

氏名(本籍)	さか 坂	もと 本	とも 知	あき 昭	(岡山県)
学位の種類	博士(農学)				
学位記番号	博甲第2256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1項該当				
審査研究科	農学研究科				
学位論文題目	Molecular Studies on Plant Homeodomain Proteins and Gibberellin Biosynthetic Genes (植物のホメオドメインタンパク質とジベレリン合成系酵素遺伝子の分子生物学的研究)				
主査	筑波大学教授	農学博士	岩掘修一		
副査	筑波大学教授	農学博士	西村繁夫		
副査	筑波大学教授	理学博士	鎌田博		
副査	筑波大学助教授	農学博士	弦間洋		

論文の内容の要旨

本論文は植物の形態形成に重要な役割を果たしていると考えられるホメオボックス遺伝子、(ホメオドメインタンパク質)の機能解析を行い、さらにジベレリン(GA)の代謝に関わる酵素遺伝子の単離と機能解析を行ったものである。まずリンゴから2種類のkn1型ホメオボックス遺伝子を単離し、その部分配列を決定し、植物体内でのそれらの発現領域が異なることを示した。さらにタバコをモデル植物としてホメオドメインタンパク質の転写調節因子としての機能解析を行った。

タバコから単離した6種類のkn1型ホメオドメインタンパク質を過剰発現させた形質転換体では、正常、軽微な異常、中間的な異常、極めて強い異常の4つの表現型が観察された。そこで形態異常の程度がどの領域に依存しているのかを明らかにするため、きわめて異常な形態を引き起こすNTH15、軽微な異常しか引き起こせないNTH1、全く異常を引き起こさないNTH23の3種を用い、各タンパク質間でアミノ酸配列を交換した33種類のキメラタンパク質を構築し、それらの示す形態異常の程度を調べた。その結果形態異常の程度は、DNA結合モチーフと考えられているホメオドメインを含むC末領域と、KNOXドメインを含むN末領域の相対的影響により決定されていることが示された。またN末領域を酵母のGAL4転写調節因子の転写活性化ドメインと置換した場合、全く形態異常が観察されなかったことから、N末領域は標的遺伝子に対する特異的結合に何らかの機能を持つことが示唆された。さらにKNOXドメイン内の部分配列のみをNTH1からNTH15に置換することで、NTH15と同じ形態異常が誘導された。この領域は α ヘリックスを構成し、NTH15のみ両親媒性ヘリックスとなることから、形態異常の程度にKNOXドメインの2次構造が重要な意味を持つ可能性が示唆された。

次にNTH15の過剰生産に伴って生じる変化のキネティクスを明らかにするため、NTH15とグルココルチコイド受容体のキメラタンパク質を構築し、形質転換したタバコ植物体内でNTH15の機能を人為的に誘導できる実験系を確立した。NTH15の機能誘導後、まず葉身の異常な伸長が観察され、その後異常な細胞分裂が観察された。GA₁含量は機能誘導後24時間以内に半減し、それに先立ち、12時間以内に前駆体であるGA₂₀の含量が検出限界以下にまで減少した。これはGA₂₀酸化酵素遺伝子の発現が、NTH15の機能誘導後3時間以内に抑制された結果であると考えられた。以上の結果から、NTH15の機能発現に伴いきわめて早い段階でGA₂₀酸化酵素遺伝子の発現が抑えられ、内生のGA含量が減少していることが明らかになった。これはNTH15直接GA₂₀酸化酵素遺伝子の発現を制御しているためと示唆された。

GA20酸化酵素遺伝子の発現が抑制されると内生のGA含量が激減し、結果としては植物体は矮化したが、内生GA含量の調節はGAの代謝を制御することによっても可能である。GAは2位の炭素が水酸化されることにより不可逆的に不活性化する。そこでこの過程を触媒する2β水酸化酵素をコードする遺伝子をシロイヌナズナとイネから単離した。両遺伝子がコードするタンパク質はいずれも、ラクトン環を持つC19-GAを2β水酸化する活性を有した。イネの胚や茎頂におけるGA2β水酸化酵素遺伝子OsGA2ox1の発現は、活性型GAを生成するGA3β水酸化酵素遺伝子が発現している領域の境界にある細胞に局在していた。さらにシロイヌナズナのGA2β水酸化酵素遺伝子AtGA2ox3を過剰発現させた形質転換タバコとOsGA2ox1を過剰発現させた形質転換イネは節間伸長が著しく阻害されたことから、矮化植物を作出する手段としてこれらの遺伝子を有効に利用できる可能性が示された。

審査の結果の要旨

本研究は植物の形態形成に重要な役割を演じていると考えられるホメオボックス遺伝子、ホメオドメインタンパク質の機能を明らかにし、さらにこの機能発現からジベレリン生合成系の阻害のキネティクス、ジベレリン代謝に関わる酵素遺伝子の単離と機能解析にまで及んだものである。

まずリンゴから2つのknlタイプのホメオボックス遺伝子を単離しその部分配列を決定し、植物体内での発現部位が異なることを見出し、その機能が異なることを示唆した。これは果樹におけるホメオボックス遺伝子の単離の最初の例である。

ついでモデル植物としてタバコを用い、ホメオドメインタンパク質を過剰発現させた形質転換体のうちきわめて異常な形態を示すNHT15、軽微な異常を示すNTH1、異常を起こさないNTH23を用い、アミノ酸配列を交換したキメラタンパク質を構築してその形態異常を調べた。異常はホメオドメインを含むC末領域とKNOXドメインを含むN末領域の相加的影響によることを示した。従来機能の明らかでなかったKNOXドメインの機能を明らかにし、その2次構造が重要な意味をもつことを示したのは重要な知見である。

NTH15とグルココルチコイド受容体のキメラタンパク質を構築し、形質転換タバコ植物体内でNTH15の機能を人為的に誘導できる実験系を確立した。NTH15の機能誘導後葉身の異常伸長がみられ、これはGA20酸化酵素遺伝子の発現抑制によるGA₁の減少によることを認めた。この結果はホメオドメインタンパク質の働きの1つがGA合成系酵素遺伝子の発現の調節であることを直接的に示したもので意義深い。

さらに活性型GAを不活性化する2β水酸化酵素をコードする遺伝子をアラビドプシスとイネから単離してその配列を決定し、イネの胚や茎頂におけるこの遺伝子発現の局在を明らかにした。またこの酵素遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコと形質転換イネで節間伸長が著しく阻害されることを見出した。これは1年生草本のみならず果樹の矮化をも可能にする知見で、農業に対する応用に大きな貢献ができる。

以上のように本研究はホメオドメインタンパク質の機能、ジベレリン生合成酵素遺伝子の発現調節など基礎的な面に重要な知見を与えるとともに、GAの不活性化による矮性植物の作出にまで及んで農業への応用に関して重要な資料を示した論文であると評価される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。