には成功しておらず、本研究は、この光周性花成誘導の分子機構の一端を解明するための重要な知見をもたらすものとして高く評価できる。特に、本研究の成果は、花成誘導機構ばかりでなく、高等植物ではほとんど解明されていない生体内時計や計時機構に関する重要な知見を与えるものであり、今後の生物時計に関する研究分野の発展にとって重要な礎となるものと評価できる。

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。