

所 属 (主指導教官)	分化・形態形成学講座 (横田 明穂教授)		
氏 名	西井 晶子	提 出	平成 12年 1月 6日
題 目	シロイヌナズナの花芽特異的に発現する ジンクフィンガータンパク質遺伝子ZIMの解析		
<p>動物では、胚発生の過程で細胞の分化と器官の発生は一過的に起こるのに対して、植物では胚発生時にはっきりとした細胞の分化の方向性は決定されておらず、植物特有の分裂組織によって生涯を通じて分化を繰り返す。植物体は発芽後栄養成長を続けるが、光、温度等の環境要因、並びに個体齢や栄養状態などの内的要因によって生殖成長に転換し、それまで葉の原基を次々と生み出していた栄養成長分裂組織が、花序分裂組織に転換する。花序分裂組織から細胞分裂を繰り返し花序を生長させるとともにその脇に花分裂組織を生じる。花分裂組織は花器官原基が形成され、がく、花弁、雄ずい、雌ずいに分化する。このような発生と分化という生命現象は遺伝的プログラムによって制御されており、その制御機構には遺伝子の転写制御が深く関わっている。本研究では花序分裂組織の分化に着目し、シロイヌナズナをモデル系として花芽分化における遺伝的プログラムを解明することを最終目的としている。そのためシロイヌナズナ均一化 cDNAライブラリーを用いて花芽特異的な低発現性の遺伝子群が単離された。その中でも特に転写制御に関与すると思われる遺伝子についての単離、並びにその構造と機能の解析を行った。</p> <p>花序茎頂の分化と維持に関わる遺伝子の発現の制御に関与する遺伝子の系統的単離を目的に、均一化cDNAライブラリーを用いたディファレンシャルハイブリダイゼーションにより、選抜された花芽特異的に低発現性と予想される遺伝子群を単離した。この結果より、新規の遺伝子が多く見つかり、均一化cDNAライブラリーを用いた遺伝子のスクリーニングは、これまで生体内で発現量が僅かであるため単離が困難であった新規の遺伝子を効率良く単離できる方法であることが判明した。また、384個の遺伝子の中から無作為に選んだ遺伝子の発現解析より、多くの遺伝子が主に花芽、それに加えて花芽でも発現していた。以上の結果、均一化cDNAライブラリーを用いたディファレンシャルハイブリダイゼーション法は、組織特異的に低発現する遺伝子を単離するために非常に有用な方法であることが判明した。そこで、選抜された遺伝子群の中から、アミノ酸配列相同性検索より転写に関わる遺伝子と相同性を示した遺伝子を選抜し、これらの発現の組織特異性を調べた。その結果、1つの遺伝子が花序特異的に発現しており、花序の発達における遺伝子の発現制御に関わる遺伝子の最も有力な候補として考えられ、この遺伝子について詳細な解析を行った。</p> <p>この花序特異的に発現し、転写制御に関わると推測される新規の遺伝子は、ジンクフィンガーを持ち、その発現部位から、ZIM (<i>Zinc finger protein expressed in Inflorescence Meristem</i>) 遺伝子と命名した。ZIMは、C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C型のジンクフィンガードメインを1つだけ持ち、GATA-1タイプのジンクフィンガーを持つ転写因子群とフィンガー部分において有意な相同性を示した。典型的な GATA-1 ジンクフィンガーは2つのシステインに挟まれたアミノ酸は17、あるいは18残基である。し</p>			

かし、ZIMはこのアミノ酸が20残基であることから、GATA-1タイプのジンクフィンガーに属するが、新規のジンクフィンガーを持つことが判明した。また、ZIMは、ジンクフィンガードメインの他に、ヘリックス-ターン-ヘリックス領域(HTH)、核移行シグナルとなる塩基性領域、転写活性化領域と思われる酸性領域とグルタミンに富む領域を持っていた。これらの構造的特徴から、ZIMは転写因子であると期待された。ZIMは、1つのジンクフィンガーとHTHを持つことが予測されたが、ZIMが転写因子である場合、この2つのDNA結合ドメインによって標的遺伝子との結合特異性を上げている可能性が考えられる。このようにZIMは、転写因子として機能的なドメインを持つことが明らかとなった。

また、Green fluorescence protein レポーター遺伝子を用いたZIMの細胞内局在部位の解析により、ZIMは核局在性タンパク質であることが明らかとなった。これにより、ZIMはさらに強く転写因子として機能するタンパク質であることが示唆された。ZIMの塩基性領域は、RKKRとKKVRが6アミノ酸残基によって分断されている配列(RKKR-X6-KKVR)を含んでいる。今回の結果から、ZIMは、RKKR配列だけでは核局在能を持つことは不可能であり、RKKR配列とその後に続くKKVRが核局在に必要であることが明らかとなった。このことから、ZIMの核移行シグナルはbipartite型であると判断された。

シロイヌナズナ植物体におけるGUSレポーター遺伝子を用いたZIM遺伝子の発現部位の解析結果から、ZIMは雄ずいと雌ずい、花茎伸長前の花序茎頂と托葉で発現していることが明らかとなった。また、花序茎頂においては、特に分裂組織内で発現していると考えられ、ZIMは花序分裂組織の発達に関与している可能性が考えられる。しかしながら、ZIMは、花茎伸長前においては、花序茎頂で発現し、花茎が伸長しはじめるとその発現は弱まっていくことから、花茎の伸長と花序茎頂の発達の間には何らかの相関関係があり、ZIMがそれに関わっている可能性も考えられる。一方、雄ずいと雌ずいに発現が見られたことから、これらの器官の形成と維持にも関わる遺伝子であると思われる。これまでに、ZIMと同様な発現様式を示す遺伝子は単離されておらず、植物体内における詳細なZIMの発現解析を行うことは非常に興味深いと思われる。

また、植物体内におけるZIM遺伝子の機能を調べるために、ZIM遺伝子内にT-DNAが挿入された形質転換植物体を6000のタグラインより選抜した。この形質転換体は、ZIM遺伝子の開始コドン340bp上流にT-DNAが挿入されていた。この形質転換体と野生型の表現型を比較したところ、形質転換体の側枝の花序は、花序茎頂が欠失し、異常な花が形成されたために、有限花序になっていた。また、雄ずいと雌ずいにおいても器官の変異と欠失が観察された。このことから、ZIM遺伝子は、花序分裂組織の分化、雄ずいと雌ずいの形成、維持に関わる遺伝子であると推測された。

以上の解析より、ZIMは花茎伸長前の花序茎頂の分化と花器官の形成、維持に関わる転写活性化因子である可能性が考えられた。今後、さらにシロイヌナズナの花芽形成時の遺伝子制御機構におけるZIM遺伝子の機能の解明が望まれる。そのためには、ZIMが転写因子であるならば、その標的遺伝子の単離、その結合配列の同定を行う必要がある。また、ZIM遺伝子が、花芽形成時に関わる遺伝子の制御ネットワークにおけるZIM遺伝子の位置づけを行うことも重要である。これらの解析によって、花芽形成に関わる遺伝子の発現制御機構の一部が明らかになり、茎頂分裂組織の形成維持、器官発生の機構、花芽分化に関わる遺伝子の制御ネットワークの解明に貢献できるであろう。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 西井 晶子

本論文は、シロイヌナズナを材料に、植物の花序茎頂分裂組織の機能を分子レベルで明らかにするため、効率的なディファレンシャルスクリーニング系の開発およびこれを用いた花序茎頂に低レベルで発現する遺伝子の系統的単離、ならびに、上記の単離により見いだされた新規のジンクフィンガータンパク質遺伝子*ZIM*の構造および機能解析に関するものである。本論文の主要な成果は下記の通りである。

第1章では、均一化 cDNA ライブラリーのマクロアレイを用いたディファレンシャルスクリーニング法を開発し、実際にスクリーニングを進めた。花序茎頂由来の均一化 cDNA ライブラリーを用いて、花序茎頂特異的低発現性の遺伝子候補を系統的に 384 コ単離した。スクリーニングにより得られた遺伝子の一部の転写物蓄積を解析した。10%程度はスクリーニングのエラーと思われる構成的な発現を示すものの、残りは概ね茎頂特異的な発現を示した。上記のスクリーニングにより得られる遺伝子群について塩基配列を決定して機能分類を行った。その結果、低発現性で発現特異性をもつと考えられるものには、これまでに発現する遺伝子として論文やデータベースに記載されていないものの比率が高いこと、細胞のシグナリングや転写制御に関わることが考えられるものが多数存在することがわかった。すなわち、効率的に遺伝子の発現特異性および発現レベルを分析する方法を確立するとともに、得られた花序茎頂特異的に低発現性遺伝子の機能的に分類し、評価することに成功した。

第2章では、上述のスクリーニングにより得られた遺伝子の中から転写制御に関わると考えられる遺伝子*ZIM*に注目して解析を進めた。*ZIM*は新規なGATA1タイプのジンクフィンガーモチーフを持つことに加え、酸性アミノ酸に富む領域、グルタミンに富む領域、核移行シグナルをもつ塩基性アミノ酸に富む領域、ヘリックスターナーヘリックスからなるモジュラー構造をもつタンパク質をコードすることがわかった。それぞれの領域が異なるエクソンにコードされていることは進化的にも興味深い。また、実験的に、*ZIM*タンパク質の核局在を明らかにし、*ZIM*が転写制御に関わる可能性を示唆した。レポーター遺伝子を連結した*ZIM*プロモーターを利用した組織レベルでの発現解析を行い、花茎伸長直前の生殖生長期茎頂で遺伝子発現すること、ならびに、その発現が茎頂の状態により変化することを示した。T-DNAによる遺伝子破壊株の同定にも成功した。今後の花序茎頂の形成/維持に関する*ZIM*の機能解析が期待される。

以上のように、本論文は新規な方法論の開発、その利用による遺伝子の系統的単離、ならびに、単離された遺伝子のひとつ*ZIM*の構造と発現と特異性を明らかにしたもので、また、今後の機能解析の方向性を示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。