

論文審査の結果の要旨

氏名 松下 茜

本論文は、植物ホルモンの一つジベレリン (GA) 内生量の恒常性維持のメカニズムに関して、分子生物学的、植物生理学的に解析したものであり、5章からなる。第1章では、Prefaceとして、この研究の背景と研究を始めるにあたっての動機を述べている。第2章では本研究で使われた材料と方法について記述されている。第3、4章は研究の結果とその考察であり、第3章では、GA生合成の最終反応を触媒するGA 3-酸化酵素をコードする*AtGA3ox* 遺伝子群の発現パターンの解析と、*AtGA3ox1* 遺伝子のGAフィードバック制御に関するシス配列の解析について記述されている。第4章では、前章で同定したGAフィードバック制御に関するシス配列に結合する転写因子AGF1の同定とその機能解析について記述されている。第5章では得られた結果を受けて、総合的にGAフィードバック制御の生理学的意義について考察している。

植物はGA内生量を一定の範囲内に保つ機構を有している。GA 3-酸化酵素遺伝子の転写レベルでのフィードバック制御は、その中心的なメカニズムの一つと考えられる。論文提出者は、GA 3-酸化酵素遺伝子*AtGA3ox1*のフィードバック制御の分子機構を解明するために、シス配列と転写因子の同定とその機能解析を行った。

論文提出者は、まず、シロイヌナズナの全てのGA 3-酸化酵素遺伝子*AtGA3ox1-4*の発現パターンの解析を行った。その結果、フィードバック制御を受けるのは*AtGA3ox1*のみであり、他の遺伝子の発現はGA内生量変化に影響されないことが明らかになった。また*AtGA3ox1*は他の遺伝子に比べ、恒常的、かつ高い発現量を示した。よってフィードバック制御、発現量の2つの点から見て、シロイヌナズナにおける主要なGA 3-酸化酵素遺伝子*x*は*AtGA3ox1*であると結論し、以降の転写制御解析の対象とした。

*AtGA3ox1*のフィードバック制御に関するシス配列を同定するため、様々な長さの5'欠損*AtGA3ox1*プロモーターをレポーター遺伝子上流に挿入し、シロイヌナズナに導入した。得られた形質転換植物を用いて解析した結果、*AtGA3ox1*の翻訳開始点から上流808 bp-1016 bpの間にフィードバック制御に必要なシス領域が含まれていると推定された。そこでこの約200 bpの領域だけを複数連結させると、最小プロモーターに非常に強いフィードバック

応答性を付与した。この領域に関してさらに詳細な解析を行ったところ、*AtGA3ox1* プロモーター上の 961 bp-1003 bp までの配列がフィードバック応答には必須であることが明らかとなった。このシス領域を GNFE I (GA Negative Feedback Element I) と命名した。これらの成果は GA フィードバック応答を制御するシス配列に関する初の研究として高く評価された。

次に、論文提出者は、GNFE I に直接結合して、*AtGA3ox1* の転写を制御する因子の単離を行った。酵母 one-hybrid 法によりシロイヌナズナ cDNA ライブラリをスクリーニングした結果、複数の AT-hook モチーフを持つクローンが得られた。これらを AGF1 (AT-hook protein of GA feedback regulation) 及び AGF2 と命名した。AGF1、2 はいずれも DNA 結合ドメインである AT-hook モチーフと機能未知の PPC ドメインを有しており、シロイヌナズナ内で 30 の遺伝子からなるファミリーを形成している。AGF1 と GNFE I の結合はゲルシフト法により *in vitro* においても確認された。また GNFE I 内の特定の塩基に変異を導入すると AGF1 との結合が消失した。更に AGF1 結合配列位に変異を導入した上流 1016 bp までのプロモーターを GUS に結合した融合遺伝子は、形質転換植物体においてフィードバック応答を消失していた。従ってこれらの結果から AGF1 は *in vivo* においても GNFE I に結合しフィードバック制御に関与していると推定された。

さらに、論文提出者は AGF1 の植物体における機能を解析するために AGF1 を過剰発現する形質転換体を作製し、*AtGA3ox1* 発現への影響を解析した。その結果、AGF1 過剰発現体では、GA 欠乏状態での *AtGA3ox1* の発現量上昇が野生株に比べ促進され、さらに GA 投与による *AtGA3ox1* の発現量減少が抑制されることが明らかになった。すなわち AGF1 は GA フィードバック制御における *AtGA3ox1* の転写活性化因子であることが示された。この成果は *AtGA3ox1* の GA フィードバック制御に関与する転写因子を同定した世界初の研究として高く評価された。

なお、本論文は古本強（広島大学理学研究科）、石田さらみ（東京大学理学系研究科）、高橋陽介（広島大学理学研究科）との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上、ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うのに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、松下茜提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。