

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	SULTANA MST MOMTAZ
審 査 委 員	<p style="text-align: center;">主 査 中川 強 <span style="float: right;">(印)</span></p> <p style="text-align: center;">副 査 明石 欣也 <span style="float: right;">(印)</span></p> <p style="text-align: center;">副 査 松井 健二 <span style="float: right;">(印)</span></p> <p style="text-align: center;">副 査 江角 智也 <span style="float: right;">(印)</span></p> <p style="text-align: center;">副 査 蜂谷 卓士 <span style="float: right;">(印)</span></p>
題 目	<p style="text-align: center;">Development of binary vector systems for promoter assay and expression analysis of AtMLLR genes in <i>Arabidopsis thaliana</i> (プロモーターアッセイのためのバイナリベクターシステム開発とシロイヌナズナにおける AtMLLR 遺伝子の発現解析)</p>
<p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>植物科学において着目遺伝子の発現パターンをあきらかにすることは極めて重要であり、様々な手法で解析が行われている。それらの中で蛍光タンパク質をレポーターとするプロモーター：レポーターアッセイは生きた植物での詳細な発現解析が可能な優れた方法である。しかしながら発現が弱いプロモーターでは蛍光シグナルの検出が困難なことがあり、改善が望まれていた。そのため申請者はオルガネラ標的蛍光タンパク質を活用し、検出感度が高い植物プロモーター解析用ベクターシステムの開発を試みた。また、発現解析にプロモーター：GUS が併用されることが多いが、そのためにはプロモーター：蛍光タンパク質導入植物、プロモーター：GUS 導入植物をそれぞれ作製する必要があった。そこで申請者はプロモーター：蛍光タンパク質とプロモーター：GUS をひとつのバイナリベクターに組み込み、ひとつの形質転換植物でプロモーター：蛍光タンパク質とプロモーター：GUS の両解析を行うことが可能なシステムの開発を試みた。さらにこれらベクターシステムを活用してシロイヌナズナ AtMLLR 遺伝子の発現解析を試みた。</p> <p>正しい局在を示すオルガネラ標的蛍光タンパク質として、シロイヌナズナ endo-xyloglucan transferase の ER 移行シグナルと ER 残留シグナル (HDEL) を付加した sGFP (ER-sGFP)、SV40 の核移行シグナル (NLS) を付加した sGFP (NLS-sGFP)、ペルオキシソーム標的シグナル (SKL) を付加した sGFP (Px-sGFP)、シロイヌナズナ F<sub>1</sub>ATPase <math>\gamma</math> サブユニットのミトコンドリア移行シグナルを付加した sGFP (Mt-sGFP) が知られていた。申請者はこれらと同じシグナルを持つ TagRFP を新規に作製し、オルガネラ標的 sGFP およびオルガネラ標的 TagRFP のベクターシリーズ計 56 種のバイナリベクターを構築した。次いで申請者はシロイヌナズナ由来の弱いプロモーター 2 種 (ProP1-PK <math>\beta</math> 1、ProMYB21)、誘導性プロモーター 2 種 (ProDALL2、ProKAT2) を用いた発現解析を行った。その結果、通常の sGFP では蛍光の検出が困難な ProP1-PK <math>\beta</math> 1、ProMYB21 でも、NLS-sGFP や Px-sGFP では明瞭な蛍光シグナルが得られ、高感度プロモーターアッセイが可能であることがあきらかとなった。また ProDALL2、ProKAT1 の実験において、通常の sGFP では検出が困難な非誘導時の弱い発現が NLS-sGFP では検出可能であることもわかった。</p> <p>次いで申請者はプロモーター：GFP とプロモーター：GUS を一つのバイナリベクターに組み込むことが可能な dual-promoter:reporter Gateway クローニングシステムを開発し、遺伝子発現解析を行った。マレクチンはアフリカツメガエルで発見された二糖 (マルトース) 結合性 ER タンパク質で、動物に広</p>	

く存在し、ER 内での糖鎖付加の制御に関わると考えられている。植物では CrRLK1L ファミリーの受容体型キナーゼ細胞外領域にマレクチン様ドメイン (MLD) が存在することが知られており、アポプラストにおける信号の受容を行っていると考えられている。シロイヌナズナには17種のCrRLK1Lが存在し、10種については機能解析が行われている。申請者は植物におけるマレクチン様ドメインの機能をより詳細に解明するため、まずシロイヌナズナゲノム配列から受容体型キナーゼ以外のマレクチン含有タンパク質遺伝子を探索し、4種の遺伝子を見出した。それらはマレクチン様ドメインとロイシンリッチリピート (LRR) を持つもので、AtMLLR1~AtMLLR4 と名付けられた。いずれもシグナルペプチドを持ち、AtMLLR1 と 2 は膜貫通領域も持つ膜局在タンパク質、AtMLLR3 と 4 は細胞外タンパク質と推測された。申請者は AtMLLR2 と AtMLLR3 について、dual-promoter:reporter Gateway クローニングシステムにより発現解析を行った。その結果、これら遺伝子が種々の領域で発現し、AtMLLR2 については特に花粉、孔辺細胞、トライコームで、AtMLLR3 については特に根端、花糸と葯の連結部で発現することが示され、これらの部位で機能していることが推測された。

以上のように申請者は植物遺伝子の発現解析に有用なベクターシステムを開発し、同システムを活用してシロイヌナズナ AtMLLR 遺伝子の発現パターンをあきらかにした。これらの成果は植物におけるマレクチン様ドメイン機能解明への重要な知見をもたらし、また植物遺伝子の発現解析にも大きく貢献するものである。これらのことより、本委員会は本論文を学位論文として十分価値があるものと判断した。