

## 論文内容の要旨

博士論文題目 Functional Analysis of LIM14 Gene Induced During Anther Development in Lily.

(薬の発達過程において発現が誘導されるユリLIM14 遺伝子の機能解析)

氏 名 Mousavi Amir (ムサヴィ アミール)

(論文内容の要旨)

(1, 200字程度)

減数第一分裂前期、特に細糸期から対合期にかけて特異的に発現する遺伝子が18ヶ単離され、LIM1-LIM18 と呼ばれている(小林等、1994)。この内のホモロジー検索で相同性遺伝子が発見できずその機能が未知である遺伝子の一つにLIM14遺伝子がある。この遺伝子の発現様式とLIM14 タンパク質の機能解析を行った。

1. LIM14 mRNA は減数分裂前期から成熟花粉まで存在するのみならず、その中の花粉母細胞が減数分裂前期に入る葯壁細胞にも検出できる。LIM14 関連遺伝子は茎、葉、萼片、雌蕊でも発現しているが、その転写物はLIM14 の転写産物より短い。
2. 遺伝子特異的プライマーによるRT-PCR 解析は LIM14 mRNA が葯内に高レベルに存在することを示した。
3. グリシンに富むLIM14タンパク質の機能解析の為、アフィニティ精製した抗体を作成し、ウエスタン法とFISH 法により、LIM14 タンパク質の局在と消長を調べた。LIM14 タンパク質は15 kD の分子として検出され、減数分裂初期の葯や花粉母細胞では少なく、4 分子期から増加を始め、半数体細胞分裂をし澱粉粒を蓄積している未熟花粉で最大量となり、花粉が成熟すると消滅する。LIM14タンパク質は葯の細胞(胞子体)内でも花粉(配偶体)内でも常時澱粉粒に分布する。これは、生化学的解析でも証明された。LIM14 mRNA の出現時期とLIM14 タンパク質の出現時期の間にズレが発見された。
4. レポーターGUS 又はGFP遺伝子を連結し、35S プロモーターをつけたLIM14 遺伝子をタマネギ表皮細胞、タバコBY-2細胞に遺伝子銃法により導入すると、細胞内で一過的に発現し、澱粉粒や色素体に移行し結合する。LIM14タンパク質なしでは、レポーターは細胞質内全体に拡散したままで留まる。このような細胞質内顆粒への移行はLIM14タンパク質のN端の疎水性領域に依存し、この部分があれば十分にタンパク質分子を色素体顆粒だけに局在させる機能を示す。
5. 遺伝的解析が可能なシロイヌナズナにLIM14 相同遺伝子を発見した。
6. LIM14タンパク質は葯内(花粉と花粉母細胞を含めて)特異的に発現するグリシンリッチタンパク質として初めて解析された。

今後の研究課題は：LIM14 の転写と翻訳産物の出現の間に見られる時間的ズレの理由、澱粉粒形成過程のどのステップにLIM14 が働くのか、アラビドプシスを使ってLIM14 の生体内機能を証明する事等である。

氏名	Mousavi Amir
----	--------------

(論文審査結果の要旨)

## 葯の発達過程において発現が誘導されるユリ LIM14 遺伝子の機能解析

高等植物の有性生殖過程は花芽分化、花の中の葯の形成、子房と雌薬の形成、それに続いて雄性器官では葯内の精母細胞の分化と減数分裂、4分子から花粉形成、花粉内での半数体細胞の分裂等で特記される。成熟花粉は雌薬柱頭に就いて発芽し花粉管を伸長させ胚珠に到達し重複受精を行う。このような複雑で長時間にわたる形態と機能の変化はエネルギーを必要とするが、澱粉がそのエネルギー源の一部であると考えられてきた。本論文は澱粉の蓄積は最初葯壁細胞に現れ、減数分裂の後半から花粉形成時に花粉の中に澱粉粒が大量に出現し、葯の細胞から減数分裂中の花粉母細胞に糖の形で澱粉が輸送され分裂終了後澱粉に再構築されている事を示している。減数分裂前期にRNAやタンパク質の合成を阻害すると澱粉形成も抑制される事から、有性生殖のエネルギー源である澱粉蓄積に転写と翻訳が極めて重要だと考えている。

本論文は減数第一分裂前期に特異的に発現する LIM14 遺伝子とその転写産物、LIM14 mRNA を、その後の減数分裂細胞内と半数体生殖細胞内に存在させ、その翻訳産物である LIM14 タンパク質を花粉細胞内の澱粉粒と結合・共存させることを明らかにしている。LIM14 タンパク質はN端の疎水性領域を使って色素体や澱粉粒に選択的に移動し、その機能は適切なプロモーター存在下で生殖系細胞のみでなく体細胞でも明白示されている。然し、植物体内では LIM14 は茎、葉、根、萼片等殆どの体細胞組織では発現せず、体細胞では LIM14 に相同な遺伝子が発現し、より短い転写産物を産出している。本研究で用いた抗 LIM14 抗体は体細胞の澱粉粒や色素体とは反応しない特異的なものであり、生殖に関するエネルギー源と体細胞のエネルギー貯蔵の構造を区別する貴重なものである。

更に、減数分裂特異的遺伝子として単離されたもの (18ヶ) の中に減数分裂以後の過程で働く遺伝子 (LIM14) が存在する事、その翻訳産物が花粉内で最初に報告されたグリシンリッチタンパク質である事、減数分裂直後に見られる顕著なリボソーム合成と LIM14 タンパク質の形成に平行がみられる事等この分野での研究に全く新しい知見を提供し貢献をしている。又、葯から花粉への炭水化物の移動機構、LIM14 遺伝子の転写と翻訳にみられるズレの原因、体細胞から生殖細胞への遺伝子発現切り替えの機構、LIM14-突然変異株を使った分子遺伝学的解析等興味ある点に展開する事を示している。分子遺伝学的解析は *Arabidopsis* で相同遺伝子を検出し、研究の進行を示している。

以上の点から本論文を博士学位論文として認定した。