

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中山 明

本論文は、双子葉植物であるアサガオの種子成熟過程におけるジベレリンの生理的役割を明らかにすることを目的として行った研究の結果をまとめたものであり、5つの章から成っている。

第1章は序論にあてられている。単子葉植物と双子葉植物それぞれの種子におけるジベレリン(GA)の機能に関するこれまでの研究について概説し、申請者が行うアサガオ未熟種子を対象としたGAの機能に関する研究の位置づけについて論じている。

第2章においては、主に免疫組織化学的解析からアサガオ未熟種子中に存在する活性型GAと α -アミラーゼ *PnAmy1* との関連性について述べている。まず、アサガオ未熟種子中の活性型GAの内生量をイムノアッセイにより測定し、開花後9日目(9-DAA)から12-DAAにかけて急増し、その後、減少することを示した。また、主要な活性型GAとしてはGA₁およびGA₃がほぼ等量ずつ存在することをGC/MSにより確認した。続いて、活性型GAの免疫組織化学を行い、9-DAA頃から珠皮(Integument)に局在することを確認した。また、その近傍に存在するデンプン粒がGAの消長に伴って分解される様子が観察されたことから、GAが珠皮中のデンプン粒の分解に関与すると推論し、その検証を目的として未熟種子中で発現する α -アミラーゼ遺伝子 *PnAmy1* の完全長 cDNA をクローニングした。つづいて、ノーザン法により、本遺伝子が明瞭なGA応答能を有することを示した。また、大腸菌発現系を用いて調製した*PnAmy1* リコンビナントを用いて抗血清を調製した。得られた抗体の特異性を確認した後、イムノウェスタン解析により、*PnAmy1* が12~15-DAAにおいて明瞭に発現していることを確認した。さらに、免疫組織化学により、12-DAA頃から活性型GAの局在部位と重複して*PnAmy1* が存在することを認めた。これらの結果から、種子中の活性型GAが*PnAmy1* の誘導を介して珠皮中のデンプン粒の分解に関与している可能性が強く示唆された。

第3章においては、*in situ* ハイブリダイゼーションにより、*PnAmy1* の発現部位に関して検討した結果について述べている。前章における免疫組織化学で得られる情報は産物が固定された瞬間における存在部位であり、別の場所で生合成されたのち移動してきたものと区別することはできない。そこで、*in situ* ハイブリダイゼーションをおこなって*PnAmy1* のシグナルが珠皮と隣接する種皮(Seed coat)において明瞭に認められたのに対し、珠皮ではシグナルが認められなかったことから、*PnAmy1* の発現部位を種皮と特定した。また、経時的な解析により、9~12-DAA頃から種子の外部組織との連絡口である胎座と接する部位から発現が認められはじめ、その後、発現領域が種皮中を広がることが判明した。このことから、 α -アミラーゼ *PnAmy1* は種皮で生合成され、その後、珠皮へ分泌されてデンプンの分解に関わる可能性が強く示唆された。

第4章においては、アサガオ未熟種子中で発現するGA生合成酵素遺伝子のクローニングを行い、それらの発現解析をとおして、種子におけるGA生合成部位を特定し、*PnAmy1* の誘

導部位について再検証した結果について述べている。まず、*in situ* ハイブリダイゼーションにより得られた *PnAmy1* の発現部位と免疫組織化学により得られた活性型 GA の局在部位が一致しないことから、活性型 GA の生合成部位を特定するために、この生合成に直接関わる GA 3-oxidase に焦点を当て、アサガオ未熟種子中で発現する 2 種類の相同遺伝子 (*PnGA3ox1*, 2) の完全長 cDNA をクローニングした。このうち、未熟種子で主に発現している *PnGA3ox2* の発現パターンが *PnAmy1* のそれと一致したことから、アサガオ未熟種子における GA の生合成および *PnAmy1* の誘導は種皮において起きることが判明した。一方、これらの遺伝子の発現が共通の特定部位(種皮の胎座と接する部位)から開始することから、種子の外部組織から何らかのシグナル物質が種子内へ輸送され、*PnGA3ox2* の発現を誘導している可能性が考えられた。そこで、アサガオ芽生えにおいて GA_1 の生合成前駆体である GA_{20} が子葉から茎頂へ移行するという知見が得られていたことから、アサガオ果実を種子とその周辺部とに分割し、それぞれの部位に存在する活性型 GA および GA_{20} をイムノアッセイにより定量した。成熟初期において種子の周辺部に検出される GA_{20} が種子では同時期にほとんど検出されなかったことから、この周辺部に存在する GA_{20} が種子内へ輸送されシグナル物質として働く可能性が考えられた。この点について検証するため、 GA_{20} の生合成に直接関わる GA 20-oxidase に焦点を当て、アサガオ未熟果実中で発現する 2 種類の相同遺伝子 (*PnGA20ox1*, 2) の完全長 cDNA をクローニングした。ノーザン法による発現解析から、*PnGA20ox1* のみ未熟種子において顕著な発現が認められた。また、両遺伝子とも種子の周辺部では全く発現が認められなかったことから GA_{20} の主たる生合成部位は種皮であることが示され、外部から種皮に輸送された GA_{20} が *PnGA3ox2* の発現を誘導するシグナル物質として働く可能性はないと考えられた。さらに、未熟種子で主に発現が認められた *PnGA20ox1* の発現部位ならびに発現パターンが *PnGA3ox2* や *PnAmy1* のそれと全く同様であったことから、*PnAmy1* の誘導に関わる GA は種皮において *de novo* 合成される可能性が強く示唆された。

これらの観察結果を通して、アサガオ未熟種子においては、種皮で生合成された活性型 GA が α -アミラーゼ *PnAmy1* を誘導すること、その *PnAmy1* は珠皮へ分泌されてデンプンの分解に関わり、単子葉植物において発芽時に観察される GA の関わる生理過程が、双子葉植物では子葉形成期に進行している可能性が高いことを示した。

第 5 章においては、本研究の結果について総合的な考察を行い、当該研究の将来への展望や今後の検討課題について論述している。

以上、要するに本論文は、これまでほとんど明らかにされていなかった種子成熟過程におけるジベレリンの生理的役割に関して、注目すべき新たな知見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。よって審査員一同は、申請者に博士(農学)の学位を授与してしかるべきものと判定した。