

学位論文審査の結果の要旨

氏名	中村 真也
審査委員	<p>主査 中川 強 (印)</p> <p>副査 松下一信 (印)</p> <p>副査 板井章浩 (印)</p> <p>副査 西村浩二 (印)</p> <p>副査 川向 誠 (印)</p>
題目	Arabidopsis thaliana 低分子量分泌タンパク質の発現解析
<p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>申請者は植物での低分子量タンパク質による局所的信号伝達に興味を持ち、実験に必要な技術開発も含め研究を行った。その結果は3編の学術論文として発表あるいは受理されている。今回はこれらの成果をもとに、学位申請がなされた。</p> <p>植物の成長・発達においてシグナル伝達は不可欠な過程である。細胞外分泌型の低分子量分泌タンパク質は植物の病害応答、物質輸送、そして形態形成を含む多様なメカニズムを調節している。低分子量分泌タンパク質は細胞表面のレセプターに結合し、細胞外から細胞内に信号が伝達される。シロイヌナズナゲノムには多くの低分子量分泌タンパク質がコードされている。しかしながら、それらのタンパク質の大部分は未だ機能が解明されていない。遺伝子の発現解析は、タンパク質の機能解析のための最初のステップである。シロイヌナズナの遺伝子発現は、マイクロアレイ解析により様々な条件下で調査されている。マイクロアレイ解析は網羅的な手法として優れているが、一方で組織・細胞単位の解析や発達ステージごとの解析は困難である。組織・細胞単位の詳細な発現解析にはシロイヌナズナ植物体を用いたプロモーター：レポーター解析が適しているが、多くの形質転換植物体を作製するためには優れたシステムが必要である。そのため、申請者の研究では植物形質転換用ベクターシステムの開発も同時に行われた。</p> <p>シロイヌナズナなどの植物では、植物形質転換用ベクターにクローニングしたDNA断片を、アグロバクテリウムを介して植物体へ遺伝子導入する方法がよく使われている。しかし、植物形質転換用ベクターへのクローニングは、ベクターのサイズの大きさや制限酵素サイトの制約のために、困難であった。これらの問題を解決するために、組み換え反応に基づく植物形質転換用 Gateway vector が開発された。以前の研究でカナマイシン耐性ベクターシリーズ (pGWB4xx) またはハイグロマイシン耐性ベクターシリーズ (pGWB5xx) の2種類のシステムが開発されていた。これらのベクターはサイズが小さく、高いコピー数を持つので、目的遺伝子を容易にクローニングすることが出来る。またこれらのベクターは sGFP, GUS, LUC, EYFP, ECFP, G3GFP, mRFP, 6 x His, FLAG, 3 x HA, 4 x Myc, 10 x Myc, GST, T7, TAP の15種類のタグまたはレポーターのいずれかをもち、様々な実験に用いる種々の発現クローンを容易に作製することを可能とした。</p>	

一方で、R4pGWB システムは *attR4-Cm^r-ccdB-attR2* の受容部位を持ち、*attL4-attR1* タイプのプロモーターエントリークローンと *attL1-attL2* タイプの cDNA エントリークローンを連結してクロニングすることが可能なシステムである。これらのベクターは非常に有用であり、植物の研究によく使われている。

申請者はまず、プロモーターレポーターコンストラクトを容易に作製することが可能な R4L1pGWB ベクターの開発を行った。R4L1pGWB は受容部位として *attR4-attL1* カセットを持ち、LR 反応により *attL4-promoter-attR1* エントリークローンを組み込むことができる。レポーターは GUS, LUC, eYFP, eCFP, G3GFP, TagRFP, G3GFP-GUS を揃えた。R4L1pGWB では 1 種類のエントリークローン *attL4-promoter-attR1* を用いるため、非常に効率のよいクロニングが可能であった。このベクターによりプロモーター：レポーター実験を効率よく行えることを明らかにした。

次いで申請者は、bialaphos 耐性遺伝子をもつ植物形質転換用 Gateway ベクターの開発を行った。バックボーンとして pGWB4xx や pGWB5xx と同じくサイズが小さく、コピー数が大きい pPZP を用いてビアラフォス耐性遺伝子 (*bar*) マーカーを持つ pGWB6xx および R4pGWB6xx シリーズを開発した。これらは従来の pGWB または R4pGWB と同じタグやレポーターを備えおり、様々なクロニンの作製に用いることが可能である。これらベクターを用い、モデル実験としてシロイヌナズナやイネ、タバコ培養細胞の形質転換を行ったところ、良好な結果が得られた。カナマイシン、ハイグロマイシンに続く第 3 のマーカーシリーズとして植物研究に広く利用可能であることを報告した。

申請者は上記の研究成果を応用し、さらにシロイヌナズナの低分子量分泌タンパク質をコードする遺伝子の網羅的な発現解析を行った。申請者はシロイヌナズナの低分子量タンパク質として、シグナル配列を持ち 100 アミノ酸以下のタンパク質をコードする *ATSP* 遺伝子をシロイヌナズナデータベースから抽出した。そして、122 の *ATSP* 遺伝子についてプロモーターレポーターによる発現解析を行なった。その結果、79 の遺伝子がシロイヌナズナ実生のいずれかの領域において発現しており、37 の遺伝子が特異的な領域で発現していることが分かった。これらの結果を発現パターン、系統樹との関連も交えてまとめ、低分子量タンパク質の機能解析のための重要な情報として報告した。

以上のように申請論文は技術開発を含めた植物低分子量タンパク質遺伝子の網羅的な発現解析を行い重要な情報を示した研究成果であり、大学院連合農学研究科の博士（農学）の学位に値するものと認められた。