

氏名	おおざしまき 大岸麻紀
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2353号
学位授与の日付	平成13年3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	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	光形態形成を制御する転写因子 ATHB-2 の機能解析

論文調査委員 (主査) 教授 岡 穆宏 教授 井口 八郎 教授 七田 芳則

### 論文内容の要旨

高等植物の形態形成は個体発生プログラムによって規定されているだけでなく、外部環境シグナルによっても大きく影響を受ける。このような形態的可塑性は植物形態形成を理解する上で重要な点であるにもかかわらず、これまで環境シグナルから形態形成へとつながる情報伝達経路に関する知見は極少数にとどまる。申請論文においては、近赤外光刺激によって発現誘導され、shade avoidance 応答に伴う形態的变化に関与するシロイヌナズンのホメオドメイン型転写因子 ATHB-2 に注目した。そして、それを中心とした転写制御ネットワークを解析することにより、近赤外光シグナルから shade avoidance 応答につながる植物形態形成制御機構を明らかにしようとした。

ATHB-2 が直接に転写制御を行う標的遺伝子を同定するために、ATHB-2 の DNA 結合ドメイン、ヘルペスウィルスの転写因子 VP16 の強い転写活性化ドメイン、およびラットのグルココルチコイド受容体のホルモン結合ドメインを融合したキメラ転写因子遺伝子 *HD-Zip-2-V-G* を作製し、形質転換系を用いてシロイヌナズナに導入した。この形質転換シロイヌナズナではグルココルチコイドの誘導體デキサメタゾン (DEX) とタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドを同時に加えることによって、直接の標的遺伝子のみの転写を上昇させることができる。まず、この形質転換植物に対して DEX を作用させたところ、胚軸および葉柄の肥大生長が観察された。ATHB-2 を過剰発現する形質転換シロイヌナズナでは胚軸や葉柄の伸長生長が起こること、および *HD-Zip-2-V-G* が転写活性化因子として働くことから、ATHB-2 は転写のリプレッサーではないかと考えられた。また、一過的発現系を用いた解析においても ATHB-2 がリプレッサーとして働くことが確認された。次に、*HD-Zip-2-V-G* を発現する形質転換植物を用いて、ATHB-2 の標的遺伝子を検索する実験を行ったところ、ATHB-2 遺伝子自身および *HD-Zip II* サブファミリーに属する遺伝子群すべてが ATHB-2 の標的遺伝子であることが判明した。それらの遺伝子では、ATHB-2 がリプレッサーとして働くことから予想されるように、ATHB-2 の過剰発現植物体内では転写量が低下していることが確かめられた。また、ATHB-2 遺伝子においては実際に ATHB-2 タンパク質が上流領域に結合することが、DNase I-footprinting 法により確認された。さらに ATHB-2 に認識される *HD-Zip II* サブファミリー遺伝子の一つである *HAT2* 遺伝子の機能解析を行ったところ、植物体における発現領域、光刺激や植物ホルモンに対する応答性、過剰発現植物体の表現型の点で、ATHB-2 と同様の性質を有することが判明した。

以上のように、申請論文はシロイヌナズナの shade avoidance 応答において形態形成制御に関わる転写因子 ATHB-2 が、転写のリプレッサーとして働き、負の自己制御を含む複雑な転写制御ネットワークを形成していることを明らかにした。

なお、主論文の基礎となる論文 2 編は申請論文の研究成果の一部を共著者とともに公表したものである。

### 論文審査の結果の要旨

環境に応答する形態的可塑性は植物特有の現象であり、植物形態形成を理解する上で最も重要な点である。申請論文においては、このような植物形態形成に関する研究を行うために、高等植物における shade avoidance 応答という現象に関与

する転写因子 *ATHB-2* に注目した。植物は光の強度、光質、日周性などの様々な光シグナルに対して応答し、それらのシグナル伝達経路も多種多様であると考えられる。shade avoidance 応答に関しては、近赤外光の赤色光に対する強度比が高くなることがシグナルの実体であること、しかもそのシグナルは赤色光・近赤外光受容体であるフィトクロムによって感知されることが判明している。さらに最近、シロイヌナズンの *ATHB-2* が転写因子をコードする遺伝子としては初めて、フィトクロムを介する高近赤外光/赤色光比シグナルにより発現誘導を受けることが明らかになった。*ATHB-2* に関しては、以前から、胚軸の伸長などの光形態形成に関与することが指摘されていたことから、*ATHB-2* が shade avoidance 応答において中心的な働きをする転写因子であると考えられた。このような状況において、*ATHB-2* を中心とする転写制御ネットワークの解析を行うことは非常に意義深いことであり、遺伝子の発現制御という観点を持ち込むことは、shade avoidance 応答という現象の分子生物学的理解につながるものと考えられる。

アプローチとしては、動物の転写因子研究で多用されているステロイドホルモン受容体のホルモン結合ドメインを利用した転写活性化能誘導系が用いられた。この系は、植物においても転写因子の標的遺伝子を検索する目的で使用され始めているが、申請論文においては転写因子一般に利用できる誘導系として開発されている点も意義が大きい。実際の検索の結果、shade avoidance 応答時の形態につながる機能タンパク質をコードする遺伝子の同定には至らなかったが、*ATHB-2* 自身に対する負の自己制御を発見した。これは植物においては初めての負の自己転写制御の例であり、*ATHB-2* の発現量が非常に厳密に制御されていることを意味する。さらに、*ATHB-2* はそれと paralogous な遺伝子群全体を負に制御すること、およびそれらの遺伝子の一つは *ATHB-2* とほぼ同様の機能を有していることが明らかにされた。これら一連の実験から、shade avoidance 応答において *ATHB-2* を含む複雑な転写制御ネットワークが形態形成制御に関わっていることを明らかにした。

ここに得られた研究成果は、高等植物の形態形成制御における複雑性を遺伝子転写制御という観点から理解しようとしたものであり、植物転写因子研究の新しいアプローチを示した点においても高く評価される。よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年2月2日、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。