

氏名	くほけんいち 久保 健一
授与学位	博士（工学）
学位授与年月日	平成12年3月23日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科、専攻の名称	東北大学大学院工学研究科（博士課程）生物工学専攻
学位論文題目	植物の生殖過程におけるジンクフィンガー転写調節因子の役割に関する研究
指導教官	東北大学教授 西野徳三
論文審査委員	主査 東北大学教授 西野徳三 東北大学教授 野澤 庸則 東北大学教授 熊谷 泉

論文内容要旨

【1章：序論】植物の器官形成、生殖、および傷害や病害などに対する抵抗性反応など、様々な過程の制御において、転写因子が中心的な役割を果たしていることが知られており、転写因子の単離および機能解析は、遺伝子工学的手法による有用植物の作製に重要な知見をもたらすと期待される。本研究では、転写因子の一種であるTFIIIAタイプジンクフィンガー（ZF）タンパク質に着目し、園芸植物の一種ペチュニアから新たなZFタンパク質遺伝子の単離および構造解析を行った。また、いくつかのZF遺伝子について、雌しべにおける発現パターンの解析を行い、さらに生理学的機能の解析を試みた。

【2章：新奇なZF転写調節因子の遺伝子の単離と構造解析】^{1,2)}植物のZFタンパク質の構造上の類似性を利用し、新規に18種類のZF遺伝子のcDNAをクローニングし、構造を決定した。その結果、18種類の新奇なZF遺伝子が得られ、それらにコードされるタンパク質の構造が推測された(図1)。これらのタンパク質は2つから4つのZFモチーフを持ち、それぞれが長いスペーサーによって隔てられている。スペーサーの長さは最短のZPT2-7の19アミノ酸から、最長のZPT4-2の293アミノ酸まで、多岐にわたっている。これらのような分子種の存在から、個々のZFタンパク質の標的DNA配列の特異性がZFモチーフ間のスペーサーの長さに依存するという、高辻らのモデルが支持された^{1,2)}。また、遺伝子ファミリーの分子進化などに関する考察を行った²⁾。

【3章：雌しべの花粉管伸張経路において発現するZF転写調節因子】³⁾植物の雌性生殖器官である雌しべは、先端部にあつて花粉の受容器官である柱頭と、基部にあつて胚珠を含む子房、それらの間をつなぐ花柱からなる(図2)。第1章において新規に得られたZF遺伝子の発現の器官特異性を調べたところ、一部の遺伝子が雌しべに特異的に発現することを見いだした（ZPT2-10およびZPT3-3）。そこでこれらのZF遺伝子の発現部位を詳細に解析するために、それぞれの遺伝子の上流プロモーター領域とβ-グルクロニダーゼレポーター遺伝子（GUS）の融合遺伝子を持つ形質転換ペチュニアを作出し、これらのプロモーターに誘導されるGUS活性の発現パターンを調べた。

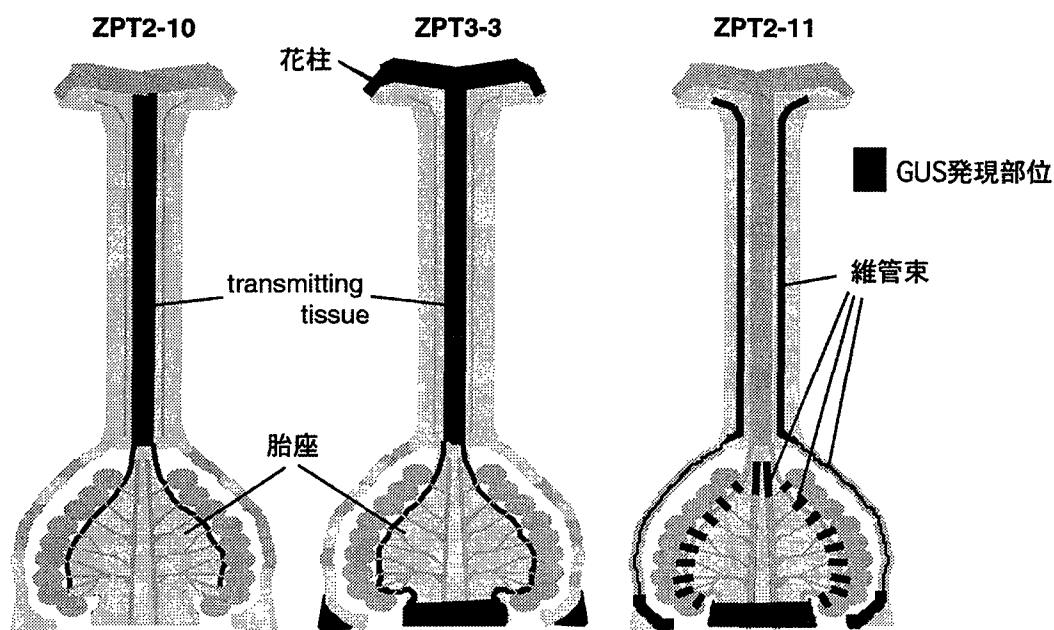


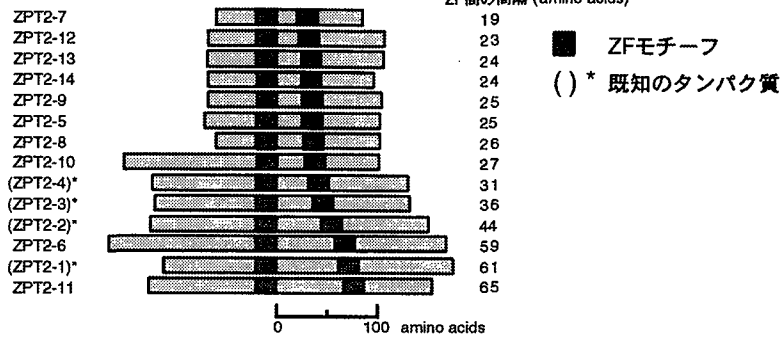
図3. 雌しべにおけるZF遺伝子の発現パターンの模式図

【4章：雌しべの維管束において発現するZF転写調節因子】⁴⁾ 遺伝子発現の器官特異性の解析から、もう一つのZF遺伝子、*ZPT2-11*も雌しべに選択的な発現を示した。上述と同様、この遺伝子上流プロモーター領域とGUSの融合遺伝子をもつ形質転換ベクターを作成し、GUSの発現の分布を調べた。その結果、*ZPT2-11*は雌しべの維管束において特異的に発現することが見いだされた(図3)。ノーザン分析を行ったところ、*ZPT2-11*の発現も*ZPT2-10*同様、雌しべの生長に伴って増加し開花直前にピークに達するというパターンを示した。*ZPT2-11*が発現する維管束とは、水や養分の輸送器官であり、また、生殖に必須のフラボノイド化合物の合成の場でもある。*ZPT2-11*がこれらの過程の制御に関与していると考えると興味深い。さらに、*ZPT2-11*の発現量が過剰となった形質転換体を作製したところ、花のサイズを含めていくつかの変化を生じた。今後この形質転換体のより詳細な解析によって、*ZPT2-11*の機能が解明されると期待される。

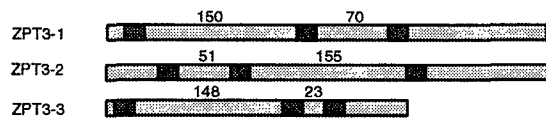
【5章：総括】本研究では、生殖過程やストレス耐性など、さまざまな過程に参与する可能性のある新規転写因子の単離に成功し、それらの分子構造から、DNA配列認識機構および分子進化などに関する情報が得られた。また、雌性生殖器官である雌しべに発現するZF遺伝子の機能解析を試み、その一歩として発現部位を詳細に特定することができた。その結果、ZF転写因子の雌性生殖器官の機能調節への関与が示唆され、今後の研究に重要な情報が得られた。なお、雌性稔性は花の老化と深く関わっていることから、本研究の過程で得られた雌しべ特異的なプロモーターは、雌性稔性を調節することによって花卉の花保ちを改良するなどの遺伝子工学的技術への実用的応用が期待される。

【文献】1) Kobayashi, A. *et al.*, *Plant J.* **13**: 571-576 (1998)、2) Kubo, K. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* **26**: 608-616 (1998)、3) Kubo, K. *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, accepted.、4) Kubo, K. *et al.*, in preparation.

2-フィンガータイプ



3-フィンガータイプ



4-フィンガータイプ

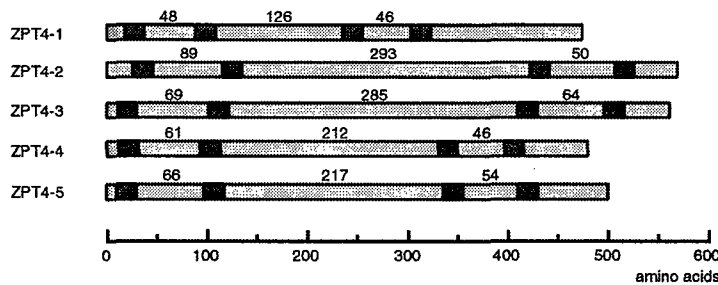


図1. ペチュニアのTFIIIAタイプZFタンパク質の構造模式図

その結果、*ZPT2-10*は花柱の中心軸に位置するtransmitting tissueに、*ZPT3-3*はtransmitting tissueと柱頭に、それぞれ特異的に発現することが見いだされた(図3)。雌しべの生長に伴うこれらの遺伝子の発現の変化をノーザン分析によって調べたところ、*ZPT2-10*の発現は生長に伴って増加し、開花直前にピークに達するパターンを示したのに対して、*ZPT3-3*はほぼ一定レベルの発現を示した。*ZPT2-10*および*ZPT3-3*が発現する組織は花粉管の通り道にあたり、生殖過程に必須の機能を持つ組織である。また、これらの組織には病害抵抗性に関するタンパク質群が豊富に存在し、独特な防御機構を持っていると考えられる。*ZPT2-10*および*ZPT3-3*が雌しべにおいてこれらの機能の制御に関与している可能性が推測される。

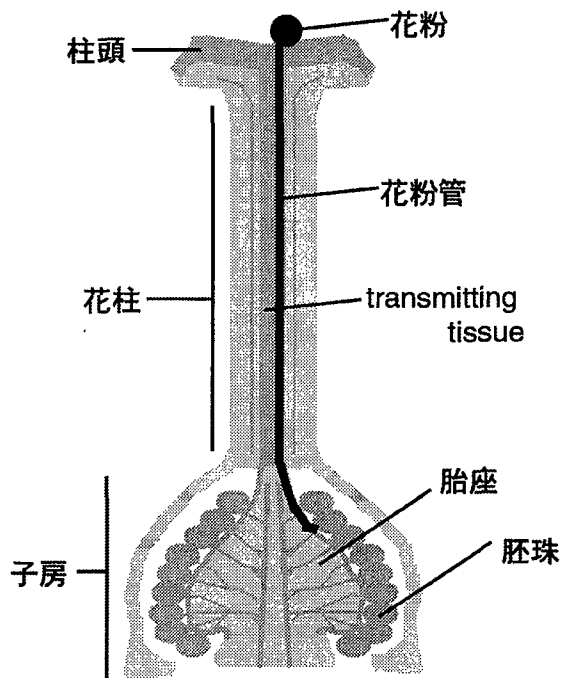


図2. ペチュニアの雌しべの構造模式図

審査結果の要旨

植物の器官形成、生殖、および傷害や病害などに対する抵抗性反応など、様々な過程の制御において、転写因子が中心的な役割を果たしていることが知られており、転写因子の単離および機能解析は、遺伝子工学的手法による有用植物の作製に重要な知見をもたらすと期待される。本研究では、転写因子の一種である TFIIIA タイプジンクフィンガー (ZF) タンパク質に着目し、園芸植物の一種ペチュニアから新たな ZF タンパク質遺伝子の単離および構造解析を行った。また、いくつかの ZF 遺伝子について、雌しべにおける発現パターンの解析を行い、さらに生理学的機能の解析を試みた。本論文は、この研究成果についてまとめたもので、全文 5 章からなる。

第 1 章は序論であり、本研究の背景および目的を述べている。

第 2 章では、新規な ZF 遺伝子の cDNA を 18 種類単離し、これらの遺伝子にコードされるタンパク質の一次構造から、植物の ZF タンパク質に特有の標的 DNA 認識機構、および機能ドメインに関し得られた知見について述べている。また、タンパク質構造の類似性および多様性に基づき、本ファミリーの形成過程における分子進化上のメカニズムに関する考察を行っている。

第 3 章では、新規な ZF 転写因子のうち、ZPT2-10 および ZPT3-3 の発現特異性および機能解析の試みについて述べている。形質転換植物を用いてプロモーター活性の解析を行い、両遺伝子が雌しべの分泌組織において組織特異的に発現することを見いだしている。これらの組織は受粉後の花粉管伸張の経路にあたり、病害抵抗性遺伝子が特異的に発現する組織にも対応していることから、両転写因子が生殖過程または病害抵抗性反応において果たす役割についての可能性を指摘している。また、同研究で単離されたプロモーター DNA について、花保ちの良い花卉の作出など、遺伝子工学的应用における有用性を指摘している。さらに、遺伝子導入によって、それぞれの遺伝子の発現レベルが変化した数種類の形質転換体を得ており、今後の生理学的な機能解析の進展が期待できる。

第 4 章では、もう一つの ZF 遺伝子、ZPT2-11 の発現特異性および機能解析の試みについて述べている。形質転換体を用いてプロモーター活性の解析を行い、雌しべの維管束に特異的に発現することを見出している。また ZPT2-11 の機能を解析するため、遺伝子導入によって本遺伝子の発現レベルが変化した数種類の形質転換体を得ており、そのうち ZPT2-11 を過剰に発現する個体では、花のサイズを含めていくつかの変化を見出している。これらの形質転換体をより詳細に解析することによって、ZPT2-11 の機能が解明されると期待される。

第 5 章は総括である。

以上、要するに本論文は、生殖過程やストレス耐性など、さまざまな過程に関与する可能性のある転写因子の単離に成功し、雌性生殖器官である雌しべにおいて機能する遺伝子に特に着目し、発現パターンから推測される機能および形質転換系を用いた機能解析にも成功したものであり、今後の植物生物学および有用組換え植物の作出を目指した遺伝子工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。