

氏名(本籍)	東 克己(埼玉県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博乙第1,436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	Studies on the Relationship between the Effects of Glutamine and the Gene Expression of Glutamine Synthetase Isoforms during Somatic and Zygotic Embryogenesis in Carrot (ニンジン不定胚及び受精胚発生過程におけるグルタミンの効果とグルタミン合成酵素アイソフォーム遺伝子の発現との関係についての研究)
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 (理化学研究所)
副査	筑波大学教授 理学博士 高橋 三保子
副査	筑波大学助教授 理学博士 佐藤 忍

論文の内容の要旨

高等植物においては、一度特定の機能を持つに至った体細胞であっても一定の条件下では再度細胞分裂を開始し、受精胚と類似の形態変化を経て幼植物体が再生される。この現象は体細胞不定胚形成と呼ばれており、受精胚発生のモデル系として多くの研究者らによってさまざまな研究が行われてきた。多くの植物種では、不定胚を誘導する際の組織培養培地に還元型の窒素の添加が必要であることが示されている。還元型窒素の中でもグルタミンは特に強い促進効果を持つが、本来は酸化型窒素を利用できる植物でなぜ還元型窒素が強い不定胚形成促進効果をもつのかについてはこれまでその真の理由は明らかにされていなかった。そこで、本論文では、数種還元型窒素、特にグルタミンが不定胚の分化・発達に及ぼす効果を詳細に検討し、グルタミンが不定胚の分化ばかりでなくその発達を強く促進することを明らかにし、次に、還元型窒素による不定胚発達促進効果と窒素代謝、特にグルタミン合成酵素の活性変動およびグルタミン合成酵素遺伝子の発現変動との相関を検討してグルタミンによる不定胚発達促進の原因を明らかにし、最後に、不定胚発生と種子胚発生の両者におけるグルタミン合成酵素遺伝子の発現変動を比較・検討することで、不定胚発生と種子胚発生における遺伝子発現制御系の同一性を論じている。

本論文では、不定胚形成のモデル植物として世界中の研究者が利用しているニンジンを利用し、グルタミン、グルタミン酸、アラニン等の還元型窒素(アミノ酸)の培地への添加が不定胚形成数や不定胚の発達に及ぼす効果を詳細に検討した。その結果、無機還元型窒素であるアンモニウムイオンに比べ、このようなアミノ酸が不定胚の形成数を強く促進し、特にグルタミンは他のアミノ酸に比べて不定胚の発達、中でも不定胚発達後期過程を極めて強く促進することを明らかにした。次に、グルタミンによる不定胚発達促進の原因を探るため、グルタミン合成酵素(GS)に着目し、不定胚発達に伴うその活性変動を検討した。その結果、GS活性が不定胚発達中期から後期にかけて急速に低下することが明らかとなった。このような結果は、GS活性が不定胚発達後期に低下することによって各種アミノ酸合成の出発物質であるグルタミンの供給量が低下し、これが原因となって不定胚の発達が悪くなることを示しており、このことが、GS活性の低下時期にグルタミンを添加することで不定胚の後期発達が促進されることの主要な原因であることを明らかにした。

さらに、このGS活性の低下がGS遺伝子の発現低下によるのではないかと予測し、ニンジンからGS遺伝子を単離してその発現変動を調査した。多くの植物種において、GS遺伝子は複数のアイソフォームとして存在し、局在部位や機能が異なるⅠ型（細胞質型）とⅡ型（プラスチド型）に大別されることが知られている。そこで、ニンジンのさまざまな細胞・組織・器官から調整したcDNAライブラリーをスクリーニングし、最終的に2種類のⅠ型GSアイソフォーム遺伝子（CGS102とCGS103）と1種類のⅡ型GSアイソフォーム遺伝子（CGS201）を単離した。次に、この3種類のGSアイソフォーム遺伝子についてそれぞれ特異的な配列をプローブとし、不定胚発達に伴う発現変動を詳細に調査した結果、不定胚においては、CGS102とCGS201のみが発現しており、CGS103は発現していないこと、および、CGS102とCGS201の発現は不定胚発達の中期から後期にかけて低下することが明らかとなった。この結果は、当初の予測と合致しており、不定胚発達中期から後期に見られるGS活性の低下が転写（遺伝子発現）レベルで制御されていることを示している。

ところで、不定胚は種子胚と類似の形態変化をすることから、解析困難な種子胚発生を研究する際のモデル系と考えられており、これまでに種子貯蔵タンパク質の種類や蓄積等が比較検討されてきたが、胚発生過程全体を通じた遺伝子の発現制御機構が不定胚と種子胚で同一である否かについては明確な結論は得られていなかった。そこで、本論文では、この点を検討するため、ニンジン種子発達過程におけるGSアイソフォーム遺伝子の発現変動を調査し、不定胚におけるその発現変動と比較検討した。その結果、種子においても不定胚と同様、CGS102とCGS201の発現は種子発達の中期から後期にかけて低下することが明らかとなった。この結果は、不定胚発生と種子胚発生は原則的に同一と見なすことができ、同じ遺伝子発現制御機構に従ってさまざまな遺伝子の発現が引き起こされることを示唆している。ところで、GSアイソフォーム遺伝子のうちCGS103は不定胚では発現が見られず、種子においては発達の最終段階（種子乾燥時期）に発現が認められ、不定胚と種子胚で異なる発現パターンを示した。しかし、CGS103は葉の老化に伴って発現が増加することを実験的に示しており、CGS103は老化に伴うグルタミンの分解に関与するGSアイソフォームをコードしており、種子においては、種子胚を取り囲む母系の組織である種皮（不定胚には存在しない）の退化（乾燥）に伴って発現したものであり、上記の概念（種子胚と不定胚は原則的に同一と見なすことができる）と矛盾しないと結論されている。

審査の結果の要旨

本研究は、高等植物の持つ特徴的な性質の1つである分化全能性の実験的証拠である体細胞不定胚形成について、体細胞不定胚形成のモデル材料であるニンジンを用い、これまでに多くの報告があったにもかかわらずその原因が解明されていなかった還元型窒素、特にグルタミンによる不定胚形成促進に関する詳細な検討を行い、培地へのグルタミンの添加が不定胚形成、特に不定胚の発達を強く促進することを新たに見出し、その原因が不定胚発達中期以降に起こるグルタミン合成酵素の活性低下によることを明らかにし、さらに、この活性低下はグルタミン合成酵素遺伝子の転写量の低下が原因であることを分子生物学的技術を用いて明らかにしたものである。還元型窒素が体細胞不定胚形成を強く促進することは多くの植物種で一般的に見られる現象であるが、その真の原因はこれまで解明されてこなかった。本研究はこの点について窒素代謝の観点からその原因を明らかにしたものとして高く評価できる。また、体細胞不定胚形成は従来の技術では解析が困難とされている受精胚発生機構解明のためのモデル実験系と考えられ、多くの研究が行われてきたにもかかわらず、両者における遺伝子発現制御機構の同一性は明確には示されてこなかった。本研究では、複数のグルタミン合成酵素アイソフォーム遺伝子の発現変動を不定胚と受精胚で比較検討することにより、両者の遺伝子発現制御系が基本的に同一とみなせることを示しており、高等植物における胚発生機構をより詳細に解析するための重要な基盤を与えるものとして高く評価できる。

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。