

氏名(本籍)	おぐち た いち 小口太一(埼玉県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第3329号		
学位授与年月日	平成16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	生物科学研究科		
学位論文題目	<b>Studies on Circadian Oscillation of Expression of Clock-Controlled Gene AtC401, an Arabidopsis Homolog of PnC401 Which Related to Photoperiodic Induction of Flowering</b> (光周性花成誘導に関連する時計制御遺伝子 <i>PnC401</i> のシロイヌナズナ相同遺伝子 <i>AtC401</i> の発現の概日振動に関する研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	鎌田 博
副査	筑波大学教授	理学博士	神崎 亮平
副査	筑波大学教授	理学博士	白岩 善博
副査	筑波大学助教授	理学博士	佐藤 忍

### 論文の内容の要旨

概日リズムは、内生の自律的振動機構(概日時計)によって制御される約24時間周期で変動する生命現象である。昼夜の長さに応じて生殖器官である花芽の分化を誘導する高等植物の光周性花成誘導も、概日リズムと密接に関連することが示唆されてきた。先行研究により、光周性花成誘導のモデル植物であるアサガオ品種ムラサキから、光周性花成誘導と強く相関した発現様式を示す新規遺伝子 *PnC401* が単離された。興味深いことに、*PnC401* は恒常条件において約24時間周期の自律振動を示した。そこで、*PnC401* の機能および発現制御機構を分子生物学的に解析することを目的とし、モデル植物シロイヌナズナからその相同遺伝子 (*AtC401*) が単離された。*AtC401* はC末領域に *PnC401* と高い相同性を示すドメイン (C401ドメイン) をコードし、*PnC401* と同じ位相の自律的発現振動を示した。そこで、本研究では、*C401* 遺伝子の自律的発現振動に着目し、シロイヌナズナを用い、*AtC401* の転写調節機構の解明を旨として分子生物学的・時間生物学的解析を行った。

まず始めに、*AtC401* のプロモーター領域を同定するため、*AtC401* 遺伝子5'上流領域を含むゲノムDNA配列約7kbpを単離し、塩基配列を決定した。正確な転写開始点を決定した結果、単離した配列中には約900bpの5'上流配列が含まれていた。そこで、5'上流領域を含むゲノムDNA断片にホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*luc+*) を連結した融合遺伝子を構築し、シロイヌナズナに導入し、生物発光によるレポーター発現を観察した。その結果、転写開始点上流174bpと下流73bpを含む断片 (d3断片) は、恒常条件における自律振動を誘起するために十分であった。また、恒常条件におけるこの形質転換体のレポーター発現振動について時間生物学的検証を行った結果、*AtC401* の自律的発現振動は概日リズムの必要条件を満たすことが明らかになった。

次に、d3断片から概日時計に関連するMyb型転写因子CCA1の結合保存類似配列を削除したd4 (-73 ~ +73)断片について検討したところ、d4断片を導入した形質転換植物においても概日発現振動が見られた。しかし、転写開始点下流の配列約70bpを削除した断片では、レポーター遺伝子の発現が見られなかった。

さらに、シロイヌナズナ培養細胞 T87 株を用いて詳細に解析した結果、転写開始点上流 13bp と下流 73bp を含む断片は、概日振動発現を誘起するために十分であることが明らかとなった。この断片は、真核生物の RNA ポリメラーゼ II 型基本転写装置の結合に必要な TATA 配列を含まないことから、*AtC401* の発現は TATA 配列を必要としない転写制御機構によって制御されることが強く示唆された。また、この断片にはイニシエーター配列および 4 回の GAT/AAA の繰り返し配列が存在していた。そこで、4 つの GAT/AAA 配列のうち 3 つを削除したところ、概日振動は失ったが、遺伝子の発現は観察された。これらの結果から、*AtC401* の発現においては、イニシエーター配列が基本プロモーターとして機能し、転写開始点下流の GAT/AAA 繰り返し配列が概日振動発現の制御に機能することが予想された。

TATA 配列を持たない時計制御遺伝子プロモーターはこれまでに報告がない。本研究においては、概日発現振動する *AtC401* の転写が TATA 配列を介さない転写装置によって制御されることを世界で初めて示した。今後、*AtC401* の発現調節に関わる転写装置の解析により、高等植物の概日発現振動制御機構に新たな知見を与えるものと期待される。

### 審査の結果の要旨

本研究では、概日時計制御遺伝子 *AtC401* のゲノム構造を解析し、その概日リズム発現機構を明らかにした。また、*AtC401* の C 末領域に存在する新規ドメイン構造を解析し、異種植物間で高度に保存されていることを示した。本研究は、最近その存在が示された新規ドメイン構造 (Pentatricopeptide repeat protein, PPR) を持つ遺伝子が光周性花成誘導に関係することを示した初めての報告であり、大変意義深い。さらに、本研究では、*AtC401* の転写制御が TATA 配列を介さない転写装置によって制御されることを明らかにした。最近、シロイヌナズナの遺伝子プロモーターの約 2 割が TATA 配列を持たない TATA-less プロモーターであることが報告されたが、高等植物の TATA-less プロモーターの転写制御機構に関する知見はほとんどなく、概日リズム発現を示す遺伝子の報告もない。*AtC401* プロモーターの解析は真核生物の TATA-less 時計制御遺伝子プロモーターに関する最初の報告であり、高く評価される。これまでほとんど明らかにされていない植物における概日発現振動の制御機構の一端を解明した本研究は、植物の発生・分化に関する研究の今後の発展に多大な貢献をするものと強く期待される。

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。