

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小林 奈通子

アサガオ (*Pharbitis nil* cv. Violet) は光条件に非常に敏感な短日植物であり、過去の研究から Ca^{2+} の花成誘導への関与が認められている。さらに、申請者は、成長相移行の舞台となる茎頂部における Mg^{2+} 濃度が光条件に応じて増減する現象を確認した。そこで本研究では茎頂部における花成誘導のメカニズムの一端を明らかにすることを旨とし、 Mg^{2+} が花成制御メカニズムに対して果たす役割について追究した。

1. アサガオ茎頂内における Mg^{2+} の分布解析

花成を誘導する 16 時間の暗処理が終了してから 2 時間後には、双葉で産生された花成シグナルが完全に茎頂部に到達することが示された。そこで Mg^{2+} の茎頂内における分布解析の対象を、暗処理終了時点 (花成誘導率 12%) と終了後 4 時間目 (花成誘導率 100%) に定めて実験を行った。

Mg^{2+} の分布解析法としては、 Mg^{2+} と Ca^{2+} の両方に反応する蛍光試薬と Ca^{2+} 特異的に反応する蛍光試薬を使用し、その染色差を Mg^{2+} 分布として捉える方法を考案・試行した。その結果、特に、茎頂先端部の中でも中央部の数細胞には強い蛍光が認められ、この細胞群に Mg^{2+} が集積していることが示唆された。さらに、花成誘導が Mg^{2+} 分布に与える影響を調べたところ、16 時間の暗処理終了から 4 時間後の茎頂先端部中央の Mg^{2+} 濃度が、周辺組織よりも低い状態にあることが示唆された。

これらの結果は、茎頂内における花成誘導のプロセスに Mg^{2+} が関与する可能性を示すものであると考えられた。そこで、 Mg^{2+} がどのように花成誘導に関与するのかについて Mg^{2+} の集積する組織の持つ生理学的性質を通して検討するため、アサガオ茎頂内の組織の同定を行うこととした。

2. アサガオ茎頂内で発現する、組織および花成マーカー遺伝子の単離

他植物で報告のあるマーカー遺伝子のオーソログについて、茎頂の成長と機能維持に中心的な役割を果たすとされている *Wuschel* (*WUS*) と *Shootmeristemless* (*STM*) のオーソログ候補遺伝子をディジェネレート法により、さらに、*Clavata1* (*CLV1*)、*Fruitful* (*FUL*)、*Agamous* (*AG*) のオーソログ候補遺伝子を EST ライブラリを利用して単離した。アサガオ幼植物体を双葉、葉柄、茎頂、茎、根に、また、花を萼片、花卉、雄ずい、雌ずいに分けて各部位における全 RNA 1ng 当たりの各遺伝子の RNA 蓄積量を定量的 RT-PCR により測定したところ、*WUS* 様遺伝子は雄ずいに約 500 コピーと最も多く、幼植物体中では双葉・葉柄・茎頂に等しく約 10 コピーが蓄積していた。同様な他の遺伝子の発現/蓄積様態および ORF から予想されるアミノ酸配列の解析結果も合わせ、単離した *WUS* 様遺伝子、*STM* 様遺伝子、*FUL* 様遺伝子はアサガオにおける各遺伝子のオーソログと判断した。また、*AG* 様遺伝子は Nitasaka が発表した遺伝子 *Duplicated* (*DP*) と同一のものであった。

3. 遺伝子の発現と安定性に花成誘導が及ぼす影響の解析

単離した遺伝子のうち、茎頂の有効な組織マーカーとなり、なおかつ花成誘導への関与について近年特に注目を集めている *WUS* (*PnWUS1*, EU672818)、*STM* (*PnSTM1*, EU672819)、*FUL* (*PnFUL1*, EU672820) の茎頂内における発現組織を *in situ* hybridization (ISH) 法により解析した。その結果、第1章で観察された、 Mg^{2+} が高濃度に局在する組織は未分化(茎頂メリステム)であり、花成誘導後2日目には花器官を形成する組織へと分化する細胞群であることが確認された。

次に、花成誘導時の *PnWUS1*、*PnSTM1*、*PnFUL1*、*AG/DP*、および最近遺伝子データベースに登録された *Apetala1* オーソログ遺伝子 (*PnAPI*) の茎頂における RNA 蓄積量を、定量的 RT-PCR を用いて経時的に分析した。

分析の結果、*PnFUL1* は早くも16時間の暗処理終了時点で対照区の約18倍の蓄積が見られ、その後4時間で約65倍へと上昇していったが、*PnAPI* の発現は暗処理終了から8時間後に見られた。これは、アサガオ茎頂先端部は花成誘導後4時間目には未分化の状態から花器官の形成へと組織の性質を変化させつつあるが、成長相は完全には移行していない、過渡期にあることを示すものと考えられた。一方、*PnWUS1*、*PnSTM1*、*AG/DP* の、暗処理終了後48時間以内の蓄積量には大きな変化はなかった。

PnWUS1 と *PnSTM1* が発現する茎頂メリステムにおいて Mg^{2+} 濃度が変化することから、花成誘導に伴う Mg^{2+} の濃度変化は、メリステムにおいて生成されるタンパク質の量やその活性、あるいは mRNA の安定性などに影響を及ぼす可能性を想起した。そこで、 Mg^{2+} 濃度が関わる具体的な生理活動として mRNA の安定性の調節という可能性について *PnWUS1* と *PnSTM1* をモデルに検討を行うこととし、両遺伝子の mRNA の半減期を *in vivo* で測定した。

花成誘導処理後4時間目および対照区の茎頂を mRNA 合成阻害剤処理し、各遺伝子の RNA 蓄積量の減少量を定量的 RT-PCR で測定したところ、*PnWUS1* mRNA の半減期は対照区において約13時間と算出された。それに対し、花成が誘導された茎頂における *PnWUS1* mRNA の半減期は約2.5時間と算出され、*PnWUS1* mRNA は花成誘導によって安定性が1/5に低下していることが判明した。*PnSTM1* mRNA の対照区における半減期は約11時間であったが、花成を誘導すると1/3の約4時間へと短縮した。このような mRNA の安定性の低下に Mg^{2+} が直接関与しているかについては *in vitro* の測定系による検証が必要であるが、*in vivo* で mRNA の半減期が遺伝子特異的に変化することを確認した本実験結果は、花成誘導期の複雑な遺伝子ネットワークの制御機構に、新しく mRNA の安定性の関与を提起するものである。

本研究は、花成誘導への関与が示唆されていた Mg^{2+} が具体的に果たす役割を、茎頂内局在の解析と、マーカー遺伝子の発現/蓄積量との相関から追究し、多くの有用な知見が得られ、これらの結果の今後の活用が大いに期待されるものであり、学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。