

氏 名	たに ぐち まさ とし 谷 口 雅 俊
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 3177 号
学位授与の日付	平 成 19 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 学 専 攻
学位論文題目	ARR1 による多様な機能を有する遺伝子群への直接的な転写制御
論文調査委員	(主 査) 教 授 岡 穆 宏 教 授 大 野 陸 人 教 授 七 田 芳 則

論 文 内 容 の 要 旨

サイトカイニンとは植物の細胞分裂を誘導する物質として同定された植物ホルモンの一種である。サイトカイニンは細胞増殖のみならず種子発芽、頂芽優性、葉緑体分化、栄養増殖から生殖増殖へのシフト、果実の発生、葉の老化など様々な事象の誘導・制御に関わっている。モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究から、サイトカイニンは膜結合ヒスチジンキナーゼ (CRE1 など 3 種) によって受容され、そのシグナルが HPt ドメインを有する介在分子 (AHP1 など 5 種) へ、そしてさらに転写因子型 (以下タイプ B とよぶ) 応答因子 (ARR1 など 11 種) へと伝達される。この細胞内シグナル伝達系は原核生物に広く見られる二成分制御系との類似性から、各分子間の His から Asp あるいは Asp から His へのリン酸基の受け渡しリレーによると考えられている。タイプ B 応答因子がサイトカイニンによって活性化される転写因子であることから、植物のサイトカイニン初期応答はこれらタイプ B 応答因子の多様な標的遺伝子群の発現によってもたらされていることが期待される。また、タイプ B 応答因子遺伝子はシロイヌナズナ染色体中に 11 個存在し、ほとんど全てサイトカイニンによって活性化されることが知られているが、その機能分担については明らかでない。

本研究では植物個体レベルにおいて、サイトカイニンに反応して起こる生理現象へとつながるシグナル伝達経路を明らかにするため、タイプ B 応答因子の標的遺伝子群を網羅的に解析し、様々な遺伝子がサイトカイニン初発応答標的遺伝子として働いていることを示した。タイプ B 応答因子の代表として、最初にクローニングされ、また転写量も比較的多い ARR1 を使用した。ARR1 の転写因子としての活性を人工的に制御できるように、哺乳類由来のステロイドホルモン受容体とのキメラ遺伝子 *35S-ARR1ΔDDK-GR* をシロイヌナズナに導入し、デキサメタゾン (Dex) の有無による転写パターンの違いから、ARR1 の直接標的遺伝子を探索した。

まず最初に、これまでに報告のあるサイトカイニン応答遺伝子群について Dex 添加による転写量の変動を、マイクロアレイとノザンプロット解析で調べ、サイトカイニン初発応答遺伝子と報告されたほとんど全ての遺伝子が ARR1 によって転写活性化され得ることを示した。また、ARR1 遺伝子欠損変異体 *arr1-1* を用いた遺伝子発現解析から、それら標的遺伝子群のサイトカイニン誘導における ARR1 の寄与の程度は、それぞれの遺伝子によって異なり、Dex 処理によって ARR1 を介して転写誘導され得るが、*arr1-1* 変異株でその誘導量にほとんど変化がない標的遺伝子もあった。したがって標的遺伝子によっては、ARR1 以外のタイプ B 応答因子の寄与が大きいことが推察された。

次いで、High Coverage Expression Profiling (HiCEP) 解析により *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換植物における ARR1 転写活性化能誘導時と非誘導時の遺伝子発現を比較することで、さらなる ARR1 標的遺伝子をスクリーニングした。

さらに ARR1 直接標的遺伝子のプロモーター配列の特徴を見出すために、標的遺伝子のプロモーター中に含まれる配列を *in silico* 解析し、5'-AAGAT(C/T)-3'、5'-GAT(C/T)TT-3'、5'-AAGAT(C/T)TT-3' が非標的遺伝子プロモーターより高頻度で出現することを見いだした。標的遺伝子の一つである ARR6 のプロモーター DNA 断片を用いて ARR1 との相互作用を調べ ARR1 が、5'-GATTTT-3' に 5'-AAGATTTT-3' に特異的に結合することを示した。

このようにして同定された合計23の ARR1 の直接標的遺伝子群には、タイプ A 応答因子、サイトカイニン代謝酵素、転写因子、病害抵抗応答タンパク質など様々な機能をもつタンパク質をコードするものが含まれていた。また、この23の ARR1 標的遺伝子のうち、21遺伝子がサイトカイニン初発応答遺伝子であることを確認し、また17遺伝子に関しては ARR1 が、他のタイプ B 応答因子よりも、サイトカイニンによる転写活性化に寄与していることを明らかにした。これらの結果は、His-Asp リン酸リレーが、多様な機能をもつ ARR1 標的遺伝子群の転写活性化を通して植物個体レベルにおける様々なサイトカイニン応答現象の制御に関わっていることを示している。また、ARR1 とそのパラログであるタイプ B 応答因子群がサイトカイニン初発応答における転写活性化のほとんど全てを行っていることが示されたことは、植物細胞レベルにおけるサイトカイニン応答の初期シグナル伝達が、主に His-Asp リン酸リレーを介して行われていることを意味しており、他のサイトカイニンシグナル伝達系は存在しないか、もし存在したとしても副次的なものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

サイトカイニンは植物の細胞分裂を誘導する物質として同定された植物ホルモンの一種で、その実体は2アミノプリン誘導体あるいはジフェニルウレア誘導体で、天然および合成の両化合物が知られている。サイトカイニンは細胞増殖をはじめ、種子発芽、頂芽優性、維管束形成、葉緑体分化、栄養増殖から生殖増殖へのシフト、果実の発生、葉の老化など様々な発生・分化および生理現象の誘導・制御に関わっている。モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究から、サイトカイニン初期応答における細胞内シグナル伝達は、原核生物の二成分制御系と類似のタンパク質成分が関わっていることが示されている。しかしこの制御系と様々なサイトカイニン応答反応とのリンクに関してはほとんど理解されていない。また原核生物の場合と異なり、膜結合受容体 (CRE1 など3種) および細胞質性応答因子 (ARR1 など11種) がそれぞれ小さな遺伝子ファミリーを形成している。また、ファミリー内での機能分担についての情報は皆無である。さらに3種類存在するサイトカイニン受容体を全て破壊しても植物が生長し得ることから、二成分制御系以外のサイトカイニン応答細胞内シグナル伝達経路の存在も示唆されてきた。

本申請論文はサイトカイニンによって活性化される細胞質性転写因子型応答因子の一つ ARR1 を用いて、その標的遺伝子群を、マイクロアレイ・ノザンプロット・HiCEP などの実験手法を駆使して網羅的にスクリーニングし、これまでに報告されているサイトカイニン初発応答遺伝子と比較・検討したものである。特徴的なことは、サイトカイニン処理時の複雑なノイズを取り除くために、ARR1 を人工的に活性制御できるように改変した *35S-ARR1ΔDDK-GR* を用いて実験を行ったことである。このキメラ遺伝子を有する形質転換植物ではデキサメタゾン (Dex) の添加により、新たなタンパク質合成なしに ARR1 の転写活性化能が誘導される。したがって Dex を加えて短時間内に転写量が増大する遺伝子をスクリーニングすることにより ARR1 の直接の標的遺伝子 (潜在的なものも含めて) を同定することができる。一方、ARR1 欠損株におけるこれら標的遺伝子のサイトカイニン応答性の低下から、実際のサイトカイニン応答時における各標的遺伝子に対する ARR1 の寄与の程度が測定できる。

スクリーニングの結果、これまでに報告されているサイトカイニン初発応答遺伝子を含む23遺伝子が ARR1 の直接標的遺伝子となり得ることが明らかになり、このうち17遺伝子に関しては植物個体の実際のサイトカイニン応答時に ARR1 が、各標的遺伝子で程度の差はあるものの、直接寄与していることが明らかになった。また、23標的遺伝子のうち21遺伝子がサイトカイニン初発応答遺伝子であることから、ARR1 およびそのパラログ応答因子群が大部分のサイトカイニン初発応答遺伝子の転写誘導に関与していることも明らかになった。このことは、サイトカイニン初期応答の細胞内シグナル伝達は、CRE1・ARR1 ファミリーが関わる制御系以外には存在しないか、存在したとしても副次的な制御系であることを示唆している。

同定した23の ARR1 直接標的遺伝子のプロモーター配列の特徴を見出すために、標的遺伝子のプロモーター中に含まれる配列を *in silico* 解析した。ARR1 は *in vitro* で 5'-GAT(C/T)-3' を含むオリゴ DNA に特異的に結合することが知られているが、この配列が標的遺伝子プロモーター中に非標的遺伝子プロモーター中より高頻度で出現すること、さらにこの配列を含んだ 5'-AAGAT(C/T)-3', 5'-GAT(C/T)TT-3', 5'-AAGAT(C/T)TT-3' がより高頻度で出現することを見いだした。標的遺伝子の一つである ARR6 のプロモーター DNA 断片を用いて ARR1 との相互作用を調べたところ、5'-

GATTTT-3' に 5'-AAGATTTT-3' に特異的に結合していることが確認された。

本研究により、植物個体レベルにおけるサイトカイニン応答が二成分制御系のタイプ B 応答因子群による、様々な機能をもつタンパク質をコードする標的遺伝子群の転写活性化を介して制御されていることが解明された。さらに云えば、今回明らかにされた ARR1 の直接標的遺伝子である、タイプ A 応答因子、サイトカイニン代謝酵素、各種転写因子・シグナル伝達分子など多様な機能をもったタンパク質あるいは、これらによって二次的に転写活性化される遺伝子（群）およびこれらによって二次的に修飾された細胞成分の働きによって、今までに報告されているサイトカイニンの多様な分化・発生および生理機能の誘導・制御がなされていることを示しており、今後のサイトカイニン応答の研究を方向付けたものと云える。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。また、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。