

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	野田 壮一郎
論文題目	Functional characterization of a RING-type ubiquitin ligase and MYB transcription factors involved in secondary cell wall formation (二次細胞壁形成に関与するRING型ユビキチンリガーゼおよびMYB転写因子の機能解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>陸上バイオマスの約90%を占める木質は、主に二次細胞壁で構成されている。二次細胞壁形成の制御機構の解明は、維管束植物に固有の代謝プロセスを理解し、木質の改良へ向けた植物の分子育種を進めるために重要である。</p> <p>近年、双子葉植物のシロイヌナズナなどでは、二次細胞壁形成過程において遺伝子の転写を制御する転写因子が徐々に明らかにされているが、転写因子による転写の直接的制御以外の二次細胞壁形成制御機構については、ほとんど解明されていない。また、イネ科植物の二次細胞壁成分の化学構造は、双子葉植物のものとは異なっているが、それらの生合成遺伝子の転写制御については不明な点が多い。</p> <p>E3ユビキチンリガーゼは、ユビキチン-プロテアソーム経路によるタンパク質分解において標的タンパク質の選択性を決定する重要な酵素である。RINGフィンゲータンパク質は、その最も代表的な触媒サブユニットとして知られている。本論文では、ユビキチン-プロテアソーム経路によるタンパク質の選択的分解が二次細胞壁の形成を制御していると推測し、遺伝子共発現解析によりシロイヌナズナのE3ユビキチンリガーゼをコードする遺伝子の候補を探索した。そして、その結果見出されたRINGフィンゲータンパク質ATL54 (Arabidopsis Tóxicos en Levadura54) の機能解析を行った。さらに、遺伝子共発現解析により、イネの二次細胞壁形成に関わる転写因子を探索し、見出された4種類の転写因子の解析を行った。</p> <p>第1章では、シロイヌナズナのE3ユビキチンリガーゼ候補の探索を行い、そこで見出されたATL54の機能解析を行った。まず、遺伝子共発現解析により、ATL54、ATL11、ATL72、At2g20650などのRINGフィンゲータンパク質遺伝子が、シロイヌナズナの二次細胞壁形成に関与する転写因子遺伝子や酵素遺伝子と高い共発現性を有することを示した。次いで、ATL54の組換えタンパク質がユビキチンリガーゼ活性を有することを示した。さらに、ATL54ノックアウト変異体の伸長中の花茎の先端部では、二次細胞壁のセルロース、リグニン、キシランの各生合成酵素遺伝子の発現が上昇し、ATL54ノックアウト変異体およびATL54過剰発現体の花茎中央部では、木部道管のプログラム細胞死関連遺伝子の発現が低下することを見出した。以上の結果により、ATL54が二次細胞壁の生合成および木部道管のプログラム細胞死に関与するユビキチンリガーゼであることが示唆された。</p>			

第2章では、*ATL54*の機能についてさらに深く検討した。すなわち、*GUS*レポーター遺伝子を用いた解析により、*ATL54*の発現が、花茎の道管や繊維細胞、胚軸の形成層の内側、根や展開中の葉の葉脈など、二次細胞壁形成とプログラム細胞死が起こる組織で認められることを示した。一方、デュアルルシフェラーゼアッセイにより、二次細胞壁生合成のマスター制御因子である*AtMYB46*が*ATL54*プロモーターに対する転写活性化能を有することを示した。また、ゲルシフトアッセイにより、*AtMYB46*が*ATL54*プロモーターの少なくとも2箇所に特異的に結合することを見出した。これらの結果により、*AtMYB46*による直接の転写活性化を介した、*ATL54*の二次細胞壁形成への関与が強く示唆された。

第3章では、遺伝子共発現解析により、イネの二次細胞壁成分の生合成酵素遺伝子と共発現している6種類の*MYB*転写因子遺伝子を見出した。そのうちの4種類の転写因子遺伝子*OsMYB63*、*OsMYB61*、*OsMYB61-L*、*OsMYB85*は、いずれも稈の節間や節など、二次細胞壁が発達する器官で高発現することを示した。また、デュアルルシフェラーゼアッセイにより、*OsMYB63*と*OsMYB61-L*が、イネの二次細胞壁特異的なセルロース生合成遺伝子である*OsCesA7*のプロモーターに対して、転写活性化能をもつことを見出した。さらに、ゲルシフトアッセイにより、*OsMYB63*は、*OsCesA7*プロモーターに存在する2種類のシスエレメントに特異的に結合することを見出した。*OsMYB63*は、リグニン生合成に特異的にはたらくシロイヌナズナの*AtMYB63*や*AtMYB58*のホモログであるが、上記の結果は*OsMYB63*がセルロース生合成遺伝子*OsCesA7*の発現を直接的に制御するというを示している。これらの結果により、イネとシロイヌナズナでは、*MYB*転写因子による二次細胞壁成分生合成の転写制御機構が異なっていることが示された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

二次細胞壁形成の制御機構に関して、これまで転写因子による遺伝子発現の制御が徐々に解明されてきたが、他の制御機構についてはほとんど解明されていなかった。また、二次細胞壁成分生合成における、イネ科植物と双子葉植物との転写制御機構の相違についてはほとんど検討されていなかった。本論文は、転写因子による転写制御とは異なる二次細胞壁形成制御機構として、ユビキチン-プロテアソーム経路によるタンパク質分解系を想定し、それに関わる因子の探索および機能解析を行うとともに、イネにおいて二次細胞壁成分生合成を制御する転写因子を解析したものである。成果として評価すべき点は以下の通りである。

- 1) E3ユビキチンリガーゼの二次細胞壁形成への関与を初めて提唱し、E3ユビキチンリガーゼの代表的触媒サブユニットであるRINGフィンガータンパク質の一種、ATL54の機能解析を行った。
- 2) シロイヌナズナの二次細胞壁生合成のマスター制御因子であるAtMYB46がATL54の転写を直接活性化することを示し、植物二次細胞壁形成統御における新たな機構を提案した。
- 3) イネのOsMYB63が、シロイヌナズナにおけるホモログであるAtMYB58およびAtMYB63とは異なり、セルロース生合成遺伝子の発現を直接制御することを示した。このことにより、イネとシロイヌナズナでは、MYB転写因子による二次細胞壁成分生合成の転写制御機構が異なっていることを示した。

以上のように本論文は、植物二次細胞壁形成を調節する新奇な制御因子の存在を見出し、またイネ科植物における二次細胞壁成分生合成の転写制御に関して新たな知見を示したものであり、植物生理学、植物代謝工学、植物資源科学、木質科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26年2月10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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：平成26年6月20日以降(学位授与日から3ヶ月以内)