

氏名(本籍)	リム ネフィスイ (チュニジア)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第 5713 号
学位授与年月日	平成 23 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	生命環境科学研究科
学位論文題目	Studies on Genetic and Molecular Interactions between Mutations in SUPPRESSORS OF EARLY FLOWERING 3 and Flowering Time Regulation in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナにおける <i>early flowering 3</i> の抑圧変異と花成制御間の遺伝的・分子的相互作用に関する研究)
主査	筑波大学准教授 博士(理学) 溝口 剛
副査	筑波大学教授 理学博士 鎌田 博
副査	筑波大学准教授 博士(理学) 小野 道之
副査	筑波大学准教授(連) 博士(理学) 井澤 毅

論文の内容の要旨

高等植物は周期的に変動する生育環境のもとで、より多くの子孫を残すために、適切な時期に開花・結実する機構を発達させてきたと考えられている。この際、概日時計が外部環境の情報感受から花成時期の決定過程で、重要な機能を果たしている。例えば、条件的長日性植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、16 時間明期/8 時間暗期のような長日条件下で花成が促進される。一方、10 時間明期/14 時間暗期のような短日条件下では花成は抑圧される。シロイヌナズナとは反対に、イネやアサガオなどの短日性植物は長日条件下では花成が抑制されるが、短日条件下では花成が促進される。このように、植物種によって光周期に対する花成応答は異なる。しかし、この違いが引き起こされる詳細なメカニズムは未解明である。光周期による繁殖時期の制御は、動物や昆虫にも広く見られ、分子機構の理解は重要な課題である。

EARLY FLOWERING 3 (ELF3) は、シロイヌナズナの概日時計の構成因子の一つであり、光周期への花成応答において重要な機能を有している。実際に、*elf3* 機能欠損変異体では、光周期への応答性を失い、常に早期花成形質を示す。しかし、ELF3 は既知ドメインをもたず、他のタンパク質との相同性が見られないため、その機能解析は他の概日時計因子群に比べて遅れている。所属研究室の先行研究として、Fujiwara らは、シロイヌナズナの概日時計関連遺伝子 LHY と CCA1 の二重機能欠損変異系統 (*lhy;cca1*) では、短日及び長日条件下では野生型よりも花成時期が早まり、恒明条件下では遅延することを明らかにした。*lhy;cca1* は特殊な短日性を示すシロイヌナズナ変異体のはじめての報告例である。Fujiwara らはさらに、*lhy;cca1* の恒明条件下における花成遅延形質を部分的に抑圧する変異の一つとして、*elf3-101* 変異を同定した。

本研究では、異なる光周期下における花成と器官長制御の分子機構の理解を目指し、概日時計変異体 *elf3* の分子遺伝学的解析を行なった。長日性植物シロイヌナズナを短日性植物型の花成応答に変換させた変異体を単離してその原因遺伝子を解明し、長日性植物と短日性植物の光周期への花成応答の違いを引き起こすメカニズムの解明を目指した。

elf3-1 変異体種子に重イオンビーム処理を行い、作成した変異誘発系統を用いて、恒明条件下で *elf3-1* の早期花成、長胚軸、長葉柄、淡緑色葉、葉面積縮小形質の全てまたは一部が抑圧された変異体の単離を試みた。7 種の抑圧変異系統 (S#1, S#3, S#5, S#7, S#14, S#15, S#20) を単離し、分子遺伝学的手法により変異の遺伝様式 (優性または劣性) と変異の染色体座上位置を決定した。また、花成制御に関するマーカー遺伝子 *GIGANTEA* (*GI*)、*CONSTANS* (*CO*)、*FLOWERING LOCUS C* (*FLC*)、*SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*)、*FLOWERING LOCUS T* (*FT*) の発現解析を行なった。全ての抑圧変異系統で、花成ホルモン・フロリゲンをコードする *FT* 遺伝子の発現量が親株の *elf3-1* と比較して顕著に低下していた。また、花成抑制遺伝子 *FLC* 発現量の上昇の有無により 2 グループに大別されることが分かった。

短日条件、長日条件、恒明条件の各光周期への花成応答を解析した結果、S#20 は短日条件や長日条件下では *elf3* 変異体と同様の早期花成形質を示し、恒明条件下でのみ強い花成遅延が見られた。この結果は、S#20 の花成応答性が長日性から特殊な短日性に変換されていることを示している。この応答性の変化は、*elf3* と *cry2* の変異形質の相加的効果で説明できることを明らかにした。

次に、恒明条件下で花成遅延形質が強まる S#7 について分子遺伝学的解析を行なった。S#20 とは異なり、S#7 では *FLC* 発現量が顕著に上昇していたことから、異なるメカニズムにより *elf3-1* の早期花成形質を抑圧すると考えた。そこで、マッピングにより染色体座上位置を推定した。候補領域内に存在する 53 個の遺伝子群の中に、既知の花成遺伝子及びその相同性遺伝子はなく、原因遺伝子 *SEL7* は花成制御に関して新規遺伝子であると考えられた。候補遺伝子群の塩基配列決定と遺伝子発現量の解析を行なったところ、polyA-binding protein 3 (*PAB3*) 遺伝子の発現量がコントロールと比較して顕著に低下し、かつ S#7 系統では *PAB3* のプロモーター領域に逆位が検出された。この花成遅延形質は、*PAB3* 遺伝子内にトランスポゾンが挿入された変異系統 (*pab3-102*) により確認した。以上の結果は、polyA 結合タンパク質が花成制御に関わることを示した初めての研究例であり、シロイヌナズナの主要な花成抑制遺伝子 *FLC* の転写後の制御機構を理解するうえで重要な知見である。

ELF3、*CRY2*、*PAB3* 遺伝子は多くの植物で高度に保存されている遺伝子であり、短日性を示す栽培植物や野生植物の中にはこれらの遺伝子が完全に、又は部分的に機能を失った結果、短日性の花成応答を示しているものが存在している可能性も考えられる。また、シロイヌナズナ以外の植物へも応用し、これらの遺伝子のオルソログの機能を低下または抑圧させることで、長日性植物を短日性植物に変える技術開発への貢献も期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、モデル植物であるシロイヌナズナを研究対象として、花成と器官伸長の協調的な制御に関する分子メカニズムの一端を明らかにしたものである。概日時計機能が著しく低下した *elf3-1* 変異体を、恒温恒明条件下という概日時計の同調要因のない条件下で栽培した。詳細な形態観察を行うとともに、本条件下で *elf3-1* 変異形質の全てまたは一部を抑圧する変異を 7 種単離した。これらの中で、S#20 変異体は、特殊な短日性花成応答性を示すこと、この応答性の変化が *elf3* と *cry2* の変異形質の相加的効果で説明できることを示した。突然変異の導入や形質転換技術により、一般的な長日性と短日性の変換がなされた例は、動植物や昆虫を含めてこれまでにない。今回の発見は、一般的な長日性から特殊な短日性への変換としては、*lhy;cca1* に次いで 2 例目であるが、異なる 2 遺伝子変異の組み合わせにより、光周期応答性を変換しうる実例を示すことにより、他生物種の研究を先導するものといえる。また、S#7 変異系統の原因遺伝子 *SEL7* は、既知の花成関連遺伝子との相同性がなかったことから、高精度のマッピング、53 個の全候補遺伝子のエキソン/イントロン領域の塩基配列の比較解読、これら全遺伝子の発現量比較により同定された。ポリ A 結合タンパ

ク質をコードする遺伝子の変異により、シロイヌナズナの主要な花成抑制遺伝子 *FLC* の発現量増加により花成遅延する事例の報告はこれまでになく、本研究成果は *FLC* mRNA の転写後の制御メカニズムを理解するうえで有用な知見といえる。

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。