

論文内容の要旨

申請者氏名 尾 形 信 一

LIM cDNA群は、ユリ花粉母細胞において、減数第一分裂期特異的に転写誘導される遺伝子群に対応するcDNAとして、サブトラクションスクリーニング法によって単離された。これらLIM cDNA群中には、既知の遺伝子産物に相同性を示すものが9種類含まれていたが、その予想された遺伝子産物が、既知の遺伝子産物に相同性を示さない、新規なcDNAも9種類含まれていた。本研究では、これら新規なcDNAの中で、LIM5ならびにLIM13 cDNAに着目し、両cDNAがコードする遺伝子産物の性状解明を通して、高等植物の減数分裂過程における新規な知見を得ることを目的とした。

LIM5, LIM13タンパク質の一次構造の解析から、両タンパク質はともに、1) 98%のアミノ酸配列が同一であり、2) N末端領域には疎水性アミノ酸残基に富んだ領域が存在し、3) 塩基性アミノ酸残基のクラスターが存在することが明らかとなった。また、LIM5, LIM13遺伝子の発現様式を明らかにするために、ユリの各組織における両転写産物の発現パターンの解析を行なった結果、両遺伝子共に花粉母細胞において特異的に発現していることが明らかとなった。

次に、LIM5, LIM13タンパク質の細胞内所在を明らかにするために、LIM5, LIM13 全長、および欠失変異体、部位特異的変異体と緑色蛍光タンパク質との融合遺伝子を作製し、タマネギの表皮細胞に遺伝子銃を用いて遺伝子導入を行い、融合タンパク質の細胞内所在を調査した。その結果、LIM5, LIM13タンパク質共に核局在を示し、その核移行には、2分節型の核移行シグナルが機能していることが判明した。

LIM5, LIM13タンパク質のユリ花粉母細胞内における動態を調査するために、抗LIM5/13抗体を作製し、発現様式の解析を行った。その結果、これら両タンパク質は、ユリ花粉母細胞の減数分裂期に特異的に発現・蓄積していることが示された。また、細胞内所在を検討したところ、LIM5およびLIM13タンパク質は核画分から検出され、両タンパク質は花粉母細胞において核に蓄積していることが示された。間接蛍光抗体法によって、細胞内所在を調査したところ、減数第一分裂期の核からシグナルが検出され、特にパキテン期において染色体上に局在する像が観察された。

さらに、酵母 two-hybrid スクリーニング法によって、LIM5, LIM13タンパク質と相互作用する因子の単離を試みた。その結果、ヒストンH2Aが同定された。従って、両タンパク質は、ヒストンH2Aと相互作用することによって染色体上に局在している可能性が考えられた。

以上の知見から、減数分裂期花粉母細胞の核、染色体の動態とLIM5およびLIM13の挙動について考察し、モデルを提唱した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 尾 形 信 一

減数分裂あるいは配偶体形成に関する近年の研究は主に酵母を用いた研究が主流となっており、多細胞生物を用いた当該分野における研究は実験上の制約が大きいために困難であり、その進展は遅れている。そのような状況に鑑み、申請者は、最新の分子生物学の実験技法とユリの実験生物としての特徴を活用し、時間的、空間的なタンパク質レベルでの実験を遂行し、その結果を本論文として纏めている。

申請者はテッポウユリの減数分裂期花粉母細胞において誘導される遺伝子として同定されたLIM遺伝子産物のうち、既知のタンパク質と全く相同性を示さないLIM5およびLIM13について、それらの機能解明を目的として詳細な研究を行った。すなわち、本研究開始時点において、LIM5およびLIM13は疎水性アミノ末端を持つことから、細胞外で機能する可能性が指摘されていたが、本研究により核タンパク質であることが示され、時期特異的に染色体に局在するという興味深い知見を得ている。

具体的には、緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質をタマネギ表皮細胞で発現させ、LIM5およびLIM13は核移行能を持つことを示し、極めて詳細な分子分解による解析の結果、2分節型の核移行シグナルが機能することを明らかにした。次に、LIM5およびLIM13に対する抗体を作成し、免疫学的手法によりテッポウユリにおいても両タンパク質が核内に存在することを証明した。さらに、顕微鏡観察により減数分裂の進行、染色体の動態に呼応して核内の所在様式を変化させている可能性を示唆する結果も得ている。また、酵母のtwo-hybrid systemを用いて減数分裂期の葯から作成したcDNAライブラリーをスクリーニングし、LIM5およびLIM13と相互作用するタンパク質をコードするcDNAを得ているが、これらの一連の研究は厳密かつ周到であり、今後の当該分野研究の指針となるものと考えられる。

本研究の結果、LIM5, LIM13タンパク質は、減数分裂期特異的に発現する新規な核タンパク質であることが示され、特に、相同染色体の対合、組換えが起こるパキテン期においてヒストンH2Aタンパク質と相互作用することによって、減数分裂期染色体を構築することが明らかとなった。高等植物において、減数分裂期の核および染色体の構成成分に関する知見は極めて少なく、本研究で行った、新規タンパク質 LIM5, LIM13の解析によって、高等植物における減数分裂期の核および染色体の構造解明を進める上での重要な手がかりとなる知見である。申請者は上記の内容を具体的かつ簡潔に記述し論文として纏めている。

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に関する有意義なもので、学術上、応用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。