

氏 名	こ やま とも つぐ 小 山 知 嗣
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1206 号
学位授与の日付	平 成 13 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	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Signal transduction network in the gene expression of tobacco PR-5d (タバコ PR-5d 遺伝子の発現制御に関わるシグナル伝達系の解析)

論文調査委員 (主 査)
教授 佐藤文彦 教授 關谷次郎 教授 大山莞爾

論 文 内 容 の 要 旨

植物体は病害菌の感染によって、あるいは組織特異性をもって構成的に病原菌感染誘導性タンパク質 (PR タンパク質) と呼ばれる一群の抗菌性タンパク質を発現する。これらのうちタバコオスモチン様タンパク質 (OLP, PR-5d) を含む一群のタンパク質はそのプロモーター領域に存在するエチレン応答性シス配列である GCC 配列により発現が制御されている。近年、この GCC 配列に結合するエチレン応答性因子 (Ethylene-responsive factor, ERF) 遺伝子が単離され、ERF 転写因子を介したシグナル伝達系の解明が急速に進展しつつある。本論文は転写因子 ERF による PR タンパク質の発現誘導のシグナル伝達系を解明するために、PR-5d 遺伝子をモデルとし、その発現誘導を制御するシグナル伝達機構を分子レベルで解明することを試みたものである。その内容は以下の通りである。

第 1 章ではタバコ N II 培養細胞における PR-5d および ERF1-4 遺伝子の発現の解析により、ERF による PR-5d 遺伝子の転写制御が ERF の転写後調節により行われていることを記述している。すなわち、タバコ N II 培養細胞において、(1) PR-5d 遺伝子の発現量は培養が進むにつれて顕著に増加するが、4 つのタバコ ERF 遺伝子の中で ERF1 遺伝子と ERF3 遺伝子のみが発現しており、その発現量は培養期間を通じてほぼ一定であること、(2) NaCl あるいはそのセカンドメッセンジャーであるアブシジン酸の処理により PR-5d 遺伝子の発現が顕著に減少するのに対し、ERF1 および ERF3 遺伝子の発現量には変化がないことを示し、ERF による PR-5d の発現の制御は単純な ERF の転写誘導とそれに引き続く PR-5d 遺伝子の発現誘導によるものではなく、ERF の転写後制御が重要であることを示した。

第 2 章では、ERF の転写後制御に関わる因子を明らかにするために、特に転写抑制活性を持つ ERF3 を対象として、ERF3 と結合するタンパク質の単離と解析を記述している。まず、ERF3 が転写抑制活性を持ち、他の ERF の転写誘導活性を抑制することを一過的タバコ BY2 細胞発現実験系で確認した。続いて、酵母中で転写活性化能を持たない C 末端を欠失した ERF3 (1-196) と GAL4-DNA 結合領域の融合タンパク質を用いて、タバコ N II 培養細胞から調製した cDNA ライブラリーをスクリーニングし、ERF3 (1-196) と特異的な相互作用を示すクローン b8 を単離した。さらにこれらタンパク質間の相互作用を詳細に解析し、このクローンと ERF3 の相互作用には ERF3 に特異的な ERF3 (92-196) の領域のみが必要であり、他の ERF は相互作用しないことを明らかにした。

一方、クローン b8 の塩基配列決定により、本遺伝子がユビキチン結合酵素 (NtUBC) 遺伝子の部分配列をコードしていることを明らかにした。さらに、全長 cDNA (NtUBC2) を単離し、NtUBC2 は既知の UBC と相同性が高く、活性中心である 88 番目の cysteine 残基も保存していることから、NtUBC2 がユビキチン結合酵素として機能していると推測した。NtUBC2 遺伝子は培養細胞ならびに植物体のいずれの組織においても発現していること、また、核と細胞質の両方に存在することを明らかにした。

第 3 章においては、酵母内で認められた ERF3 と NtUBC2 の物理的な相互作用が、植物細胞内で実際に機能するかどうかについて検討した結果を記述している。前述の一過的遺伝子発現実験系を用い、88 番目の Cys を Ala に置換した不活性

型 NtUBC2 (NtUBC2 (C88A)) の過剰発現の効果を検討した。まず, NtUBC2 および NtUBC2 (C88A) の一過的発現がレポーター遺伝子の発現や ERF4 による転写促進活性に影響を与えないことを確かめた。続いて, ERF3, ERF4 と共に NtUBC2 あるいは NtUBC2 (C88A) を一過的に共発現させ, NtUBC2 との共発現はレポーター遺伝子の発現に変化をもたらさないが, NtUBC2 (C88A) との共発現はレポーター遺伝子の発現を減少させることを認めた。すなわち, ERF3 の転写抑制活性が不活性型 NtUBC2 の発現により強められたことから, タバコ細胞内で NtUBC2 は ERF3 の転写抑制活性を負に制御していることを明らかとした。

以上のように, 本研究において NtUBC2 が ERF3 の転写抑制活性を負に制御して, PR-5d を含む GCC 配列を持つ PR 遺伝子の発現を制御するというシグナル伝達系の一端が初めて明らかになった。

論文審査の結果の要旨

植物体は外界からのストレスに対して, 構成的, あるいは誘導的に防御反応を発現している。このような防御応答機構の解析は, 植物における遺伝子発現制御機構を理解し, その応用を計るうえで重要である。本研究は病害菌の感染により誘導される病原菌感染誘導性タンパク質 (PR タンパク質) のうち, エチレン応答性シス配列である GCC 配列により発現が制御されているタバコオスモチン様タンパク質 (OLP, PR-5d) をモデルに, その GCC シス配列に結合するエチレン応答性因子 (Ethylene-responsive factor, ERF) を介して, 発現誘導が制御されるシグナル伝達機構を分子レベルで解明することを試みたものであり, その評価できる内容は以下の通りである。

1. タバコ培養細胞における PR-5d および ERF 遺伝子群の発現の解析により, ERF による PR-5d 遺伝子の転写制御が ERF の転写後調節により行われていることを明らかとしている。
2. タバコ ERF1-4 のうち, ERF3 は転写抑制活性を持ち, 他の ERF の転写誘導活性を抑制することを一過的タバコ BY2 細胞発現実験系で確認している。
3. 酵母中で転写活性化能を持たない ERF3 (1-196) と GAL4-DNA 結合領域の融合タンパク質を用いて, タバコ N II 培養細胞から ERF3 (1-196) と特異的な相互作用を示すクローン b8 を単離している。
4. クローン b8 と ERF3 の相互作用には ERF3 (92-196) の領域のみが必要であり, 他の ERF とは相互作用しないことを明らかとしている。
5. 塩基配列決定により, クローン b8 がユビキチン結合酵素 (NtUBC2) 遺伝子の部分配列であり, NtUBC2 遺伝子は調べた細胞全てにおいて発現し, 核と細胞質の両方に存在することを明らかとしている。
6. 酵母内で認められた ERF3 と NtUBC2 の物理的な相互作用が, 植物細胞内で実際に機能することを不活性型 NtUBC2 (NtUBC2 (C88A)) の一過的過剰発現により検討し, NtUBC2 は ERF3 の転写抑制活性を負に制御していることを明らかとしている。

以上のように本論文は, PR-5d の発現調節において転写因子 ERF の転写後調節が重要であること, さらに, ERF3 の転写抑制活性を NtUBC2 が調節することが重要であることを初めて明らかにしたものであり, 植物分子細胞生物学, 植物分子細胞育種学の発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお, 平成13年6月20日, 論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果, 博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。