

論文内容の要旨

申請者氏名 皆見政好

*LIM*遺伝子は、減数分裂過程が同調して進行するテッポウユリの特徴を活かし同定された18種類の遺伝子であり、それらの多くは花粉母細胞特異的に転写される。*LIM18*遺伝子産物は、分子シャペロンとして機能するHSP70に高い相同性し、減数分裂細胞に見られる特徴的な事象（遺伝子組み換え等）に関与することが期待された。本研究では、免疫学的手法およびレポーター遺伝子を用いた方法により、発現様式、細胞内所在を調べた。更に、減数分裂特異的遺伝子の発現調節機構を明らかにするために、*LIM*遺伝子のプロモーター領域を含む断片を単離し、それらの特徴づけを行った。

1. テッポウユリの花粉母細胞において発現するHSP70様タンパク質の解析

(1) 発現様式：ウエスタンブロット解析を行った結果、花粉母細胞の抽出物からは、花粉母細胞特異的なものと、葉、茎においても検出されるHSP70様タンパク質由来のシグナルが確認された。(2) 細胞内所在：テッポウユリ花粉母細胞の抗体染色を行うと、核を含む細胞全体からシグナルが検出された。また、花粉母細胞を用いた細胞分画実験の結果から、この抗体に反応性を示すものは、核にも存在することが示された。GFP融合タンパク質を用いた解析では、*LIM18*は核移行能を持つHSP70様タンパク質であることが示唆された。以上の結果から、高等植物の減数分裂細胞には、発現様式の異なる複数のHSP70様タンパク質が、核および細胞質において働くことが示唆された。

2. *LIM*遺伝子のプロモーター領域の単離および特徴づけ

(1) プロモーター領域の単離：ユリはゲノムサイズが大きいため、PCR法を用いて、プロモーター領域を含むDNA断片単離を試み、*LIM10*、*LIM12*、*LIM15*および*LIM18*遺伝子のプロモーター領域を単離した。(2) プロモーターの特徴づけ：遺伝子銃を用いてプロモーター活性を測定したところ、*LIM*遺伝子のプロモーターの働きは、細胞・組織特異的に制御されており、体細胞組織では抑制されているものと考えられた。

*LIM10*および*LIM18*遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子を連結したものを導入した形質転換タバコを作成し、それらを用いて発現様式を調べた。その結果、*LIM18*遺伝子プロモーターは、減数分裂細胞、一核性小孢子、二細胞性花粉において特異的に働くことが示された。一方、*LIM10*遺伝子プロモーターは、二細胞性花粉形成時期のヤク、成熟花粉で高い活性を示した。テッポウユリの*LIM*遺伝子のプロモーターが、タバコの雄性配偶体形成過程においても働くことから、高等植物の生殖細胞形成時期に働く遺伝子の発現調節には、類似の制御機構が広く存在する可能性が示された。また、*LIM18*遺伝子のプロモーターは減数分裂時期より以降に、*LIM10*遺伝子のそれは二細胞性花粉形成時期より以降に働くことから、これらのプロモーターは異なる時期の生殖細胞における外来遺伝子発現系の構築に使用可能であると考えられた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 皆見政好

申請者は減数分裂期特異的な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単離されたHSP70様タンパク質をコードする*LIM18*遺伝子について遺伝子産物の動態、さらには発現制御機構に至る詳細な解析を試み、重要な新知見を数多く得ている。

具体的には、*LIM18*タンパク質抗体を作成し、それを用いた詳細な解析を行い、減数分裂期花粉母細胞において抗原性の類似する複数のHSP70様タンパク質が存在する可能性を示した。さらに、免疫組織化学的手法と緑色蛍光タンパク質を用いることにより、*LIM18*タンパク質が細胞質のみならず、核内にも存在することを明らかにした。このことは、*LIM18*が減数分裂期の核あるいは染色体の構築・動態に直接関連する可能性を示唆するものであり、興味深い知見として評価できる。

次に、申請者は減数分裂期特異的に発現する*LIM*遺伝子群の発現制御機構を明らかにすることを企図し、そのための第一段階として、*LIM*遺伝子群のプロモーター領域の単離を行った。テッポウユリのゲノムは 1.0×10^{11} 塩基対以上であり、ヒトゲノムの30倍以上、シロイヌナズナの1000倍近い大きさがある。従って、任意のゲノム断片を得るためには通常のゲノムライブラリーをスクリーニングする方法は非効率的で、現実的でない。そこで、申請者はPCR法による手法を試み、数種*LIM*遺伝子群のプロモーター領域を単離することができた。これは、巨大ゲノム生物からのプロモーターの単離例としては最初のものであると思われる。また、申請者はレポーター遺伝子を用いた遺伝子銃による一過性発現解析により、*LIM*遺伝子の組織特異性は、プロモーター領域によって主に転写レベルで制御されていることを示した。

さらに、申請者は形質転換タバコを用いた実験により、テッポウユリ由来の*LIM10*および*LIM18*遺伝子群のプロモーターが分類学的に遠いタバコにおいても機能し、組織特異性を示すことを明らかにした。これは雄性配偶体形成あるいは減数分裂特異的な遺伝子発現制御機構が、植物において高度に保存されていることを示唆するもので、当該研究分野における重要な知見であると考えられる。

また、これまでのところ、組織特異性の高い、高等植物の減数分裂期特異的なプロモーターは例が無く、本研究で単離されたプロモーターの学術上・応用上の利用価値は高い。そこで、*LIM10*および*LIM18*遺伝子群プロモーターに関して、申請者の研究に基づいた特許を出願している。

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。