

# 論文内容の要旨

申請者氏名 阿部 誠

シロイヌナズナにおいて *GI*、*CO* および *FT* が光周性花成を制御していることが報告されている。イネにおいて、これらのオーソログとしてそれぞれ *OsGI*、*Hd1* および *Hd3a* が同定されており、これらの遺伝子もまた開花において重要な役割を果たすことが報告されている。このうち *GI* は遺伝学的な解析から開花および概日時計の両方の機能を持つが、その生化学的機構は未知であった。そこで、本研究では *OsGI* の機能を明らかにするために、Tandem-affinity purification (TAP)法を用いて *OsGI* タンパク質複合体の精製および同定を試みた。TAP 法は酵母のタンパク質複合体精製法から発達した手法で、現在では多くの生物種において適用されているが、植物における適用例は少なく、TAP 法を用いて新規タンパク質複合体を同定した報告は無かった。しかし、TAP 法による利点を加味し本研究においても TAP 法を利用し、*OsGI* タンパク質複合体の精製、同定を行った。

精製を行うに当たり、TAP タグを融合した *OsGI* タンパク質を発現する形質転換培養細胞、植物体を作成した。SGC (*OsGI* の C 末端に TAP タグを融合した形質転換体の系統) 形質転換植物体において短日条件で野生型イネと比較して開花の遅延が見られた。タグ無しの *OsGI* の過剰発現植物体は開花が遅延することが早間らによって報告されている。このことから今回作成した SGC の植物体内において機能的なタンパク質が形成されている可能性が示唆された。また、*OsGI* に *GFP* を融合した一過的発現用ベクターを作成し、イネの葉鞘細胞、培養細胞由来のプロトプラストに導入したところ *OsGI* は核および細胞質に存在していた。融合タンパク質の発現が確認された SGC 形質転換培養細胞を用いて TAP 法による *OsGI* タンパク質複合体を精製し、質量分析計を用いて同定を行った。その結果、ダイナミンを含む 7 つのタンパク質が *OsGI* に相互作用するタンパク質として同定された。さらに研究を進めるために、*OsGI* の C 末端に *myc* タグを付加したコンストラクトを導入した形質転換培養細胞を作成した。*myc* 抗体を用いた共免疫沈降の実験の結果、*OsGI* はダイナミンと相互作用することが確認された。同定したダイナミンについてイネにおけるその突然変異体の種が得られなかったことから、シロイヌナズナにおけるそのホモログの同定を試み、系統樹を作成した。その結果 ARABIDOPSIS DYNAMIN LIKE 3 (ADL3)、ARABIDOPSIS DYNAMIN LIKE 6 (ADL6) がそのホモログであることが考えられた。表現型解析の結果、これらの T-DNA 挿入突然変異体は主軸の上部にロゼット葉形成する aerial rosette の表現型を示した。同様の表現型が GA 信号伝達系において機能すると考えられている *GLABROUS INFLORESCENCE STEM (GIS)* の過剰発現体においても見られる。このことから ADL3、ADL6 は GA 信号伝達に関与する可能性が示唆された。本研究は植物において TAP 法によってタンパク質複合体を同定した初めての報告である。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 阿部 誠

これまでの植物における光周性花成の遺伝学的な解析から、シロイヌナズナにおいて *GI*、*CO* および *FT* が光周性花成を制御していることが報告されている。イネにおいても、これらのオーソログとしてそれぞれ *OsGI*、*Hd1* および *Hd3a* が同定されており、これらの遺伝子もまた開花において重要な役割を果たすことが報告されている。光周性花成のメカニズムをさらに詳細に明らかにするためには生化学的手法を用いたタンパク質間相互作用の解析が重要であるが、現在、光周性花成における生化学的側面からの解析は少なく知見が乏しい。

そこで、申請者はイネの開花において重要な機能を有すると考えられている *OsGI* のタンパク質複合体を TAP 法により精製、同定を試みることから、光周性花成における生化学的な知見を得るために研究を行った。TAP 法は酵母のタンパク質複合体精製法から発達した手法で、生体内で構成されるタンパク質複合体を精製可能、多くの生物種において適用可能および、従来手法と比較し純度の高い精製法と言う利点を持つが、植物において TAP 法を用いて新規のタンパク質複合体を精製、同定したと報告は無かった。しかし、申請者は上記の利点を加味し TAP 法による *OsGI* タンパク質複合体の精製、同定を試みた。タンパク質複合体精製、同定の結果、*OsGI* は少なくともダイナミンを含む 7 つのタンパク質と相互作用することが示唆された。このうち、ダイナミンについて *OsGI*-myc の形質転換体を用いた共免疫沈降実験によって、その相互作用を確認している。さらに、同定したダイナミンのシロイヌナズナにおける同定し、その T-DNA 挿入突然変異体の表現型を解析したところ、主軸の上部においてロゼット葉が形成される aerial rosette の表現型を示した。同様の表現型が GA 信号伝達系において機能すると考えられている遺伝子の過剰発現体においても見られることから、このダイナミンが GA 信号伝達系に関与する可能性が示唆された。今後、*GI* との二重変異体および、これらダイナミンの過剰発現体を解析することにより光周性花成における更なる知見が得られるであろう。

以上のように、本論文は TAP 法と呼ばれる新規のタンパク質複合体精製法を用い、植物において初めて *OsGI* タンパク質複合体を精製、同定を行った。さらに同定したタンパク質複合体の構成因子が GA 信号伝達系においても機能する可能性があるという新しい知見を得たもので、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。