



Title	A Study on the Mechanisms of Cytokinin Responses through Analyses of the CYTOKININ-HYPERSENSITIVE 1 Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>
Author(s)	久保, 稔
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42513
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	久保 稔
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 15721 号
学位授与年月日	平成12年9月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	A Study on the Mechanisms of Cytokinin Responses through Analysis of the CYTOKININ-HYPERSENSITIVE 1 Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナの突然変異体を用いたサイトカイニンの応答機構の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 俊治
	(副査) 教授 寺島 一郎 教授 中西 康夫 助教授 水野 孝一

論文内容の要旨

1. サイトカイニン高感受性変異体の単離と解析

植物の分化、形態形成に重要な役割を果たしていると考えられるサイトカイニンの分子機構に働く作用因子を同定するため、モデル植物として有用なシロイヌナズナから、組織培養系を用いて、サイトカイニン応答が上昇した新規の $ckh1$ 、 $ckh2$ (*cytokinin-hypersensitive*) 変異体を単離した。これらの変異体は共に劣性の変異体で、様々なサイトカイニン様化合物に対して、反応性が上昇していた。また、内在性のサイトカイニン量を定量したところ、どちらの変異体も野生型と同程度のサイトカイニン量しかないことが分かった。これらのことより、 $ckh1$ 、 $ckh2$ 変異体はサイトカイニン応答に関与した負の制御因子に欠損を持つことが示唆された。

2. $CKH1$ 遺伝子のクローニング

$CKH1$ 遺伝子の染色体上の位置決定を行ったところ、非常に近接した遺伝マーカーが存在したので、これを利用して map-based クローニングを行った。約300kb の連鎖地図を作成し、この範囲内のゲノム断片を $CKH1$ 変異体に導入したところ、変異を相補できる約30kb のゲノム断片を得ることが出来た。その断片内に含まれるいくつかの遺伝子について、 $CKH1$ 変異体の塩基配列を決定したところ、ある遺伝子に nonsense 変異が生じていることが分かった。また、 $CKH1$ 変異体の別の allele についても、同一遺伝子内に変異が見つかったので、この遺伝子を $CKH1$ 遺伝子とした。

3. $CKH1$ 遺伝子とその遺伝子産物の解析

$CKH1$ 遺伝子に対応する cDNA を単離し、そのアミノ酸配列についてデータベースを検索したところ、真核生物の基本転写因子である TFIID の構成成分、TATA-box binding protein (TBP) -associated factor (TAF) と、相同性がある事が分かった。また、 $CKH1$ 遺伝子の植物での発現部位を調べるために、器官特異的なノーザンプロット解析を行ったところ、その発現は、根、葉、茎、花等の器官で多く、鞘で少なかった。さらに、 $CKH1$ に GFP を融合した蛋白質をシロイヌナズナで発現させたところ、核内にこの蛋白質が局在することが観察された。また、サイトカイニンにより発現が誘導される遺伝子 *CYCD3*、*CAB*、について、 $ckh1$ 変異体と野生型でその発現パターンを比較したところ、 $ckh1$ 変異体ではサイトカイニンが無い条件でもそれらの遺伝子の発現が増加していた。以上のことから、C

KH1蛋白質は植物における多くの器官で、mRNA の転写調節によりサイトカイニン応答を負に制御していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

久保稔君は、高等植物の器官分化や成長に重要な役割を果たす植物ホルモンの一種であるサイトカイニンに対する植物の応答機構を解明する目的で、サイトカイニン感受性が増進したシロイヌナズナの変異体を分離した。これらを *cytokinin-hypersensitive mutant (ckh)* と名付け、2種類の相補性グループ、*ckh1*、*ckh2* に分類した。引き続いて染色体上の座位の詳細なマッピングを行い、*CKH1* 遺伝子のクローニングに成功した。決定した遺伝子構造から、CKH1 蛋白質は遺伝子の転写開始に関わる TATA-ボックス結合蛋白質と会合する TAF 蛋白質のファミリーの一員であることを見い出し、*ckh1* 変異株ではこの遺伝子のコード領域にナンセンス変異が生じていることを突き止めた。そして、CKH1 蛋白質は細胞核に局在すること、植物体の種々の器官で発現していること、さらに、本来サイトカイニンで up-regulate される *CYCD3* や *CAB* 遺伝子が、これらの変異株ではサイトカイニン非依存的に発現しているを見い出し、CKH1 蛋白質がサイトカイニンの情報伝達に関わることをはじめて証明した。これらの業績は、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。