

## 論文内容の要旨

申請者氏名 諸 橋 賢 吾

本研究では雄性配偶体形成過程、特に減数分裂機構の解明を目的として、雄性配偶体形成過程で発現する遺伝子群の大量解析を行い、新規な遺伝子群の機能解析を行った。

第一章ではテッポウユリ (*Lilium longiflorum*) 雄性配偶体形成過程で発現する遺伝子群の大量解析を行った。減数分裂前、減数分裂期、減数分裂後のテッポウユリ葯、および減数分裂対合期の花粉母細胞より作製された cDNA ライブラリーを用いて cDNA の塩基配列情報を取得した。その際、無作為選択による大量解析に加えて、同一クローンの重複選択を回避する新規な手法（セルフハイブリダイゼーション法）の有効性を示し、新手法による大量解析も行った。無作為に選択した 707 個の cDNA クローン群、およびセルフハイブリダイゼーション法によって選択した 1292 個の cDNA クローン群、合計 1999 個の cDNA クローンの塩基配列情報を取得した。機能既知の遺伝子との相同性を指標に cDNA を分類することにより、減数分裂期前後において転写される遺伝子群の変動に関して新知見を得ることができた。

第二章では第一章で行った大量解析によって得られたクローンの中から、転写制御因子と相同性を示すクローン (M1125) とシグナル伝達経路に関与するリン酸化酵素と相同性を有するクローン (M492) について詳細な解析を行った。M1125 クローンの全長遺伝子を *L. longiflorum SCARECROW-like (LISCL)* と名付け発現解析を行ったところ、*LISCL* は恒常的に発現するが、減数分裂初期において発現レベルが比較的高かった。また、GFP 融合蛋白質を用いたタマネギ上皮細胞中での一過的発現系によって *LISCL* 蛋白質は核内に局在し、核局在には二カ所の塩基性アミノ酸領域が必要であることがわかった。*LISCL* 蛋白質はテッポウユリ花粉母細胞内において *LIM10* 遺伝子プロモーターを活性化し *LIM15* 遺伝子を抑制することが示唆された。これらの結果は *LISCL* が花粉母細胞内において転写制御因子として機能することを支持するものである。一方、MAPKKK と相同性を示す M492 クローンの全長遺伝子、*Microsporocyte-specific protein kinase (MISK)* は花粉母細胞特異的に発現し、組換え *MISK* 蛋白質は自己リン酸化能を有していた。

以上のように、本研究では雄性配偶体形成過程における遺伝子発現について、大局的な視点から新たな知見が得られ、減数分裂期において発現する二つの新規遺伝子の特徴を明らかにすることができた。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 諸 橋 賢 吾

雄性配偶体形成過程、特に減数分裂過程の解明は有用作物作出の効率化、遺伝的組換え機構を利用した遺伝子治療など農学や医学への応用を秘めた魅力的な研究対象である。申請者は雄性配偶体形成過程において重要な機能を有する遺伝子群の単離を目的として、テッポウユリ雄性配偶体形成過程における、さまざまな時期および組織で発現する遺伝子群の大量解析を行った。その過程で、セルフハイブリダイゼーション法を考案し、同一クローンの選択を回避するための効率的で簡便な新規手法の開発に成功した。特殊な装置や技術を要求しない手法であるため、その汎用性は高いと考えられる。また、リバーソノーザン法を用いることにより比較的安価で簡便に cDNA クローンの大量発現解析が行えることを示した。過去に雄性配偶体形成過程において大量遺伝子発現解析を行った例はなく、また同時期の異なる細胞種（葯および花粉母細胞）由来の塩基配列データは資料価値が高い。

さらに、申請者は大量塩基配列情報の中から遺伝子発現制御に関連すると考えられる二つの cDNA クローンについて詳細な解析を行い、有用な知見を得ている。具体的には、SCARECROW 遺伝子をはじめとする GRAS 転写制御因子ファミリーと相同性を示す遺伝子、LISCL をテッポウユリから初めて単離した。LISCL は核に局在し、約 400 アミノ酸残基を隔てた塩基性アミノ酸に富む二つの領域が核移行に必要であることを明らかにしている。また、LISCL が花粉母細胞で発現し、さらに減数分裂特異的遺伝子 LIM10 と LIM15 遺伝子の発現をそれぞれ活性化、あるいは抑制化することを示唆する実験結果を得ている。これは、GRAS 遺伝子ファミリーにおいて転写活性化能を有することを示唆した最初の例である。

また、申請者は MAP キナーゼカスケードの最上流に位置する MAPKKK と相同性を有し、花粉母細胞で特異的に発現する遺伝子、MISK の単離に成功した。本研究は花粉母細胞で特異的に発現する MAPKKK の最初の報告である。MISK は N 末端領域にアンキリンリピートを持つなど構造も特徴的で、花粉母細胞において特異的な機能を担っている可能性がある。

以上のように、本論文は高等植物の雄性配偶体形成あるいは減数分裂に関して多くの知見を与える有意義なもので、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。