

氏 名	さか い ひろ え 酒 井 啓 江
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2359 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	シロイヌナズナのサイトカイニン応答に関わる二成分制御系レスポンス レギュレーターの研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 岡 穆 宏 教 授 上 村 匡 教 授 七 田 芳 則
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

細胞は外界からの様々な刺激を感知し、的確に応答するための細胞内シグナル伝達機構を有している。二成分制御系は原核生物において広範な環境刺激に応答するためのシグナル伝達系である。この系では環境刺激は膜貫通型受容体によって認識された後、固有の機能をもつ細胞質性応答因子のシグナル受容ドメインへのリン酸基転移という形で伝達される。この系は原核生物に特有のシグナル伝達機構であると長らく考えられてきたが近年、酵母の浸透圧応答や高等植物の植物ホルモン応答にもこの制御系に類似の受容体を用いられている可能性が示されつつあった。しかし植物の応答因子に関する報告は皆無であった。植物細胞において二成分制御系がどのようなシグナル伝達経路に組み込まれているかを明らかにするために、受容体からのリン酸基転移の到達点に位置し、そのシグナルが関与する応答を直接制御する応答因子に注目し、応答因子遺伝子の単離を試みた。応答因子のシグナル受容ドメイン内の特定の短い領域でアミノ酸配列のプロファイルを作成し、それと共通性が高い真核生物由来 EST を *in silico* スクリーニングによって抽出し、その配列をもとに新規の応答因子遺伝子 *ARR1* および *ARR2* を単離した。両遺伝子産物は類似したドメイン構造をもち、N 末端側にシグナル受容ドメイン、その直後に核移行シグナル、中央には原癌遺伝子産物 Myb の DNA 結合ドメインと微弱相同性を示す領域 (ARRM ドメイン)、C 末端側にはグルタミンやプロリンに富んだ領域 (Q ドメイン) が存在した。このような構造的な特性から両遺伝子産物は転写因子型応答因子として機能することが推測され、実際に以下の実験から確認された：(1)両遺伝子産物はシグナル受容ドメインの有無に関わらずタマネギの表皮細胞においてもシロイヌナズナ個体においても核に局在した、(2)Q ドメインは酵母の GAL4 DNA 結合ドメインと連結させたときタバコ葉細胞において転写活性化ドメインとして機能した、(3)ARRM ドメインは配列特異的に二本鎖 DNA に結合した、(4)両遺伝子産物は単独で自身の結合配列をプロモーター領域に含む遺伝子の転写を活性化した。

次に、植物細胞内における両遺伝子の機能について過剰発現あるいは誘導発現する形質転換植物を用いて解析した。*ARR1* の過剰発現は子葉の肥大化や主根における若干の伸長抑制を引き起こすに留まるが、植物ホルモンであるサイトカイニン存在下では茎頂、子葉、胚軸において、異所的なシュートおよびカルス形成を誘導し、根においては著しい伸長抑制を引き起こした。この形態はサイトカイニン非存在下で、シグナル受容ドメイン領域を欠失させた *ARR1* の過剰発現によって引き起こされる形態と酷似していた。さらに、*ARR1* の転写因子活性を誘導的に制御できる系を用いてサイトカイニンの初期応答遺伝子である *ARR6* 遺伝子が *ARR1* の直接の標的遺伝子であることを明らかにした。

以上のように、申請論文は植物から初めて二成分制御系に属する転写因子型応答因子遺伝子の単離に成功し、これらがシロイヌナズナのサイトカイニン応答において重要な役割を果た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

細胞は自身をとりまく環境変化を刺激として感知し、この刺激をシグナルという形で細胞内に伝達することにより、的確な応答を引き起こす。このようなシグナル伝達機構を巧妙に駆使することによって、細胞は様々な環境変化に適応している。二成分制御系は原核生物で普遍的に見られる環境刺激に応答するためのシグナル伝達系であり、シグナル伝達の実体はリン酸基転移反応である。

本申請論文は高等植物から初めて二成分制御系に属する応答因子遺伝子二つ (*ARR1* および *ARR2*) を cDNA クローンとともに単離し、その翻訳産物のドメイン解析から、核移行能、塩基配列特異的な二本鎖 DNA 結合能および転写活性化能を有することを示した。さらに両遺伝子産物がそれぞれ単独で植物細胞内で転写活性化因子として機能することも明らかにした。

次いでこの *ARR1* 遺伝子 (以下 *ARR2* も同様) を過剰発現する形質転換植物ではサイトカイニン応答 (茎頂、子葉、胚軸における異所的なシュートおよびカルス形成、根に招ける著しい伸長抑制) の感受性が高くなることを示した。シグナル受容ドメインを欠いた *ARR1* 遺伝子を過剰に発現する形質転換植物ではサイトカイニン非存在下でも顕著なサイトカイニン応答が起こることから、*ARR1* はサイトカイニン応答を正に制御しており、シグナル受容ドメインはその活性をマスクしていることが明らかになった。さらにこの遺伝子産物の転写活性化能を人為的に誘導可能な形質転換植物を用いて、誘導条件下で転写量が増加する遺伝子 (*ARR1* の標的遺伝子候補) の探索を行い、幾つかの候補を得たが、その中の *ARR6* 遺伝子が *ARR1* によって直接 (新たなタンパク質合成なしで) 転写活性化されることも示した。*ARR6* は *ARR1* などとあい前後して単離された応答因子の一つでシグナル受容ドメインのみからなりサイトカイニンによってその発現が上昇することが知られている遺伝子の一つである。

ここに得られた研究成果は、高等植物にも原核生物と類似の二成分制御系が存在し、転写因子型応答因子の *ARR1* および *ARR2* がサイトカイニン応答に関わっていることを示したものであり、植物の細胞内シグナル伝達研究とりわけこれまでほとんど理解されていなかったサイトカイニンシグナル伝達に関する研究の突破口を開いた点において高く評価される。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。