

氏 名	さか もと ひで き 坂 本 秀 樹
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2522 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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 ZPT 型 zinc-finger 転写因子群の分子生物学的研究

論文調査委員	(主 査) 助教授 飯 哲 夫	教 授 西村いくこ	教 授 長谷あきら
--------	--------------------	-----------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

TFIIIA 型 zinc-finger は最も歴史のある DNA 結合ドメインの一つである。このタイプの zinc-finger を持つ植物の転写因子は、動物のものとは異なるいくつかの構造的特徴を持ち、ZPT 型と総称される。申請者は ZPT 型因子の中でも 2 つの zinc-finger を有す因子群に焦点を当て、それらの生物学的機能を明らかにすることを目的として、シロイヌナズナから 4 種、コムギから 1 種の計 5 種の因子を対象に、転写因子としての機能とそれらをコードする遺伝子の発現を解析した。

申請者は、ZPT 型 zinc-finger 遺伝子をシロイヌナズナから新規に 3 種単離し、AZF1, AZF2, AZF3 と名付けた。さらに既知の 1 種 (STZ) を加えて、構造的特徴を記述した後、これらの転写因子としての機能解析を行った。まず、AZF/STZ 因子が核に局在することを示し、次に徹底した DNA 結合実験を行い、これらの因子が共通して A(C/G)TN3-4A(G/C)T 配列を特異的に認識することを明らかにした。この結果に基づき、従来の考えを修正した新たな結合様式のモデルを提唱した。AZF/STZ 因子の転写における役割を明らかにするために、シロイヌナズナの葉肉プロトプラストを用いた一過的発現解析をした。全ての因子に転写活性化能はみられず、複数の転写活性化因子との組み合わせ実験によって、AZF/STZ 因子が転写を抑制する負の転写制御因子であることを明らかにした。

各因子の生物学的機能を明らかにする目的で、RNA プロット解析および形質転換体を用いたプロモーター解析を行い、発現部位や、ストレス・ホルモン等による発現量の変動を調べた。その結果、AZF/STZ 遺伝子が水ストレスに応答することを見出した。特に AZF2 と STZ の発現量の上昇が顕著であった。しかし、STZ が、塩、乾燥、低温、アブシジン酸に応答する一方で、AZF2 は、塩、乾燥、アブシジン酸には応答性を示すものの、低温には応答せず、2 種の遺伝子がストレス時に機能を分担していることが示唆された。非ストレス下では根での発現が多かったが、水ストレス応答は、根よりも地上部で強く生じることが示された。AZF1 と AZF3 の発現レベルは低く、乾燥処理に対する若干の誘導性とエチレンに対する応答性が示された。AZF あるいは STZ の発現量を強制的に変えた形質転換体の解析から、これらの因子の発現量は厳密に制御される必要があり、この制御が損なわれると生育に致命的なダメージを与えること、またストレスに過敏になることが示唆された。

申請者は、上記の因子と同じグループに属するコムギの因子 WZF1 に関しても同様の解析をした。その結果、WZF1 も A(C/G)TN3-4A(G/C)T 配列を特異的に認識すること、水ストレスに応答すること、その中でもナトリウムイオン、リチウムイオンによる塩ストレスに特異的に応答することを示した。また、WZF1 を強制発現させた形質転換タバコにおいても、野生株と比較して塩ストレスに対し弱い形質が示された。

以上の一連の結果に基づき、2 つの ZPT 型 zinc-finger をもつ一群の転写因子が、共通して水ストレスに関わる可能性を指摘した。さらに、それぞれの因子は重複しつつも異なる刺激の下流で転写抑制因子として機能するモデルを提唱した。

論文審査の結果の要旨

遺伝子の発現は様々なレベルで制御されているが、その最初のステップである転写レベルでの制御が最も動的であり且つ重要な位置を占めている。動物の ZPT 型 zinc-finger 転写因子は、zinc-finger をタンデムに持つという特徴があるが、植物は 1 乃至 4 個の finger を数十アミノ酸離れて持つという特徴や、finger の内外に植物の因子にのみ見出される配列があることから、結合様式や転写制御における役割が動物と植物では異なることが示唆されている。

申請者は、植物の ZPT 型因子の中でも 2 つの finger をもつ一群の因子の機能を明らかにすべく、シロイヌナズナから新規に 3 種の遺伝子 (AZF1, AZF2, AZF3) を単離し、既知の 1 つ (STZ) を加えて、これらの遺伝子の発現と、コードする転写因子のタンパク質としての機能を詳細に解析した。その結果、これらの因子が共通して、A(C/G)TN3-4A(G/C)T 配列を認識することを明らかにした。注目すべき点は 2 つの A(C/G)T コア配列の間の長さであり、これまでの 2 つの finger 間のアミノ酸の長さに応じて 2 つのコアの長さが変わるという考えを覆すものであった。また、転写に関しては、転写活性化因子の働きを抑える転写抑制因子として機能することを明らかにした。植物においては転写抑制因子の研究が遅れており、申請者の得た結果は高く評価できるものである。

乾燥、塩、低温など浸透圧上昇を引き起こすストレスは総称して水ストレスとよばれる。AZF および STZ 遺伝子の発現解析の結果は、これら一群の遺伝子が水ストレス応答において機能することを示している。また、解析した個々の遺伝子は、互いに重複するが、異なる組み合わせの刺激に応答し、植物の細胞機能の微調整を可能にする仕組みの一端を伺わせる結果を提出している。また、形質転換植物を用いた実験結果は、AZF/STZ 因子の発現が厳密に制御される必要性を示唆している。ストレス下での遺伝子発現の抑制は、過剰発現時の細胞をストレス状態におく結果であると解釈される。

申請者は AZF/STZ 因子と同様の解析をコムギの因子 WZF1 についても行い、これらの因子が DNA 結合特異性、水ストレス応答などの点で共通の枠組みの中で機能することを示している。転写因子はその DNA 結合ドメインによりグループ化され、同じグループに属する因子が、特定の生物学的現象の中で、微妙に機能を分担している場合がある。申請者が、2 つの ZPT 型 zinc-finger を持つ植物の因子群が、共通して水ストレスに応答することを示した点は先駆的である。ZPT 型 zinc-finger 因子の機能についての以前の研究は発生などに焦点を当てたものであったが、申請者の研究結果は、従来の研究が必ずしも本質をついたものではなかったことを示している。これは同時に、申請者の着眼点が優れたものであること意味している。

水ストレスに関する研究は、耐塩性・耐乾燥性作物の育種などの実用的な側面もあり、非常に多い。それにもかかわらず、水ストレス下での遺伝子の発現抑制はほとんど研究対象にされてこなかった。申請者の研究は、転写制御と転写因子の機能という基礎理学の観点からも重要な知見を与えるものだが、それに加えて発現抑制の観点からの研究を応用面でも促す内容を含んでいる。

このように本申請論文は、優れた内容をもつ大変意義深い論文であり、博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、主論文に報告されている業績を中心にして関連研究分野について口頭試問した結果、十分優れた学識を有することを確認し、合格と認めた。