

論文内容の要旨

申請者氏名 Bayarmaa Gun-Aajav

テッポウユリ雄性配偶体形成過程において特異的に発現する新規遺伝子群の解析を引き続き行った。本研究ではテッポウユリ雄性配偶体形成に関与する新規遺伝子産物に関する知見を得る目的で、特に核局在シグナルを有するタンパク質をコードすることが予想される新規遺伝子群に関する研究を集中的に行った。雄性配偶体形成課程の減数分裂前期花粉母細胞由来の cDNA ライブラリークローンの大量塩基配列決定を行い、予想アミノ酸配列から核局在シグナルを含む新規なタンパク質をコードすると思われるものを選抜し、さらに解析を進めた。先ず、それらのタンパク質の核移行活性について調べる目的で、GFP 融合タンパク質としてタマネギ表皮細胞内で発現させた。その結果、明瞭な核移行活性を示す M355、M404、M532 の 3 クローンと細胞質と核の両方に局在する M333 と M411 の 2 クローンを得た。M355 と M532 は機能未詳なタンパク質をコードし、その相同遺伝子がシロイヌナズナ及びイネゲノムにも存在したが、M404 cDNA はテッポウユリ固有のタンパク質をコードすることが判明した。M333 cDNA は細胞分裂時に機能するタバコの NPK1 と類似タンパク質をコードすることが示唆され、M411 cDNA のコードするタンパク質はシロイヌナズナゲノムから推測される機能未詳なタンパク質と相同性が高く、 γ -tubulin 複合体と関与が示された。また、これらの mRNA 発現パターンには特異性があり、発現時期・組織から雄性配偶体形成あるいは減数分裂に関連する可能性が示唆された。

M532 は一般的な核移行タンパク質とは異なる核内局在性を示し、核小体局在性を有する新規なタンパク質であることが判明した。また、相同性検索の結果、M532 は出芽酵母のリボソーム生成に関与する Rpf2 タンパク質と高い相同性を示すことが明らかとなったことから、LIRpf2 と称した。組換え LIRpf2 タンパク質を用いて抗体を作成し、免疫染色および細胞分画法により調べたところ、LIRpf2 タンパク質は減数分裂前期の核小体に局在することが確認された。また、組織別の RNA およびタンパク質ゲルブロット解析の結果から、LIRpf2 の雄性配偶体特異的な発現には翻訳後修飾が関与する可能性が示唆された。さらに、相互作用するタンパク質を探索したところ、Zinc finger モチーフと核局在シグナルを有する RNA 結合領域を含む新規なタンパク質が同定され、LRZ (lily Rpf2-interacting zinc finger protein) と仮称した。LRZ タンパク質のアミノ酸配列は Zinc finger モチーフを除くと既知のタンパク質とは有意な相同性を示さず、テッポウユリ固有の核タンパク質であることが示唆された。LIRpf2 は Rpf2 と高い相同性を示し、同様な核内局在性を示すことから、類似した機能を担うことが想像される。また、LIRpf2 の発現は雄性配偶体形成過程初期に特異的であるため、減数分裂期花粉母細胞におけるリボソーム生成や RNA 代謝に関連する可能性が考えられた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Bayarmaa Gun-Aajav

申請者はテッポウユリ雄性配偶体形成過程において発現する遺伝子の機能を明らかにすることを目的として、テッポウユリ花粉母細胞から作成した cDNA ライブラリーの大量塩基配列決定の結果得られた予想タンパク質アミノ酸配列情報を解析し、核移行シグナルを有する新規タンパク質をコードすると考えられる 5 つの cDNA を選び、詳細な研究を行い、興味深い知見を得ている。

具体的には、得られた cDNA を用いて緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質を発現するプラスミドをそれぞれの cDNA クローンについて作成し、タマネギ表皮細胞に導入して発現させ、それらの細胞内局在を観察しているが、3 種類については新規な核タンパク質である可能性を指摘することが出来、さらに M532 と GFP の融合タンパク質は核小体に局在するという興味深い知見を得ている。さらに、詳細な組織別の mRNA 発現パターンをクローンごとに解析し、それらが雄性配偶体形成に関与する可能性が高いことを指摘している。一連の結果は興味深く資料価値もあり、高く評価できる。

申請者は核小体に局在性を示す M532 が、出芽酵母のリボソーム生成に関与する Rpf2 タンパク質と相同性が高いことを見出し、LIRpf2 と称して、詳細な解析を進めている。その結果、LIRpf2 は発現特異性が高く、雄性配偶体形成過程においてのみ発現し、その発現特異性の決定には転写後制御に関与すること、LIRpf2 タンパク質は減数分裂前期花粉母細胞において核小体に局在すること等を示している。さらに、LIRpf2 の機能に関する情報を得る目的で Yeast two-hybrid screening を行い、LIRpf2 と相互作用する新規なタンパク質をコードする cDNA を同定し、それが RNA 結合ドメインを有することを明らかにしている。以上の知見から、LIRpf2 は減数分裂期花粉母細胞特異的に発現するリボソーム生成あるいは RNA 代謝に関連する機能を持つものと推定するに至っている。高等植物の減数分裂期における RNA 動態やリボソーム生成に関連すると思われる知見は新規性が高く、今後の研究の展開も期待され、非常に重要なものであると考えられる。

以上を要するに、本論文は高等植物の減数分裂あるいは雄性配偶体形成時期に発現する新規遺伝子産物に関する有意義なもので、学術上貢献するところ大であり、本学博士論文としての要件を満たすものであると判断される。