

学 位 論 文 題 名

シカクマメ Kunitz 型キモトリプシンインヒビター

遺伝子の構造と発現に関する研究

学位論文内容の要旨

植物細胞は分化全能性や環境に対するダイナミックな適応性など極めてユニークな性質を持つが、これらの現象の基盤となる細胞分化に伴う遺伝子発現調節機構に対する分子生物学的なアプローチはようやく始まったばかりである。植物種子は胚発生の場として、大量の貯蔵タンパク質の合成、蓄積の場として、さらには休眠、発芽の場として、時間とともに遺伝子発現のパターンが大きく変動する極めて特徴的な性質を持ち、植物における遺伝子発現調節研究の対象として格好の材料である。本研究では、マメ科植物種子に多量に蓄積されている Kunitz 型プロティナーゼインヒビターに注目し、その器官および時期特異的な遺伝子発現調節機構の基礎的な解析を試みた。材料として用いたシカクマメは、種子に加えて、地中に形成する塊根にも強いインヒビター活性を有している。さらに近年、シカクマメの根粒においても Kunitz 型プロティナーゼインヒビターの発現が報告されるなど、異なる器官における遺伝子発現調節作用の比較という意味からも将来的な研究の発展が期待される植物である。

1. シカクマメ種子に多量に蓄積されている Kunitz 型キモトリプシンインヒビター (WCI-3) は、ゲノム中で多重遺伝子族によりコードされていた。WCI 多重遺伝子族は、偽遺伝子を含む少なくとも 7 種以上の遺伝子から構成されていた。構造解析の結果、このうち少なくとも 4 種の遺伝子 (WCI-3a, WCI-3b, WCI-2, WCI-x) が機能的な Kunitz 型キモトリプシンインヒビタータンパクをコードしていると

推定した。種子中に最も多量に存在すると推定されるWCI-3は2つの遺伝子（WCI-3a, WCI-3b）にコードされており、これらの2つの遺伝子のオープンリーディングフレームとその上流約1100bpまでの領域は互いに99%以上の相同性を示した。WCI-2遺伝子は、種子WCIの22%を占めると報告されているWCI-2タンパクを、WCI-x遺伝子は、未知のWCIタンパクをそれぞれコードしていると推定した。WCI-P1遺伝子を除く各WCI遺伝子の5'上流領域は極めてA-T塩基対に富み（平均75%）、典型的なTATAボックス配列を含む20bpの配列は各WCI遺伝子およびダイズKunitz型トリプシンインヒビター遺伝子においても保存されていた。

2. WCI-3cDNAをプローブとしたノザンハイブリダイゼーションの結果、WCI mRNAの蓄積は器官特異的な制御を受けていることが示された。塊根においてもWCI mRNAおよびタンパクが多量に検出されたことから、塊根におけるキモトリプシンインヒビター活性のかかなりの部分がWCIに由来すると推定した。種子においてはWCI mRNAの蓄積は種子の成熟に伴って一過的に観察され、時期特異的な制御を受けていることが示された。WCI mRNAとWCIタンパクの出現時期はほぼ一致し、インヒビター活性の出現時期に関する報告と合わせて、WCI mRNAの転写後、ただちに翻訳、プロセッシングを経て、成熟タンパクとして蓄積されることが示された。機能的なインヒビタータンパクをコードしていると推定されたWCI遺伝子由来のmRNAの蓄積量はシカクマメ各器官や種子成熟過程でそれぞれ異なり、別々の発現制御作用を受けていることが示された。WCI-P1遺伝子を除く各WCI遺伝子の5'上流領域はトランスジェニックタバコにおいても種子特異的な転写能を持つことが示され、WCI遺伝子の発現に転写段階の調節作用が存在することが示唆された。

3. ゲルシフトアッセイおよびDNaseIフットプリンティングの結果、シカクマメ各器官および成熟の各段階の種子由来の核抽出物中にWCI-3aおよびWCI-3b遺伝子の5'上流領域の複数の位置に特異的に結合するタンパク性因子が少なくとも2種存在することが示された。これらの因子に関して、各器官および種子の成熟の各段階で結合DNA断片の特異性は同じだが、因子の性質または因子の種類が異な

ることが予想された。これらの因子はA-T塩基対に富む領域に結合するが、認識配列の厳密性は低いことが推定され、high mobility group protein (HMG タンパク) 様の性質を持つと予想された。

以上のことからシカクマメにおけるWCI多重遺伝子族の構造と、その器官および時期特異的な発現の特徴が明らかになった。さらにこれらの特異的発現には転写段階の調節作用が関与していることが示され、各器官、時期における共通の因子の修飾または同じ配列に結合する異なる因子によって調節されている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 市 郎

副 査 教 授 杉 本 和 則

副 査 教 授 菊 池 九二三

副 査 教 授 大 野 哮 司 (農学研究科)

学 位 論 文 題 名

シカクマメ Kunitz型キモトリプシンインヒビター

遺伝子の構造と発現に関する研究

植物細胞は分化全能性や環境に対するダイナミックな適応性など極めてユニークな性質を持つが、これらの現象の基盤となる細胞分化に伴う遺伝子発現調節機構の分子生物学的な解析はようやく始まったばかりである。植物種子は胚発生の場として、大量の貯蔵タンパク質の合成、蓄積の場として、さらには休眠、発芽の場として、遺伝子発現のパターンが大きく変動する特徴的な性質を持ち、植物における遺伝子発現調節研究の対象として格好の材料である。申請者は、マメ科植物種子に蓄積されている Kunitz型プロテイナーゼインヒビターに注目し、その特異的な遺伝子発現調節機構の基礎的な解析を行った。

1. シカクマメ種子に多量に蓄積されている Kunitz型キモトリプシンインヒビター (WCI-3) は、ゲノム中で多重遺伝子族によりコードされていた。構造解析の結果、このうち少なくとも4種の遺伝子 (WCI-3a, WCI-3b, WCI-2, WCI-x) が機能的な Kunitz型キモトリプシンインヒビタータンパクをコードしていると推定した。種子中に最も多量に存在すると推定される WCI-3は2つの遺伝子 (WCI-3a, WCI-3b) にコードされており、これらの2つの遺伝子のオープンリーディングフレームとその上流約1100bpまでの領域

は互いに99%以上の相同性を示した。WCI-2遺伝子は、種子WCIの22%を占めると報告されているWCI-2タンパクを、WCI-x遺伝子は、未知のWCIタンパクをそれぞれコードしていると推定した。各WCI遺伝子の5'上流領域は極めてA-T塩基対に富み、典型的なTATAボックス配列を含む20bpの配列は各WCI遺伝子およびダイズKunitz型トリプシンインヒビター遺伝子においても保存されていた。

2. ノザンハイブリダイゼーションの結果、WCI mRNAの蓄積は器官特異的な制御を受けていることが示された。塊根においてもWCI mRNAおよびタンパクが多量に検出されたことから、塊根におけるキモトリプシンインヒビター活性のかなりの部分がWCIに由来すると推定した。種子においてはWCI mRNAの蓄積は種子の成熟に伴って一過的に観察され、時期特異的な制御を受けていることが示された。WCI mRNAとタンパクの出現時期はほぼ一致し、転写後、ただちに翻訳、プロセッシングを経て、成熟タンパクとして蓄積されることが示された。機能的なインヒビタータンパクをコードしていると推定されたWCI遺伝子由来のmRNAの蓄積量はシカクマメ各器官や種子成熟過程でそれぞれ異なり、別々の発現制御作用を受けていることが示された。各WCI遺伝子の5'上流領域はトランスジェニックタバコにおいても種子における転写能を持つことが示され、WCI遺伝子の発現に転写段階の調節作用が存在することが示唆された。

3. ゲルシフトアッセイおよびDNaseIフットプリンティングの結果、シカクマメ各器官由来の核抽出物中にWCI-3aおよびWCI-3b遺伝子の5'上流領域の複数の位置に特異的に結合するタンパク性因子が少なくとも2種存在することが示された。結合DNA断片の特異性は同じだが、性質の異なる複数の因子が各器官および種子の成熟の各段階に存在することが予想された。これらの因子はA-T塩基対に富む領域に結合するが、認識配列の厳密性は低いことが推定され、high mobility group protein 様の性質を持つと予想された。

以上のように申請者は、シカクマメにおけるWCI多重遺伝子族の構造と、その器官および時期特異的な発現の特徴を明らかにした。さらにこれらの特異的な発現には転写段階の調節作用が関与していることが示され、各器官、時期における共通の因子の修飾または同じ配列に結合する異なる因子によって調節されている可能性が示唆された。

審査員一同は、申請者が博士（理学）の学位を得るに十分な資格を有するものと認定した。