

氏名 (本籍)	原 美由紀 (福井県)		
学位の種類	博 士 (理学)		
学位記番号	博 甲 第 6915 号		
学位授与年月日	平成 26 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 Molecular Mechanisms Underlying Photoperiodic Flowering Responses in Circadian Clock Mutant (概日時計変異体における光周性花成応答の分子機構に関する研究))		
主査	筑波大学教授	理学博士	鎌田 博
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	三浦 謙治
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	小野 道之
副査	国際基督教大学教授	博士 (理学)	溝口 剛

論 文 の 要 旨

地球上の様々な生物は、季節変化を感知して、行動パターンや成長段階を適応させて生活しており、環境の変化を予測するために生物は日長変化を利用している。植物は日長変化を利用して花成を制御することが知られており、概日時計と呼ばれる生体内にある計時機構を利用して日長の変化を感知していることが分かっている。概日時計とは、外界の光条件によらずおよそ24時間の周期で作動し、シアノバクテリアからヒトに至るまで多くの生物で見いだされている。植物は概日時計により制御される因子を指標に時を知り、その時間情報と光の有無を組み合わせることで日長の変化を感知している。モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) においては、LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)、CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)、TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)、GIGANTEA (GI)などが、概日時計の制御系において主要な働きを担っている。実際にはさらに多くの時計因子が関与しており、概日時計の全貌は未だ明らかになっていない。

著者は概日時計が制御する光周性花成応答の理解を深めるため、2つのアプローチにより研究を行った。まず初めに、共発現データベースATTED-II (<http://atted.jp/>) を用いて、シロイヌナズナの概日時計因子 *CCA1/LHY* と同時期に発現する遺伝子群をリストアップした。これらの中で、これまでに機能解析が行われていない2遺伝子について、*CO-EXPRESSED WITH CLOCK GENES LHY AND CCA1 1 (CEC1)* および *CEC2* と命名し、これらの因子に着目してさらなる研究を行った。機能欠損変異体 *cec1* と *cec2* は、長日および恒明条件において早期花成形質を示した。一方、短日条件においては野生型と比較して花成時期はほぼ同じであった。さらに、*cec1*、*cec2* 両変異体において、*LHY* や *CCA1* の発現周期には影響が見られなかったが、*cec1* 変異体のみで *GI* の発現周期の位相が約4時間遅くなることが分かった。これらのことから、*CEC1*、*CEC2* は *LHY/CCA1* によって制御される新規な概日時計因子の一つである可能性が示唆され、さらに、*CEC1* は概日時計因子 *GI* の発現を制御する因子であることが分かった。本研究で、*CEC1* および *CEC2* という新たな概日時計関連因子の存在とその花成応答への影響を示した。

次に、長日植物シロイヌナズナを用い、複数の突然変異の導入による短日性花成応答の獲得を目指して研究を行った。シロイヌナズナでは、葉における花成誘導因子 FLOWERING LOCUS T (FT) タンパク質の産生が光周性花成応答誘導の鍵となっている。FT 遺伝子発現を正に制御しているのが CONSTANS (CO) である。シロイヌナズナの長日特異的な花成応答は CO による発現制御に大きく依存する。CO 遺伝子の発現は日周期性を示し、CO タンパク質は光によって安定化されるため、CO タンパク質が安定的に

存在することができる長日条件においてのみ花成が促進されると考えられている。*CO*遺伝子の発現制御に関わる因子として、概日時計関連因子であるEARLY FLOWERING 3 (ELF3)とGIが知られている。

本研究では、これら2つの概日時計遺伝子*ELF3*と*GI*の二重機能欠損変異体*elf3;gi*が、野生型の花成応答とは全く逆になり、短日条件で早咲き、長日および恒明条件で遅咲きになることを、複数の変異アレルの組合せを用いて確認した。これまでにさまざまな概日時計変異体の花成応答が解析されてきたが、このような反転形質を示す変異体についての学術論文報告はない。

短日植物イネにおける花成応答研究で、シロイヌナズナにおけるGI-CO-FT経路が保存されていることが分かっており、長日条件でイネにおいてはCOのオーソログHd1がFTオーソログHd3aを抑制するように働くために遅咲きになると報告されている。このことから、長日植物のシロイヌナズナと短日植物のイネの両方において、COタンパク質の機能が光周性花成において重要であることが分かる。本研究において、*elf3;gi*における光周期応答性の反転形質におけるCOの役割を解析するために、*elf3;gi;co*三重機能欠損変異体を作成した。*elf3;gi;co*は*elf3;gi*と同様に短日条件で早咲き、長日および恒明条件で遅咲きを示した。また、*elf3;co*二重機能欠損変異体は短日、長日両条件下で早咲きであった。このことは*elf3;gi*変異体で起きている光周期応答性の反転現象において、COは重要な働きをしてはいないということを示している。光周性花成において、これまでに主要な経路として知られてきたGI-CO-FT経路以外の光周性経路の存在が示唆された。

審 査 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、概日時計による光周性花成応答の制御に関する分子機構の一端を明らかにしたものである。

シロイヌナズナの概日リズムの中心的な制御因子LHYおよびCCA1と共発現している遺伝子群の中から、新規な概日時計・花成制御因子の単離に成功した。変異形質を指標とした従来の分子遺伝学的手法とは異なるアプローチにより、これまでに研究報告のない機能未知の遺伝子の解析を行った点は評価に値する。*ceci*変異体に見られるような、「振動性の遺伝子発現パターンにおける周期や振幅には影響せず、特定の遺伝子の位相に影響する」という性質はユニークであり、これまでにほとんど研究報告がない。今後の概日時計遺伝子の変異体解析において、有益な情報となる。

本研究ではさらに、概日時計遺伝子である*ELF3*または*GI*遺伝子の変異体を出発材料とし、これらの種子にEMSによる点突然変異導入を行い、光周性花成応答性が長日性から短日性に変換される変異系統を複数単離した。遺伝子マッピングによる染色体座乗位置の決定とシークエンサーによる遺伝子配列解析により、これらの変異系統における長日性から短日性への変換が、*elf3;gi*二重機能欠損変異によるものであることを結論した。

当該研究分野におけるシロイヌナズナとイネを用いたこれまでの研究では、シロイヌナズナのCOとイネのCOオーソログであるHd1の機能の違いが、長日性と短日性の違いを説明する鍵であるとされてきた。本研究では、*elf3;gi*変異体で観察される光周性の反転現象におけるCOの役割を解析するために、*elf3;gi;co*三重機能欠損変異体を作成した。*elf3;gi*と*elf3;gi;co*の花成応答の比較解析から、この反転形質において、COは主要な役割を果たしていないと結論した。CO/Hd1による光周性制御とは異なるメカニズムの存在を強く示唆する研究成果であり、このメカニズムの主要因子探索の契機となりうるものであり、本分野の今後の発展に貢献するものとして高く評価される。

平成26年1月27日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。