

氏名	みつだのぶたか 光田展隆
学位の種類	博士 (人間・環境学)
学位記番号	人博第 212 号
学位授与の日付	平成 15 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	人間・環境学研究科人間・環境学専攻
学位論文題目	Identification and Characterization of Plant-Specific Novel Transcription Factors, AtVOZ1, 2 Containing a Novel DNA Binding Motif (新規 DNA 結合モチーフを持つ植物特異的転写因子 AtVOZ1, 2 の単離と解析)
論文調査委員	(主査) 教授 津田 謹 輔 教授 倉橋 和 義 助教授 宮下 英 明

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、植物分子生物学分野のモデル植物であるシロイヌナズナにおいて、液胞膜上の H⁺ 輸送酵素 H⁺-PPase (V-PPase) をコードする遺伝子の発現制御に重要な領域を同定し、そこに結合する未知の転写制御因子 (転写因子) を同定して、その分子機能および生理的機能について解析したものである。

近年のゲノム解析の進展により、植物は動物にくらべて多くの転写因子を持つことがわかってきた。それら植物特異的な転写因子は植物独自の機構や体制に深く関わっていることが示されつつあり、生理学的に興味深い。しかしながら、植物特異的な転写因子の大部分の機能、DNA 結合様式などはほとんどが未解明であり分子生物学的・構造生物学的にも大変興味深い。したがって、このような植物特異的な転写因子を同定し機能を明らかにしていくことは、植物生命科学分野においてきわめて興味深く重要な課題である。

そこで本研究では主に高等植物に存在する酵素 H⁺-PPase の転写調節機構に着目し、その遺伝子の発現制御領域を解析し、そこに結合する転写因子の同定を試みた。具体的には、シロイヌナズナにおいて H⁺-PPase 遺伝子の制御領域と考えられる 5' 上流領域を単離し、β-グルクロニダーゼとのキメラ遺伝子を作成して、発現制御領域の解析を行った。その結果、H⁺-PPase 遺伝子の上流 1.4kbp の領域は、ほぼ全組織で発現を誘導するのに対し、0.4kbp の領域は、花粉特異的に発現を誘導することを明らかにした。さらにこの 0.4kbp 領域において花粉特異的な発現に必須な領域を 20塩基対内にまで同定した。

その後、酵母ワンハイブリッド法によりこの領域に結合する転写因子を探索した結果、維管束植物と一部のコケ植物に特異的な 2 つの新規遺伝子を同定した。これらによってコードされるタンパク質は、保存されたシステイン 3 残基とヒスチジン 1 残基からなるジンクフィンガーを構成しうる領域を持っていたが、全長にわたって既知のタンパク質と有意な相同性がほとんど見出されず全く新規な転写因子であると考えられた。以上の情報に基づいて、これらのタンパク質を AtVOZ1, AtVOZ2 (*Arabidopsis thaliana* Vascular plant-specific One Zinc finger protein) と命名した。

この新規遺伝子 AtVOZ1, AtVOZ2 によってコードされる VOZ タンパク質について様々な実験手法により以下のような事柄を明らかにした。①植物細胞内において単独で核移行し転写活性化因子として機能する。②GCGT_Nx7ACGC という Inverted repeat (下線部) を含む配列を特異的に認識して結合する。③DNA への結合に、亜鉛イオンの要求性があるほか、ジンクフィンガーを構成すると考えられる領域のシステインおよびヒスチジンに変異を導入すると DNA に結合できなくなることから、VOZ タンパク質は機能的なジンクフィンガーを持つ。④DNA への結合に必要な領域は、ジンクフィンガーに加えてあとに続く塩基性領域も含まれる。⑤二量体を形成して DNA に結合する。⑥この二量体形成は、ジンクフィンガーの後に続く塩基性領域が担っている。

以上の結果から、AtVOZ1, 2 は塩基性領域で二量体化してジンクフィンガーにより特定の Inverted repeat 配列を含む DNA を認識する新しいタイプの DNA 結合モチーフ (VOZ ドメインと命名した) を持つ新規性の高い転写因子であることが明らかになった。

また、AtVOZ1, AtVOZ2が発現する組織を調べた結果、AtVOZ1は篩部特異的に発現していることを示したが、H⁺-PPaseは花粉のみならず維管束でも高発現していることから、少なくともAtVOZ1は篩部においてH⁺-PPaseの発現を制御している可能性が示唆される。実際、篩部における有機物の取り込みないし搬出にH⁺濃度勾配が積極的な役割を果たしている可能性もあり、これら篩部におけるH⁺-PPase遺伝子の発現制御にAtVOZ1が能動的に関与している可能性もある。つまり、H⁺-PPaseの発現制御領域において花粉での発現制御に重要であるとした38塩基の領域は、花粉のみならず篩部での発現制御にも重要なシスエレメントが存在する、シスエレメントの集積された領域であると考えられた。またESTを検索した結果、VOZ遺伝子は維管束植物のみならず一部のコケ植物（蘚類）にも存在することを示した。蘚類は篩部にきわめてよく似た組織（leptoids）を持っていることから、植物が篩部様組織を獲得して上陸するにあたってVOZ遺伝子が誕生したとも考えられ、VOZ遺伝子は篩部の形成、維持という維管束植物（陸上植物）の根幹に関わる重要な役割を果たす転写因子であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

高等植物においてはじめてそのゲノム配列が完全に明らかになったシロイヌナズナは、同じ程度のサイズのゲノムを持つ線虫やショウジョウバエにくらべてはるかに多くの転写因子を持っていることが明らかにされている。これは、植物は動物のように動くことができないうえに神経系や免疫系、循環系を持たないので様々な状況に遺伝子の発現制御で対応しなければならないからだと考えられている。このような機能を担う転写因子の多くは、植物において特異的に拡張進化したもので植物にのみ見出される転写因子群も数多く見られる。また、シロイヌナズナの全遺伝子のうち1/3は既知遺伝子との相同性が見出されないことから、まだ多くの植物特異的な未発見転写因子があると推測される。これらを同定、解析していくことは植物を分子レベルで理解する上でも、また、転写因子とDNAの結合様式の完全理解を目指す上でも必要不可欠である。

本学位申請論文では、主に高等植物の液胞膜に存在する酵素H⁺-PPase（V-PPase）の発現制御機構を解析し、その発現制御領域に結合するまったく新しい植物特異的な転写因子を同定している。さらにその分子性状を明らかにすることでこの転写因子の新規性を具体的な形で提示したうえ、生理的機能についてもきわめて興味深い考察を行っている。

前半部においてはシロイヌナズナにおいてH⁺-PPaseの発現制御領域を解析した結果を報告している。多数のレポーターコンストラクトを形質転換した組み換えシロイヌナズナを作成し、各々の薬におけるレポーター活性を定量するという、労力を要するが精緻な解析によりH⁺-PPaseの花粉での発現に重要な領域を20塩基対内の範囲で同定している。この成果は特許として出願中である。また、すでに定評ある国際誌（Plant Molecular Biology 誌）に掲載されている。

後半部分では、同定した花粉での発現に重要であると考えられる領域をプローブにして、この領域に結合する植物特異的な新規転写因子を同定し、その性質について明らかにしている。申請者は独自にcDNAライブラリーを構築し、酵母ワンハイブリッドスクリーニングによって約150万コロニーをスクリーニングした結果、この新しい未知の転写因子（VOZ1, VOZ2）を同定している。この未知分子は他の既知タンパク質とほとんど相同性が見出されなかったが、申請者はこの未知因子が植物において転写活性化因子として機能することを証明している。また、様々な変異をプローブDNAに導入してこの新規転写因子が間に任意の7塩基を含む特定のInverted repeat配列を認識して結合することを明らかにしている。さらに、この新規転写因子がその2次配列上これまでに知られていないタイプの新しい機能的なジンクフィンガーを持っていることを2通りの実験手法によって証明している。加えてこの新規転写因子は二量体化してDNAに結合することを明らかにしたうえ、二量体化に関与する領域も同定している。

これらの結果から、この新規転写因子がこれまでに知られていないような様式でDNAに結合していることが明らかになった。新たに同定したDNA結合領域をVOZドメインと命名している。これら一連の成果は、この転写因子の新規性をより具体的な形で際立たせるきわめて重要な知見であり、高く評価できる。また、一方で申請者はこの新規転写因子の発現部位についても明らかにしている。VOZ1は篩部特異的な発現パターンを示したが、この点に関してV-PPase（H⁺-PPase）遺伝子の発現制御という観点から考察を加えるとともに、ESTの分析等により、VOZ遺伝子は陸上植物が篩部を獲得するにあたって誕生した転写因子であるという大変興味深い考察を行っている。これら後半部分の成果は現在国際誌への出版を準備中である。

このように本研究の成果はDNAと転写因子の結合様式に新たな1ページを書き加えるばかりか、維管束植物の進化、機能形成研究に新たな重要転写因子の存在を提示するものであり、分子レベルでの成果と生命体レベルでの考察を兼ね備えたきわめて有意義な成果である。以上のことから本学位申請論文は分子、生命、資源の関連研究をめざして創設された人間・環境学専攻、分子・生命環境論講座にふさわしい内容を備えたものと言える。よって本学位申請論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成15年6月10日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。