

## 論文内容の要旨

申請者氏名 松山 崇

本論文は植物の根の先端を覆う組織である根冠で特異的に発現する遺伝子を2種単離し、その発現様式等の分子生物学的解析を行ったものである。

申請者はまずトウモロコシの初生根から根冠組織のみを多量に単離し、cDNAサブトラクションを利用したデファレンシャル・スクリーニング法により、根冠特異的な発現を示すと考えられる新規遺伝子 $zmGRP4$ と $zmRCP2$ のcDNAを単離した。

$zmGRP4$  (*Zea mays glycine-rich protein 4*)はシグナルペプチドを持つ新規なグリシン・リッチ・タンパク質をコードしており、その成熟タンパク質の予想分子量は14.4 kDであった。ノザン解析及びRT-PCR解析により、 $zmGRP4$ がトウモロコシ地上部で発現しておらず、根においては根端で強く、根本体で弱く発現していることが示された。またin situハイブリダイゼーション解析では、 $zmGRP4$ は側部根冠組織で強く、根本体の表皮細胞で弱く発現していることが示された。側部根冠組織の細胞は根端を覆う粘液を分泌する細胞であり、 $zmGRP4$ も細胞外に放出されるタンパク質と予想されるので、 $zmGRP4$ がこの粘液に蓄積する可能性が示唆された。抗 $zmGRP4$ 抗体を用いた免疫組織化学的解析の結果、 $zmGRP4$ は根端を覆う粘液に特異的に蓄積することが示された。さらに、抗 $zmGRP4$ 抗体を用いたイムノブロット解析の結果、根端組織からのSDSバッファー抽出画分において36 kDの $zmGRP4$ シグナルを検出したが、可溶性画分にはシグナルが検出されなかった。以上の結果は、側部根冠組織の細胞で合成された $zmGRP4$ が、化学的修飾を受けた後、根端を覆う粘液に不溶性タンパク質として蓄積することを示しており、 $zmGRP4$ が根端粘液に何らかの物理的な特性を与えていることを示唆した。

次に申請者は $zmRCP2$ 並びにトウモロコシの相同遺伝子 $zmRCP1$ の解析を行った。これら $zmRCP$ は共にアミノ末端にシグナルペプチドを持ち分子量37 kDの新規タンパク質をコードしていた。また規則的に並んだシステイン残基を含む領域を持つ。アミノ酸配列のホモロジー検索の結果、種子植物でZmRCP類似タンパク質は複数見つかったが、他の生物では有意なホモロジーを示すタンパク質は存在しないことが判明した。ノザン解析、RT-PCR解析、in situハイブリダイゼーション解析により $zmRCP$ は根冠の最外の1-3細胞層で特異的に発現していることが示された。この根冠最外層では細胞が根冠組織から剥がされ、プログラム細胞死が起こっている細胞層であり、 $zmRCP$ がこうした現象に関与している可能性を提唱した。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 松山 崇

根冠は全ての高等植物の根を覆う組織であり、古くから形態学的な解析結果が蓄積している。光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた観察から、根冠は根本体の分裂組織に接する根冠分裂組織、でんぷん粒を蓄積する中央部、分泌小器官が発達している側部に分けることができる。また、根冠分裂組織で分裂増殖した根冠細胞は根冠周辺部へと押しやられ、最終的には根冠から剥がれて根冠を覆う粘液中に放出される。主にこのような形態学的知見から、根冠は根の重力認識や根端分裂組織の保護などの役割を担うと考えられている。しかしながら、根冠機能は分子レベルでは解明されておらず、根冠特異的に発現する遺伝子もほとんど知られていない。申請者は根冠で特異的に発現する遺伝子を単離し、それら遺伝子の構造や発現様式を詳細に解析することにより、根冠特有の機能の解明に迫ろうとしたものである。

本論文は実験材料の選択に特徴がある。これまでも根冠特異的な発現をする遺伝子を単離しようとする試みが他にもいくつかなされたが、真に特異的な発現を示す遺伝子の単離には至らなかった。その原因としては純度の高い根冠組織を集めることが困難であったことと、微量の組織から目的遺伝子を単離する方法が確立されていなかったこと、の2点が挙げられる。申請者は根本体から根冠組織がメスを用いて比較的容易に分離できるトウモロコシ品種をまず探しだし、PCRを用いた改良サブトラクション法により、根冠特異的に発現する遺伝子のcDNAを複数クローニングすることに成功した。この方法論は組織特異的な発現を示す遺伝子単離の非常に良い成功例である。

本論文では2種の根冠特異的な遺伝子を解析しているが、主眼は論文の大半を占める *zmGRP4* である。グリシン含量の高い細胞外分泌型タンパク質をコードする *zmGRP4* は側部根冠組織で強く発現しており、*zmGRP4* タンパク質は根冠を覆う粘液中に蓄積する。これまで形態学的に分泌機能を担うとされていた側部根冠組織で特異的に発現し、実際に粘液中に分泌されるタンパク質が同定されたのは本論文が最初である。粘液は根が土壤中を伸長するとき根端を物理的傷害から保護する潤滑剤の働きをすると推測されてきたが、その機能に *zmGRP4* が関与する可能性を示唆している。

他方の遺伝子 *zmRCP2* は類似遺伝子 *zmRCP1* とともに根冠周辺部の剥がれゆく細胞で特異的に発現しており、コードするタンパク質は植物の新規遺伝子ファミリーを形成している。タンパク質の局在性は確認されていないが、剥がれゆく細胞で特異的な機能を担っているものと推測される。トウモロコシはトランスポゾンを利用した遺伝子破壊が可能であり、本論文で単離された遺伝子の機能解析へと道が拓かれている。

以上のように、本論文は植物根冠で特異的に発現する新規遺伝子を分子生物学的に解析したもので、学術上、応用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（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。