

高等植物におけるエチレン生合成系酵素の 転写後制御機構に関する分子遺伝学的解析

吉田 均

目 次

	ページ
I. 緒論	1-10
II. シロイヌナズナのエチレン生合成を抑制する <i>ETO1</i> 遺伝子の解析	11-64
1. <i>ETO1</i> 遺伝子の単離	11-29
2. <i>ETO1</i> ファミリータンパク質と AtACS5 とのタンパク質間相 互作用の解析	29-40
3. 二重突然変異体による植物体内における <i>ETO1</i> と AtACS5 と の遺伝的相互作用の解析	40-43
4. <i>ETO1</i> による AtACS5 の酵素活性の阻害	44-53
5. <i>ETO1</i> による AtACS5 タンパク質の安定性制御機構の解析	53-64
III. トマトにおける <i>ETO1</i> ファミリータンパク質の機能解析	65-94
1. yeast two-hybrid 法による <i>ETO1</i> とトマト ACS ファミリー の相互作用の解析	66-75
2. トマトの <i>ETO1</i> ホモログ <i>LeEOL1</i> の解析	75-87
3. <i>ETO1</i> 過剰発現トマトの解析	87-94
IV. <i>ETO1</i> ファミリータンパク質の標的配列の解析	95-101
V. 総合考察	102-110
1. <i>eto</i> 変異体におけるエチレン過剰合成の分子機構	102-103
2. 植物のエチレン生合成と応答の転写後制御機構	104-105
3. <i>ETO1</i> によるタイプ2 ACSの抑制を解除する機構	105-106
4. 農作物における <i>ETO1</i> とタイプ2 ACSの役割	106-109
5. <i>ETO1</i> ファミリータンパク質とタイプ2 ACSによる制御機構	109-110

の進化	
6. 結語	110
謝辞	111-112
引用文献	113-136
摘要	137-140

I．緒論

エチレンは C_2H_4 という単純な構造を持つガス状の分子であるが、さまざまな生理現象に関与する植物ホルモンでもある。とりわけ、発芽・葉の上偏生長 (epinasty)・根毛や根粒形成などの形態形成・花芽形成の促進・雌雄異花植物における性決定・葉や花の老化・果実の成熟・病傷害応答・ストレス応答などに関与しているため、農業上もきわめて重要な植物ホルモンである。

エチレンの発見

エチレンの研究の歴史は長く、19 世紀には街灯から生じるガスが街路樹を落葉させることが知られており、ガス中に植物の生長を調節する物質が含まれていると考えられていた。1901 年にロシアの学生 Neljubow はガス中のエチレンがエンドウの生育に影響を与えることを見出し(Neljubow, 1901)、街路樹の落葉も街灯から生じるガスに含まれるエチレンが原因となっていたことが明らかになった。さらに 1934 年には植物がエチレンを産生することが明らかにされ(Gane, 1934)、植物ホルモンとして認識されるようになった。

エチレンの化学特性

エチレンの化学構造式は C_2H_4 と極めて単純であり、異性体は存在しない。分子量は 28 で空気よりも軽く、室温・大気圧下では気体として存在するが、水にも溶解する (25°C で約 0.1ml の気体エチレンが 1ml の水に溶解する)。組織で生成されたエチレンは生体膜を容易に通過するため、組織間を移動して個体外へと放出される。エチレンは反応性の高い π 電子を持つため、遷移金属と結合しやすいと考えられ(Burg and Burg, 1967)、実際、エチレン受容体は銅イオンを配位することによってエチレンを結合・認識し、機能することが明らかにされている(Hirayama *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999; Hirayama and Alonso, 2000)。また、銅イオンと同様に遷移金属である銀イオンはエチレン情報伝達を阻害することが知られているが、エチレン受容体には結合するものの受容体の構造を適切に制御できないために、その活性を阻害するのではないかと考えられる。

エチレンの生理作用

エチレンの生理作用は多岐にわたり、果実の成熟、休眠の打破、花芽形成の促進、雌雄異花植物における性決定、葉や花など様々な組織の老化促進、根毛の誘導、病傷害応答、低酸素（hypoxia）やオゾンなどのストレス応答、さらにエチレン特異的な形態形成に関与している。これらの応答反応は植物種によって異なる場合もある。少なくともエチレンによる形態形成誘導は、エチレンによるオーキシン応答の変化によりもたらされていると考えられている。

最も古くから研究されているエチレンの生理作用は果実の成熟促進であろう。古代エジプト人は、未熟なイチジクの実にナイフで傷を付けることによって成熟を促進させたと言われるが、これは傷害によって誘導されたエチレンがイチジク果実の成熟を促進したものと考えられる(Galil, 1968)。また、不完全燃焼ガスが緑色のレモンを黄色に着色させる効果を持つことが知られていたが、このガスを臭素水中に通気すると着色効果が無くなることから、この有効成分はエチレンであると考えられ、低濃度のエチレンを緑色レモンに与えると黄色に着色することが見出された(Chace and Denny, 1924)。また、リンゴ果実が成熟段階に入るときに呼吸量が増加することが見出され、クリマクテリック（climacteric）と名付けられたが(Kidd and West, 1924)、後にこの呼吸の増大はエチレンによって誘導されることがわかった(Kidd and West, 1945)。クリマクテリック型の成熟をする果実としては他にトマト、メロン、バナナ、アボカド、セイヨウナシなどがあるが、いずれも果実成熟後期にエチレンの爆発的な産生を伴う呼吸量の増大をしめし、エチレンが果実の成熟を促進することが明らかにされている。

種子の発芽においてはピーナッツ、オナモミ、オオツメクサなど多くの種子の休眠がエチレンによって打破されることが知られている。一方では、ヘビイチゴの仲間である *Potentilla norvegica* ではエチレン処理によって発芽が阻害される。シロイヌナズナではエチレンによって種子休眠が打破されるが、これは種子休眠を促進しているアブシジン酸（ABA）の活性をエチレンが抑制するためと考えられている(Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000)。

パイナップルでは他の植物と異なり、エチレンが花芽の形成を誘導することが知られており(Burg and Burg, 1966)、この性質を利用してエチレン処理によって一斉に花芽を形成させ、収穫期が調節されている。また、エチレン生合成酵素の発現を阻害することによって花芽形成が阻害されることが示されている

(Trusov and Botella, 2006)。

エチレンは葉の老化 (senescence) (Zacarias and Reid, 1990)、離層の形成 (abscission) (Jackson and Osborne, 1970)や花の老化を促進する。切り花などではエチレン阻害剤で処理することによって、花の日持ちを長くしていることはよく知られており、また、エチレン情報伝達に関わる遺伝子を利用して日持ち性を操作できることがいくつかの植物種において示されている(Wilkinson *et al.*, 1997; Shibuya *et al.*, 2004; Langston *et al.*, 2005)。

Neljubow の実験(Neljubow, 1901)で示されたように、黄化したエンドウマメの苗をエチレンで処理すると、①胚軸先端部の肥大成長、②胚軸の伸長阻害および、③水平屈曲、という三つの形態変化が見られる。同様の生理現象は多くの双子葉植物で観察され、Knight and Crocker はこの反応をいわゆる「三重反応 (triple response)」と名付けた(Knight and Crocker, 1913)。モデル植物であるシロイヌナズナでは、暗所で芽生えにエチレン処理を施すと、①強調された茎頂のフック形成、②太く短くなった胚軸と③太く短くなった根、が観察され、シロイヌナズナの三重反応とされている(Guzman and Ecker, 1990)。また、エチレンは、葉柄の上部の成長のみが促進され、結果として葉が垂れ下がる現象 (上偏生長 ; epinasty)、根毛形成の促進(Dolan *et al.*, 1994; Masucci and Schiefelbein, 1994)、根粒の形成(Zaat *et al.*, 1989)等、多くの形態形成に関与している。

また、エチレンはいわゆるストレスホルモンのひとつとしてもよく知られている。特に病原菌の感染や害虫の食害や傷害に応答して、植物はわずか数分のうちにエチレンを爆発的に産生することが知られているが、それをトリガーとして PR タンパク質をはじめとする抵抗性遺伝子群の発現を促し、防御反応を起こすと考えられている(Ecker and Davis, 1987; Botella *et al.*, 1996; Arimura *et al.*, 2002)。

このように、エチレンは農業と深い関わりを持つ重要な植物ホルモンであるため、これまで、生化学、分子生物学、分子遺伝学などさまざまな手法を用いて生合成および情報伝達機構が研究されてきている。

エチレン関連突然変異体

三重反応、果実の成熟、葉の上偏生長などの形質の有無を指標にして、エチレンに関連する多くの突然変異体が同定されている。三重反応を指標とした変

異体についてはシロイヌナズナ(Bleecker *et al.*, 1988; Guzman and Ecker, 1990; Roman *et al.*, 1995)、果実の成熟、葉の上偏生長を指標とした変異体についてはトマト(Wilkinson *et al.*, 1995; Barry *et al.*, 2001; Vrebalov *et al.*, 2002; Barry and Giovannoni, 2006; Manning *et al.*, 2006)での報告が多い。これらの変異体の分子遺伝学的解析により、エチレンの生合成経路や受容・情報伝達経路に関する重要な知見が次々に得られている。

シロイヌナズナの突然変異体としては、エチレン処理をしても三重反応を示さないエチレン非感受性変異体と、エチレン処理をしなくても三重反応を示す恒常的エチレン応答性変異体、組織特異的にエチレン応答性が変化した変異体、基質特異的な変異体などが同定されている。エチレン非感受性変異体としては、*etr1* (*ethylene-response1*)、*etr2*、*ein4* (*ethylene-insensitive4*)、*ein2*、*ein3*、*ein5*、*ein6*などが同定されている(Bleecker *et al.*, 1988; Guzman and Ecker, 1990; Roman *et al.*, 1995; Hua *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 1998)。一方、恒常的エチレン応答性変異体としては、エチレン情報伝達経路が恒常的に活性化されている *ctr1* (*constitutive-triple-response1*)とエチレン過剰合成変異体である *eto1* (*ethylene-overproducer1*)、*eto2*、*eto3* が同定されている(Guzman and Ecker, 1990; Kieber *et al.*, 1993; Baskin and Bivens, 1995; Roman *et al.*, 1995)。組織特異的なエチレン非感受性変異体としては、黄化苗をエチレン処理すると胚軸や根の肥大成長と短縮は見られるもののフック形成が起きない *hls1* (*hookless1*)や、胚軸の肥大・短縮とフック形成は見られるものの、根の肥大・短縮が起きない *eir1* (*ethylene insensitive root1*)等が同定されている。その他の変異体としてはエチレンの競合阻害剤である *trans*-cyclooctene (TCO)に応答して三重反応を示す *ran1* (*responsive-to-antagonist1*) (Hirayama *et al.*, 1999)、低濃度のエチレンに非感受性である *wei1* (*weak ethylene insensitive1*)、*wei2*、*wei3*、*wei4*、*wei5*(Alonso *et al.*, 2003; Stepanova *et al.*, 2005)、低濃度の ACC にも応答性を示す *eer1* (*enhanced ethylene-response1*) (Larsen and Chang, 2001)、*etr1-2*変異の抑制変異体である *rte1* (*reversion-to-ethylene sensitivity1*) (Resnick *et al.*, 2006)および *hls1-1* の抑制変異体である *hss1* (*hls1 suppressor1*) (Li *et al.*, 2004)などが同定されている。

一方、トマトでは *Nr* (*Never-ripe*) (Wilkinson *et al.*, 1995)、*rin* (*ripening-inhibitor*) (Vrebalov *et al.*, 2002)、*Gr* (*Green-ripe*) (Barry and Giovannoni, 2006)、*nor* (*nonripening*) (Tigchelaar *et al.*, 1973)、*Cnr* (*Colorless*,

nonripening) (Manning *et al.*, 2006)などのように果実が正常に成熟しない変異体が数多く報告されている。また、葉の上偏生長を恒常的に示す変異体として *epi* (*epinastic*) (Fujino *et al.*, 1988)が報告されている。*Nr*、*Gr*、*epi*はエチレン情報伝達経路の遺伝子の変異体、*rin*、*Cnr*はエチレン情報伝達経路の下流で果実の成熟を制御する遺伝子の変異体と考えられている。

これらの変異体の分子遺伝学的解析を通して、エチレン情報伝達経路は、受容から遺伝子応答まで大まかな経路が明らかとなり、最もよく理解されている植物の細胞内情報伝達経路の一つとなった。植物ホルモンとしての研究が後発であるにもかかわらず、情報伝達経路の解明が進んだ理由は、三重反応というエチレン特異的かつ明瞭な形態形成を指標として使えたことと、エチレン応答の変異は致死性や不稔性を付与するものがほとんどなかった為と考えられる。

エチレンの情報伝達

エチレンの受容および情報伝達経路は多くの植物に共通の機構を持つと考えられ、おもにシロイヌナズナの変異体を用いた解析によって明らかにされてきた。エチレンはシロイヌナズナでは *ETR1*、*ETR2*、*ERS1*、*ERS2*、*EIN4* の5つの遺伝子によってコードされるエチレン受容体によって認識される。トマトのエチレン受容体としては *NR* が知られている。これらの受容体は3つ〜4つの膜貫通ドメインとヒスチジンキナーゼ様ドメインを持つ膜タンパク質で、原核生物などの他の膜貫通型ヒスチジンキナーゼと類似の構造を持ち(Chang *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995; Wilkinson *et al.*, 1995; Hua *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 1998)、エチレン応答を負に制御する(Hua and Meyerowitz, 1998)。これらの受容体が機能するために必要な銅イオンは、細胞内銅イオントランスポーターである *RAN1* によって供給される(Burg and Burg, 1967; Hirayama *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999)。受容体によって認識されたシグナルはさらに下流のいくつかの情報伝達系の構成要素によって伝達される。また、シロイヌナズナの *RTE1* およびトマトの *GR* はともに真核生物に共通の機能未知タンパク質であるが、エチレンレセプターの機能を制御するものと考えられる(Barry and Giovannoni, 2006; Resnick *et al.*, 2006)。

現在知られているエチレン受容体直下の下流因子は *CTR1* で、動物で MAPキナーゼキナーゼキナーゼ (MAPKKK) として機能する *Raf-1* と類似の構造を持つタンパク質リン酸化酵素である(Kieber *et al.*, 1993)。エチレン受容体同様、

CTR1 も負の制御因子と考えられている。CTR1 のさらに下流では EIN2 という 1 2 回の膜貫通ドメインを持つ巨大な機能不明のタンパク質が正の制御因子として働いている(Guzman and Ecker, 1990; Alonso *et al.*, 1999)。

EIN2 の下流で機能する因子として同定されているのは、EIN2 と同様正の制御因子として働く転写因子の EIN3 である(Chao *et al.*, 1997)。シロイヌナズナには EIN3 の他に EIL1~EIL5 の 5 つの EIN3 類似遺伝子が存在する。弱いエチレン非感受性変異として分離された *wei5* の原因遺伝子は EIL1 であることが報告されている(Alonso *et al.*, 2003)。EIN3 は植物特有の転写因子で、EIN3 と相同性の高い EIL3 のタンパク質立体構造によると、これまでにない DNA 結合ドメインを持っていることが明らかとなっている(Yamasaki *et al.*, 2005)。

EIN3 は AP2 ドメインを持つ転写因子の遺伝子 *ERF1* のプロモーター領域に存在する配列に結合し、転写を活性化することが確認されている(Solano *et al.*, 1998)。ERF1 は、エチレン応答シス配列と考えられていた GCC ボックスに結合する一連の転写因子(EREBP または ERF)に属し、下流の様々な遺伝子の転写を活性化すると考えられる。エチレン応答では、このような 2 段階の転写調節により多種多様な遺伝子の発現上昇を達成していると考えられている。EDF1、2、3、4 (ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTORS) も ERF 転写因子群に属し、エチレン応答の正の制御因子として重複して働くものと考えられる(Alonso *et al.*, 2003)。一方では、ERF 転写因子群の中にはリプレッサーとして機能しているものもあり(Fujimoto *et al.*, 2000)、エチレン応答では複雑な転写ネットワークが構築されていると考えられている。EIN3 のタンパク質レベルでの安定化が重要であるが、エチレン誘導性遺伝子によってコードされる F-BOX タンパク質 EBF1、EBF2 がプロテアソーム依存的に EIN3 のタンパク質量を調節しているものと考えられている(Guo and Ecker, 2003; Potuschak *et al.*, 2003)。また、*EIN5* 遺伝子は 5'→3' exoribonuclease のひとつである XRN4 をコードし、EBF1/2 の mRNA の安定性を制御している(Olmedo *et al.*, 2006; Potuschak *et al.*, 2006)。

エチレンの生合成

上記のように、エチレンの情報伝達に関しては 1990 年頃からさまざまな突然変異体が同定され、近年、分子遺伝学的手法の進歩により数多くの遺伝子が同定され、作用機作が解明されている。一方、エチレンの生合成に関しては、古

くから生化学的研究が行われ、1980年代半ばには生合成経路が明らかにされていた(Yang and Hoffman, 1984)。高等植物においては主に、メチオニンからS-アデノシル-L-メチオニン (SAMまたはAdoMet) および1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) を経てエチレンが合成される(Lieberman *et al.*, 1966; Adams and Yang, 1977, 1979; Lizada and Yang, 1979; Yang and Hoffman, 1984)。SAMはタンパク質を構成するアミノ酸の一つであるメチオニンからSAM合成酵素 (SAM synthase) によって合成され、エチレンの他に、スぺルミジンやスぺルミンなどのポリアミン、ニコチアナミンやシデロフォアなどの金属イオンのキレーターの生合成に用いられる他、細胞内の各種メチル化反応のメチル基供与体としても機能する(Roje, 2006)。エチレン生合成の第1段階は、SAMからエチレンの直接の前駆体であるACCを合成する反応であり、これはACC合成酵素 (ACS) によって触媒される。第2段階はACCを酸化してエチレンを合成する反応で、ACC酸化酵素 (ACO) により触媒される。一部のACCは結合反応を受け、マロニルACCやグルタミルACCとなり、不活性化される(Peiser and Yang, 1998)。また、やはり植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) との結合により、JA-ACCが作られるとの報告もあるが、その生物学的意義については不明である(Staswick and Tiryaki, 2004)。SAMからACCを合成する反応では副産物として5'-メチルチオアデノシン (MTA) を生じるが、これはYang回路 (メチオニン救済経路) (Miyazaki and Yang, 1987)を経てメチオニンへと再転換されるため、細胞内のメチオニン濃度はほぼ一定に保たれており、エチレン生合成の増減に伴って増減するようなことはないと考えられている。

植物のほとんどすべての細胞がエチレンを合成する能力を持っていると考えられているが、実際には植物は必要な時に必要な量のエチレンしか合成しない。すなわち、発芽、葉や花の老化、果実の成熟、オーキシンやサイトカイニンといった植物の生育シグナルや、傷害、病原菌の感染、浸水、乾燥、オゾン処理、温度変化と言ったさまざまなストレスに応答してエチレンの生成量が急激に増加し、必要が無くなれば急激に減少する。エチレン生合成は、さまざまな内的・外的シグナルに応答して厳密に制御されていると考えられるが、そのメカニズムの詳細は不明であった。植物をACCで処理するとACC濃度に応じてエチレンを合成することから、ACSによってACCを合成する反応がエチレン生合成の律速段階であり、ACOは植物細胞中に十分量存在すると考えられている。

ACSは細胞内にごく微量しか存在せず、非常に失活しやすい性質から、研究

初期における精製は非常に困難であったが、ACS 活性に対する抗体を用いた研究により、1989 年にズッキーニから初めて *ACS* 遺伝子がクローニングされ (Sato and Theologis, 1989)、その後さまざまな植物種から *ACS* 遺伝子がクローニングされた。*ACS* はピリドキサルリン酸を補酵素とするアミノトランスフェラーゼに類似した構造を持っており、シロイヌナズナの場合、*ACS* 様の遺伝子はゲノム中に 12 個存在するが、そのうち 2 つ (*AtACS10*, *AtACS12*) のコードするタンパク質は *ACS* 活性を持たず、アミノトランスフェラーゼとして働くと考えられる。また、*AtACS1* は非活性型の酵素をコードし、*AtACS3* は偽遺伝子 (pseudogene) であるため、活性型の *ACS* をコードする遺伝子は合計 8 個である (Yamagami *et al.*, 2003)。また、トマトでは少なくとも 10 個、イネでは 5 個の遺伝子によってコードされており、ほとんどの植物種において多重遺伝子族によってコードされている。また、*ACO* も多くの植物種でいくつかの遺伝子によってコードされていることが知られている。*ACS* はボックス 1-7 と呼ばれる 7 つの保存領域を持ち、二量体形成によって活性部位を形成する (Tarun and Theologis, 1998; Yamagami *et al.*, 2003)。*ACS* はアミノ酸配列の類似性によっていくつかのグループに分類されるが、類似性の高いアイソフォーム間では活性型のヘテロ二量体が形成され、類似性の低いアイソフォーム間では非活性型のヘテロ二量体が形成される場合が多いと考えられている (Tsuchisaka and Theologis, 2004)。*ACS* の N 末端と C 末端は比較的保存性の低い領域であるが、C 末端にはいくつかのアイソフォーム間で保存されている小モチーフが存在し、*ACS* の翻訳後制御に関与すると考えられている (Tatsuki and Mori, 2001)。

多くの植物種において多くの *ACS* 遺伝子の転写パターンが解析され、さまざまな内的・外的シグナルに応答して転写が誘導されることが明らかになった (Olson *et al.*, 1991; Zarembinski and Theologis, 1993; Abel *et al.*, 1995; Olson *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 1996; Oetiker *et al.*, 1997; Nakatsuka *et al.*, 1998; Peck and Kende, 1998; Shiu *et al.*, 1998; Arteca and Arteca, 1999; Barry *et al.*, 2000; Bekman *et al.*, 2000)。また、それぞれの遺伝子は特異的な組織で発現することも知られており、*ACS* 遺伝子の転写制御がエチレン生合成制御において重要な役割を果たしていることを示唆している (Tsuchisaka and Theologis, 2004)。しかし一方では、薬理学的な研究結果等から、*ACS* タンパク質の安定性が何らかの制御を受けていることが示唆されており、*ACS* の転写後制御もエチ

レン生合成制御において重要な役割を果たすと考えられていたが、その実態は明らかになっていなかった(Spanu *et al.*, 1994)。

シロイヌナズナの優性突然変異体 *ethylene overproducer2-1 (eto2-1)* では、*AtACS5* 遺伝子の C 末端領域にフレームシフト変異が起こっており、mRNA の量は変化していないにもかかわらず *AtACS5* タンパク質が高蓄積し、エチレンが過剰合成される。また、やはり優性のエチレン過剰合成変異体 *eto3* においても *AtACS5* と類似性の高い遺伝子 *AtACS9* の C 末端領域にアミノ酸置換変異 (V457D) が起きており、C 末端領域がこれらの *ACS* 遺伝子の転写後制御に関わっていると考えられていた(Vogel *et al.*, 1998; Chae *et al.*, 2003)。一方、*eto2-1* や *eto3* とは異なり劣性の突然変異体 *eto1* においても、転写量に変化が見られないにもかかわらず *AtACS5* タンパク質が蓄積していたため、*ETO1* 遺伝子は *AtACS5* の転写後制御に関与する因子をコードすると考えられていた(Chae *et al.*, 2003)。また、シロイヌナズナの黄化苗において、低濃度のサイトカイニン処理はエチレン合成を誘導し、結果として三重反応が観察されるが、*AtACS5* 遺伝子に機能欠失型変異を持つ *cin5 (cytokinin insensitive5)* 変異体は、サイトカイニン誘導性の三重反応を示さない。サイトカイニンで処理した黄化苗においても *AtACS5* mRNA は誘導されないものの *AtACS5* タンパク質が蓄積しており、*AtACS5* がサイトカイニン誘導性エチレン生合成において転写後制御を受けていると考えられる。*cin5* と *eto2-1* はともに *AtACS5* 遺伝子の変異アリルであるため、本稿においては *cin5* の各アリルを *eto2-x* と表記することにする。

ACS の多くのアイソフォームは C 末端に保存性の高いセリン残基を持ち、このセリン残基はカルシウム依存的プロテインキナーゼ (CDPK) によってリン酸化されると考えられている(Tatsuki and Mori, 2001)。また、ホスファターゼ阻害剤処理によって、*ACS* 活性が上昇することが報告されている(Spanu *et al.*, 1994)ことから、CDPK による *ACS* の C 末端のリン酸化が *ACS* タンパク質の安定化に関与することが想像されているが、証明はされていない。また、*ETO1* との関連は不明であるが、*AtACS6* の C 末端のリン酸化がタンパク質の安定性制御に関わっていることが報告されている(Liu and Zhang, 2004)。*AtACS6* は *AtACS5* や *AtACS9* とは異なり、CDPK の標的部位と考えられるセリン残基に加え、MAP キナーゼ (MAPK) の標的部位と考えられるセリン残基をいくつか持っており、エリシターなどのシグナルに応答して活性化された *AtMPK6* 等の

MAPK により、これらのセリン残基がリン酸化され、AtACS6 が安定化すると考えられている。

このように、ACS タンパク質の C 末端はリン酸化などの制御を受けること、タンパク質の安定性に関わることなどが知られており、その制御においては ETO1 タンパク質が重要な役割を果たすことが想像されるが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていなかった。そこで本研究では、エチレン生合成の転写後制御機構を明らかにするため、ポジショナルクローニングによって *ETO1* 遺伝子を単離し、ETO1 タンパク質を介したエチレン生合成制御のメカニズムについて分子遺伝学及び生化学的解析を行った。II 章ではシロイヌナズナの *ETO1* 遺伝子を同定し、分子遺伝学および生化学的手法によって、ETO1 タンパク質が AtACS5 タンパク質と直接相互作用し、直接の ACS 活性抑制およびプロテアソーム依存的タンパク質分解によって AtACS5 の活性を抑制するメカニズムを明らかにした。III 章では *ETO1* 遺伝子を恒常的に発現するトマトの解析を通して、トマトの ETO1 ホモログである LeEOL1 を同定し、ETO1 ファミリータンパク質が ACS アイソフォームの中でも特定の C 末端構造を持つ一群とだけ特異的に相互作用することを明らかにした。IV 章では ACS タンパク質群における ETO1 ファミリータンパク質の標的配列を同定し、シグナル配列としての機能を明らかにした。V 章ではエチレン生合成の転写後制御機構についてまとめ、今後残された問題点を整理した。

Ⅱ. シロイヌナズナのエチレン生合成を抑制する *ETO1* 遺伝子の解析

シロイヌナズナの *eto1* 突然変異体は黄化苗において AtACS5 タンパク質を過剰に蓄積するために通常の約10倍ものエチレンを合成する (Chae *et al.*, 2003)。*eto1* 変異体では幼苗で発現している *AtACS2*、*AtACS4*、*AtACS5* などの ACS 遺伝子の転写産物の高蓄積は観察されないため (Woeste *et al.*, 1999)、ETO1 タンパク質は ACS 遺伝子の転写を制御しているのではなく、ACS タンパク質の安定性を制御していると考えられ、*ETO1* 遺伝子の実体およびその作用機作を明らかにすることによって、エチレン生合成の転写後制御機構の一端を明らかにすることができると考えられる。

一方、分子遺伝学的手法および生化学的手法の進歩により DNA マーカーを用いたマップベースクローニング、yeast two-hybrid 法や pull-down アッセイ法などを用いたタンパク質間相互作用の解析、植物細胞内における一過的遺伝子発現を利用したタンパク質の安定性の解析などが可能となったため、これらを駆使して *ETO1* 遺伝子の単離、そのタンパク質間相互作用の解析などを行えば、エチレン生合成の転写後制御機構に関する新しい知見が得られると考えられる。

そこで本研究では、分子遺伝学的・生化学的手法により *ETO1* 遺伝子の単離、ETO1 タンパク質の作用機作の解析を行った。

1. *ETO1* 遺伝子の単離

近年、シロイヌナズナにおいては、多くの突然変異体が同定されるとともに、全ゲノムの DNA 配列が解読され、SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms) (Bell and Ecker, 1994) や CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) (Konieczny and Ausubel, 1993)、dCAPS (derived CAPS) (Neff *et al.*, 1998) などのさまざまな DNA マーカーが整備されたため、これらを利用して大規模な集団を用いた詳細な遺伝解析が可能となった。このことにより、マップベースクローニング法を利用して比較的容易に突然変異体の原因遺伝子を単離できるようになった。そこで本研究では、シロイヌナズナの *eto1* 突然変異体を用い、マップベースクローニングによってその原因遺伝子で

ある *ETO1* 遺伝子を単離し、その解析によって ETO1 タンパク質の作用機作の推定を試みた。

材料と方法

シロイヌナズナの供試系統と生育条件

すべての *eto1* および *eto2-1* アリルの遺伝的背景は Columbia (Col-0) エコタイプである。遺伝子のマッピングは、Landsberg *erecta* (Ler) エコタイプとの交雑により得られた F₂ 集団（ペンシルベニア大・平山隆志博士（現理化学研究所／横浜市立大学）より分譲）を用いた。空气中あるいはエチレン存在下での植物の育成は Guzman and Ecker の方法に従った (Guzman and Ecker, 1990)。すなわち、黄化苗の表現型を解析する際には、1/2 x MS 培地に播種したシロイヌナズナの種子を 4℃・明所にて 4 日間、低温処理した後、23℃・暗所で 3 日間、発芽させた。マッピングや採種等のために成体を得る際には、22 – 25℃、連続光のグロースチャンバーにて植物体を栽培した。

ETO1 遺伝子のマップベースクローニング

ETO1 遺伝子は形態マーカーを用いた解析により、第 3 染色体下流に遺伝的にマップされていたため、第 3 染色体下流の SSLP (Bell and Ecker, 1994)、CAPS (Konieczny and Ausubel, 1993) および dCAPS マーカー (Neff *et al.*, 1998) を用いて *ETO1* のマッピングを行った。約 1cm² の成葉を液体窒素で凍結させた後、ガラスビーズで粉砕し、Klimyuk らの方法 (Klimyuk *et al.*, 1993) に従って DNA を抽出し、PCR 反応に用いた。*eto1* の各アリルにおける塩基配列はダイレクトシーケンス法によって決定した。

ETO1 cDNA の単離

Ecker らによって λ ZAP II ベクターを用いて構築されたシロイヌナズナ黄化苗の cDNA ライブラリー (Kieber *et al.*, 1993) から、プラークハイブリダイゼーションによって *ETO1* cDNA を単離した。プローブは、シロイヌナズナ第 3 染色体下流の *AtEm1* 座 (accession no. AF049236) にアノテートされていた 2 番目の Open Reading Frame (ORF2) 内から増幅した DNA 断片 (ORF2a) を Random Prime DNA Labeling Kit (Amersham 社) を用いて ³²P ラベルし、平均インサート長 3-6kb となるように濃縮した cDNA ライブラリー、約 100,000 プ

ラークをスクリーニングした。 λ ファージは15cm シャーレ1枚あたり約25,000 プラークとなるように4枚のシャーレにプレーティングし、ナイロンメンブレン (Hybond-N+ ; Amersham 社) にブロッティングした。6 x SSC、5 x Denhardt's solution、0.1% SDS、100 μ g/ml salmon sperm DNA からなるハイブリダイゼーション液を用いて68°C、16時間のハイブリダイゼーションを行った後、メンブレンを最終的に0.1 x SSC – 0.1% SDS の洗浄液を用いて68°C、60分間洗浄し、X線フィルムに露光した。

相補性試験

ETO1 完全長 cDNA を構成的発現用バイナリーベクターpRok2 (Baulcombe *et al.*, 1989)にクローニングし、アグロバクテリウム C58 株に導入後、減圧浸潤法(Bechtold *et al.*, 1993)にてシロイヌナズナ *eto1-4*株または Col-0 株に導入した。50 の独立した形質転換体について三重反応の有無を解析した。

結果

はじめに、*ETO1*遺伝子のマッピング及びマップベースクローニングの材料として用いるF₂集団について検討した。*eto1*変異個体(劣性ホモ個体)は野生型の約10倍のエチレンを合成・放出するため、培地上で隣接した野生型個体もその影響を受けて弱い三重反応を示す場合がある。ここでは*ETO1*遺伝子をマッピングすることが最終目的であり、確実に劣性ホモである個体を選び出し、遺伝子型の解析に供する必要があるため、特に三重反応の明確な個体のみを選抜した。すなわち、①胚軸・根の伸長阻害、②極端なフックの形成、③胚軸・根の肥大成長、の3つの表現型が明確なものだけを劣性ホモ個体として選抜することにした。*eto1*の2つのアレル、*eto1-2*および*eto1-4*(いずれもCol-0バックグラウンド)とLerとの間の2つのF₂集団の間での、明確な劣性ホモ個体の出現頻度を比較した。*eto1-2* x Lerでは11.5%、*eto1-4* x Lerでは17.1%の個体が明確な三重反応を示した(表1)。これらの値はいずれも理論上の単因子劣性変異の出現頻度(25%)より低くなっているが、弱い三重反応を示した劣性ホモ個体を選抜しなかったことによるものと考えられる。実際、*eto1-2* x LerのF₂集団においては極度のフックの屈曲は示すが、胚軸および根が比較的長い個体が一定の頻度で存在したが、これらが表現型の弱い劣性ホモ個体なのか、野生型のコンタミネーションであるのかが判別できなかったため、あえて選抜しなかった。

表 1. *eto1*変異体アリの遺伝分析

交配組み合わせ	三重反応		合計	χ^2	+/合計 (%)
	+	-			
<i>eto1-2</i> x <i>Ler</i>	7	54	61	5.66 ^a	11.5
<i>eto1-4</i> x <i>Ler</i>	36	174	210	6.75 ^a	17.1

^a $P > 0.05$

この段階においては、2つの集団間での劣性ホモ個体の出現頻度の差が、2つの*eto1*アレル間での表現型の強さの違い、エチレンによる分離比の歪み、採種条件などの何らかの前歴の違いのいずれに起因するのかは判断できなかったが、特に多数の個体を必要とするファインマッピングにおいては、もっとも劣性ホモ個体を選抜しやすい*eto1-4 x Ler*のF₂集団を使用することとした。

Roman *et al.* は形態マーカーを用いた連鎖解析により、*eto1-1*変異を第3染色体下流、*tt5*座の上流5.4cMの位置にマップしているが、その詳細な位置は不明であった(Roman *et al.*, 1995)。そこでまず、*tt5*を挟むSSLPおよびCAPSマーカーを用いて*ETO1*遺伝子のおおよその位置をマップした。*eto1-4 x Ler*および*eto1-2 x Ler*のF₂から選抜した劣性ホモ43個体を用いた結果、*ETO1*遺伝子の位置はAthGAPabから30.7±6.9cM、EDS1Aから3.6±2.5cM、CDC2BGから6.0±2.6cM、nga707から9.2±4.5cM、nga6から25.8±6.1cMと計算された。この結果は、*ETO1*遺伝子を*tt5*座付近にマップしたRomanらの結果と一致する。これらの結果を統合し、図1に示すマップを作成した。

さらに個体数を増やして解析を行った結果、*ETO1*はEDS1Aとnga707との間に座乗していることが明らかになった。そこで、EDS1Aとnga707との間の分子マーカーを用い、ファインマッピングを行った。前項に述べたように、F₂集団においては誤って野生型個体（野生型ホモもしくはヘテロ）を劣性ホモ個体と判定してしまう可能性があったため、必要に応じてF₃個体の表現型によりF₂個体の遺伝子型を確認しながらマッピングを進めた。EDS1Aとnga707との間に座乗する2つのCAPSマーカー（AtPK41AおよびAFC1）を用いた解析の結果、*ETO1*はAtPK41AとAFC1との間にマップされた。AtPK41AとAFC1の中間に位置する*AtEm1*座（accession no. AF049236）は、60kbにわたって塩基配列が決定されていたため、これをもとに構築した新しいSSLPマーカーEm1Bを用いて1806染色体について連鎖解析を行った結果、*ETO1*との組換えは全く検出されなかった（図2）。すなわち、*ETO1*遺伝子は*AtEm1*座の極めて近傍に座乗すると考えられた。*ETO1*遺伝子が*AtEm1*座の60kb領域に座乗するかどうかを調べるため、この領域の両端に設計した2つのSSLPマーカー（Em1HおよびEm1N）を用いた解析の結果、Em1Hとの間に1つ、Em1Nとの間に2つの組換えを検出し、*ETO1*はEm1HとEm1Nとの間の約58kbの領域に座乗することがわかった（図2）。Em1HとEm1Nの内側にさらに設計した2つのマーカーEm1L（dCAPS; derived CAPS）およびEm1A（SSLP）による解析の結果、組換えは

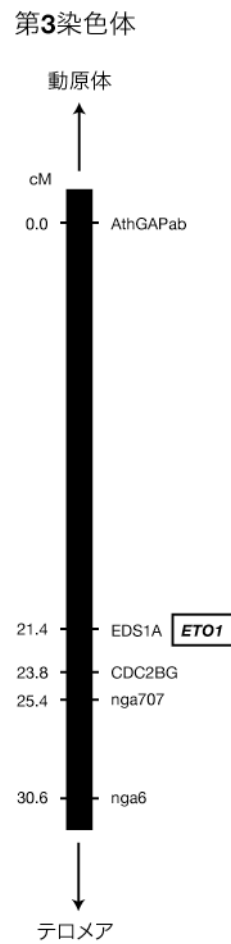


図1. *ETO1* 遺伝子のラフマッピング

SSLP と CAPS マーカーにより *ETO1* を EDS1A の近傍にマップした。

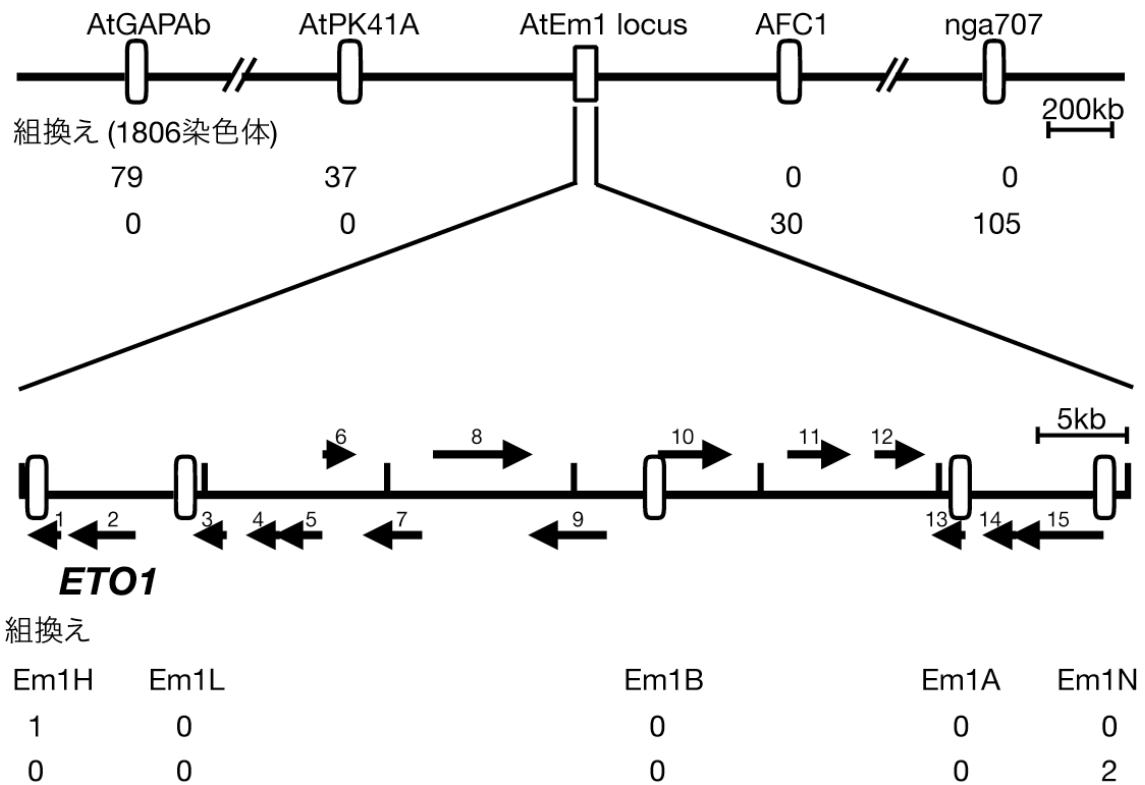


図 2. *ETO1* 遺伝子のマップベースクローニング

ETO1 遺伝子は第 3 染色体下流の約 60kb の領域 (*AtEm1* 座) にマップされた。白抜き四角は SSLP、CAPS、dCAPS マーカーを表す。*AtEm1* 座のアノテーション (GenBank accession no. AF049236) で予測されていた ORF を矢印で示した。

全く検出されなかったため、ここでファインマッピングを終了した。

*AtEm1*座には15個のORF (Open Reading Frame) が予測されており(表2)、その全てが上記の58kb領域に含まれている。*ETO1*遺伝子はエチレン生合成の調節因子と推測されており、この領域に予測されているDNA結合性タンパク質やプロテイン・カイネースなどの調節的機能を持つことが知られている遺伝子が*ETO1*である可能性が考えられるが、一方では機能未知のタンパク質をコードすると予測されるORFも多く、15個のORFのうちいずれも*ETO1*遺伝子である可能性が考えられた。そこで、*eto1-1*から*eto1-10*までの10個のアリル(表3)から抽出したDNAを用いて、予測される各ORFに欠失や挿入等の変異が起きていないかを調べた。用いたアリルの中にはX線によって誘発されたものが5つあり、欠失や挿入が起きている可能性が期待されたため、PCRによって各ORF内に約2kbのDNA断片が増幅されるようにプライマーを設計し、アリル間での多型の有無を調べた。その結果、機能未知のタンパク質をコードすると予測される第2 ORF (At3g51770) 内に、ともにX線によって誘発された*eto1-2*および*eto1-3*の2つのアリルで欠失が起きていることを見出した(図3A)。PCR増幅産物を制限酵素EcoRIで処理した結果、*eto1-2*および*eto1-3*はともに約50bpの欠失を起こしていることがわかった(図3B)。さらに塩基配列を解析し、これら2つのアリルはともに同一の50bpの欠失を持つことを明らかにした(表3)。この欠失は第2イントロンと予想される領域内に見出されたが、107bpのイントロンのうち50bpが欠失していることから、スプライシング阻害が起きていることが予測された。さらに確認のため、他のアリルにおけるAt3g51770の塩基配列を解析した結果、表3に示すように7つのアリルにおいてさらに塩基置換・欠失・rearrangementを見出した。これらの結果から、At3g51770が*ETO1*遺伝子であることが強く示唆された。

次に、シロイヌナズナの黄化苗cDNAライブラリー(Kieber *et al.*, 1993)中から、At3g51770のゲノミックPCR断片ORF2aをプローブとして、対応するcDNAクローンをスクリーニングした。約100,000個のクローンをスクリーニングした結果、36個のポジティブクローンを得た。ヘルパーファージExAssistの共感染によりλ ZAP IIベクターをpBluescriptプラスミドに変換して得られたクローンのインサート長を解析したところ、最長のもの(pcETO1.9)は3395bpであり、最長のORFは951アミノ酸からなる分子量約107kDと推定される新規タンパク質をコードしていた。このcDNAとゲノムDNAの塩基配列を比較した結果、

表2. *AtEm1*座における予測ORFとその機能

ORF	MIPSコード	ホモロジー	機能
ORF 1	At3g51760	none	unknown
ORF 2	At3g51770	none	unknown
ORF 3	At3g51780	none	unknown
ORF 4	At3g51790	bacterial CycJ protein	transmembrane protein/ cytochrome c biogenesis
ORF 5	At3g51800	mouse p38-2G4 protein	DNA-binding
ORF 6	At3g51810	<i>AtEm1</i>	<i>AtEm1</i> (LEA)
ORF 7	At3g51820	bacteriochlorophyll synthetase BchG	chlorophyll synthase
ORF 8	At3g51830	yeast Sac1 protein	transmembrane phosphoinositide phosphatase
ORF 9	At3g51840	mouse glutaryl-CoA dehydrogenase	energy biogenesis
ORF10	At3g51850	Arabidopsis CDPK	calcium dependent protein kinase
ORF11	At3g51860	Arabidopsis CAX1	high affinity calcium antiporter
ORF12	At3g51870	cow mitochondrial solute carrier	mitochondrial
ORF13	At3g51880	barley HMG-like	DNA-binding
ORF14	At3g51890	none	unknown
ORF15	At3g51895	Arabidopsis sulfate transporter	sulfate transport (ATST1)

表3. *eto1*の各アリルにおける変異の塩基配列解析

アリル	変異原 ^a	塩基配列の変化	アミノ酸配列の変化
<i>eto1-1</i>	EMS	C-to-T	R867stop
<i>eto1-2</i>	X-ray	50塩基の欠失	R676の後に"CMLF"で終止
<i>eto1-3</i>	X-ray	50塩基の欠失	R676の後に"CMLF"で終止
<i>eto1-4</i>	EMS	G-to-A	W641stop
<i>eto1-5</i>	DEB	T-to-A	F466I
<i>eto1-6</i>	X-ray	リアレンジメント	プロモーター and/or 5' 領域にリアレンジメント
<i>eto1-7</i>	X-ray	N.D.	ND ^b
<i>eto1-8</i>	DEB	Aの欠失	N563の後に"RFLDSRPLLTV"で終止
<i>eto1-9</i>	EMS	C-to-T	Q161stop
<i>eto1-10</i>	X-ray	Cの欠失	P-541の後に"TSSGQWLWWKKTSLQLSQN"で終止

^a 各アリルを作出するのに用いられた変異原。EMS: エチルメタンサルホン酸、DEB: ジエボキシブタン

^b ND, 未決定

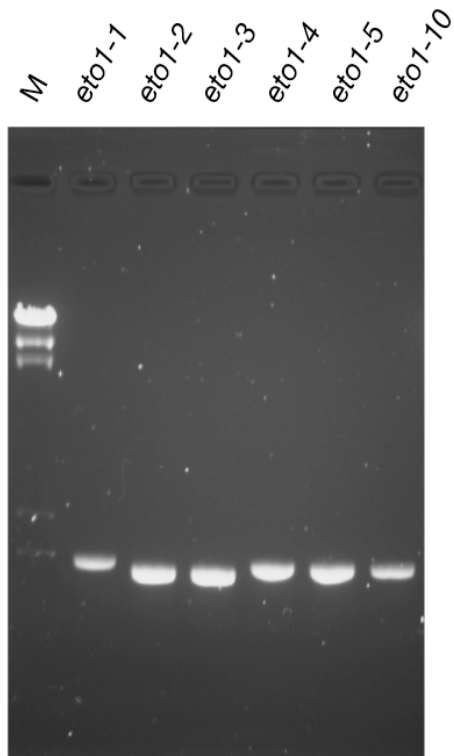
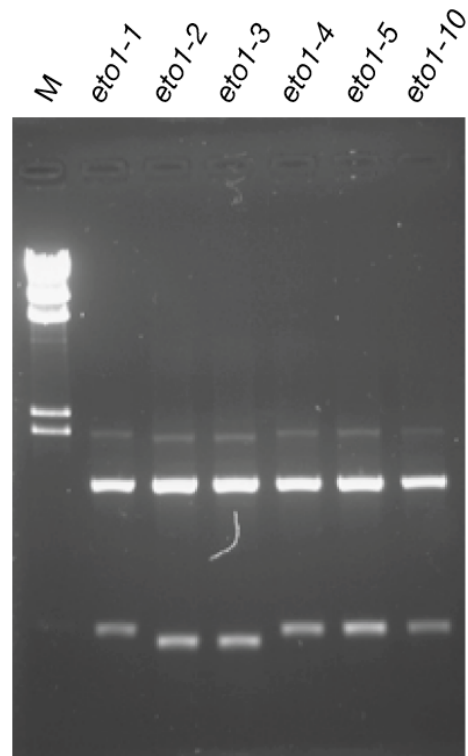
A**B**

図3. *eto1-2*と*eto1-3*アリルにおける欠失の検出

A) 各 *eto1* アリルから *AtEm1* 座の予測 ORF2 (At3g51770) 3'側半分に対応する領域を増幅した。M: λ Hind III マーカー

B) (A)の PCR 断片を Eco R I で消化したもの。M: (A)と同じマーカー

*ETO1*遺伝子は4つのイントロンを持つことがわかった。第1イントロンは開始コドンよりも上流に位置していた(図4)。BLASTP検索の結果、ETO1タンパク質はTPR (tetratricopeptide repeat)と呼ばれるモチーフを持つ一連のタンパク質と弱い相同性を示した。TPRモチーフは縮重された34アミノ酸(“tetratrico”とは「34」の意味)からなるモチーフで、減数分裂、転写、スプライシング、タンパク輸送、分子シャペロン等幅広い機能を持つタンパク質中に見出されるが、いずれもタンパク質間相互作用に関与すると考えられている(Goebl and Yanagida, 1991; Lamb *et al.*, 1995; Das *et al.*, 1998)。TPRには分子量の大きな(bulkyな)フェニルアラニンあるいはチロシンを含む領域と疎水性の領域が存在するが、bulkyなアミノ酸がノブ(knob)のような構造を形成し、疎水性アミノ酸によって形成された穴(hole)にはまりこんでTPRモチーフの立体構造を維持すると考えられている(Goebl and Yanagida, 1991; Das *et al.*, 1998)。*eto1-5*アレルでは1番目のTPRモチーフ中のフェニルアラニン(F)がイソロイシン(I)に置換されており(表3および図4)、TPR構造が欠失することによって、ETO1の機能が失われたことを示唆している。また、EMSによって誘発された*eto1-1*アレルは、6番目のTPRモチーフ直前にC-Tの転位を起こすことによって867番目のアミノ酸の位置に終止コドンが作られ、最もC末端側に位置する1つのTPRモチーフだけを欠失すると予測されるが、他のアレルと同程度の表現型を示し、TPRモチーフがETO1の機能に不可欠であることを裏付けている。さらに、変異箇所を同定したアレルのうち、*eto1-6*以外の全てのアレルでもTPRモチーフが欠失あるいは変異していることから、TPRモチーフの重要性が強く示唆された。X線によって誘発された*eto1-6*アレルでは大規模なゲノムのリアレンジメントが起きているために、遺伝子発現が阻害されていると考えられた。

一方、SMARTプログラムによる解析(Schultz *et al.*, 1998)およびPSI-BLAST検索(Altschul *et al.*, 1997)によって、アミノ末端(N末端)側にBTB (Broad-Complex, Tramtrack, Bric-à-brac)ドメイン(別名POZドメイン; Poxvirus, Zinc finger)が存在することが明らかになった。BTBもやはり保存性の低いモチーフであり、タンパク質間相互作用、特に多量体形成に関与すると考えられていた(Collins *et al.*, 2001)。また、最近、BTBドメインタンパク質はユビキチン/プロテアソーム・システムの重要な構成要素の一つであるE3ユビキチンリガーゼとの相互作用を媒介することが分かってきた(Furukawa *et al.*, 2003; Geyer *et al.*, 2003; Pintard *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003)。こうしたこと

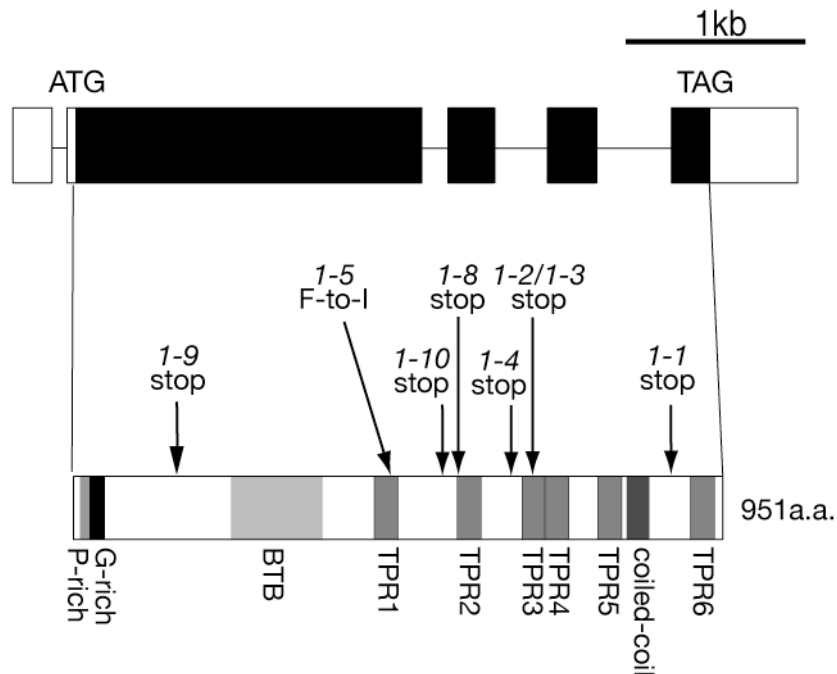


図4. *ETO1* 遺伝子のエクソン-イントロン構造と *ETO1* タンパク質の構造
 上) *ETO1* 遺伝子の構造。ボックスはエクソンを、ラインはイントロンを表す。
 黒いボックスはコード領域、白いボックスは非翻訳領域 (UTR) を表す。
 下) *ETO1* タンパク質の構造。P-リッチ、G-リッチ、BTB、TPR、CC の各モ
 チーフをボックスで示した。 *eto1* 各アレルにおける変異箇所を矢印で示した。

から、ETO1も多量体を形成する、あるいはE3ライゲースとの相互作用を介して機能する可能性が示唆された。

ETO1タンパク質中にはTPRとBTBの他にcoiled-coil (CC)ドメインがSMARTによって検出された。CCドメインもタンパク間相互作用を介在するドメインとして知られているため(Lupas, 1996)、ETO1はTPR、BTB、CCのドメインを利用して何らかのタンパク質と相互作用し、エチレンの生合成を抑制しているものと考えられた。

ETO1の推定アミノ酸配列をもとに、シロイヌナズナ全ゲノム配列およびEST配列に対してTBLASTNサーチを行った結果、シロイヌナズナには2つの*ETO1*パラログ (At4g02680、At5g58550) と1つの偽遺伝子 (BACクローンT13013上) が存在することがわかった。これらの2つのパラログをそれぞれ*EOL1* (*ETO1-LIKE1*; At4g02680)および*EOL2* (*ETO1-LIKE2*; At5g58550)と名付けた。*EOL1*は第4染色体の上腕部に、*EOL2*は第5染色体の下腕部に位置し、いずれも既知のエチレン過剰合成変異とは連鎖していなかった。ETO1とEOLタンパク質との相同性(similarity)はTPRモチーフおよびCCモチーフを含むC末端側で特に高く、アミノ酸レベルでEOL1とは76%、EOL2とは77%の相同性を示した。一方、BTBドメインを含むN末端側の相同性はアミノ酸レベルでEOL1とは48%、EOL2とは60%であった(図5)。EOL1とEOL2のC末端領域はETO1と同じく6つのTPRモチーフと、1つのCCモチーフを含んでいた。*eto1-5*アリルで変異が起きていた1番目のTPR中のフェニルアラニンはEOL1、EOL2両タンパク質中でも保存されており、1番目のTPRの構造がETO1ファミリータンパク質の機能に必須であることを示唆している。また、EOL1およびEOL2はともにN末端領域にBTBドメインを含んでおり、BTB、TPR、CCの組合せからなる構造によってETO1ファミリータンパク質の機能が決定されていることが示唆された。一方、他の生物種におけるオルソログをTBLASTNサーチによって検索したところ、シダ、単子葉植物、樹木を含む双子葉植物と言った多くの植物種にETO1オルソログの存在が確認された。興味深いことに、植物以外の生物種からはETO1オルソログは検出されず、ETO1ファミリーは植物に固有の新規タンパク質ファミリーであると考えられた。

9つの*eto1*アリルにおいてDNAレベルでの変異が見られたことから、At3g51770が*ETO1*遺伝子であることが強く示唆されたので、さらに確認のために、At3g51770が*eto1*変異を相補するかどうかを解析した。pcETO1.9の挿入

A

```

TPR1 443: QLAYHLCVVMLEKKEYKQACRVFNAAVEAGHLV
TPR2 572: PDCEMRAVI SI GMEDYEGALKDI RALITLERNF
TPR3 664: SLLEHRCCLLLRLNCOQAAARSLRLRNHRSSE
TPR4 698: HEHLYVEGVN LYDTGHEEALAKAEESI SIQRSE
TPR5 772: GQALNNLGSVVYDCEKLDLAADQYTMALSIKHTR
TPR6 901: LQLHLHRAAFYDSMCEGASAIKDCEAALQDPGH
consensus . . . W . LG . . . . . A . . . F . A . . . P . .

```

B

```

ETO1 242: YDNVSCIGDEEVRCVRYKI ASLSRPFKAMLYGGFREMKRATINFTONGI SVEGMRAAEI FSRTNRLDNFP
EOL1 180: KNVVEKLGEEKI ACQRRKIASLSAPFHAMLVGNFTESLLDEI DVSSENHVSSAMRVVRDFSVVGVLI GVS
EOL2 207: SDI SFQVSGSEKAKVRSRI AALSRPFKAMLYGGFVSTTSEI DISENGI SI EAMIALNI YSRI KHVDFR
OsEOL1 248: NDLVFMIGEEVACEESCI AALSKPLNTLLVGFHAAQRDRIDFTRDGI PCGMRAVSAYSRIHGLDDFS
OsEOL1 318: TDTLLELLAFSINKFCCEGLKSCADNKLATMVSGVEDALSIVDLGLEEAHLLVAAACLOA
OsEOL2 249: LETLLELLVFANFTCDRLKQACDRKLASFVSRQDAVELVALAFENAPVLAASCLQV
OsEOL3 248: ADAILEMLDFRANKFCOGLKQACERKLASFICSRQDAIDFMECALELGCSTLAAACLOV
mel-26 270: TDMATALLI AADKYRLEELKSCCKYLVENINENACSLIIIGDLYSAPKLRKRAVTYI
kelch 157: CDVILVADDVEI HAHMMLAASCPYFAMT SIEESRQARTLQGS VDALELLI DVVYIATVEVN
PLZF 34: CDVVI MDSQEFHAHTVLACTSKMFEI LFIH . RN . SHYTLDELFS . . . PKT . FQQLLEVAYTATQAK

```

```

ETO1 312: PNVVLELLKLANFCCODELKSACDSHLAHLVNSLDEAVLLIEYGLEEAAYLLVAAACLOV
EOL1 250: KNLLLEVLVFRANKFCOERLKQACDREASLISSEVCAI EIMDFALEENSPILASSCLOV
EOL2 277: VETVFELLQLASKFCODDLKSECEARLAASVTDLDKALTFVEYALEERTITLLSACLQV
OsEOL1 318: TDTLLELLAFSINKFCCEGLKSCADNKLATMVSGVEDALSIVDLGLEEAHLLVAAACLOA
OsEOL2 249: LETLLELLVFANFTCDRLKQACDRKLASFVSRQDAVELVALAFENAPVLAASCLQV
OsEOL3 248: ADAILEMLDFRANKFCOGLKQACERKLASFICSRQDAIDFMECALELGCSTLAAACLOV
mel-26 270: TDMATALLI AADKYRLEELKSCCKYLVENINENACSLIIIGDLYSAPKLRKRAVTYI
kelch 157: CDVILVADDVEI HAHMMLAASCPYFAMT SIEESRQARTLQGS VDALELLI DVVYIATVEVN
PLZF 96: AEDLDDLIIAYAEI LEI EYEEECQKMETI QASDDNDTEATMADGGAEEEEEDRKARYLK

```

C

```

EOL1 1: MRFYPSDSCKESCLDSL NPSWLQVE . . . . . FC . . . . . KISSASSAP . . . . . LQRESFI KVP
ETO1 1: MRSKLAFECQKIGVVALNPSAPTPPPPPGNSSTGGGGGGSGGGTGGVGDKLLQHLSDHLRVNSVSKSRFTYDPPPTOPNAVVSPEFLPQGLVMTDLL
EOL2 1: MRNKLRFERKSTGVAFITIDSPSTSS . . . . . NSP . . . . . R . . . MKFLGPKSKRS . . . . . LLPGFTITDLL

EOL1 51: EPOI LPHYKPUYVEMLAQHEELDTQPLQERSI LYLICYQVFRGLGETKLRHSLCSAWCEATTIVHEKVVFSWRYEKO GHEVITDILISSCGKYSEE
ETO1 101: EPOI DPQKFDVLEKMAQVYRRI ENCSOFKSKGAYLECAALFERGISDPKLRFRSLRSSHQAVDVAKVVL ASWLRFRERREDEITGITSMDCCGNLEO
EOL2 60: EPLLDYLLKPI DLVESISNLYRRI ESSSESEASVLYLEGAYVRLGLAKLLRQQLI MARPHADVPCKVVFSAWLRFRERREHVLGVESMDONGLASEC

EOL1 150: FVPLDIASVYF . . . . . ATIASPFAAS . . . . . VKINRSVSKNVVFKI GEEKI ACQRRKIASLSAPFHAMLVGNFTESLLDEI DVSSENHVSSA
ETO1 201: PKRATLVSGYDFESVYDPVQVCSARSEMMNE . . . . . DECSTSCGEVDYDSFCI GDEEVRCVRYKI ASLSRPFKAMLYGGFREMKRATINFTONGI SVEG
EOL2 160: PKTSLTTHCODLNVDDEGCSTVCEDFGSDVDKI SKADEFSGLDEVDI SDI SFQVSGSEKAKVRSRI AALSRPFKAMLYGGFVSTTSEI DISENGI SI EA

EOL1 233: MVRVRDFSVVGVLI GVSKNLLLEVLVFRANKFCOERLKQACDREASLISSEVCAI EIMDFALEENSPILASSCLOVFLVEMPDLSINDERVVEVLTFRVNSR
ETO1 295: MRAAEI FSRTNRLDNFPNVLELLKLANFCCODELKSACDSHLAHLVNSLDEAVLLIEYGLEEAAYLLVAAACLOVFLRELPSMHNPNMIKIFCSAIEGR
EOL2 260: MIALNIYSRI KHVDFRVEITVFELLQLASKFCODDLKSECEARLAASVTDLDKALTFVEYALEERTITLLSACLQVFLRELPSLHNPKVMRFFCSSEAK

EOL1 333: GVSTMAC KAPHSLSYQLSEVSICI DPRSURTQFLEKLVDFEANDRCQVIGFFRLGOVRLIRKEYREAEAEETAFNLTGHVYSATGLARLQVIGGHLW
ETO1 395: ERLASLC HASTLYYFLSQI AMEDDMKSNITVMVLEHLEVECAVDSWEKQALAYHLCVVMLEKKEYKQACRVFNAAVEAGHLVSGVARTIKRHDRYS
EOL2 360: EQLAFLGSECVFLLYFLSQVGVKEKLTITDTMILLERLREFARTNWKALSLHQMGOVLFERKDYKACGFHRLASSLGHVYSLAGVSRITFYKQGRYS

EOL1 432: AYEKLSSVIVSVSPPLGWYQERSFYCECDKLEDELEKATELDPITLTPYNYRAVTRMVKQNAKAALEI NRI LGFKALEOLEIFQLYLGMDVYEAAL
ETO1 494: AYKILNSLI SDIRATQWFOERSLYCSCKEKLIDLDITATELDPITLTPYKYRAVALVEENQGAALAEINKILGFKASPOLEENRAWLSTGMEDYEGAL
EOL2 460: AYRLMNLFI SI NIKPFGWYQERSLYNVVEKLEKIDATELDPITLTPYKYRAVWKFEOKIKBAFCEIDRLTQFKLSPEOLEENRAWLYLATGDFESOL

EOL1 532: FDIQAALTFLQPDYRMECKVACRQLOTIVYEHVENITADQWMLYKEWNVDDIGSLSVI YCMLESIAQGVLYFROSLLLLRLNOPEAMRSLQLARE
ETO1 593: KDI RALLTLEPNFMNMKILGHIVVELLRFLAQMSQADQWMLYDRWSSVDDIGSLAVVHMLANDPKSLHFRQSLLLLRLNOQKAAMRSLRLARN
EOL2 559: FDIRAVLSLEPNYVVECKMRDLEALTAQGLEVESADQVHLEDRWSAVDDVSLAWHCLNDPSKINLFRQSLLLLRLNOQGAAMRQLRWAN

EOL1 632: HASSDHERLYVEGVN LYDTGHEEGLQAKESI SI CRSFEEAFFLKAYALAESSLDPSSSSTVSLLEIALKCPSDRLRKGOALNNLGSVVYDCEKLDLAA
ETO1 693: HSKSEHERLYVEGVN LYDTGHEEALAKAEESI SI CRSFEEAFFLKAYALADSTLDPSSSNVYVQLQALCPKPSDGLRKGOALNNLGSVVYDCEKLDLAA
EOL2 659: LAISEAERLYVEGVN LYDGVYEETITKAEESI SI CRSFEEAFFLKAYALADKNLDADET SQVQVLEALCPKPSDGLRKGOALNNLGSIMNLGMDDAE

EOL1 732: DCYINALKVRIHRAHGLARVIFLENDKAAAYEEMTKLIEKAQNNASAYEKRSEYCDRELAJSDLEIMVTRDPLRVYPYRYRAAVLMDSRKEAEAITELS
ETO1 793: DCYTNALTI KHTRAHGLARVYFLKNQKAAAYEEMTKLIEKAQNNASAYEKRSEYCDREMAASDLQIATQDPLRTYPPYRYRAAVLMDDKESAEI IDELS
EOL2 759: TAYKNATIEI KHTRAHGLARVYFLKNQKAAAYEEMTKLIEKSCSRAAAYEKRSEYCDREKAKEDLDNATITDPLRTYPPYRYRAAVLMDDCHETAEAVEELS

EOL1 832: RAI AFKADLHLLHRAAFHEHIGDVTSLRDQFAALSVDPNPQEMLEISFVNSHEP . . . . .
ETO1 893: RAI SFKPDQLLHRAAFYDSMCEGASAIKDCEAALQDPGHADTLELYHAKREPNDQK . . . . .
EOL2 859: RAI AFIRPELCILHRAAFHEATGNLSIATQDCEAALQDPNHTETLFLYSRSKQDASSI DNTI FGLD

```

図 5. ETO1 ファミリータンパク質のモチーフ構造

- A)** ETO1 の TPR モチーフのアライメント。コンセンサス配列および TPR モチーフ中の 2 つの α -ヘリックスサブドメインを示した。
- B)** ETO1、EOL1、EOL2 および他の BTB タンパク質の BTB ドメインのアライメント。各タンパク質の由来とアクセッション番号は以下の通り。ETO1、EOL1、EOL2 : シロイヌナズナ (本研究)、OsEOL1-3 : イネ (AC137072, AP003826, AC104847)、mel-26 : センチュウ (AAC63596)、kelch : ショウジョウバエ (A45773)、PLZF : ヒト (AAD03619)
- C)** ETO1、EOL1、EOL2 のアミノ酸配列のアライメント。BTB (破線)、TPR (実線)、CC (一点鎖線) モチーフを示した。
- すべてのアライメントは CLUSTALW プログラムを用いて作成した。同一および類似のアミノ酸をそれぞれ黒およびグレーのボックスで強調した。(A - C)

cDNAを35Sプロモーターに連結し、アグロバクテリウムを介した減圧浸潤法によって*eto1-4*変異株に導入した。50系統の独立した形質転換体のうち、20系統がエチレン過剰合成の表現型を示さず、野生型の表現型が復帰した（図6）。このことは導入した35S::*ETO1*遺伝子が*eto1*変異を相補したことを示しており、At3g51770が*ETO1*遺伝子であることが確認された。

ETO1の機能を推測するため、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、SignalP (Bendtsen *et al.*, 2004)、ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999)、TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000)、PSORT (Nakai and Horton, 1999)等の予測プログラムを用いてETO1タンパク質の細胞内局在等について解析したが、明確な膜貫通ドメインやシグナルペプチドを持たず、特定の細胞内局在をする可能性は低いと予測された。

考察

*eto1*変異体は当初、恒常的に三重反応を示す変異体として同定されたが、エチレン生合成やエチレン作用の阻害剤であるアミノエトキシビニルグリシン (AVG)、 α -アミノイソブチル酸 (AIB)、銀イオン、トランスサイクロオクテン (TCO) などによって三重反応が抑制されることから、恒常的シグナル伝達変異体ではなく、エチレン生合成の制御に関する変異体であると考えられていた(Guzman and Ecker, 1990; Kieber *et al.*, 1993; Hirayama *et al.*, 1999)。また、*eto1*変異体が劣性の変異体であることから、ETO1タンパク質はエチレン生合成を負に制御する因子であると考えられる。エチレン生合成経路の酵素であるACSやACOをコードする遺伝子が組織特異的あるいはストレス応答性の発現パターンを示すことが知られているので、*ETO1*がコードするタンパク質の候補として、たとえば*ACS*遺伝子の発現を調節する転写因子等が想像されていた。また、プロテインキナーゼ阻害剤あるいはプロテインホスファターゼ阻害剤の処理がトマトACSの活性を変化させることが知られていたため(Spanu *et al.*, 1994)、ACSタンパク質の活性や安定性を調節するプロテインキナーゼなども候補のひとつと想像されていた。一方ではもちろん未知機能を持つ新規タンパク質である可能性もあり、これまでETO1の実体はまったく不明であった。もしもETO1が*ACS*遺伝子の負の転写調節遺伝子であるならば、*eto1*変異体においては*ACS*遺伝子の転写産物が野生型よりも過剰に蓄積しているはずである。しかし、Woesteらが報告しているように、*eto1*変異体において*AtACS2*、*AtACS4*、

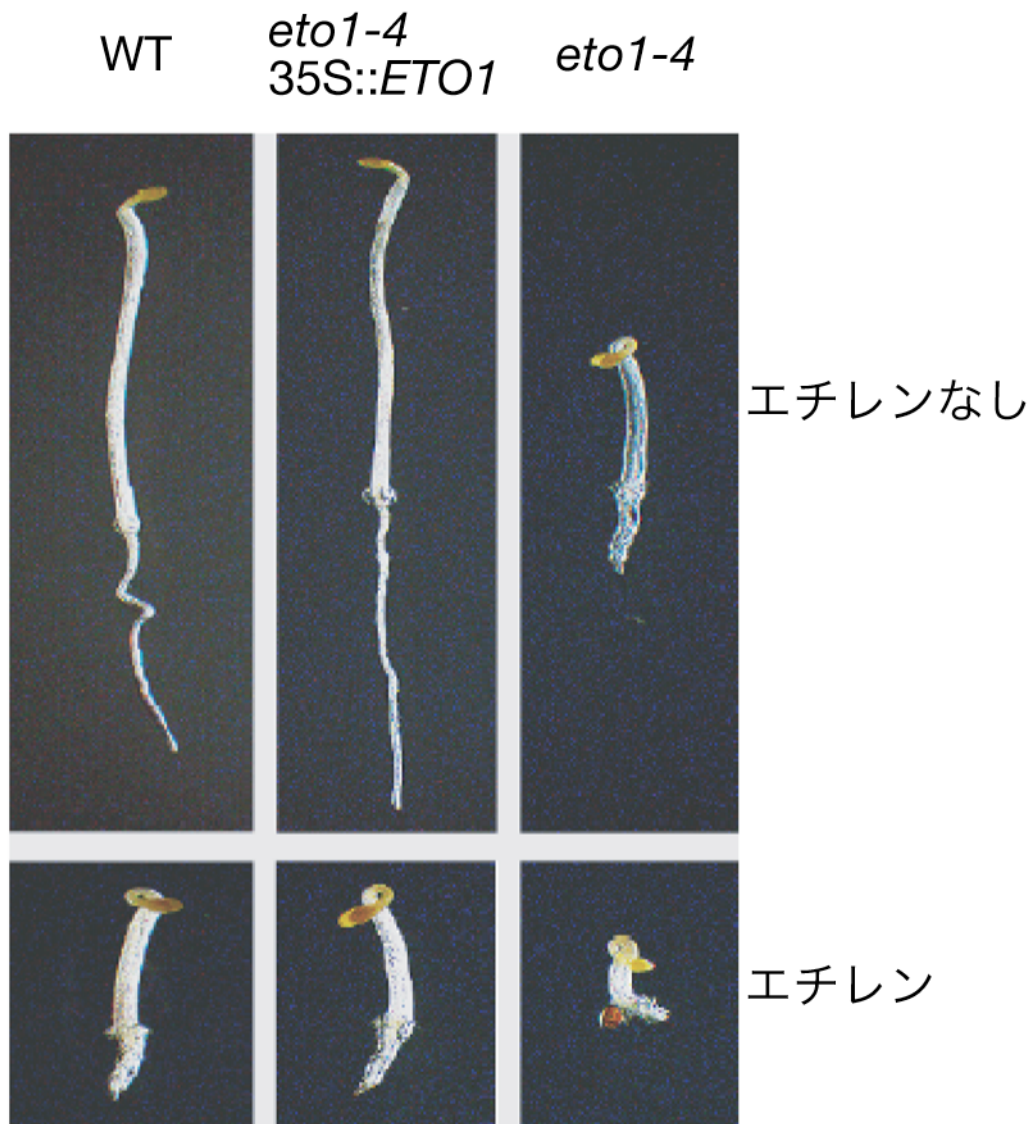


図6. 35S::*ETO1* 遺伝子の導入による *eto1* 表現型の相補

エチレンの存在下 (10ppm) または非存在下で発芽させた野生型 (Col-0)、*eto1-4* および *eto1-4* 35S::*ETO1* の T₂ 世代植物の発芽3日後の黄化苗の様子。

*AtACS5*などの黄化苗で発現する*ACS*遺伝子の転写産物は過剰蓄積しておらず、*ETO1*が*AtACS2*、*AtACS4*、*AtACS5*以外の*ACS*遺伝子の転写を調節している可能性が排除できないものの、*ETO1*が*ACS*遺伝子の転写以降の段階で機能することが示唆されていた(Woeste *et al.*, 1999)。実際、本研究で単離した*ETO1*遺伝子は既知の転写因子とはホモロジーを示さず、BTB/TPR/CCドメインから構成される新規タンパク質をコードしており、コンピュータープログラムを用いた解析によっても核移行シグナルは予測されなかった。

一方、Vogelらは*eto2-1*変異体ではフレームシフト変異により*AtACS5*タンパク質C末端の12アミノ酸が変異を起こしているものの、*AtACS5*遺伝子の転写産物は増加していないことから、*AtACS5*タンパク質のC末端領域が何らかの転写後制御を受け、活性が制御されていると考えた(Vogel *et al.*, 1998)。さらに、Chaeらはmycエピトープでタグした*AtACS5*タンパク質とグルコシルコイドによる転写誘導系を用いて*AtACS5*タンパク質の動態を解析し、*eto2-1*変異が*AtACS5*タンパク質の安定性を上昇させ、サイトカイニン処理や*eto1*変異が*AtACS5*の安定性を上昇させることを明らかにした(Chae *et al.*, 2003)。これらのことから、*ETO1*タンパク質と*AtACS5*タンパク質のC末端との何らかの相互作用が、エチレン合成の転写後制御において重要な役割を果たしていることが示唆される。*ETO1*の持つBTB、TPR、CCモチーフはいずれもタンパク質間の相互作用に関与するドメインであり、*ETO1*が直接*AtACS5*と相互作用する可能性がある。特に、本研究で変異箇所を明らかにした*eto1*の各アリルはいずれもTPRドメインを含む領域に変異を生じており、*ETO1*のTPRドメインが*AtACS5*との相互作用に重要であることが示唆される。*ETO1*遺伝子のマッピング予備試験において、*eto1-2* x Col-0および*eto1-4* x Col-0の2つの集団に由来するF₂個体群の表現型の強さを比較したが、塩基配列解析の結果、*eto1-2*と*eto1-4*はともに第3 TPRモチーフ付近にストップコドンを生じており、第3 TPRモチーフ以降を欠失していると考えられ、変異型タンパク質に機能的な差があるとは考えづらい。また、これらのアリルの遺伝的背景はともにCol-0であることから、マッピング集団間での表現型の強さは採種時の栽培条件もしくは採種後の環境による影響と考えられる。

ところで、*AtACS5*のC末端のアミノ酸配列の変異あるいは*eto1*変異のいずれによっても*AtACS5*タンパク質が過剰蓄積し、エチレンを過剰合成することから、*AtACS5*のC末端領域が直接*ETO1*と相互作用するというモデルが考えられる。

また、ChaeらはACSファミリーの中でも特にAtACS5と類似性の高いAtACS9のC末端領域におけるアミノ酸置換変異 (V457D) がもう一つの優性エチレン過剰合成変異 *eto3* の原因であることを明らかにしており (Chae *et al.*, 2003)、AtACS5だけでなく複数のACSのC末端が転写後制御、特にETO1との相互作用に関与していることが示唆される。これらのモデルを検証するためには、yeast two-hybrid法やpull-down法などを用いて、ETO1とAtACS5とのタンパク質レベルでの直接の相互作用について解析することが有効であると考えられる。

本研究ではシロイヌナズナにおいて2つのETO1パラログが、また他の多くの植物種にもオルソログが存在することを示した。ETO1との相互作用が示唆されるACSタンパク質もまた多くの植物種で非常に保存性の高いタンパク質であるため、これらのタンパク質ファミリーの間での相互作用もまた多くの植物種で保存されているのではないかと考えられる。

2. ETO1 ファミリータンパク質と AtACS5 とのタンパク質間相互作用の解析

ETO1 タンパク質の構造解析の結果、ETO1 は何らかのタンパク質間相互作用に関与することが示唆された。特に、ETO1 はTPR ドメインを介してAtACS5 タンパク質の C 末端と相互作用することが示唆されたので、これら 2 つのタンパク質の間の相互作用の解析を行った。

タンパク質間の相互作用を解析するための有効な方法として、yeast two-hybrid (Y2H) 法が確立されている (Fields and Song, 1989)。yeast two-hybrid 法はレポーター遺伝子の転写活性を指標に、2 つのタンパク質間の相互作用を酵母内で検出するシステムである。現在ではさまざまな変法が考案されているが、基本的には2つの遺伝子をそれぞれ DNA 結合ドメイン (BD または bait (「おとり」の意)) および転写活性化ドメイン (AD または prey (「獲物」の意)) と融合させたものを酵母内で発現させ、2 つのタンパク質間に相互作用が起きるとタンパク質複合体が形成されて BD と AD が近接するようになるため、レポーター遺伝子の上流に結合した複合体が転写を活性化するという原理に基づいている。BD としては酵母の GAL4 や大腸菌の LexA などの DNA 結合ドメインが、AD として酵母の GAL4 やヘルペスウィルスの VP16 などの転写活性化ドメインが用いられている。また、レポーター遺伝子の上流域

に *GAL1*、*GAL2*、*MEL1* などの遺伝子の *GAL4* 結合領域や *LexA* オペレーターなどの *LexA* 結合領域が用いられている。レポーター遺伝子としては、特定の基質を分解することによって発色反応を起こさせる *LacZ* や、*HIS*（ヒスチジン要求性）、*ADE*（アデニン要求性）などの栄養要求性遺伝子が用いられている。

yeast two-hybrid 法で検出されたタンパク質間相互作用を *in vitro* で確認する方法として、pull-down アッセイが広く用いられている。pull-down アッセイでは、片方のタンパク質をレジンに結合させておき、そこにもう一方のタンパク質を混合し、洗浄、溶出後のサンプルをそれぞれ SDS-PAGE などに供試することによって両者の結合の有無を解析する。それぞれのタンパク質に GST、myc、HA、6xHIS などのエピトープ・タグを付加することにより、特異的な抗体が無くても実験を行うことが可能である。

こうして確認されたタンパク質間の相互作用が本当に植物体内でも起きているかどうかは、免疫共沈降法（Co-Immunoprecipitation; Co-IP）によってさらに確認することができる。免疫共沈降法では、あるタンパク質を細胞内で発現させ、そのタンパク質に対する抗体を用いて、相互作用するタンパク質と一緒に沈降させ、検出する方法である。pull-down 法と同様に、エピトープ・タグを付加することにより、特異的な抗体が無くても実験を行うことが可能である。

本研究ではこれらの方法を用いて、*ETO1* およびそのパラログである *EOL1*、*EOL2* と *AtACS5* との相互作用について解析した。

材料と方法

yeast two-hybrid (Y2H) アッセイ

ETO1 のコード領域は完全長 cDNA クローン (pcETO1.9) を鋳型として、5' 側に BamHI サイト、3' 側に SalI サイトを付加したプライマーを用い、*Pfu* DNA Polymerase (Stratagene 社) による PCR で増幅し、pAS2 ベクターの BamHI と SalI サイトの間にクローニングした。*EOL1*、*EOL2*、*AtACS5* のコード領域は、以下の方法で RT-PCR によって増幅し、yeast two-hybrid 用ベクターにクローニングした。発芽後 11 目のシロイヌナズナ黄化苗を 150μM のシクロヘキシミドで暗黒下、8 時間処理し、total RNA を抽出した。こうして抽出した RNA 5μg を鋳型として、SuperScript Preamplification System (インビトロジェン社) を用いて 1st strand cDNA を合成し、遺伝子特異的プライマーおよび *Pfu*

DNA Polymerase を用いて PCR を行った。プライマーにはそれぞれ、5'側に SmaI サイト (*EOL1*)、BamHI サイト (*EOL2* および *AtACS5*) を、3'側に SmaI サイト (*EOL1*)、SalI サイト (*EOL2*)、XhoI サイト (*AtACS5*) をそれぞれ付加した。増幅した PCR 産物を yeast two-hybrid ベクター (*EOL1*、*EOL2* は pAS2、*AtACS5* は pACT2) の適当なサイトにクローニングした。同様に C 末端の 12 アミノ酸を欠失した *AtACS5* (t*AtACS5*)、C 末端の 25 アミノ酸を欠失した ETO1 (tETO1) も PCR によって増幅し、pACT2 および pAS2 ベクターにそれぞれクローニングした。これらのベクターを酢酸リチウム法 (Gietz *et al.*, 1992) によって分裂酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) Y190 株に導入し、SDA-Leu-Trp 培地で形質転換細胞を選抜した。2 つのタンパク質間の相互作用を *HIS3* あるいは *LacZ* レポーター遺伝子の発現によって解析した。*HIS3* 遺伝子の発現は SDA-Leu-Trp-His 培地上での生育によって検出した。*HIS3* 遺伝子のバックグラウンドレベルでの発現を抑制するため、培地に 50mM 3-AT (1,2,4-アミノトリアゾール) を添加した。また、*LacZ* 遺伝子の発現はコロニーリフトあるいは液体培養による β -ガラクトシダーゼアッセイ (Schneider *et al.*, 1996) によって検出した。陽性のコントロールとして酵母 SNF1 と酵母 SNF4 を、陰性のコントロールとして酵母 SNF1 とヒト lamin C を用いた。

in vitro pull-down アッセイ

ETO1 タンパク質は、QIAGEN 社 pQE 系プラスミドに由来する RGS-His エピトープタグ (アミノ酸配列: RGSHHHHHH) を付加した形で分裂酵母に導入し、ガラクトースで誘導して発現させ、Ni カラムで精製した。野生型および C 末端の 12 アミノ酸を欠失させた *AtACS5* (以下、それぞれ *AtACS5* および t*AtACS5* と表記することにする) は Single-Tube Protein System (Novagen 社) を用いて *in vitro* 合成する際に、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンでアイソトープラベルした。等量の放射能をもつ *AtACS5* および t*AtACS5* をそれぞれ結合バッファー (50mM HEPES, pH 7.5、150mM NaCl、0.1% Nonidet P40、10% グリセロール、20mM イミダゾール) 内で RGS-ETO1 と 25°C で 30 分間インキュベートして結合させた。Ni-NTA アガロースレジン (QIAGEN 社) を添加して RGS-ETO1 を沈殿させた後、洗浄バッファー (50mM HEPES, pH 7.5、500mM NaCl、0.1% Nonidet P40、10% グリセロール、20mM イミダゾール) で洗浄した。さらに 250mM イミダゾールで溶出を行い、精製タンパク質、フロー

ルー、洗浄、溶出液をそれぞれ SDS-PAGE で電気泳動し、オートラジオグラフィーにより AtACS5、tAtACS5 を検出した。

免疫共沈降 (co-immunoprecipitation (Co-IP))

35S::RGS-ETO1 および 35S::HA-AtACS5 あるいは 35S::HA-tAtACS5 を持つ植物細胞での発現ベクターとして、C 末端側に融合タグを持つバイナリーベクター pCHF1-GFP および pCHF1-ProteinA (Salk Institute、Yanhai Yin 博士より分譲) を用いて、pCHF1-HA-AtACS5-GFP および pCHF1-RGS-ETO1-ProteinA をそれぞれ構築した。HA タグおよび RGS (6xHis) タグ (QIAGEN 社の pQE プラスミドに由来) は PCR を用いて AtACS5 および ETO1 の N 末端側にそれぞれ in-frame に融合させた。シロイヌナズナの懸濁培養細胞は黄化苗の胚軸から誘導し (Sainsbury Institute、Jonathan D. G. Jones 博士より分譲)、Murashige & Skoog (MS) 基本培地に Gamborg の B5 ビタミン、3% ショ糖、1mg/L 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を加えた培地 (pH5.7) を用いて、24℃、暗黒下で 110rpm の速度で振とうして維持した。毎週、15ml の培養細胞を 35ml の新鮮な培地に継代した。こうして誘導したシロイヌナズナ黄化苗胚軸由来の懸濁培養細胞系にアグロバクテリウムを感染させ、これらのタンパク質を一過的に発現させた。10-20 O.D.₆₀₀ のアグロバクテリウムを 50μg/L のアセトシリンゴンの存在下で 50ml の懸濁培養細胞に感染させ、2-3 日後に 50mM Tris-HCl, pH 7.5、150mM NaCl、0.1% Triton X-100、10% グリセロール、plant protease inhibitor cocktail (Sigma 社) からなるバッファーを用いてタンパク質を抽出した。後述の理由によりこれらのタンパク質を高蓄積させるためにはプロテアソームを阻害する必要があるため、プロテアソーム阻害剤である MG132 (10μM) で 1 時間処理してからタンパク質を抽出した。タンパク質粗抽出物から抗 HA タグ抗体アガロースで免疫沈降 (immunoprecipitation (IP)) を行い、SDS-PAGE で泳動後、放射ラベルした抗 HA 抗体または抗 RGS-His 抗体でウェスタンブロット解析を行った。オートラジオグラフおよび PhosphorImager を用いてシグナルを検出した。

結果

AtACS5 と ETO1、EOL1、EOL2 との間でのタンパク質間相互作用を Y2H 法によって解析したところ、AtACS5 は ETO1、EOL1、EOL2 のいずれとも

強い相互作用を示した (図 7A)。一方、*eto2-1* 変異における AtACS5 の C 末端の変異が ETO1 との相互作用を抑制するかどうかを調べるため、*eto2-1* 変異を部分的に模倣した変異型 AtACS5 (tAtACS5 ; C 末端の 12 アミノ酸を欠失) と ETO1 ファミリーとの相互作用を Y2H 法によって解析した結果、tAtACS5 は ETO1 ファミリーとまったく相互作用を示さなかった (図 7B)。これらのことから、AtACS5 は C 末端領域を介して ETO1 と相互作用するものと考えられた。

また、*eto1-1* アリルでは 6 番目の TPR モチーフのみが欠失しているが、この欠失が AtACS5 との相互作用を抑制するかを調べるため、C 末端の 25 アミノ酸を欠失することによって、6 番目の TPR モチーフを欠失した変異型 ETO1 (tETO1) と AtACS5 とのタンパク間相互作用を同様の方法によって解析した。tETO1 も AtACS5 と強い相互作用を示さず、*eto1* アリルの変異箇所の解析結果とあわせて、TPR ドメインが AtACS5 との相互作用に必要であると考えられた (図 7B)。

Y2H 法の結果を確認するために、pull-down 法によって AtACS5 あるいは tAtACS5 と ETO1 との相互作用を解析した。pull-down 法において ETO1 は AtACS5 との強い結合を示したのに対し (図 8 レーン 4)、tAtACS5 とは強い結合を示さず (図 8 レーン 8)、Y2H の結果と一致するものであった。

次に、ETO1 と AtACS5 とが植物細胞内でも相互作用しているかを確認するために、シロイヌナズナの懸濁培養細胞において AtACS5 もしくは tAtACS5 と ETO1 とを一過的に共発現させ、Co-IP 実験を行った。後述の結果が示すように、ETO1 の過剰発現は AtACS5 のタンパク質量を減少させるので、懸濁培養細胞系を MG132 で処理して 26S プロテアソームの活性を阻害し、AtACS5 を安定化させてから Co-IP を行った。その結果、AtACS5 は ETO1 と共沈降し (図 9 左のレーン)、植物体内において ETO1 と相互作用していることが確認された。tAtACS5 も ETO1 と共沈降したが、沈降量は AtACS5 に比べて著しく少なかった (図 9 中央のレーン)。この結果は、Y2H および *in vitro* pull-down アッセイの結果と同様、AtACS5 が C 末端領域を介して ETO1 と相互作用することを示している。

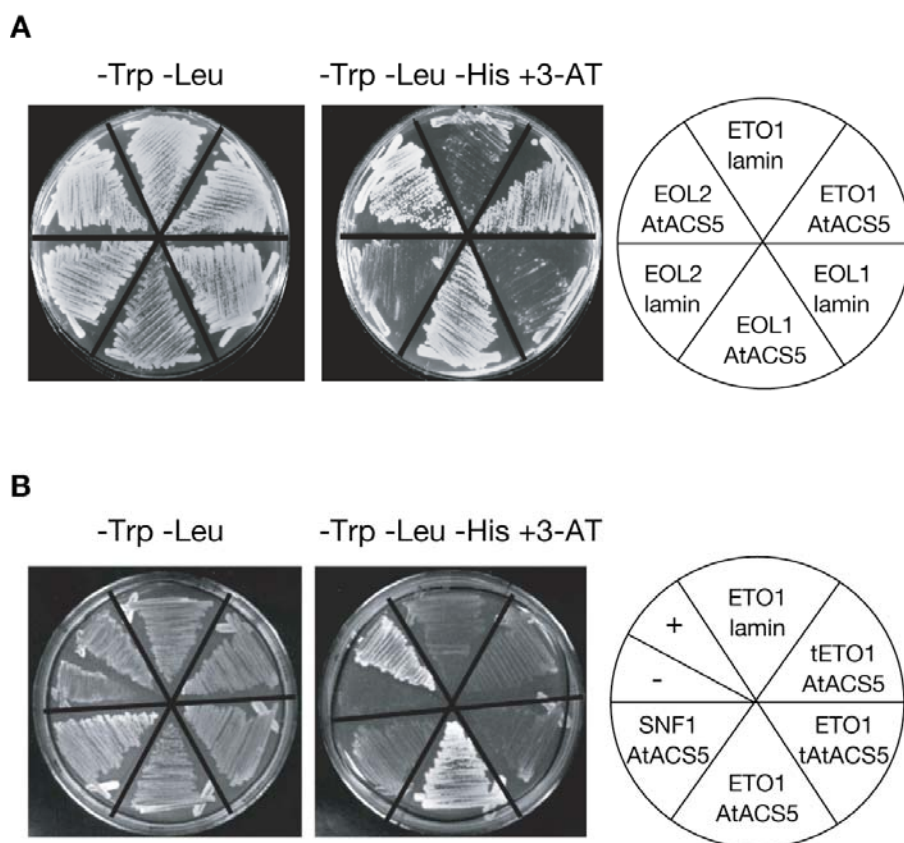


図 7. yeast two-hybrid システムにおける ETO1 ファミリータンパク質と AtACS5 との相互作用

- A)** ETO1 およびそのホモログである EOL1、EOL2 は酵母細胞中で AtACS5 と特異的に相互作用する。*ETO1*、*EOL1*、*EOL2* を pAS2 bait ベクター (*TRP3* マーカー遺伝子を持つ) に、*AtACS5* を pACT2 prey ベクター (*LEU2* マーカー遺伝子を持つ) にそれぞれクローニングし、発現させた。レポーター遺伝子として *HIS3* 遺伝子を用いた結果を示す。培地に 1,2,4-アミノトリアゾール (3-AT; *HIS3* タンパク質の基質のアナログのひとつ) を加えることにより、レポーター遺伝子のバックグラウンドを下げ、特異的なタンパク質間相互作用を検出している。
- B)** C 末端同士を介した ETO1 と AtACS5 の相互作用。AtACS5 の C 末端の 12 アミノ酸の欠失 (tAtACS5) または ETO1 の C 末端の 25 アミノ酸の欠失 (tETO1) によって yeast two-hybrid における相互作用がなくなる。これらのアミノ酸はそれぞれ、*eto2-1* および *eto1-1* での変異部位に相当する。ポジティブコントロール (SNF1 と SNF2) およびネガティブコントロール (SNF1 と lamin) を +、- で示した。

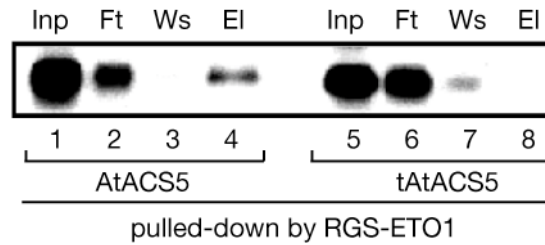


図 8. *in vitro* pull-down アッセイにおける ETO1 と AtACS5 との相互作用

AtACS5 の完全長または欠失型 (tAtACS5) を *in vitro* トランスレーション時に ^{35}S ラベルし、RGS エピトープでタグした ETO1 (RGS-ETO1) とそれぞれ混合し、インキューベートした。Ni-NTA アガロースレジンを用いて RGS-ETO1 およびその結合タンパク質を回収した。フロースルー (Ft)、洗浄 (Ws)、溶出 (El) 画分を 10% SDS-PAGE で分離し、オートラジオグラフィーに供した。インプット (Inp) は各アッセイに供試した AtACS5 タンパク質 (AtACS5 と tAtACS5) の 30% を泳動したもの。

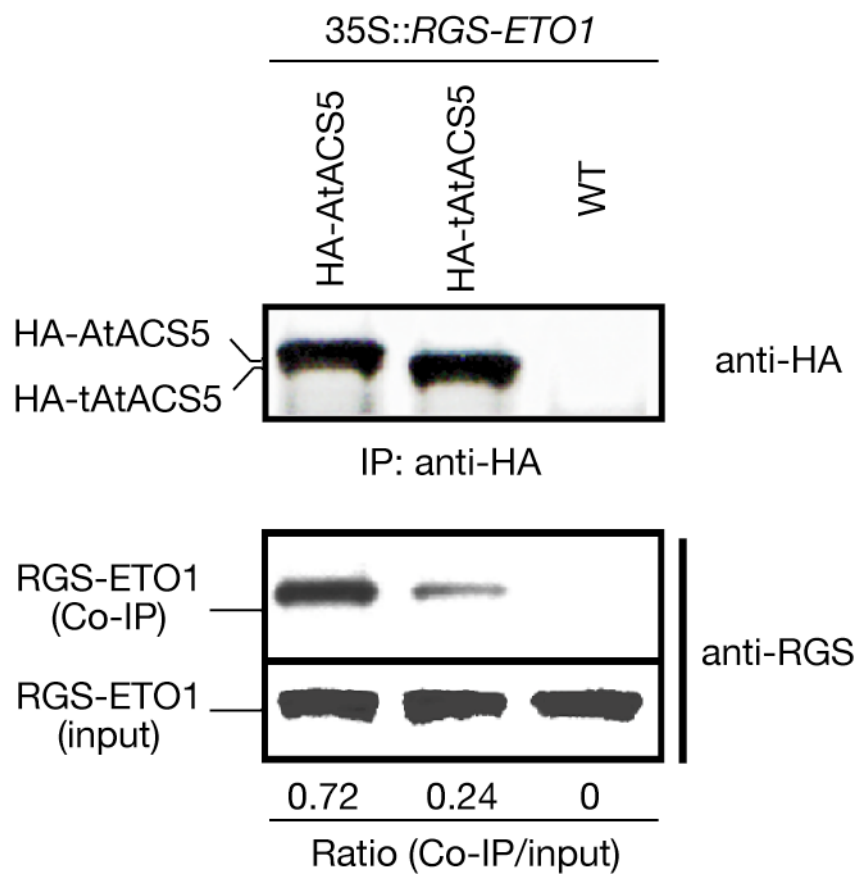


図 9. 植物細胞内での **ETO1** と **AtACS5** の相互作用

各遺伝子を導入した懸濁培養細胞を MG132 処理し、タンパク質を抽出した。HA-AtACS5 または HA-tAtACS5 に結合した RGS-ETO1 を PhosphorImager によって定量し、供試した RGS-ETO1 (Inp) との比で表した。

考察

本研究では、機能未知タンパク質として同定された ETO1 が TPR ドメインを介して AtACS5 の C 末端と相互作用することを示した。

はじめに Y2H アッセイを用いて両タンパク質の相互作用を示した。Y2H アッセイにおいて ETO1 と AtACS5 は相互作用し、ETO1 の TPR または AtACS5 の C 末端 12 アミノ酸が欠失した際に相互作用はなくなっている。このことは ETO1 の TPR 領域に変異を生じたすべてのアリル (*eto1-1/ 1-2/ 1-3/ 1-4/ 1-5/ 1-8/ 1-10*) および AtACS5 の C 末端にアミノ酸置換を生じた *eto2-1* がともにエチレン過剰合成の表現型を示すことと一致する。ETO1 が TPR ドメインを介して AtACS5 の C 末端と相互作用して、AtACS5 の活性を抑制しているとすれば、上記の *eto1* アリルおよび *eto2-1* 変異体においては AtACS5 と ETO1 との相互作用が失われているため、AtACS5 に対する抑制が解除され、エチレンを過剰合成するものと考えられる。

Y2H アッセイは2つのタンパク質間の相互作用を示す有効な方法であり、微生物や動物だけでなく植物においても多くのタンパク質の間の相互作用がこの方法を用いて示されている。しかし、一方では酵母細胞内で2つのタンパク質を高発現させた条件での実験であるため、かならずしも *in vivo* での相互作用を反映するとは限らず、その解釈には注意を要すると言われる。この原因として、①BD と融合させたタンパク質自身が転写活性を持つ、②両タンパク質が適切に核に局在しない (GAL4 システムの場合、ベクター上の配列によって BD、AD どちらの融合タンパク質も核に局在するように設計されている)、③BD や AD が融合させたタンパク質の結合領域を覆ってしまう、④翻訳後のフォールディングが適切に起きずにタンパク質の構造が異常になってしまう場合、⑤本来の細胞内では翻訳後に起きる糖鎖付加などが相互作用に必要である、等さまざまな理由が考えられる。そのため、Y2H で得られた結果を他の何らかの手法によって確認することが必要と考えられている。本研究では、*in vitro* pull-down アッセイおよび植物細胞を用いた Co-IP を用いて ETO1 と AtACS5 との相互作用を確認した。*in vitro* pull-down では、Y2H を裏付ける結果が得られ、ETO1 が AtACS5 と結合する性質を持つことが示された。さらに、Co-IP により、両タンパク質の結合がたしかに植物細胞内で起きることを確認した。植物細胞内における両者の相互作用については、*eto1* と *AtACS5* の機能欠失型アリルとの二重変異体を作成することによっても確認ができると考えられる。このことは

次節で検証する。

さらに、Y2H アッセイによって ETO1 だけでなく、EOL1 や EOL2 などの ETO1 ホモログも AtACS5 と相互作用することを示した。前節で述べたように、ETO1 ファミリータンパク質は植物に固有のタンパク質と考えられるが、本結果は多くの植物種に存在する ETO1 ファミリータンパク質が ACS タンパク質と相互作用することを示唆している。

以上の結果から、ETO1、EOL1、EOL2 は AtACS5 と直接相互作用し、その活性を制御していることが示唆された。また、この相互作用は ETO1 の TPR ドメインおよび AtACS5 の C 末端を介して起きるものと考えられた。では、ETO1 は AtACS5 に結合してから、「どのように」その活性を抑制しているのだろうか。図 10 に ETO1 による AtACS5 の抑制のモデルを示した。図 10 の上部に示したように、ETO1 の非存在下においても AtACS5 の活性は C 末端の欠失により上昇するとの報告がある(Li and Mattoo, 1994)。モデル A には、酵素活性阻害モデルを示した。ETO1 が AtACS5 の活性中心をふさいだり構造を変化させたりして、基質である SAM の侵入を防ぐなど、物理的にその酵素活性を阻害するモデルである。ACS ファミリータンパク質において、触媒ドメインは非常に保存性が高いのに対し、C 末端領域は多様性に富み長さもまちまちである。もともと ACS の C 末端が酵素活性を阻害する性質を持ち、ETO1 の結合がその効果を促進すると考えるならば、トマトの LE-ACS2 の C 末端を欠失させたところ ACS 活性が上昇したとの報告(Li and Mattoo, 1994)はこのモデルに当てはまる。実際、多くの酵素について、エフェクター（アクティベーターまたはインヒビター）の結合によるアロステリックな構造変化が酵素活性を制御する例が知られており(Kobe and Kemp, 1999)、ETO1 と AtACS5 の場合にもこうした制御が行われているのかも知れない。モデル B には二量体形成阻害モデルを示した。生化学的解析および構造解析の結果から、AtACS5 は二量体を形成することによっておのおのの単量体が活性中心を共有することによって活性型となると考えられているため(Tarun and Theologis, 1998; Capitani *et al.*, 1999)、モデル B のように ETO1 が結合することによってこの活性型二量体形成が阻害される可能性も考えられる。モデル C にはタンパク質分解モデルを示した。このモデルでは ETO1 がプロテアソームの構成因子等と相互作用することにより、AtACS5 の分解を促進する可能性を示している。AtACS5 が ETO1 との相互作用を介して分解系へと導かれるとすると、*eto1* 変異体あるいは

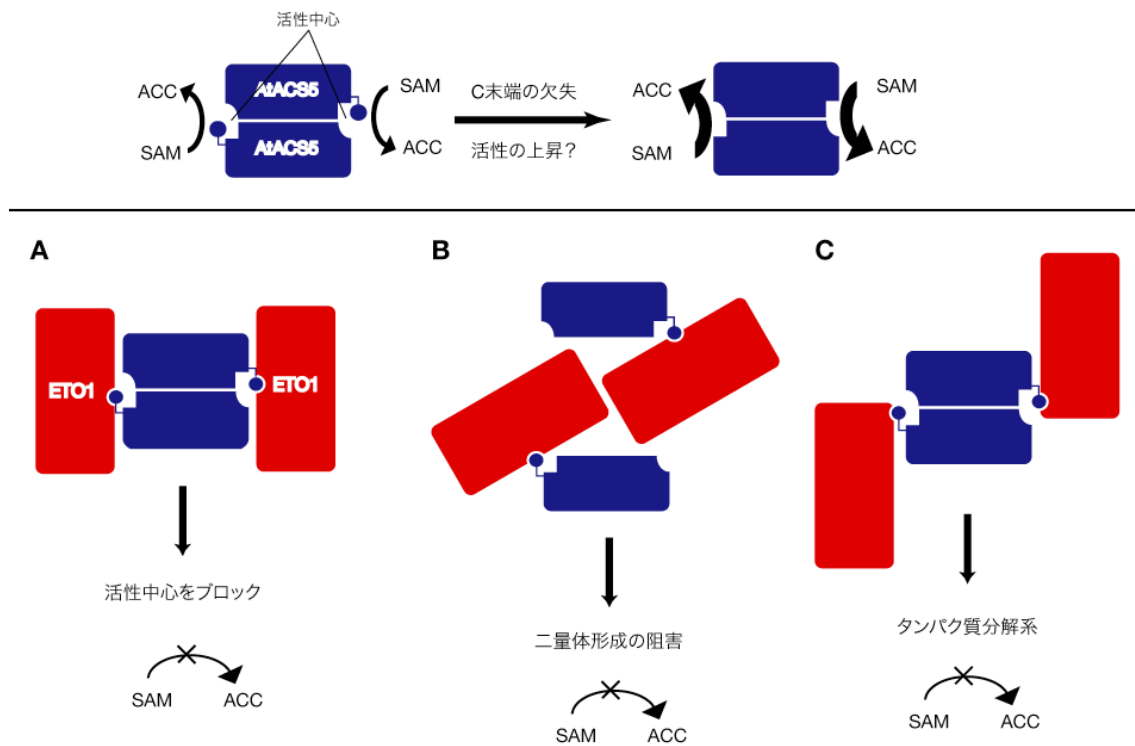


図 10. ETO1 ファミリータンパク質によるエチレン生合成制御機構のモデル

A) ETO1 は AtACS5 二量体に結合し、活性中心をふさいでしまう。

B) ETO1 は AtACS5 二量体の形成を阻害し、活性中心の形成を妨げる。

C) ETO1 の結合によって AtACS5 の分解が促進される。

eto2-1 変異体においては AtACS5 と ETO1 との相互作用が失われ、その結果 AtACS5 が分解されずに蓄積するため、Chae らの報告とよく一致する(Chae *et al.*, 2003)。これらのモデルは互いに両立可能なモデルであり、実際の植物体内ではこれらの現象が同時あるいは連続的に起きているのかも知れない。

これらの可能性については、分子遺伝学的あるいは生化学的手法によって検証を行う必要がある。たとえば、*in vitro* の系において ETO1 を添加することによって AtACS5 活性が低下するかどうかによって、モデル A またはモデル B を検証することが可能であり、また、ETO1 を植物細胞内で高発現させた時の AtACS5 のタンパク質量をモニターすることによってモデル C を検証することが可能である。以下の節において、これらの検証を順次行っていく。

3. 二重突然変異体による植物体内における ETO1 と AtACS5 との遺伝的相互作用の解析

前節で示したように、Y2H、*in vitro* pull-down および Co-IP の各実験によって ETO1 と AtACS5 との相互作用が検出されたが、さらに植物体における ETO1 と AtACS5 との遺伝的相互作用を確認するために *ETO1* および *AtACS5* 両遺伝子の機能欠失 (loss-of-function) 型二重変異体を作成して、表現型を解析することが必要である。ETO1 と AtACS5 の間に前節で考察したような相互作用があれば、二重変異体では *eto1* の示す恒常的三重反応が消失するはずである。このことを確認するためには *eto1* 変異体に加えて、*AtACS5* の機能欠失型アリルが必要である。すでに述べたように、*eto2-1* は *AtACS5* 遺伝子の変異体だが、C 末端領域に欠失を起こした優性のアリルであり、機能欠失型のアリルではない(Vogel *et al.*, 1998)。これに対して、*cin5-1*、*cin5-2*、*cin5-3* などが *AtACS5* の機能欠失型変異アリルとして報告されている(Vogel *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998)。シロイヌナズナの黄化苗を低濃度のサイトカイニンで処理すると、エチレン合成が誘導され、三重反応を示すが、これらの 3 つのアリルではサイトカイニンで処理しても三重反応を示さないため、*cin5* (*cytokinin-insensitive5*) と命名されている。*cin5* の 3 つのアリルはすべて *AtACS5* 遺伝子に変異を生じたものであるため、*eto2* のアリルと言えるが、歴史的に見ると *eto2-1* が 1993 年に報告されているのに対し(Kieber *et al.*, 1993)、*cin5* は 1998 年に報告されているため(Vogel *et al.*, 1998)、*cin5-1*、*cin5-2*、*cin5-3* はそれぞれ *eto2-2*、*eto2-3*、*eto2-4* と表記

されるべきである。本研究においてはこれらの*AtACS5*遺伝子の機能欠失型アリルを*eto2-2*、*eto2-3*、*eto2-4*と表記することにする。*eto2-2*は*AtACS5*遺伝子の転写開始点より608bp上流にT-DNAが挿入されたために*AtACS5*の転写産物が確認されなくなっており、nullのアリルと考えられる。また、*eto2-3*、*eto2-4*はアミノ酸置換変異が起きたアリルである（それぞれS269N、S201F）。*eto2-3*では、ACSの活性部位に位置する親水性のセリン残基（S269）が荷電した酸性アミノ酸であるアスパラギン酸（D）に変異しており、*eto2-4*でもACSファミリーにおいて極めて保存性の高い親水性アミノ酸（S201）が疎水性アミノ酸であるフェニルアラニン（F）に置換されているため、ともに完全に酵素活性を失っていることが示唆される。解析の結果、これらの変異体ではいずれも上記のように*AtACS5*遺伝子に変異を生じていたので、シロイヌナズナ黄化苗のサイトカニン誘導性エチレン合成には*AtACS5*が必要であることが明らかにされている（Vogel *et al.*, 1998a; Vogel *et al.*, 1998b）。

本研究においては、*eto1*と*eto2-2*との二重変異体を作成し、表現型の解析によってETO1と*AtACS5*との相互作用について考察する。

材料と方法

シロイヌナズナの供試系統と生育条件

*ETO1*の変異体として*eto1-4*アリルを、*AtACS5*の変異体としては*eto2-2*アリルを用いた。野生型に比べて約20倍のエチレンを過剰合成する優性変異アリル*eto2-1*とは異なり、*eto2-2*はエチレンを過剰合成しない機能欠失型の劣性アリルである。*eto2-2*は*AtACS5*遺伝子の5'上流域にT-DNAが挿入されており、遺伝的背景はWassilewskija (WS)である（Vogel *et al.*, 1998）。一方、*eto1-4*の遺伝的背景はCol-0である。空気中あるいはエチレン存在下での植物の育成はGuzman and Eckerの方法に従い（Guzman and Ecker, 1990）、黄化苗の表現型を解析する際には、1/2 x MS培地に播種したナズナの種子を4℃で4日間、明所にて低温処理した後、23℃で3日間、暗所で発芽させた。採種等のために成体を得る際には、22 – 25℃、連続光のグロースチャンバーにて植物体を栽培した。*eto1-4*と*eto2-2*との二重変異体は*eto1-4*アリルに対するdCAPSマーカーと*eto2-2*アリルに挿入されたT-DNAを識別するPCRマーカーを用いて確認した。

結果

まず、*eto1-4*と*eto2-2*のF2集団を作出し、*eto1-4*に特異的なdCAPSマーカーおよび、*eto2-2*の持つT-DNAの挿入を検出するPCRマーカーを利用して二重変異体を選抜した。

こうして得られた*eto1-4 eto2-2*二重変異体を暗所・空气中で発芽させたところ、野生型 (Col-0) に比べるとやや胚軸長、根長が短いものの、胚軸の肥大、根の肥大、茎頂部のフックの顕在化は見られず、*eto1*変異体に特徴的な三重反応が部分的に抑制されていた (図11)。一方、暗所・エチレン存在下で発芽させた場合には、野生型、*eto1-4*、*eto2-2*、*eto1-4 eto2-2*のいずれの系統も三重反応を示したが、*eto1-4*では著しく強い三重反応が観察された (図11)。

考察

本研究においては、*ETO1*と*AtACS5*との二重機能欠失型変異体において*eto1*の表現型が抑制されることを示した。このことは、植物体において*AtACS5*の活性が*eto1*の表現型の発現に必要であることを示しており、タンパク質間の相互作用の結果を強く支持するものと考えられる。また、*eto1*の表現型が部分的にしか抑制されなかったことは、*AtACS5*以外のACSアイソフォームが*ETO1*と相互作用し、*eto1*変異体の表現型発現に寄与していることを示唆している。実際に、やはり優性のエチレン過剰合成変異体*eto3*は*AtACS5*と相同性の高いアイソフォーム、*AtACS9*のC末端のアミノ酸置換 (V457D) によってもたらされることが示されている (Chae *et al.*, 2003)。*eto2-2*における*AtACS5*の場合と同様に、*eto3*においては*AtACS9*がC末端構造の変化により*ETO1*と相互作用しなくなったために過剰蓄積したと考えれば、*eto3*のエチレン過剰合成を説明できる。シロイヌナズナ・ゲノム上には活性型のACSをコードする遺伝子は全部で8個存在するが、*AtACS9*を含めて*AtACS5*とC末端領域の相同性の高いACSアイソフォームをコードする遺伝子が4つあり、少なくともこれらのアイソフォームは*ETO1*ファミリータンパク質によって制御されているものと推測される。*ETO1*ファミリータンパク質とACSファミリータンパク質との相互作用パターンの特異性については第Ⅲ章および第Ⅳ章で検証する。

本研究では、植物体においても*ETO1*が*AtACS5*と相互作用することを明らかにしたが、*ETO1*が*AtACS5*の活性をどのように抑制しているのかについては不明である。前節で提唱した活性抑制のメカニズムのモデルを検証するには、分子遺伝学および生化学的手法を用いた実験が必要と考えられる。

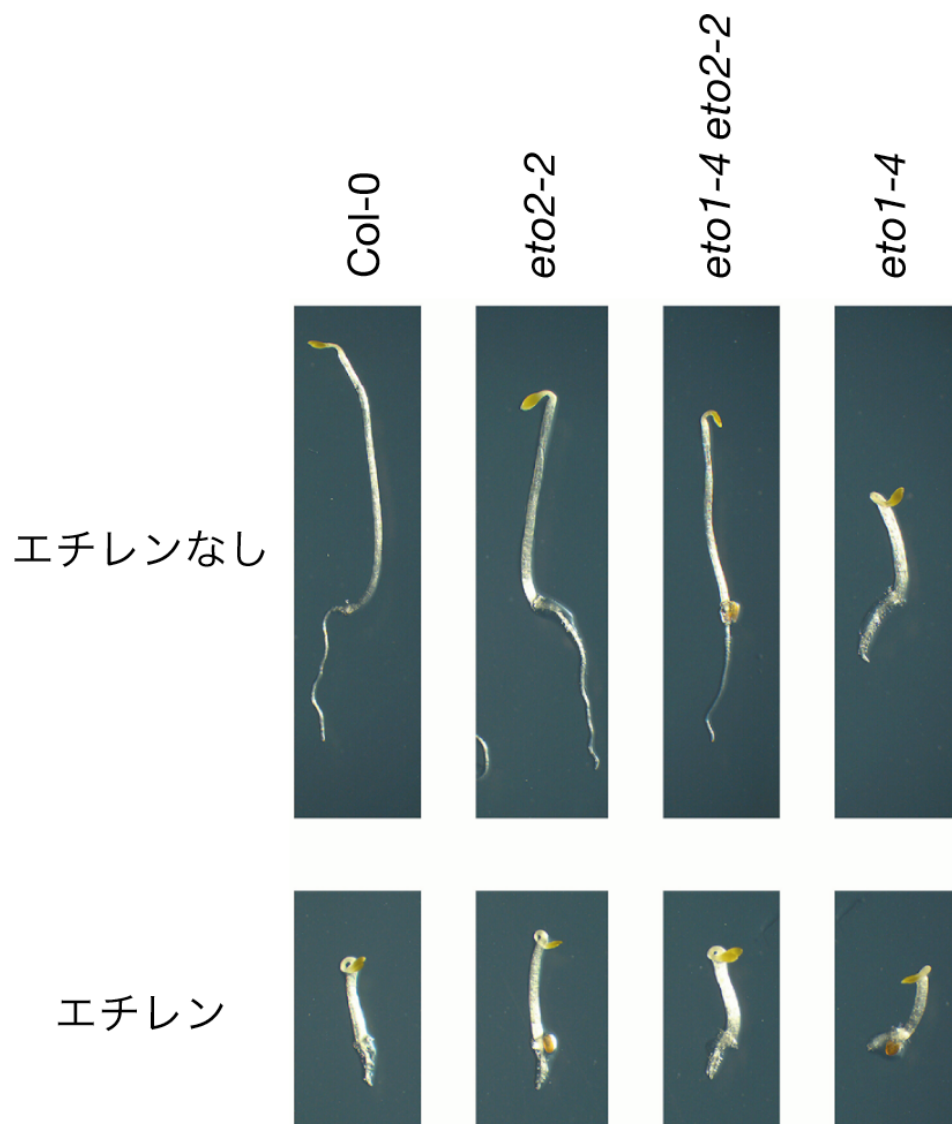


図 11. *eto2-2* 変異は *eto1* の表現型を抑制する

エチレンの存在下 (10ppm) または非存在下における、暗所で発芽 3 日後の野生型 (wt)、*eto1-4*、*eto2-2*、*eto1-4 eto2-2* 二重変異体の様子。

4. ETO1によるAtACS5の酵素活性の阻害

前節までの遺伝学的解析結果から、ETO1 は AtACS5 の負の制御因子であることが示唆された。本章第2節において、ETO1 による AtACS5 の制御メカニズムとして3つのモデルを提唱したが、順次これらを検証していく必要がある。

モデル A およびモデル B はともに ETO1 が AtACS5 の活性を阻害することを提唱したものであるため、ETO1 の共存下で AtACS5 の活性を測定することによってこのモデルを検証することができる。ACS の活性を *in vitro* で測定する方法のひとつとして、反応液中で ACS によって SAM から ACC を合成させ、これを化学的にエチレンに変換した後、エチレンをガスクロマトグラフィーによって定量する方法が挙げられる(Lizada and Yang, 1979; Chae *et al.*, 2003)。ACS に基質である SAM および補酵素であるピドキサルリン酸を加え、反応させることによって ACC が合成されるため、これに次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) を加えてエチレンを発生させ、定量するものである。一方、ACS の活性を細胞内で検出する方法として、ACC 要求性の大腸菌株を用いる方法がある(Tarun *et al.*, 1998)。この方法で用いられる大腸菌株 JAde6 は、イソロイシン要求性の大腸菌変異株 JHM544 に *Pseudomonas* 由来の ACC デアミナーゼ遺伝子を組み込んだものである(図 12A; Tarun *et al.*, 1998 より改図)。JHM544 (灰色のボックス部分) ではスレオニンからイソロイシンに至る代謝経路のうち、初期のステップであるスレオニンから α -ケトブチル酸を合成するステップに変異を生じているため、イソロイシンを合成することができない。このため本来、JHM544 はイソロイシンもしくは α -ケトブチル酸以降の代謝産物を合成培地に添加することによってはじめて生育できるのだが、JAde6 では培地に ACC を添加すれば、導入した *Pseudomonas* 由来の ACC デアミナーゼ (黄色のボックス) の働きによって ACC から α -ケトブチル酸を合成できるためにイソロイシン合成が回復し、生育が可能になる。さらに、大腸菌は SAM を合成できるため、植物の ACS 遺伝子 (点線のボックス) を導入すれば JAde6 は ACC を合成し、さらにはイソロイシンを合成することができるため、ACC を添加しなくても M9 最少培地で生育できるようになる。Tarun らはこの性質を利用してランダムに変異を導入したトマトの ACS 遺伝子を JAde6 に導入し、ACS の活性に必要なアミノ酸を解析している(Tarun *et al.*, 1998)。また、Tsuchisaka らはやはり JAde6 株を用いて、さまざまな ACS のヘテロ二量体の活性を解析している(Tsuchisaka and Theologis, 2004)。同様に、JAde6 で AtACS5 と ETO1

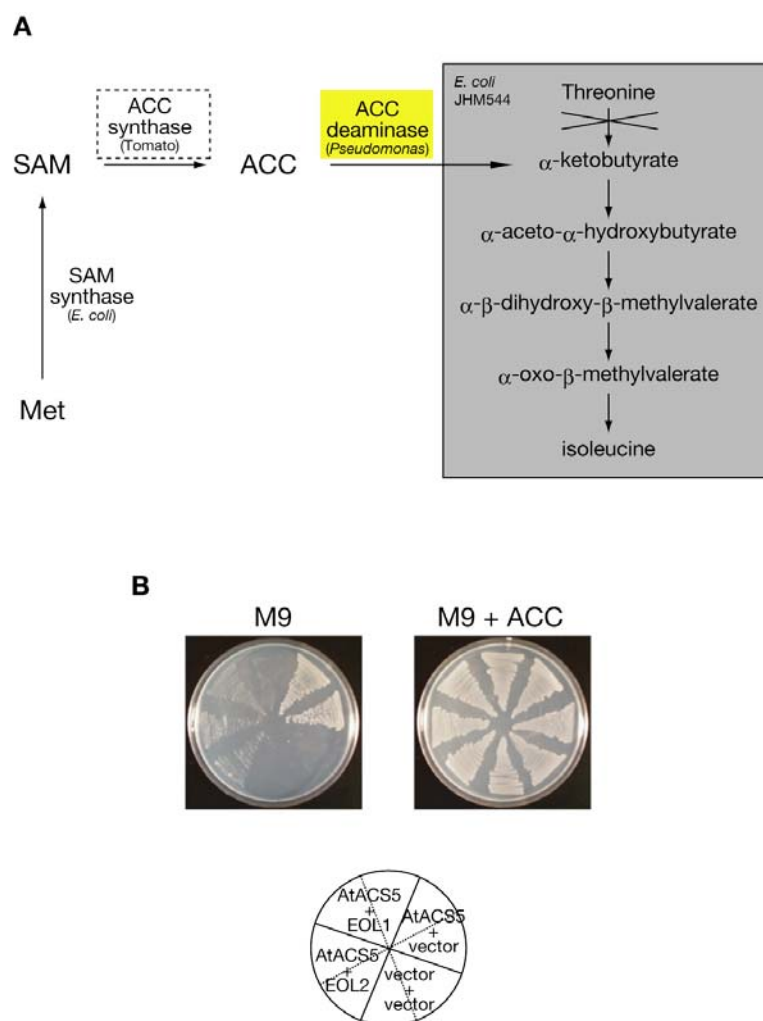


図 12. 大腸菌内において EOL1 と EOL2 は AtACS5 の活性を阻害する

- A)** 栄養要求性の大腸菌変異株 JHM544 におけるイソロイシン合成経路（グレーのボックス部分）。JAde6 株では、JHM544 株のゲノムに ACC デアミナーゼ遺伝子（黄色のボックス）を導入してあり、ACC を培地に添加すればそれを代謝してイソロイシン合成系が復帰するため、生育が可能となる。JAde6 に、さらに ACS 遺伝子（点線のボックス）を導入すると SAM から ACC を合成するため、イソロイシンや ACC を培地に添加しなくても生育が可能になる。（Tarun et al., 1998 より改図）
- B)** JAde6 に図の下に示した遺伝子を導入し、M9 最少培地または 3mM ACC を添加した M9 培地上で 37℃、2 日間培養した。各コンストラクト組み合わせにつき、独立した 2 クローンを供試した。

を共発現させれば、ETO1 が AtACS5 の活性を阻害するかどうかを細胞内で検出することが可能になると考えられる。一方、植物体における AtACS5 の活性は、サイトカイニン処理により誘導されたエチレンの合成量や、それにとまなう三重反応等の形態変化で検出することができる。そのため、ETO1 を過剰発現させたシロイヌナズナをサイトカイニンで処理すれば、AtACS5 に対する ETO1 の活性阻害効果を植物体において解析することができると考えられる。

そこで本研究ではこれらの方法を用いて、ETO1 の AtACS5 に対する活性阻害効果を解析した。

材料と方法

in vitro における ACS の活性測定

*in vitro*でのACS活性測定はChaeらの方法(Chae *et al.*, 2003)に従って行った。GST-AtACS5あるいはGST-tAtACS5 (各 1 μ g) を *S*-アデノシルメチオニン (500 μ M)、ピリドキサルリン酸 (10 μ M)、ジチオスレイトール (5 mM)、BSA (10 μ g) およびHEPES (250 mM、pH 8.0) とともに25°Cで60分間反応させた。必要に応じて、精製ETO1タンパク質0.8 μ gを反応液に加えた。この酵素反応によって合成されたACCを化学法によってエチレンへと変換し(Lizada and Yang, 1979)、キャピラリーカラム (PoraPLOT U; Varian社) とFIDを装着したガスクロマトグラフィー (Perkin-Elmer社) を用いてVogelらの方法に従って測定した(Vogel *et al.*, 1998)。エチレンの濃度はTurbochrome 4ソフトウェア (Perkin-Elmer社) を用い、既知濃度 (10ml/L) のエチレンを標準として解析した。黄化苗のエチレン合成量はVogelらの方法に従い、22mlバイアル瓶中の植物体数と24°C、暗黒下での発芽時間で標準化した。

大腸菌中でのACS活性の機能的解析

RT-PCRにより ETO1、EOL1、EOL2およびAtACS5のcDNAを増幅し、ETO1、EOL1、EOL2のcDNAはアンピシリン耐性マーカー遺伝子を持つpTrc99Aベクター (Pharmacia社) のイソプロピル β -D-チオガラクトシド (IPTG) 誘導性プロモーター下にクローニングした。AtACS5のcDNAは同じベクターのアンピシリン耐性遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換したベクターにクローニングした。形質転換した大腸菌JAde6株 (カナマイシン耐性) (Tarun *et al.*, 1998)を3種類の抗生物質 (10mg/L クロラムフェニコール、50 mg/L アンピシ

リン、25mg/L カナマイシン)を含むLuria-Bertani (LB) 培地で選抜し、*AtACS5* および *ETO1*、*EOL1*、*EOL2* コンストラクトの存在をPCRによって確認した。各コロニーをIPTG (100 μ M) および3種類の抗生物質を含むM9最少培地に移植し、2日後の生育を調査した。コントロール実験には、ACC (3mM) を加えた同じM9培地を用いた。*AtACS5*が活性を示している細菌だけがACCを添加していないM9培地で生育できる。

***ETO1*過剰発現シロイヌナズナのサイトカイニン応答性解析**

材料には、本章第1節の相補性実験において作出した *35S::ETO1* 形質転換シロイヌナズナ、または第2節の免疫共沈降実験において用いた *35S::RGS-ETO1* および *35S::HA-AtACS5* 遺伝子を導入したシロイヌナズナを用いた。これらの植物を 5 μ M のカイネチンの含む培地または含まない培地で、暗黒下、25°C、3日間発芽させ、形態の変化を観察またはエチレン合成量を測定した。エチレン合成量の測定は *in vitro* における ACS 活性測定の場合と同様に行った。

結果

in vitro の ACS アッセイ系においては、*AtACS5* が約 17 μ mol μ g⁻¹ h⁻¹ の活性を示したのに対し、これに *ETO1* を添加した場合の活性は約 9 μ mol μ g⁻¹ h⁻¹ となり、*AtACS5* の活性を約 50%阻害した。これに対して、C末端を欠失した *AtACS5* (*tAtACS5*) の活性は約 33 μ mol μ g⁻¹ h⁻¹、*ETO1* を加えた場合には約 30 μ mol μ g⁻¹ h⁻¹ であり、阻害効果は約 10%であった (図 13)。

次に、*ETO1*の*AtACS5*に対する活性阻害効果が*in vivo*でも起きるかどうかを調べるために、大腸菌内での遺伝子発現系を用いた機能的解析を行った。ACC要求性の大腸菌株JAde6に*AtACS5*遺伝子のみを導入するとM9培地上での生育能を獲得した。ところが、*AtACS5*に加えてさらに*EOL1*あるいは*EOL2*遺伝子を共発現させた場合、大腸菌の生育は著しく阻害された。*AtACS5*と*EOL1*または*EOL2*を共発現する大腸菌株は、ACCを添加した場合にのみ生育が可能であった (図12B)。大腸菌内で*ETO1*を単独で発現させると生育阻害効果を持ったため、*ETO1*の*AtACS5*への阻害効果は確認できなかった。

次に、植物体内において*ETO1*が*AtACS5*に対する活性阻害効果を持つかどうかを検証するため、*ETO1*を過剰発現するシロイヌナズナをサイトカイニン処理

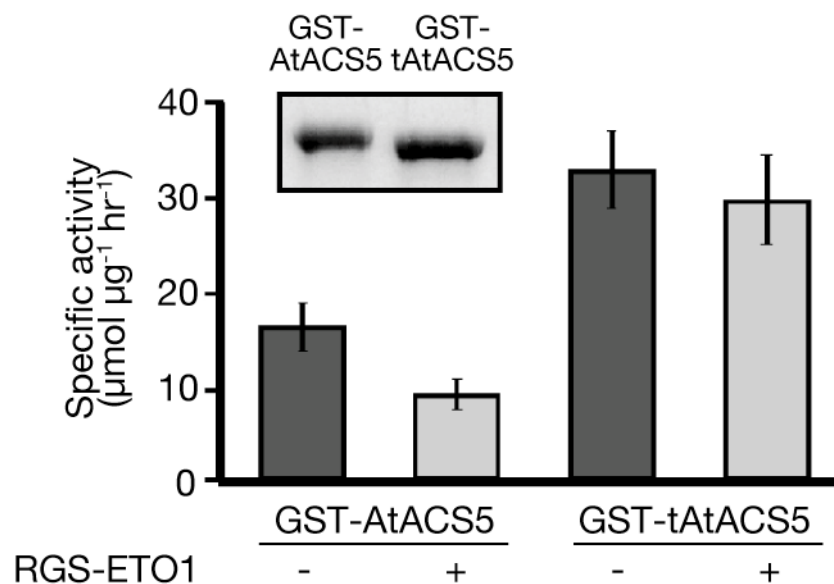


図13. *in vitro*アッセイにおいてETO1はAtACS5の活性を直接阻害する

1μgのGST-AtACS5またはGST-tAtACS5と、0.8μgのRGS-ETO1タンパク質を用いた*in vitro* ACSアッセイ。反応によって合成されたACCを化学的にエチレンに変換し、ガスクロマトグラフィーによって定量した。各サンプルにつき測定は3回ずつ行い、実験全体を2回繰り返した。はめ込み図は供試したGST-AtACS5とGST-tAtACS5の量を表す。

し、サイトカイニン誘導性エチレン合成が抑制されるかどうかを解析した。野生型シロイヌナズナの黄化苗を5 μ Mのカイネチンで処理するとエチレン合成が誘導され、三重反応を示した(図14)。また、*AtACS5*の機能欠失型変異体である*eto2-2*は、このカイネチン誘導性エチレン合成を示さなかった(Vogel *et al.*, 1998)(図14)。これに対し、35Sプロモーターによって*ETO1*遺伝子を過剰発現させた形質転換体をカイネチン処理した場合、5つの独立した35S::*ETO1*形質転換体系統の全てにおいて、カイネチン処理時のエチレン合成量および三重反応は野生型よりも減少していた(図14)。つまり、*ETO1*はカイネチンによって誘導される*AtACS5*活性を抑制することを示している。さらに、35Sプロモーターによって*AtACS5*遺伝子を過剰発現させた植物体では弱い三重反応が観察されたが、交配によってこの系統に35S::*ETO1*遺伝子を導入し、*AtACS5*と同時に*ETO1*を過剰発現させた結果、三重反応が抑制された(図15)。

考察

本研究においては、*in vitro*および*in vivo*での実験結果から*ETO1*が*AtACS5*の活性を抑制することを明らかにした。精製タンパク質を用いた*in vitro*の実験系において*ETO1*が*AtACS5*の活性を阻害すること、バクテリアでのアッセイ系においてEOL1とEOL2が同様の機能を示すことから、*ETO1*ファミリータンパク質が他の植物由来の因子を必要とせず、直接*AtACS5*の活性を阻害することが示唆された。

*in vitro*のACS活性測定系においては、*ETO1*は*AtACS5*の活性を阻害し、t*AtACS5*に対しては*ETO1*の阻害効率が減少することから、*ETO1*の阻害効果には*ETO1*と*AtACS5*との直接のタンパク質間相互作用が必要であると考えられる。また、*ETO1*非存在下においてもt*AtACS5*の活性は野生型*AtACS5*の約2倍であった。同様にいくつかのACSについて、C末端を欠失させることによって活性が上昇することが過去に報告されている。LiとMattooはトマトのLE-ACSのC末端46アミノ酸を欠失させることにより(LE-ACS2 Δ C46)、同タンパク質が二量体を形成できずに単量体となり、活性が460%に上昇すると報告している(Li and Mattoo, 1994)。もしもACSがC末端を欠失することにより、酵素自体が高活性を有するようになるとすれば、*eto2-1*においてエチレン合成量が約20倍にも上昇するのは、ACSの酵素活性上昇によるものとも考えることも可能である。しかし、この考えは以下の理由によって否定されている。TarunとTheologisは

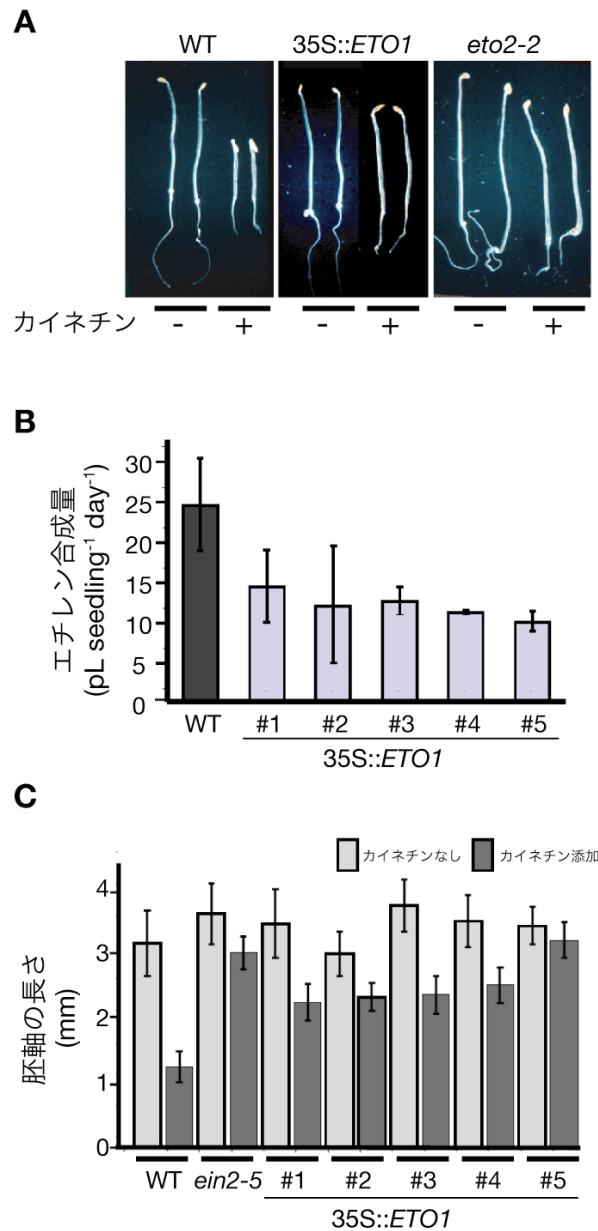


図14. *ETO1*を過剰発現する植物体ではサイトカイニン誘導性のエチレン生合成と胚軸の表現型が抑制される

A、C) カインチン添加(+)または無添加(-)の培地上で生育させた野生型(WT)、*ein2-5*および5つの独立した35S::*ETO1*形質転換系統(#1から#5)の黄化苗の胚軸長を解析した。各系統につき20〜30個体を観察した。**A)**では*eto2-2*をサイトカイニン非感受性のコントロールとして用いた。

B) カインチン存在下での35S::*ETO1*形質転換植物のエチレン合成量。

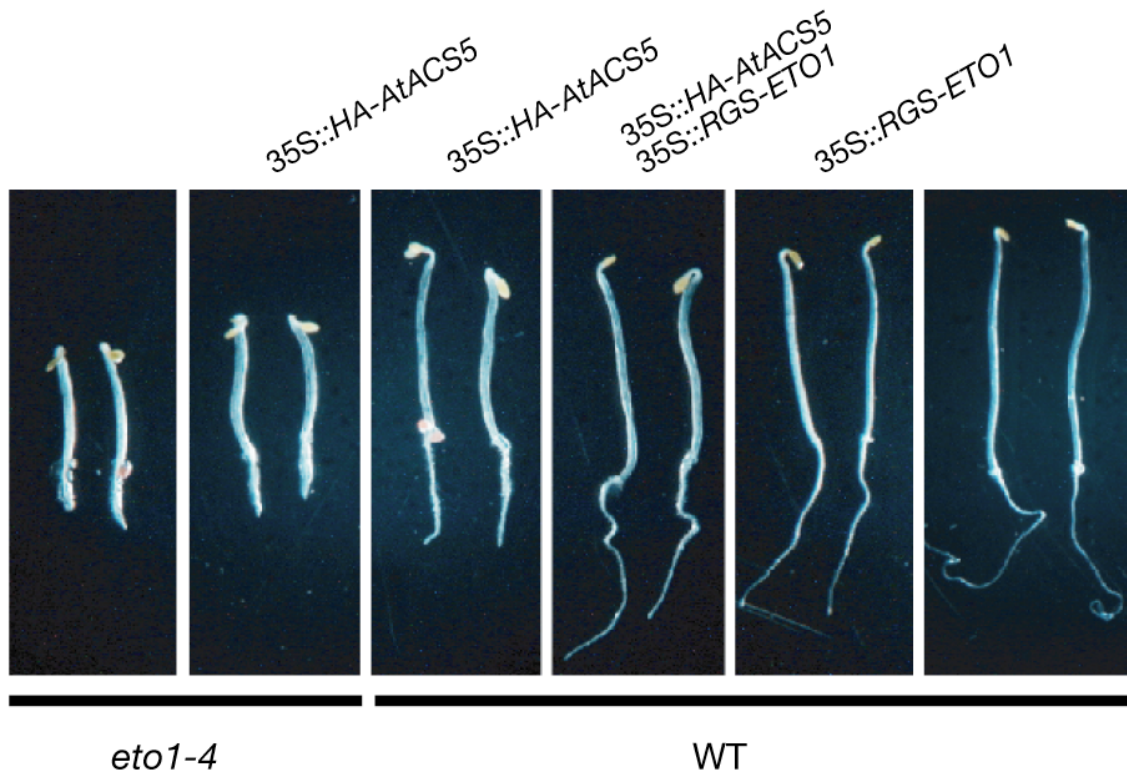


図15. *ETO1*の過剰発現は*AtACS5*過剰発現植物におけるCtr-表現型を抑制する各系統は交配により作成した兄弟系統である。エチレン非存在下の暗所で発芽3日目の表現型を比較した。

同じLE-ACS2ΔC46を用いた生化学的解析を行い、その活性は野生型の120%にまでしか上昇しないとしている(Tarun and Theologis, 1998)。彼らは、LiとMattooがACSタンパク質の定量に用いた抗体のLE-ACS2ΔC46に対する結合能が野生型LE-ACS2に比べて低かったため、結果的にLE-ACS2ΔC46の方が多くアッセイに用いられてしまい、比活性が過剰に大きく見積もられたのだらうと推論している。彼らはまた、LE-ACS2ΔC46も二量体形成が可能であることを示しており、ACSの単量体が高活性を持つという説も否定されている。一方、Chaeらは野生型のAtACS5と*eto2-1*型のAtACS5を用い、酵素活性を比較しているが、やはりC末端変異型AtACS5の活性は野生型の約120%にしか上昇しないと報告しており、TarunとTheologisの報告と一致している(Chae *et al.*, 2003)。本研究の結果においては、tAtACS5の活性は野生型AtACS5の約200%に上昇しており、やはりC末端領域の変異により活性が上昇することを示している。この結果は、LiとMattooの結果(460%)とTarunとTheologisやChaeらの結果(120%)の中間の値となっているが、これが変異の構造の微妙な違いによるものなのか、タンパク質定量時の誤差による人為的なものなのかは明らかでない。しかし、明らかに野生型のAtACS5のC末端自体がACSの活性に何らかの阻害的効果を持つことを示唆している。

大腸菌を用いた機能的解析においてはACSの微妙な活性の差までは検出できないが、本研究の結果はEOL1とEOL2がAtACS5の活性を阻害することを明確に示している。この実験では、ETO1の持つ阻害効果については明らかにできなかったが、Y2Hの系でETO1, EOL1, EOL2のすべてがAtACS5と相互作用したこと、および、*in vitro*の実験系でETO1がAtACS5に阻害効果を示したことを併せて考えると、ETO1もやはり*in vivo*においてAtACS5に対して阻害効果を持つものと推定される。

さらに、35S::ETO1シロイヌナズナにおいて、サイトカイニン誘導性のエチレン合成量が減少し、三重反応が抑制されたことから、植物体内においてもたしかにETO1がAtACS5の活性を抑制することを示している。

本研究によって、ETO1がAtACS5の酵素活性を抑制することを明らかにしたが、その詳細な機構は明らかでない。本章第2節に述べたように、ETO1がAtACS5の活性中心を覆ったり、その構造を修飾したりすることによって基質との接触を妨げ、活性を阻害するモデルAあるいは活性型であるAtACS5の2量体の形成を阻害するモデルBのいずれも、本実験の結果に当てはまる。ただし、プ

プロテアソームによるAtACS5の分解をETO1が促進するとするモデルCは、*in vitro*の酵素活性アッセイおよびJAde6を用いた結果からは支持されない。なぜなら、*in vitro*の実験系および原核生物である大腸菌のどちらにもプロテアソームが存在しないからである。しかし、植物細胞中には当然プロテアソームが存在するため、35S::ETO1シロイヌナズナを用いた結果からはモデルCを否定できない。Chaeらは*eto1*変異体においてAtACS5タンパク質の安定性が上昇し、過剰に蓄積することを報告しており、プロテアソーム系による制御を示唆している(Chae *et al.*, 2003)。先にも述べたように、上記のモデルに示したメカニズムは互いに相反し合うものではなく、植物体内においては同時に起きている可能性もある。このことを確認するためには、植物細胞内でETO1の発現を変化させ、AtACS5の動態を生化学的に解析する必要がある。また、プロテアソーム阻害剤による処理やプロテアソームの構成要素とETO1との相互作用についても解析を行うことによって、ETO1によるAtACS5の制御におけるタンパク質分解系の役割が明らかになるとと思われる。

5. ETO1によるAtACS5タンパク質の安定性制御機構の解析

ACS活性の転写後制御にタンパク質の安定性制御が関与することはすでに示唆されていたものの、その制御機構の詳細は不明であった。すでに述べたように、Chaeらは*eto1*、*eto2-1*変異体あるいはサイトカイニン処理した黄化苗においてAtACS5タンパク質が蓄積することを報告しているし(Chae *et al.*, 2003)、Liuらは細菌のエリシター的一种であるFlg22で処理したシロイヌナズナにおいて、MAPキナーゼのひとつであるMPK6が活性化され、AtACS6タンパク質のC末端をリン酸化し、リン酸化されたAtACS6タンパク質が安定化することによって、エチレン生合成が促進されることを報告している(Liu and Zhang, 2004)。AtACS5、AtACS6ともにC末端領域の関与によってタンパク質が安定化し、エチレン生合成を促進している。特にAtACS5については、Chaeらの報告および本研究で得られた結果から、ETO1の機能を介してタンパク質の安定性が制御されていることが強く示唆される。これに関連して、最近、ETO1とタンパク質の安定性制御との関連を示す興味深い報告がなされた。ETO1はN末端領域にBTBドメインを持っているが、線虫のBTBドメインタンパク質MEL-26がE3ユビキチンリガーゼの構成要素として働き、標的タンパク質であるMEI-1を分解へと

導くというものである(Furukawa *et al.*, 2003; Geyer *et al.*, 2003; Pintard *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003)。これらの報告によれば、MEL-26はN末端側にMATHドメインと呼ばれるタンパク質間相互作用ドメインを、C末端側にBTBドメインを持つ機能未知のタンパク質として知られていたが、MATHドメインを介して標的因子であるMEI-1と、BTBドメインを介してE3ユビキチンリガーゼ複合体の構成要素のひとつであるCullin3 (CUL3) と相互作用し、プロテアソームを通じてMEI-1を分解へと導く基質特異的アダプタータンパク質として機能するという。E3ユビキチンリガーゼは複合体の骨格 (scaffold) を形成するCullinタンパク質の種類によって分類されるが、BTBタンパク質は特異的にCUL3タイプと相互作用し、CUL3-BTB型のE3ユビキチンリガーゼを形成する(Thomann *et al.*, 2005)。CUL3-BTB型E3ユビキチンリガーゼはRBXタンパク質を介してE2ユビキチン結合酵素と相互作用し、BTBタンパク質によって認識された標的タンパク質をユビキチン化し、ユビキチン化された標的タンパク質は26Sプロテアソームによって分解される。AtACS5がETO1を介してユビキチン化され、分解されると考えれば、*eto1*変異体においてAtACS5タンパク質が蓄積したことが説明される。

このことを検証するため、ETO1の発現量を変化させたときにAtACS5タンパク質の蓄積量に変化するかどうか、AtACS5の蓄積量が26Sプロテアソームによって制御されているかどうか、ETO1タンパク質もシロイヌナズナのCUL3タンパク質と相互作用するかどうかを解析し、ETO1によるAtACS5のプロテアソーム依存的制御機構について考察した。

材料と方法

植物細胞内でのAtACS5タンパク質量の解析

植物体内での遺伝子発現カセットの構築は本章第2節と同様に行った。野生型および*eto1-4*の両方のバックグラウンドで、HAエピトープを融合したAtACS5または前出の*tAtACS5* (HA-AtACS5およびHA-*tAtACS5*) を35Sプロモーターによって過剰発現する形質転換体を作出した (35S::HA-AtACS5/wt、35S::HA-*tAtACS5*/wt、35S::HA-AtACS5/*eto1-4*、35S::HA-*tAtACS5*/*eto1-4*)。4つの形質転換体集団のそれぞれから、抗生物質耐性によって選抜した100個体以上のT₁の幼植物からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット解析に供試した。また、第2節と同様に懸濁培養細胞系をアグロバクテリウムによって形質

転換し、35S::HA-AtACS5あるいは35S::HA-tAtACS5と35S::RGS-ETO1を同時に一過的に過剰発現させた。抽出したタンパク質をそのままSDS-PAGE電気泳動後、メンブレンにブロッティングし、抗RGS抗体によってETO1を検出した。また、抽出したタンパク質から抗HA抗体によって免疫沈降したものをSDS-PAGE電気泳動後、メンブレンにブロッティングし、抗HA抗体によってAtACS5を検出した。同様にHA-AtACS5を一過的に発現させた懸濁培養細胞を10 μ MのMG132で処理し、AtACS5をウェスタンブロット解析によって検出した。タンパク質量はPhosphorImagerによって、転写産物量は定量的RT-PCRによって定量した。

ETO1とCUL3の相互作用の解析

組換えCUL3AおよびCUL1融合タンパク質発現用のコンストラクトは完全長cDNA (CUL3A: RAFL25-14-c10, CUL1: U09998) (Yamada *et al.*, 2003)から、Cre-loxシステムによる組換えを用いて6xHisおよびGSTタグを持つ発現ベクターにクローニングして構築し、組換えタンパク質を大腸菌内で発現させた。in vitro pull-downアッセイは第2節と同様に行った。

結果

図16に示すように、AtACS5のタンパク質量は野生型バックグラウンドの場合に比べてeto1-4バックグラウンドの場合において顕著に増加しており(レーン1と3を比較)、eto1-4変異体においてAtACS5がより安定であることを示している。AtACS5タンパク質量の値をAtACS5 mRNA量の値で割って標準化して比較すると、遺伝的背景が野生型の場合には0.05、eto1-4の場合には0.83となった。発現していたAtACS5 mRNA量は処理区間で大きな差はなかったため、明らかにeto1変異体においてAtACS5のタンパク質量が増加していると判断された。一方、野生型バックグラウンドにおいてもeto1-4バックグラウンドにおいても、tAtACS5タンパク質はAtACS5よりも多く検出され、tAtACS5がAtACS5よりも安定であることを示していた(図16; レーン1と2、3と4をそれぞれ比較)。一方、tAtACS5のタンパク質量も野生型バックグラウンド(0.72)に比べてeto1-4バックグラウンド(2.86)において約4倍増加していた(図16; レーン2と4)。

次に、ETO1をAtACS5あるいはtAtACS5と同時に植物細胞内で過剰発現させ、

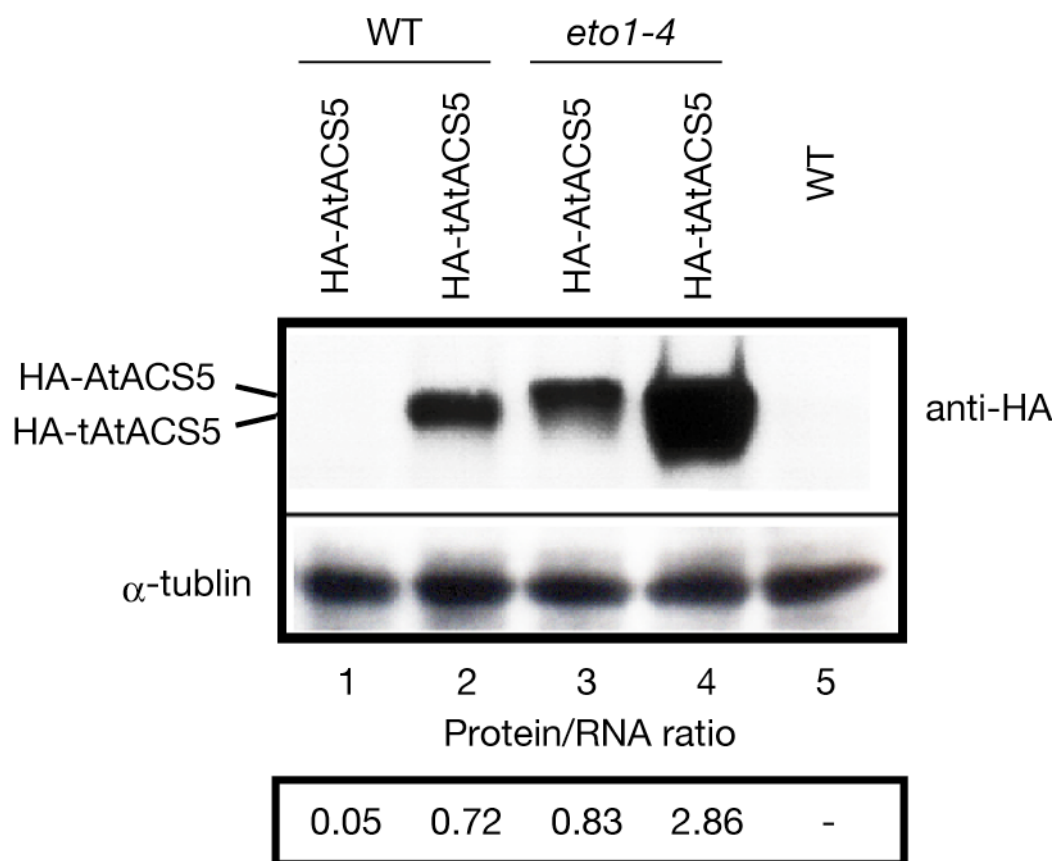


図16. *eto1-4*におけるAtACS5タンパク質の高蓄積

各グループにつき100個体以上のT₁黄化苗を用い、タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質（50mg／レーン）をSDS-PAGEで泳動し、ウェスタンブロットハイブリダイゼーションにより解析した。HAエピトープ融合AtACS5タンパク質の量を抗HA抗体でモニターした。各レーンのタンパク質およびRNAの量を α -チューブリンの発現量で標準化した後、RNAとタンパク質の比を求めてレーン間の比較を行った。

AtACS5タンパク質の安定性を低下させるかどうかについて調べた。AtACS5あるいはtAtACS5を過剰発現する植物体をETO1過剰発現体と交配することによって、ETO1およびAtACS5あるいはtAtACS5を同時に過剰発現する植物体を作出しようと試みたが、AtACS5あるいはtAtACS5を過剰発現する植物体のほとんどが激しい不稔性を示したため、交配が不可能であった。そのため、以下の実験においてはシロイヌナズナの懸濁培養細胞における一過的発現系を用いた。これまでの形質転換植物における結果と同じく、野生型の懸濁培養細胞系においてもtAtACS5はAtACS5よりも安定であった（図17；レーン1と2）。RGS-ETO1融合タンパク質を過剰発現させたとき、AtACS5とtAtACS5のタンパク質量はどちらも野生型に比べて減少した（図17；レーン1と3，レーン2と4の比較）。ETO1の過剰発現による減少はtAtACS5に比べてAtACS5の方がより顕著であった。これらの結果から、ETO1はAtACS5のC末端と相互作用し、AtACS5タンパク質の分解を促進すると考えられた。

次に、ETO1によるAtACS5タンパク質の分解促進にプロテアソーム系が関与しているかを調べるため、26Sプロテアソームの特異的阻害剤であるMG132の存在下でAtACS5を一過的に発現させ、タンパク質量の変化を観察した。MG132処理によって、AtACS5タンパク質は約14倍増加した（図18）。また、AtACS5タンパク質はMG132処理開始後45分間ですでに蓄積しており、90分後においてもさらにその量を維持していた。

次に、ETO1がE3リガーゼ複合体におけるアダプタータンパク質として機能するかどうかを調べるため、ETO1とCUL3との直接の相互作用を*in vitro* pull-downアッセイによって解析した。ETO1はAtCUL1とは相互作用しなかったのに対し、AtCUL3Aと特異的に相互作用した（図19A；レーン3と4の比較）。さらに、ETO1のN末端側（1-420アミノ酸残基）とC末端側（420-951アミノ酸残基）のどちらがAtCUL3Aと相互作用するかを調べたところ、BTBドメインを含むETO1のN末端側がAtCUL3Aと相互作用したのに対し、TPRおよびCCドメインを含むC末端側は相互作用しなかった（図19B；レーン3と4の比較）。

考察

eto1変異体においてAtACS5 mRNA量が変化せず、AtACS5タンパク質量が増加することから、ETO1がAtACS5のタンパク質の安定性を制御していることが

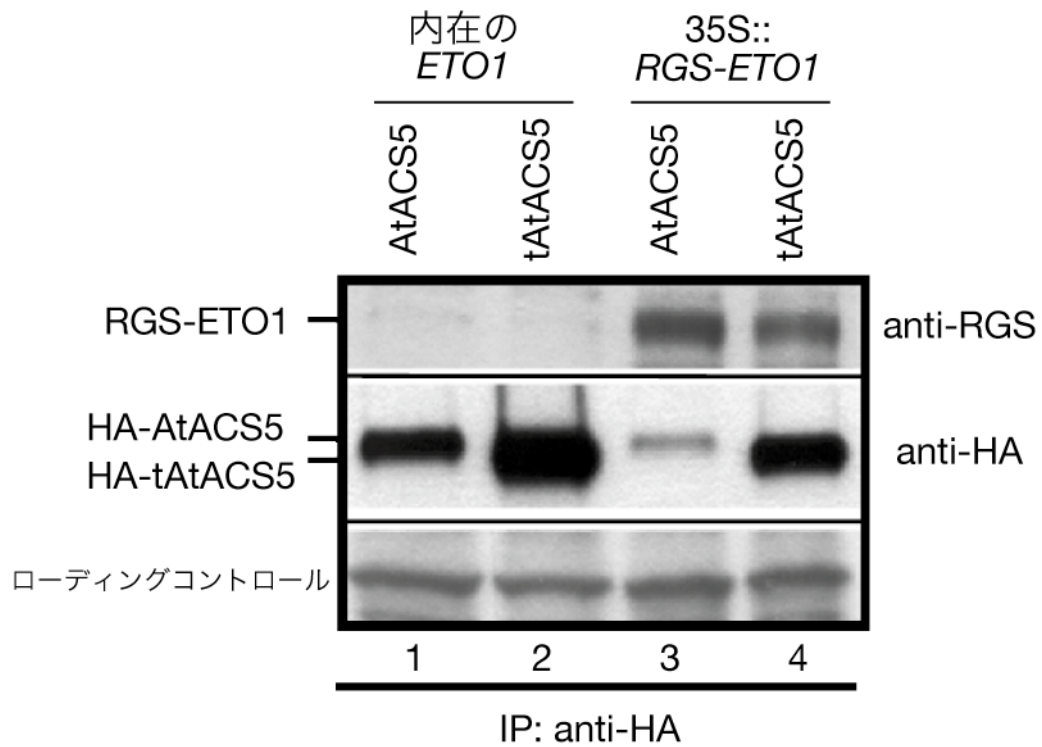


図17. ETO1の過剰発現はAtACS5の分解を促進する

35S::HA-AtACS5または35S::HA-tAtACS5を持つアグロバクテリウムを単独で（左側2レーン）または35S::RGS-ETO1を持つアグロバクテリウムとともに（右側2レーン）シロイヌナズナの懸濁培養細胞に感染させ、各遺伝子を一過的に過剰発現させた。タンパク質粗抽出物を用い、RGS-ETO1融合タンパク質を抗RGS抗体を用いて検出した（上パネル）。AtACS5とtAtACS5は、抗HA抗体で免疫沈降（IP; immunoprecipitation）させた後、同じ抗体を用いたウェスタンブロットハイブリダイゼーションで検出した（中パネル）。抗HA抗体による非特異的バンドをローディングコントロールとした（下パネル）。

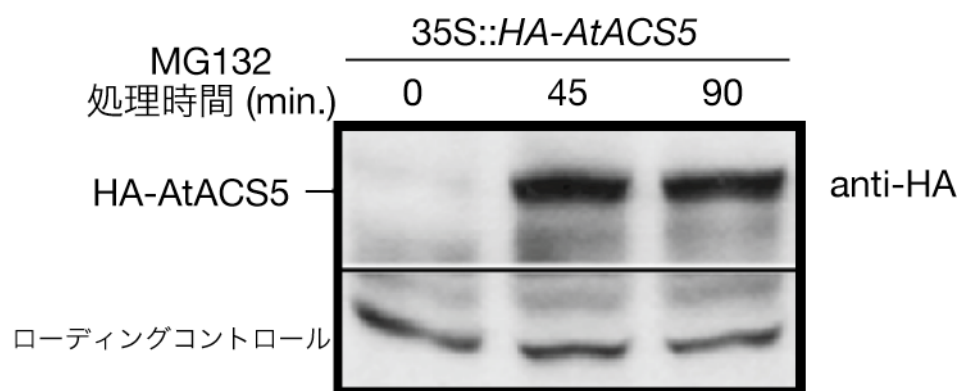


図18. プロテアソーム阻害剤MG132処理はAtACS5タンパク質を安定化させる
35S::*HA-AtACS5*を一過的に発現させた懸濁培養細胞を10 μ M MG132で処理し、
図に示した時間にタンパク質サンプルを回収した。10% SDS-PAGEで泳動後、
抗HA抗体を用いたウェスタンブロットハイブリダイゼーションを行い、
AtACS5タンパク質の量を検出した（上パネル）。抗HA抗体による非特異的バ
ンドをローディングコントロールとした（下パネル）。

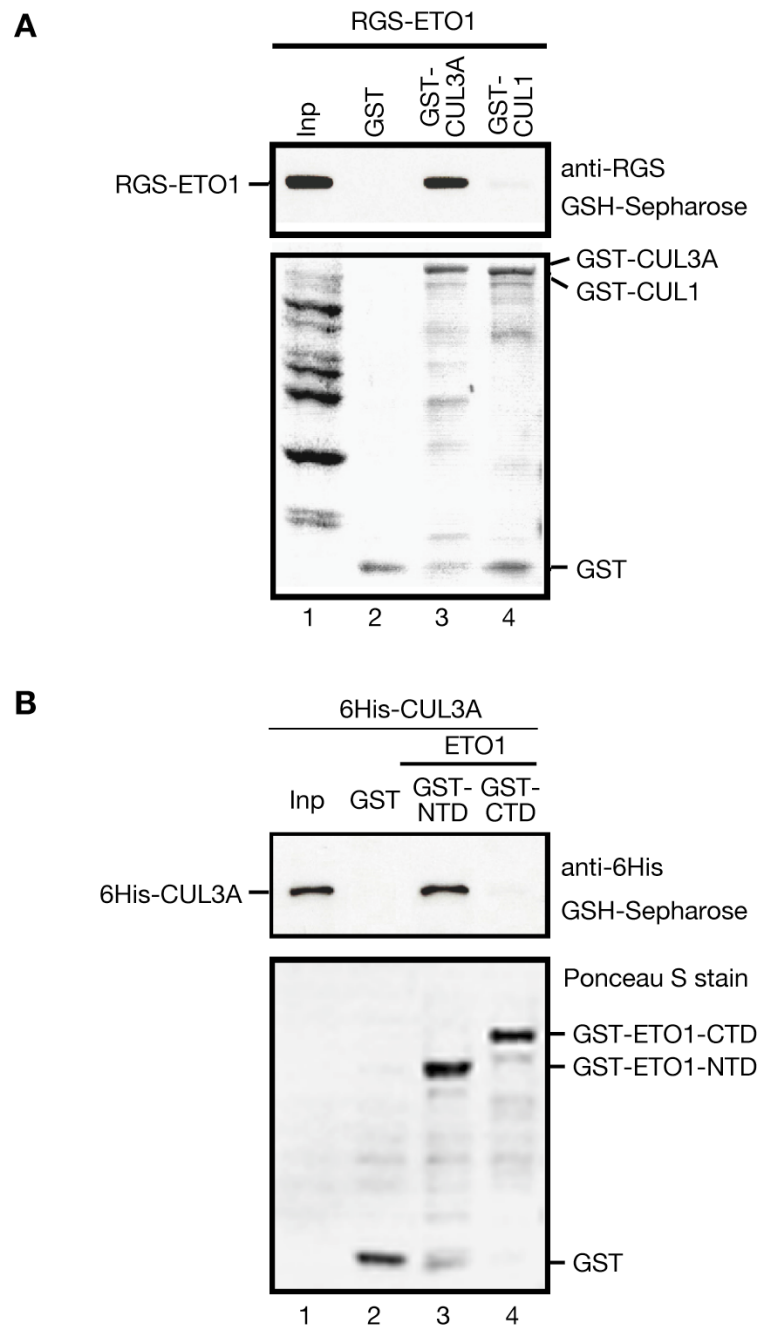


図19. ETO1はCUL3と相互作用する

A) *in vitro* pull-downアッセイにおいてCUL3AはETO1に結合するが、CUL1は結合しない。GSH; 還元グルタチオン

B) *in vitro*においてETO1のN末端側がCUL3Aと相互作用する。NTD; N末端側ドメイン、CTD; C末端側ドメイン

Inp; 供試タンパク質の30%に相当する。

下パネル; 上と同じブロットをPonceau Sで染色した。

示唆されていたが(Woeste *et al.*, 1999; Chae *et al.*, 2003)、その分子メカニズムは不明であった。本研究において、ETO1はC末端側のTPRドメインを介してAtACS5と、N末端側のBTBドメインを介してCUL3と結合することによって、AtACS5を26Sプロテアソーム系へと導く基質特異的アダプタータンパク質として機能することを示した。この結果は前節の結果と併せて、ETO1タンパク質がAtACS5の活性抑制およびプロテアソーム依存的分解という2つの機能によって、AtACS5の活性を厳重に抑制していることを示している。これらの結果をモデル化して図20にまとめた。

野生型シロイヌナズナにおいて、C末端の12アミノ酸を欠失したtAtACS5の方がAtACS5よりも安定していたとの結果は、C末端領域に変異を生じた*eto2-1*変異を模倣していると考えられる。つまり、*eto2-1*変異体においては、C末端構造の変化によりETO1タンパク質と相互作用できなくなり、活性抑制を受けなくなったAtACS5^{*eto2-1*}タンパク質が蓄積したために、ACCひいてはエチレンを過剰合成するようになったものと考えられる。一方、野生型に比べて*eto1-4*変異体においてAtACS5がより安定していたことは、*eto1*変異体においては変異型ETO1タンパク質もしくはその発現消失によってAtACS5を認識できなくなり、AtACS5が蓄積するとともに活性抑制が解除されたために、やはり過剰のACCひいては過剰のエチレンを合成するようになったことを示唆している。一方、*eto1-4*変異体におけるtAtACS5が野生型におけるtAtACS5や*eto1-4*におけるAtACS5よりも3〜4倍も多く蓄積していたという結果は興味深い。*in vitro*や酵母の系ではtAtACS5はETO1と相互作用しないのであるから、この結果は、植物体内においてはAtACS5のC末端を介したETO1との相互作用以外の因子がAtACS5の安定性を負に制御していることを示唆している。先に述べたように活性型のACSは二量体と考えられるが、TsuchisakaらはACSアイソフォーム間でヘテロ二量体が形成され、いくつかの組み合わせにおいては活性を持つことを示した(Tsuchisaka and Theologis, 2004)。このため、本実験で用いた外来性のtAtACS5が内在性のAtACS5もしくは他のアイソフォームとヘテロ二量体を形成し、ETO1に結合したために、ある程度分解されたと考えれば、野生型におけるtAtACS5の弱い分解を説明できる。あるいは、*in vitro*ではETO1とtAtACS5はほとんど結合しないものの、実際の植物細胞内では他のファクターの影響によってこれらが弱く結合するのかも知れない。一方、*eto1-4*変異体においてAtACS5が弱く分解されることは、ETO1を介さない分解経路の存在を示唆して

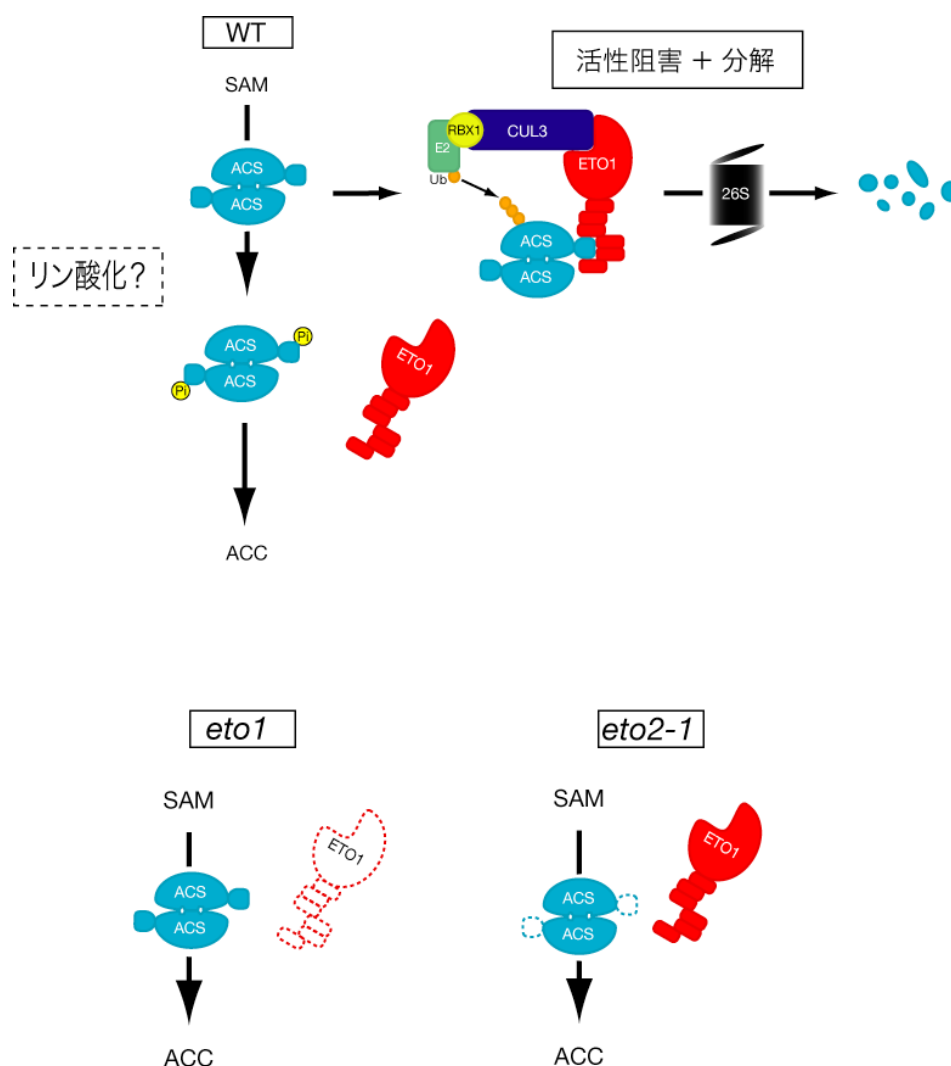


図20. ETO1によるAtACS5の制御のモデル

AtACS5 (ACS5) と ETO1 をそれぞれ水色と赤で示した。AtACS5 の C 末端は水色の小さい円形で示した。各 ACS は二量体を形成し、活性部位を共有している (二量体 1 組につき 2 ポケット)。

上パネル：ETO1 が野生型の AtACS5 二量体に結合し、その活性を阻害しプロテアソーム依存的分解系へと導く。AtACS5 の C 末端領域の未知の修飾 (リン酸化 (黄色の丸) の可能性がある) によって、AtACS5 と ETO1 との結合が阻害され、ACC 合成が起きるのかも知れない。

下パネル (左)：*eto1* 変異体においては ETO1 の機能欠失により、AtACS5 に対する制御が解除され、SAM から ACC が合成される。

下パネル (右)：*eto2-1* 変異体においては、ETO1 との結合に必要な特異的な C 末端構造を失っている AtACS5^{*eto2-1*} 二量体は ETO1 と結合できない。

いる。*eto1-4*バックグラウンドにおいてもtAtACS5の方がAtACS5よりも安定であることから、この分解経路においてもAtACS5のC末端構造が重要な役割を果たしていると考えられる。

ETO1を過剰発現させた場合にも、AtACS5の方がtAtACS5よりもより顕著にタンパク質量が減少したことから、ETO1とAtACS5とのタンパク質間相互作用が重要であることが示唆される。しかし、ETO1の過剰発現によってtAtACS5の分解も促進されていることから、植物細胞内においてはtAtACS5もETO1と弱く相互作用しているものと考えられる。

本研究においてはETO1がプロテアソームを介してAtACS5の分解を促進することを示したが、タンパク質分解系は植物の光形態形成や多くのホルモンシグナリングに関与することが示されている(Hellmann and Estelle, 2002)。シロイヌナズナの例を挙げるならば、光形態形成においてはRINGフィンガー型のE3ユビキチンリガーゼであるCOP1が転写因子であるHY5の分解を(Osterlund *et al.*, 2000)、オーキシニンシグナリングにおいてはF-boxタンパク質でありオーキシニン受容体でもあるTIR1が転写因子であるAux/IAAタンパク質群の分解を(Gray *et al.*, 2001)、ジベレリンシグナリングにおいてはF-boxタンパク質であるSLY1 (イネGID2のオルソログ) が転写リプレッサーであるGAIやRGAの分解を(Dill *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2004)、エチレンシグナリングにおいてはF-boxタンパク質であるEBF1/2が転写因子EIN3の分解を(Guo and Ecker, 2003; Potuschak *et al.*, 2003)、それぞれ促進することが知られており、このほかにも膨大な数の現象がユビキチン-プロテアソーム系によって制御されていることが明らかになってきている。

E3ユビキチンリガーゼはE2ユビキチン結合酵素および基質の両方に相互作用するプラットフォームとして機能するが、その構造からHECT型、RINGフィンガー型、SCF (SKP1-CUL1-F-box) 型、APC型など、いくつかの種類に分類されていた。また、近年、ECS (ElonginC-CUL2-SOCS-box)型、CUL3-BTB型、CUL4-DDB1型など新しいタイプのE3複合体が報告されている(Thomann *et al.*, 2005)。BTBタンパク質は、SCF型におけるSKP1とF-boxタンパク質、ECS型におけるElonginCとSOCS-boxタンパク質のキメラ様モジュールとして働き、基質とE3リガーゼの骨格をなすCUL3との相互作用を媒介する(Furukawa *et al.*, 2003; Geyer *et al.*, 2003; Pintard *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Pintard *et al.*, 2004)。植物においてはこれまでCUL3-BTB複合体は報告されておらず、

CUL3- ETO1は植物で初めて同定されたCUL3-BTB複合体である。

以上、本研究の結果は、ETO1が基質特異的アダプタータンパク質としてAtACS5をユビキチンE3リガーゼに取り込み、プロテアソーム依存的にAtACS5タンパク質の分解を促進していることを示している。ETO1ファミリータンパク質は植物に普遍的に存在するタンパク質であるため、他の植物種においても同様のメカニズムによってエチレン生合成が制御されていると推定される。一方、本研究においてはシロイヌナズナのACSファミリータンパク質のうち、AtACS5がETO1によって制御されることを示した。AtACS9はeto3変異の原因遺伝子であり、AtACS5とC末端領域においても相同性が極めて高いことから、ETO1ファミリータンパク質によって制御される可能性が高いが、その他のACSアイソフォームとETO1ファミリーとの関連は今後の解析によって明らかにする必要がある。EOL1、EOL2などのETO1ホモログの植物における機能についても、今後明らかにする必要があるだろう。

Ⅲ. トマトにおける ETO1 ファミリータンパク質の機能解析

エチレンは植物のさまざまな生理現象の制御に関わることが知られているが、中でもエチレンによるトマト (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 果実の成熟促進は、もっともよく知られた例である。トマトはクリマクテリック型果実に分類され、果実が十分に大きくなった後に呼吸の激しい増加および爆発的なエチレン合成が起き、これが引き金となって軟化をはじめとする成熟が促進される。トマト果実においては、まず成熟開始前にエチレン生合成が増加し (システム 1 エチレン)、呼吸が増加する。それに続いて、さらにエチレンの増加が起き (システム 2 エチレン)、軟化や着色などの成熟が進む。成熟の進行に伴い、エチレンは自己触媒的に増加し、成熟は加速度的に進むことになる。トマトは少なくとも 10 個の *ACS* 遺伝子と 4 個の *ACO* 遺伝子を持つが、トマト果実の成熟におけるエチレン生合成系遺伝子の重要性は *LE-ACS2*(Oeller *et al.*, 1991)、*LE-ACS4*(Nagata *et al.*, 1995)、*LE-ACO1*(Hamilton *et al.*, 1990)などのアンチセンス遺伝子を発現させたトマトで果実の成熟遅延が起きることによって明らかにされている。*ACS* 遺伝子群については、システム 1 のエチレン生合成は *LE-ACS1A* や *LE-ACS6*によって、システム 2 のエチレン生合成は、*LE-ACS4* および *LE-ACS2*の 2 つの *ACS* の活性によって引き起こされると考えられている(Nakatsuka *et al.*, 1998; Barry *et al.*, 2000)。このうち、*LE-ACS4*は成熟時の果実特異的に発現するのに対し、*LE-ACS2*は傷害によって誘導されることが知られているため(Lincoln *et al.*, 1993)、果実成熟時の軟化によって誘導される可能性も示唆されている。エチレンは果実の成熟以外にも、葉の上偏生長(Fujino *et al.*, 1988)、根の生長(Clark *et al.*, 1999)、病原菌感染やエリシターへの応答(Oetiker *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 2006)、冠水ストレス応答(Olson *et al.*, 1995; Shiu *et al.*, 1998)、オーキシン応答(Olson *et al.*, 1991)など、トマトのさまざまな現象に関与している。

前章において、シロイヌナズナの ETO1 ファミリータンパク質がエチレン生合成を抑制することを明らかにした。ETO1 ファミリータンパク質は植物に固有の保存性の高いタンパク質であることから、多くの植物において ETO1 ファ

ミリータンパク質が ACS ファミリータンパク質との相互作用を介してエチレン生合成を抑制していることが示唆されるが、その詳細は明らかでない。そこで本章においては、エチレンに関する研究蓄積の多いトマトを材料として、トマトのエチレン生合成における ETO1 ファミリータンパク質の役割を明らかにするため、実験を行った。

1. yeast two-hybrid 法による ETO1 とトマト ACS ファミリーの相互作用の解析

ETO1 に相同性を示す配列（オルソログ）はトマトを含む多くの植物種に見出すことができる。これらのオルソログは、ACS との特異的な相互作用に関与する TPR ドメインにおいて特に ETO1 と高い相同性を示すため、ACS との相互作用を介してエチレン生合成を抑制することが示唆される。実際、前章で述べたように、シロイヌナズナにおける ETO1 パラログである EOL1 および EOL2 も TPR ドメインにおいて ETO1 と高い相同性を示し、酵母細胞中で AtACS5 と相互作用し、大腸菌内で ACS 活性を阻害した。そこでまず、yeast two-hybrid (Y2H)法によって ETO1 とトマトの ACS との間の相互作用を解析した。LE-ACS2 および LE-ACS4 はともに果実の成熟過程で主要アイソフォームとして働くのに対し、LE-ACS3 はオーキシンおよび冠水ストレスによって誘導されるアイソフォームとして知られている(Yip *et al.*, 1992; Olson *et al.*, 1995; Nakatsuka *et al.*, 1998; Barry *et al.*, 2000)。

一方、ETO1 との相互作用に関与すると考えられる ACS の C 末端領域は多様性に富んだ領域として知られているため、この領域のアミノ酸配列の詳細な解析を行い、ETO1 との相互作用に関する考察を行った。

材料と方法

yeast two-hybrid 解析

yeast two-hybrid 解析は前章で述べた方法によって行った。SuperScriptII (インビトロジェン社) および *Pfu*Turbo DNA Polymerase (ストラタジーン社) を用いた RT-PCR によって増幅した *LE-ACS2*、*LE-ACS3*、*LE-ACS4* cDNA は pACT2-1 ベクターに、また pcETO1.9 プラスミドより調整した *ETO1* cDNA は pAS2 ベクターにクローニングした。*LE-ACS2* および *LE-ACS3* の欠失あるいはキメラ遺伝子は *Pfu*Turbo DNA Polymerase を用いた PCR によって構築した。

定量的 β -ガラクトシダーゼ活性測定は市販の測定キット (BD Biosciences 社) を用いて行った。各実験は独立したクローンを用いて、少なくとも 3 回行った。

アミノ酸配列の解析

トマトおよびシロイヌナズナの既知の ACS のボックス 7 以後の C 末端領域のアミノ酸配列を用い、CLUSTALW プログラムによってアライメントを作成した。アライメントの描画は、MacBoxShade プログラムによって行った。

結果

ETO1 とトマトの ACS を用いた Y2H 解析において、 β -ガラクトシダーゼ・レポーター遺伝子の活性を指標とした場合、LE-ACS3 は AtACS5 に匹敵する強い相互作用を示したが、LE-ACS2 および LE-ACS4 はともに ETO1 との相互作用を示さなかった。(図 21)。この結果は、ETO1 がその基質である ACS のアイソフォームとの結合において基質特異性を持っていることを示唆している。

そこで、Y2H 解析に用いた LE-ACS2、LE-ACS3、LE-ACS4 を含むトマトおよびシロイヌナズナの様々な ACS アイソフォームについて、ETO1 の標的である C 末端領域のアミノ酸配列を比較した。ACS は、酵素活性を持つ中央の領域 (ボックス 1ーボックス 7 と呼ばれる) においては高度にアミノ酸配列が保存されているが、N 末端および C 末端に関しては保存性が低く、特に C 末端領域に関しては最も保存性の低い領域であると言われていた (Kende, 1993; Zarembinski and Theologis, 1994)。しかし、様々な ACS アイソフォームの C 末端配列を比較した結果、この保存性の低い領域内にも一つの小さな共通するモチーフが存在することが分かった。すなわち、「RLSF」(あるいは「(F/L)RLS(F/L)」) (Oetiker *et al.*, 1997; Tatsuki and Mori, 2001; Chae *et al.*, 2003; Yamagami *et al.*, 2003)モチーフである。これまで、ACS の活性部位のうち、ブロック 4 およびブロック 6 と呼ばれる領域をコードする塩基配列の比較による ACS の分類が報告されている (Oetiker *et al.*, 1997)。また、ACS 全長のアミノ酸配列に基づいた系統樹も構築されている (Liu and Zhang, 2004; Tsuchisaka and Theologis, 2004)。これらの分類とは別に、上記の C 末端のコンセンサス・モチーフを基準として、ACS を次の 3 つのタイプに分類した (図 22)。なお、AtACS3 は偽遺伝子であり、AtACS10 と AtACS12 は ACS ではなくアミノトランスフェラーゼであることが明らかにされているため、これらの

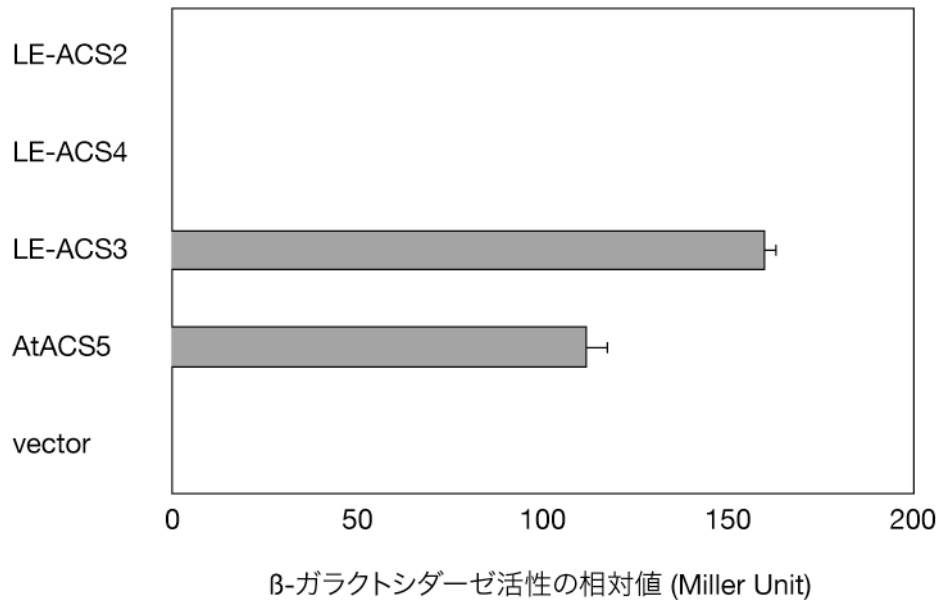


図21. yeast two-hybridシステムにおいてシロイヌナズナのETO1はLE-ACS3と相互作用するが、LE-ACS2やLE-ACS4とは相互作用しない

シロイヌナズナのETO1をpAS2ベクターに、トマトのACS（LE-ACS2、LE-ACS3、LE-ACS4）をpACT2ベクターにクローニングし、yeast two-hybridアッセイによって相互作用を解析した。シロイヌナズナのAtACS5をETO1と強く相互作用するポジティブコントロールとして用いた。pACT2の空ベクターをネガティブコントロールとして用いた。各組み合わせにつき、独立した3クローンを解析し、平均±標準誤差（ $n = 3$ ）を示した。

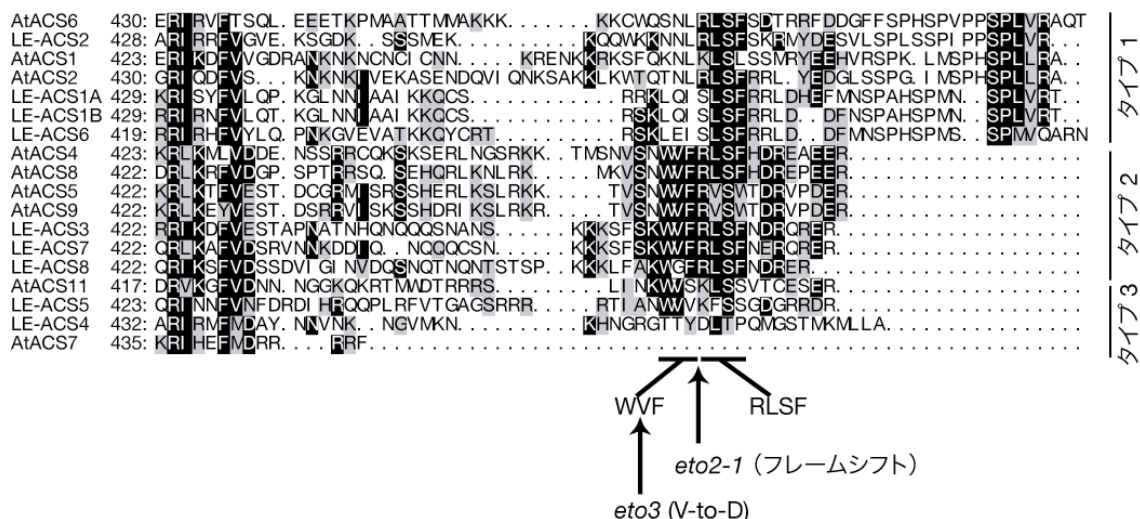


図22. C末端構造の比較によるトマトとシロイヌナズナのACSの分類

C末端のアミノ酸配列をCLUSTALWプログラムにより比較し、相同性によってACSを3つの独立したタイプに分類した。シロイヌナズナの9個のACS (AtACS1、AtACS2、AtACS4、AtACS5、AtACS6、AtACS7、AtACS8、AtACS9、AtACS11の9個。AtACS3はpseudo geneであり、AtACS10とAtACS12はアミノトランスフェラーゼであるため、用いていない) とトマトの9個のACS (LE-ACS1A、LE-ACS1B、LE-ACS2、LE-ACS3、LE-ACS4、LE-ACS5、LE-ACS6、LE-ACS7、LE-ACS8) を比較した。同一および類似のアミノ酸をそれぞれ黒とグレーのボックスで強調した。WVF、RLSFの各モチーフとeto2-1とeto3の変異箇所を示した。

アイソフォームは解析に含めていない(Yamagami *et al.*, 2003)。

タイプ1 : 「RLSF」モチーフの後に 23〜27 アミノ酸の長いテールを持つタイプ (AtACS2 や LE-ACS2 など)。

タイプ2 : 「RLSF」モチーフの直前に「WVF」というコンセンサス配列を、「RLSF」の後にアルギニン (R) と酸性アミノ酸 (アスパラギン酸 (D) およびグルタミン酸 (E)) に富んだ短いテール (R/D/E リッチ領域) を持ち、「ER」コンセンサス配列で終わるタイプ (AtACS5 や LE-ACS3 など)。

タイプ3 : 「RLSF」モチーフを持たないタイプ (AtACS7 や LE-ACS4 など)。

の3つのタイプである。なお、Oeticker らが各グループを「クラス」と表現して分類したのに対し、今後、本論文においては混乱を避けるため、上記の分類を「タイプ」と表記することにする。

CLASTALW プログラムを用いた場合、AtACS6 の RLSF 配列は N 末端側に 2 アミノ酸ずれてしまったが、AtACS6 は明らかに RLSF およびそれに続く長いアミノ酸のテールをもっているため、達観により AtACS6 をタイプ1に分類した。AtACS11、LE-ACS4 および LE-ACS5 の場合、C 末端のテールの長さはタイプ2 ACS とほぼ同等だが、RLSF モチーフおよび R/D/E リッチ領域を持たないため、極端に短い C 末端領域を持つ AtACS7 とともにタイプ3に分類した。興味深いことに ETO1 と強い相互作用を示す AtACS5 および LE-ACS3 はともにタイプ2に属するのに対し、LE-ACS2 はタイプ1に、LE-ACS4 はタイプ3に属する。AtACS5 の C 末端は ETO1 の標的であるので、上記の分類と併せ、タイプ2 ACS の C 末端が ETO1 との結合に必要な特異的な配列を含んでいる可能性が示唆される。

タイプ2 ACS の一つの特徴は RLSF モチーフの後のテールの長さである。タイプ1 ACS はタイプ2 ACS よりも長い RLSF 後のテールを持ち、タイプ3 ACS は RLSF を欠き、より短いテールを持つ。さらに、ACS の C 末端は *in vivo* においてプロテアーゼによる消化を受けると考えられていた(Li and Mattoo, 1994)。一方、Tatsuki らは、タイプ1 ACS である LE-ACS2 の C 末端の縮合は *in vivo* においては起こらないと報告しているが(Tatsuki and Mori, 2001)、タイ

プ1に属する他のACSがC末端の縮合を受け、「最適の」長さのテール（タイプ2ACSと同等の長さ）を持つようになり、その結果、ETO1ファミリータンパク質と相互作用できるようになる可能性も棄却できない。そこで、RLSFの後のC末端テールの長さがETO1との相互作用に及ぼす効果を検討した。C末端を欠失した2種類の変異型 *LE-ACS2* cDNA をY2H用のpACT2ベクターにin frameにクローニングした。LE-ACS2Δ16はC末端の16アミノ酸を欠失したLE-ACS2であり、RLSFモチーフの後にタイプ2ACSと同等の長さのテールを持っている。もう一つの変異体、LE-ACS2Δ28はRLSFの1アミノ酸前までの合計28アミノ酸を欠失している（図23）。もしもRLSFモチーフがETO1との相互作用に必要であり、なおかつRLSF以後のテールの長さがETO1との相互作用能を決定しているとすれば、LE-ACS2Δ16はETO1と相互作用するのに対し、LE-ACS2Δ28は相互作用しないと予想される。しかし、Y2H解析の結果、LE-ACS2Δ16およびLE-ACS2Δ28はいずれもETO1と相互作用しなかった（図23）。この結果は、ACSのC末端におけるRLSFモチーフ後のテールの長さはETO1との相互作用能の決定因子ではなく、タイプ2ACSには他の何らかの決定因子が存在することを示唆している。

そこで次に、タイプ2ACSに特徴的なアミノ酸配列がETO1との相互作用に関与するかどうかを解析した。先に述べたようにタイプ2ACSは他のタイプのACSには見られない特徴的なコンセンサス配列、つまり「WVF」、「RLSF」の両モチーフおよび、それに続くR/D/E領域を持っている。RLSFがタイプ1とタイプ2に共通して存在するのに対して、WVFはトマトとシロイヌナズナにおいてはタイプ2ACSにのみ保存されている（図22）。興味深いことに、*eto2-1*と同様に優性のエチレン過剰合成変異を持つ*eto3*変異体では、やはりタイプ2に属するAtACS9のWVFモチーフ中のバリニン残基(V)がアスパラギン酸(D)に置換されており、このモチーフがETO1との相互作用に必要であることが示唆される(Chae *et al.*, 2003)。そこで、LE-ACS2のC末端の31アミノ酸の領域をLE-ACS3の第456から第469アミノ酸までの14アミノ酸で置換し、WVFモチーフ以降を含むように改変し(LE-ACS2ΔC31-ACS3₄₅₆₋₄₆₉)、pACT2にクローニングした。Y2H解析の結果、この変異体はLE-ACS3と同等の強度でETO1と相互作用した（図23）。

以上の結果から、タイプ2ACSに特異的なWVFモチーフから始まるC末端のテールがETO1との相互作用に必要であることが明らかになった。

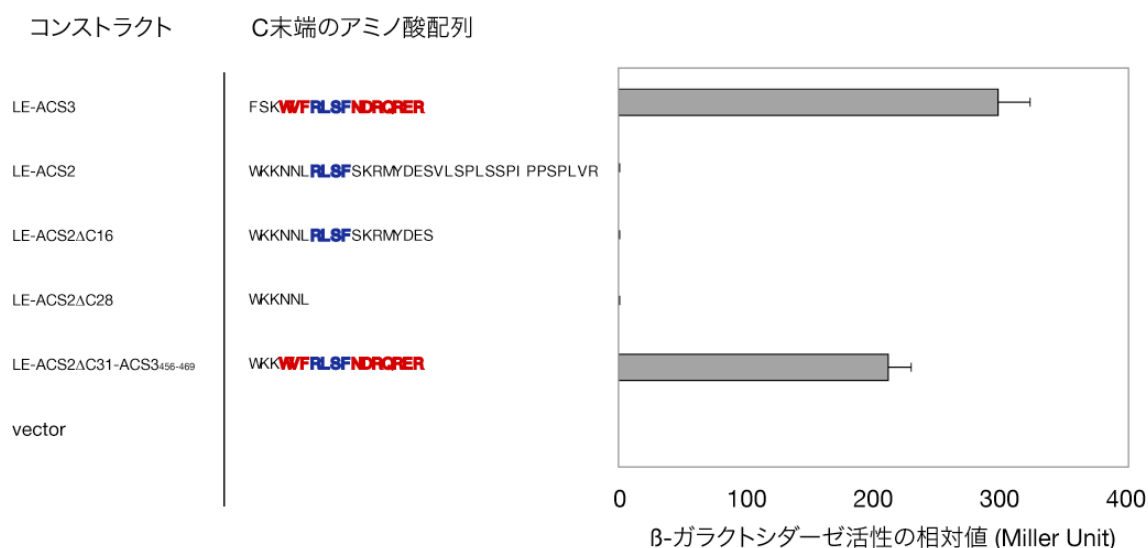


図 23. yeast two-hybrid システムにおいてタイプ 2 ACS 特異的な C 末端アミノ酸配列が ETO1 との相互作用に必要である

C 末端を欠失または LE-ACS3 の C 末端と交換した変異型 LE-ACS2 を yeast two-hybrid アッセイによって解析した。ETO1 を pAS2 ベクターに、各変異型 ACS を pACT2 ベクターにそれぞれクローニングし、酵母に導入した。導入した各 ACS の C 末端アミノ酸配列をグラフの左に示した。LE-ACS3 に由来する WVF モチーフおよび R/D/E リッチ領域を赤で、LE-ACS2 と LE-ACS3 に共通する RLSF モチーフを青で示した。pACT2 の空ベクターをネガティブコントロールとして用いた。各組み合わせにつき、3 個の独立したクローンを用いて解析し、平均±標準誤差 ($n = 3$) を示した。

考察

前章においては植物特異的なBTB-TPRタンパク質であるETO1がシロイヌナズナのエチレン生合成系酵素のひとつAtACS5を直接の相互作用によって制御することを示した。しかし、ETO1との相互作用およびその制御はAtACS5あるいはそれと極めて相同性の高いパラログやオルソログに限定されるのか、それともその効果は植物のすべてのACSファミリータンパク質に及ぶのかは不明であった。本研究においては、C末端のアミノ酸配列をもとにACSを3つのタイプに分類し、ETO1と相互作用するACSはタイプ2アイソフォームに属するものに限定されることを明らかにした。Oetikerらが「クラスⅠ」と分類したすべてのトマトのACSアイソフォーム (LE-ACS1A, LE-ACS1B, LE-ACS6) は本研究の「タイプ1」に相当し、また、彼らが「クラスⅡ」 (LE-ACS2 and LE-ACS4) および「クラスⅢ」 (LE-ACS3 and LE-ACS5) と分類したものの中には本研究の「タイプ2」だけでなく、「タイプ1」および「タイプ3」のものが含まれていた(Oetiker *et al.*, 1997)。この違いはおそらくOetikerらがACS遺伝子の保存性の高い領域の部分塩基配列をもとに分類を行ったのに対して、本研究ではC末端領域のアミノ酸配列をもとに分類を行ったことによるものと考えられる。一方、やはりアミノ酸配列をもとに分類を行ったTsuchisakaらの結果(Tsuchisaka and Theologis, 2004)と比較すると、本研究の「タイプ2」は彼らが「グループB」と分類したうちの2つの密接に関連したクレードに相当し、「タイプ3」は「グループB」中の上記のクレード以外に属するアイソフォームに相当する。また、本研究の「タイプ1」は彼らの「グループA」に相当し、本研究とほぼ一致する分類結果となっている。これは各タイプのACSアイソフォームの機能的な関係を反映しているものであるかも知れない。実際、Tsuchisakaらは密接に関連しているACSアイソフォーム間では活性のあるヘテロ二量体が形成されることを示しており、この分類がACSの機能を反映するものであることを支持している(Tsuchisaka and Theologis, 2004)。

植物の生育、ストレス応答、果実の成熟などの調節においてエチレンの生合成を制御する内生因子についてはほとんど知られていなかった。ホモロジーサーチの結果、トマトには少なくともひとつのETO1オルソログが存在すると考えられることと、一連のACSファミリータンパク質およびエチレンに関連した表現型が存在することから、本研究においては、Y2Hを用いてシロイヌナズナのETO1がトマトのACSと相互作用するかどうかを解析した。Y2Hにおいては、

ETO1はシロイヌナズナのAtACS5やトマトのLE-ACS3などのタイプ2 ACSとは相互作用したが、タイプ1のLE-ACS2やタイプ3のLE-ACS4とは相互作用しなかった。

このことから、ETO1はタイプ2 ACSとだけ特異的に相互作用し、その活性を抑制していることが示唆される。このことを明らかにするため、ETO1を過剰発現する形質転換トマトを作出し、エチレンに関連する表現型を詳細に解析する必要がある。

本研究において、タイプ2 ACSに特異的なC末端配列(WVF、RLSFからなるコンセンサスアミノ酸配列とそれに続くR/D/E-リッチ領域)がETO1の標的であることを示した。また、*eto2-1*においてはAtACS5のRLSFからR/D/E-リッチ領域に至る配列が、*eto3*においてはAtACS9のWVFモチーフが変異していたことから、この領域のアミノ酸配列が重要であることが強く示唆される。一方、末端のTPRモチーフだけを欠失した*eto1-1*アリルが、他のアリルと同等の表現型の強さを示すこと、C末端のTPRモチーフをひとつだけ欠失させたETO1 (tETO1) がY2HにおいてAtACS5と相互作用しなかったことから、ETO1のTPR構造がAtACS5との相互作用に必須であると考えられる。TPRモチーフはさまざまなタンパク質間相互作用に関与するが、一般的にTPRドメインと標的タンパク質との相互作用は静電的相互作用 (electrostatic interaction) と疎水的相互作用 (hydrophobic interaction) の双方によって厳密に制御されている。ヒトの熱ショックタンパク質Hsp70とHsp90はともにTPRタンパク質であるHop (Hsp70 and Hsp90 organizing protein) と相互作用し、HopのTPRドメインとの相互作用にはHsp70とHsp90のC末端の荷電性コンセンサス配列「EEVD」とその上流に位置する疎水性アミノ酸残基が必要である(Scheufler *et al.*, 2000)。タイプ2 特異的なACSのC末端領域は、やはり荷電性アミノ酸であるR/D/Eに富んだ領域と、疎水性アミノ酸からなるWVFモチーフを有しており、ETO1のTPRモチーフと厳密に相互作用するために必要な条件を備えていると言える。*eto2-1*においてはフレームシフト変異によって荷電性のR/D/E-リッチ領域が失われ、ETO1のTPRドメインと相互作用できなくなったものと考えられる。また、*eto3*においてはWVFの疎水性のバリン残基(V)が荷電性のアスパラギン酸(D)に変異したため、やはりETO1と相互作用できなくなったものと考えられる。

LE-ACS2の結晶構造によれば、LE-ACS2のC末端領域はACSの単量体あるいは二量体の表面から突出しているようである(Huai *et al.*, 2001)。互いにhead-to-tailに位置したLE-ACS2二量体においてはN末端の11から19番目のアミノ酸残基がC末端のテールの直前に位置するヘリックスH14と接触しているという。このN末端とC末端の相互作用の重要性は明らかでないが、生化学的研究によって、二量体構造の安定性と活性の維持に重要かも知れないとの報告もある(Li and Mattoo, 1994)。ETO1-ACS複合体の構造解析により、個々のモチーフの重要性が明らかになると考えられる。また、タイプ2 ACSとして分類したLE-ACS8はコンセンサスに一致するWVF配列を持っておらず、代わりにWGFと言う配列を持つ(図22)。eto3変異型のAtACS9(WDF)と異なり、LE-ACS8は荷電を持たない中性アミノ酸であるグリシン(G)をWとFの間に持っている。このため、LE-ACS8においてはETO1との相互作用が失われはしないものの、疎水性相互作用が弱くなっている可能性がある。LE-ACS8の生理的役割は明らかになっていないが、C末端領域のこのような変異が植物細胞内での酵素活性の強さに影響しているのかも知れない。

2. トマトの *ETO1* ホモログ *LeEOL1* の解析

前節の Y2H 解析において ETO1 はシロイヌナズナの AtACS5 およびトマトの LE-ACS3 などと特異的に相互作用したことから、ETO1 はタイプ2 ACS と特異的に相互作用することを示した。データベースサーチによって他の植物種からも ETO1 オルソログが見出され、これらのオルソログはタイプ2 ACS と相互作用する TPR ドメインにおいて高い相同性を示すことから、すべての ETO1 ファミリータンパク質がタイプ2 ACS と特異的に相互作用することが示唆される。

本節においては、ETO1 ファミリータンパク質とタイプ2 ACS との相互作用の特異性が他の植物種においても保存されているかを明らかにするため、トマトの *ETO1* オルソログを単離し、発現解析、Y2H 解析などによってタイプ2 ACS との相互作用やトマトにおける生理的機能について考察を行った。

材料と方法

cDNAクローニング

5'-および3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) PCR反応のため、SMART RACE cDNA Amplification kit (クロンテック社) を用いてファーストストランドcDNAを合成した。得られた一本鎖cDNAをHerculase DNAポリメラーゼ (ストラタジーン社) によって二本鎖に変換し、pCR2.1 TOPOベクター (インビトロジェン社) にクローニングした。反応には、EST (expressed sequence tag) をもとに設計した以下のプライマーを用いた。

LEO1aL-f (5'-GGGAAGAGCTTGATGAAGCTGAGCTTC-3')

LEO1bL-r (5'-GCGAGCTCTCTTGGTACATCCATCCA-3')

LEO2aL-f (5'-GGCAGTGTGTATGTCGACTGCGGTAAAT-3')

LEO2bL-r (5'-GTACACGAGCAAGACCTTGGTGAGCCC-3').

RT-PCR解析

50ngのトータルRNAを鋳型とし、Titan one-tube RT-PCR system (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を用いたRT-PCRによって、遺伝子発現解析を行った。*LeEOL1* (トマト*ETO1*オルソログ) および*LeGAPDH* (アクセッションNo. U97257 ; トマト・グリセルアルデヒド3-ホスファターゼ デヒドロゲナーゼのひとつ) の転写レベルを解析するため、それぞれ以下のプライマーを用いた。

LEO1-3'UTR-f (5'-GTTATGGGTGCATTGCGAGA-3')

LEO1-3'UTR-r (5'-GAGATGCTTGTGGCATCCAA-3')

LeGAPDH-f (5'-ACCACTGTCCACGCCATGAC-3')

LeGAPDH-r (5'-TCAATCACACGGGAAGTGTGTA-3')

*LeEOL1*および*LeGAPDH*特異的なプライマーセットの両者を同一のチューブに添加し、マルチプレックスPCRを下記の条件で行った。

逆転写反応 : 50°C、30分

予熱 : 94°C、2分

第1ラウンド (10サイクル) : 変性 (94°C、30秒) + アニーリング (55°C、30秒) + 伸長 (68°C、45秒)

第2ラウンド (18サイクル) : 変性 (94°C、30秒) + アニーリング (55°C、30秒) + 伸長 (68°C、45秒+5秒/サイクル)

最終伸長反応 : 68°C、7分

yeast two-hybrid解析

RT-PCRによって、トータルRNAから *LeEOL1*、*LE-ACS2*、*LE-ACS3*、*LE-ACS4*、*AtACS5* の cDNA コーディング領域を増幅した。*LE-ACS1A* と *LE-ACS6* はベクターにクローニングされた cDNA (名古屋大学・森仁志教授より分譲) から PCR によって増幅した。cDNA の増幅は、遺伝子特異的プライマーと *PfuTurbo* DNA ポリメラーゼ (ストラタジーン社) を用いて行った。*LeEOL1* は pAS2-1 ベクターに、*ACS* 遺伝子は pACT2 にそれぞれクローニングした。これらのベクターを分裂酵母 Y190 株に導入し、Y2H 解析を行った。β-ガラクトシダーゼ活性はクロンテック社のマニュアル (Yeast Protocols Handbook) に従って行った。各実験は、独立したクローンを用い、少なくとも 4 回繰り返した。

結果

(1) *LeEOL1* の cDNA クローニングと構造解析

トマトにおける ETO1 ファミリータンパク質の機能を解析するため、トマトの *ETO1* ホモログ遺伝子の cDNA クローニングを行った。GenBank データベースに対する TBLASTN によってトマトの *ETO1* ホモログを検索したところ、4 つの EST (expressed sequence tag) が検出された。これらをもとに 2 つのコンティグが構築できたので、それぞれに対応する PCR プライマーセットをデザインし、5'-および 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) PCR 法によっていくつかの cDNA をクローニングした。これらの cDNA の塩基配列を決定した結果、全てのクローンが約 3,700bp にわたる 1 つのコンティグに対応することが明らかになったため、この遺伝子を *LeEOL1* (*Lycopersicon esculentum* *ETO1-LIKE 1*) と名付けた。*LeEOL1* のクローニング後もデータベースが随時更新されているため、GenBank のサーチによって *LeEOL1* に相同性を示す EST をさらに 14 個見出した。そのうちの 10 個は *LeEOL1* の部分配列であり、さらにそのうちの 3 個は *LeEOL1* の選択的スプライシングによって形成されたものと考えられた。しかし、残りの 4 個の EST は *LeEOL1* の一部とは考えられず、トマトゲノム上には *LeEOL1* 以外にも *ETO1* オルソログが存在すると考えられた。*LeEOL1* の最長の ORF (open reading frame) は 886 アミノ酸からなるタンパク質をコードし、その分子量は約 101kDa と予測された。cDNA 配列から予測された *LeEOL1* タンパク質はシロイヌナズナの ETO1、EOL1、EOL2 およびゲノムや EST の配列から予測されるイネとタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) の ETO1 オルソログ、OsEOL1/2/3、MtEOL1/2 と高い相同性を

示した(図 24)。シロイヌナズナの ETO1 ファミリータンパク質の中では、EOL1 が LeEOL1 と最も高い相同性(アミノ酸レベルで 61%の同一性(identity)および 80%の類似性(similarity))を示した。ETO1 や他の EOL と同様に、LeEOL1 も N 末端側に BTB ドメインを、C 末端側に 6 つの TPR モチーフおよび 1 つの CC モチーフを持っていた(図 24)。シロイヌナズナの *eto1-1* 変異体においては第 6 TPR だけが欠失することによって完全に ETO1 の機能が失われ、この TPR を欠失させた変異型 ETO1 は Y2H 解析において AtACS5 との相互作用能を失うが、LeEOL1 においても TPR ドメインの構造が保存されていることは、ETO1 ファミリータンパク質が C 末端側に 6 つの TPR と 1 つの CC を持つことがその機能にとって必須であることをさらに強く支持している。また、シロイヌナズナの *eto1-5* アリルにおいては第 1 TPR 中のフェニルアラニン残基がイソロイシン残基に置換することによって ETO1 の機能が失われるが、LeEOL1 においてもこの位置にやはりフェニルアラニン残基が保存されている(図 24)。このフェニルアラニンはシロイヌナズナの EOL1/2、イネの OsEOL1/2/3、タルウマゴヤシの MtEOL1/2 においても保存されており、おそらくは ETO1 ファミリータンパク質が他のタンパク質と相互作用するために必要な構造を維持する役割を持っているため、ETO1 ファミリーにとって必須なのではないかと推測される。また、LeEOL1 の N 末端には ETO1 や EOL タンパク質と同様に BTB ドメインが存在するため、E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成因子のひとつである CUL3 と相互作用して機能することが示唆される。BTB ドメインよりも上流の N 末端領域は ETO1 ファミリータンパク質全体に渡って多様性が高かった。しかし、LeEOL1 はタンパク質全体に渡ってシロイヌナズナ、イネ、タルウマゴヤシの ETO1 ファミリータンパク質と相同性を示しており、トマトのエチレン生合成制御に関わっていることが強く示唆された。

(2) 様々な組織および果実の成熟過程における *LeEOL1* の発現の解析

トマトの生育過程における *LeEOL1* の役割を探るため、様々な組織における *LeEOL1* の転写量を RT-PCR によって解析した。新鮮な葉、老化葉、茎、根および花において *LeEOL1* の発現が検出されたが、蕾においては発現レベルが極めて低かった(図 25)。果実の成育過程においては、*LeEOL1* は「full-ripe」ステージの果実において発現していた(図 25)。一方、「immature green」、「mature green」、「turning」、「pink」、「red」の各ステージにおいては *LeEOL1* の発現

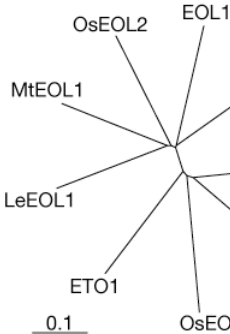
[illegible]

図24. LeEOL1の系統学的解析

- A)** LeEOL1とETO1 (AY572791)、EOL1 (AY572792)、EOL2 (AY572793)、OsEOL1 (AC137072)、OsEOL2 (AP003826)、OsEOL3 (AC104847)のアライメント。アミノ酸配列より予測されるBTB、TPR、CCの各モチーフをそれぞれ破線、実線、一点鎖線のボックスで示した。アライメントはCLUSTALWプログラムを用いて作成し、MacBoxShadeプログラムで描画した。同一および類似のアミノ酸をそれぞれ黒、グレーのボックスで強調した。矢印はすべてのETO1ファミリータンパク質のTPR1で保存されているが*eto1-5*アリルで変異しているフェニルアラニン残基を示す。
- B)** ETO1ファミリータンパク質の系統樹。パネルAで示したものの他に、ESTから予測されるタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) のETO1ファミリータンパク質MtEOL1 (AC139748)、MtEOL2 (AC146554)を加えてCLUSTALWにより系統樹を作成した。

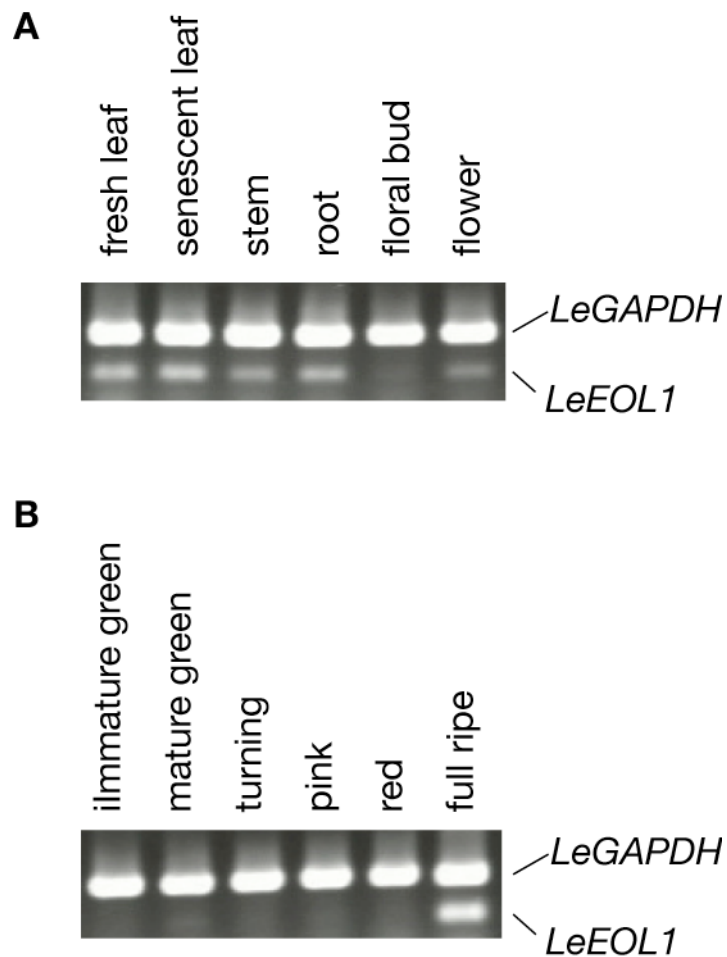


図25. RT-PCRによる*LeEOL1*遺伝子の発現解析

さまざまな組織 (A) またはさまざまなステージの果実 (B) から抽出した 50ng のトータル RNA を用いてマルチプレックス RT-PCR を行い、*LeEOL1* と *LeGAPDH* 遺伝子の発現量を解析した。*LeGAPDH* は内部コントロールとして用いた

が検出されなかった。他のステージがエチレン合成量の急速に増加していく時期であるのに対し、「full-ripe」ステージはクリマクテリックなエチレン生合成量が急速に低下していく時期である。*LeEOL1* の発現が成熟前〜中期にかけて抑制され、後期に増加することから、*LeEOL1* がトマト果実の成熟時におけるエチレン生合成の制御に関わっている可能性が示唆された。

(3) *LeEOL1* とトマトの ACS との相互作用の解析

トマトのエチレン生合成制御における *LeEOL1* の役割をさらに理解するため、*LeEOL1* といくつかのトマトの ACS アイソフォーム (*LE-ACS1A*、*LE-ACS2*、*LE-ACS3*、*LE-ACS4*、*LE-ACS6*) との間で yeast two-hybrid 解析を行った。*LE-ACS1A*、*LE-ACS2*、*LE-ACS6* はタイプ 1、*LE-ACS3* とコントロールとして用いた *AtACS5* はタイプ 2、*LE-ACS4* はタイプ 3 の ACS である。解析したトマトの ACS の中で *LE-ACS3* だけが *LeEOL1* と強い相互作用を示した。シロイヌナズナの *AtACS5* もまた、*LE-ACS3* と同レベルの強い相互作用を示した (図 26A)。この結果は、前節でシロイヌナズナの *ETO1* とトマトの ACS との間で行った Y2H の結果と一致するものであった。これらの結果は、*ETO1* ファミリータンパク質と ACS との相互作用の特異性がトマトにおいても保存されていることを示唆している。

(4) *LeEOL1* とトマトの変異型 ACS との相互作用の解析

さらに、このタンパク質間相互作用に必須なアミノ酸配列を同定するため、各種の変異型 *LE-ACS* タンパク質と *LeEOL1* の相互作用について Y2H によって解析した。*ETO1* との相互作用を解析するために用いた、2 種類の C 末端欠失型変異タンパク質 (*LE-ACS2ΔC16* および *LE-ACS2ΔC28*) および、*LE-ACS2* の C 末端の 31 アミノ酸を *LE-ACS3* の C 末端 14 アミノ酸に置換したキメラタンパク質 (*LE-ACS2ΔC31-ACS3₄₅₆₋₄₆₉*) と *LeEOL1* との相互作用を解析した。さらに、WVF モチーフがこの相互作用に必要であるかどうかを明らかにするために、*LE-ACS2* の C 末端の 24 アミノ酸を *LE-ACS3* の C 末端 7 アミノ酸に置換した第 2 のキメラタンパク質 (*LE-ACS2ΔC24-ACS3₄₆₃₋₄₆₉*) についても解析した (図 26B)。これらの変異型 ACS タンパク質のうち、*LE-ACS2ΔC31-ACS3₄₅₆₋₄₆₉* のみが *LE-ACS3* と同等の強い相互作用を示した。これに対して、*LE-ACS2Δ16*、*LE-ACS2Δ28*、*LE-ACS2ΔC24-ACS3₄₆₃₋₄₆₉*

A

コンストラクト

C末端のアミノ酸配列

LE-ACS1A (type 1)

RRKLQI **SLSF**RRLLDHEFMNSPAHSPMNSPLVRT

LE-ACS2 (type 1)

WKNNL **RLSF**SKRMYDESVLSPLSSPIPPSPLVR

LE-ACS3 (type 2)

FSK**WFRLSF****NDRQ**ER

LE-ACS4 (type 3)

MGSTMKMLLA

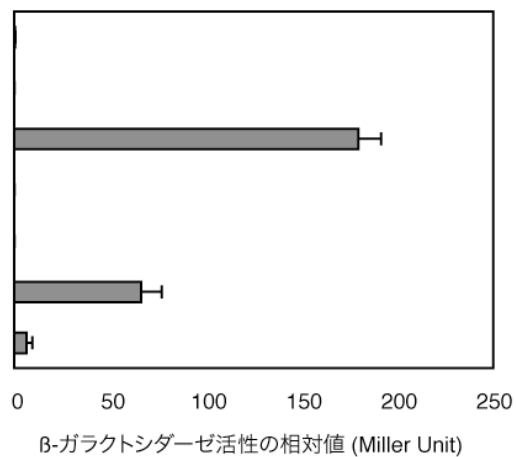
LE-ACS6 (type 1)

RSKLEI **SLSF**RRLLDDFMNSPHSPMSPPMQARN

AtACS5 (type 2)

VSN**WFRVSW****DRVP**DER

vector



B

コンストラクト

C末端のアミノ酸配列

LE-ACS3

FSK**WFRLSF****NDRQ**ER

LE-ACS2

WKNNL **RLSF**SKRMYDESVLSPLSSPIPPSPLVR

LE-ACS2ΔC16

WKNNL **RLSF**SKRMYDES

LE-ACS2ΔC28

WKNNL

LE-ACS2ΔC24-ACS3₄₆₃₋₄₆₉

WKNNL **RLSF****NDRQ**ER

LE-ACS2ΔC31-ACS3₄₅₆₋₄₆₉

WKK**WFRLSF****NDRQ**ER

vector

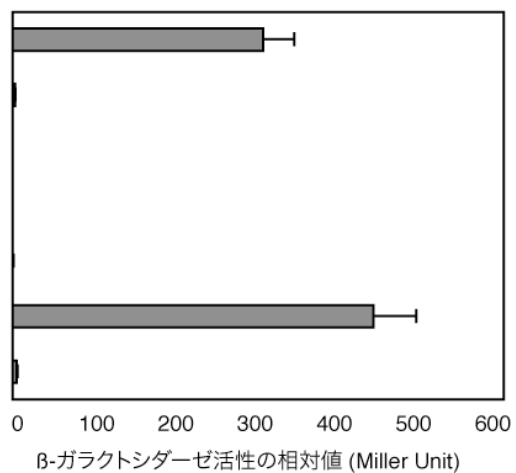


図26. yeast two-hybridシステムにおけるLeEOL1とタイプ2 ACSとの相互作用

- A)** LeEOL1とトマトのACSとの相互作用。pAS2ベクターにクローニングしたLeEOL1とpACT2ベクターにクローニングしたトマトのACS (LE-ACS1A、LE-ACS2、LE-ACS3、LE-ACS4、LEACS6) の相互作用をyeast two-hybridアッセイにより解析した。シロイヌナズナのAtACS5とLeEOL1との相互作用も同時に解析した。各ACSのタイプ（タイプ1，2または3）を括弧の中に、各アイソフォームのC末端アミノ酸配列をグラフの左に示した。
- B)** タイプ2 ACSのC末端のWVFモチーフはLeEOL1との相互作用に必要である。yeast two-hybridによる、C末端を欠失またはLE-ACS3のC末端と交換した変異型LE-ACS2とLeEOL1との相互作用の解析。*LeEOL1* cDNAはpAS2ベクターに、各変異型ACSのcDNAはpACT2ベクターにクローニングした。各変異型ACSのC末端アミノ酸配列をグラフの左に示した。LE-ACS2とLE-ACS3に共通するRLSFモチーフを青で、タイプ2 ACS特異的配列であるWVFモチーフとR/D/Eリッチ領域をそれぞれ赤と緑で示した。

両実験とも、pACT2の空ベクターをネガティブコントロールとして用い、各組み合わせにつき4個の独立したクローンを解析した。標準誤差 ($n = 4$) をエラーバーで示した。

はLeEOL1と相互作用しなかった。2つの欠失型LE-ACS2がどちらもLeEOL1と相互作用しなかったことは、LE-ACS2のC末端の欠失によってはLeEOL1との相互作用は生じないことを示している。また、上記の2つのキメラ型タンパク質の違いはWVFモチーフの有無であることから、これらの結果は、WVF、RLSF、R/D/E-リッチ領域によって構成されるタイプ2 ACS 特異的なC末端領域がLeEOL1との相互作用に必要であることを明確に示している。この領域はETO1ファミリータンパク質の標的部位と考えられるので、タイプ2 ACSのC末端14アミノ酸をTOE (target of ETO1) 配列と呼ぶことにした。

考察

本研究においては、トマトのETO1オルソログであるLeEOL1を単離し、発現パターンおよびACSファミリータンパク質との相互作用について解析した。LeEOL1はシロイヌナズナおよびイネのETO1ファミリータンパク質に共通するすべての構造的特徴、すなわちN末端側のBTBおよびC末端側のTPR/CCドメインを有していた。ETO1様の遺伝子群は植物固有の小遺伝子ファミリーを形成しており、双子葉植物（シロイヌナズナ、トマト、バレイショ、トウガラシ、ダイズ、タルウマゴヤシ、ワタ、レタス、テンサイ、サツマイモ、ヒマワリ、カンキツ、モモ、ブドウ、カキ、アーモンド、ポプラなど）だけでなく、単子葉植物（イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、ソルガムなど）やシダ植物（リチャードミズワラビ）からも相同配列を見出すことができる。興味深いことに*eto1-5*アレルで変異を起こしている1番目のTPR中のフェニルアラニン残基(F⁴⁰³)はすべてのETO1ホモログで進化的に保存されているため、F⁴⁰³残基はETO1ファミリータンパク質の機能にとって必須であることが示唆される。バルキー (bulky) なフェニルアラニン（またはチロシン）残基は、TPRモチーフ中の α -ヘリックス間や隣接するTPRモチーフ間に形成される疎水性の「穴」にぴったりと当てはまる「ノブ」を形成し、TPRドメインの構造を維持するのに必要である(Goebl and Yanagida, 1991; Das *et al.*, 1998; Scheufler *et al.*, 2000)。バルキーなフェニルアラニンが疎水性のイソロイシンに置換された*eto1-5*アレルが他のナンセンス変異アレルと同等の強い表現型を示すことから、F⁴⁰³がETO1ファミリータンパク質の構造維持に関わっていることが示唆される。

本研究によって、ETO1ファミリータンパク質の構造と機能が植物界で高度

に保存されていることが明らかになったが、このことはまた、これらのタンパク質がすべての植物種において *ETO1* と同じように、保存されたメカニズムを通して機能することを示唆している。*BTB*、*TPR*、*CC* の各ドメイン内の構造が高く保存されていることから、*ETO1* ファミリータンパク質は *TPR/CC* ドメインによってタイプ 2 *ACS* を認識し、*BTB* ドメインと *CUL3* との相互作用を介してプロテアソーム依存的に機能するものと考えられる。*LeEOL1* もタイプ 2 *ACS* と特異的に相互作用すること、*LeEOL1* が *ETO1* よりも *EOL1* と高い相同性を示すことから、この相互作用のパターンは *EOL1/2* や *OsEOL1/2/3* を含むすべての *ETO1* ファミリーに共通するものと考えられる。このことから、*ETO1* ファミリータンパク質の機能的冗長性 (redundancy) が示唆される。

また、本研究において *RLSF* モチーフおよび *R/D/E*-リッチ領域だけでは *ETO1* ファミリーと相互作用するのに十分ではなく、*WVF* モチーフの存在が必須であることが示された。この結果は、疎水性の *WVF* モチーフと荷電性の *R/D/E*-リッチ領域の存在が *TPR* ドメインとの相互作用に必須であるという仮説を支持している。両者の間に位置している *RLSF* モチーフはこの相互作用のオン・オフの調節に必要なのかも知れない。

データベースサーチによって、シロイヌナズナの *ETO1* と類似性を示すトマトの *EST* は 18 個見出されたが、そのうちのいくつかは *LeEOL1* の部分配列ではなかったため、トマトゲノム中に *LeEOL1* 以外の *ETO1* オルソログが存在することが示唆される。また、3 つの *EST* (*cLEW25B20*、*LC02BB10*、*LC03BB10*) はおそらく *LeEOL1* のオルタナティブ・スプライシングによって生じたものと考えられる。これらの転写産物は 5'側の約 300bp を欠き、そのため、本来の *LeEOL1* の N 末端側 100 アミノ酸を欠失したタンパク質をコードすることになっている。非欠失型の *LeEOL1* はシロイヌナズナの *EOL1* と高い相同性を持ち、*EST* も欠失型に対応するものよりも非欠失型に対応するものの方が多く見られる。しかし、たとえ N 末端の 100 アミノ酸を欠失してもこのタンパク質はやはり *ETO1* ファミリーに特徴的なすべてのモチーフ、つまり *BTB*、*TPR*、*CC* をすべて持っており、タイプ 2 *ACS* を抑制するための機能を完全に保持していると考えられる。このオルタナティブ・スプライシングの意義を理解するためには、組換えタンパク質等を用いた詳細な解析が必要であろう。

成熟中の果実を除いて、*LeEOL1* の発現パターンはこのタンパク質がトマトのすべての生育段階において機能していることを示唆している。マイクロアレ

イ解析によれば、シロイヌナズナの *ETO1*、*EOL1*、*EOL2* の発現パターンもまた構成的であると言われ (Guzman and Ecker、未発表)、*LeEOL1* の結果と一致している。定常状態においては常に発現している *ETO1* ファミリータンパク質がタイプ 2 ACS を抑制し続けており、エチレンが必要になったときにリン酸化などによって ACS の抑制を解除していることが想定される。果実の成熟過程で *LeEOL1* の発現量が低下し、「full-ripe」ステージにおいて増大することは、成熟中期までに *LeEOL1* による ACS の抑制を積極的に解除している可能性や、成熟後期に *LE-ACS3* (Nakatsuka *et al.*, 1998) の活性を積極的に抑制している可能性を示唆している。他のタイプ 2 ACS (*LE-ACS7*、*LE-ACS8*、あるいはさらに他のアイソフォーム) や未知の標的タンパク質が *LeEOL1* によって制御されている可能性も考えられる。新鮮な葉と老化葉とでは *LeEOL1* の転写産物の量に顕著な差は見られなかったため、*LeEOL1* の転写制御は葉の老化の制御において重要な役割を果たしていないものと考えられる。

3. *ETO1* 過剰発現トマトの解析

前節までに、*ETO1* ファミリータンパク質がトマトにおいてもタイプ 2 ACS とだけ特異的に相互作用することを Y2H 法によって示したが、植物体内においてもタイプ 2 ACS だけが特異的に *ETO1* ファミリータンパク質によって抑制されるかどうかは不明である。*ETO1* ファミリータンパク質をトマトで過剰発現させ、個別の ACS によって制御される形質について解析することによって、植物体内における *ETO1* ファミリータンパク質の機能を解析することが可能と考えられる。もしもトマトの植物体内において、*ETO1* ファミリータンパク質が特定のタイプの ACS を抑制しているのであれば、*ETO1* 過剰発現トマトにおいては、その ACS によって制御されている形質が抑制されることが期待される。

そこで本研究においては、シロイヌナズナの *ETO1* 遺伝子を過剰発現するトマトを作出し、主にタイプ 1 およびタイプ 3 の ACS (それぞれ *LE-ACS2* と *LE-ACS4*) によって制御される果実の成熟、およびタイプ 2 の ACS (*LE-ACS3*) によって制御されるオーキシン誘導性のエチレン生合成の変化について解析を行い、*ETO1* ファミリータンパク質のトマト植物体内での機能に関して考察した。

材料と方法

供試植物および生育条件

遺伝子発現解析および形質転換には、トマト品種「秋玉」(*Lycopersicon esculentum* Mill.)を用いた。植物体は北陸研究センターおよび北海道研究センターの通常温室あるいは隔離温室において植木鉢(24cm 径)に植え、通常条件で栽培した。

トマトの形質転換

完全長の *ETO1* cDNA を pROK2 ベクター(Baulcombe *et al.*, 1989) (選抜マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子 (*NPT II*) を持つ) のカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターおよびアグロバクテリウムノパリン合成酵素遺伝子 (NOS) ターミネーターの間にセンス方向に連結した。このベクターをアグロバクテリウム LBA4404 株に導入し、以下の形質転換実験に用いた。

1/2xMurashige & Skoog (MS) 最少培地で発芽させたトマト幼植物の胚軸あるいは子葉を 1mg/L ナフタレン酢酸 (NAA)、0.5mg/L ベンジルアミノプリン (BA)、3% ショ糖を含む MS 培地で前培養し、アグロバクテリウム法(Nagata *et al.*, 1995)によって形質転換を行った。形質転換植物はカナマイシン選抜の後、35Sプロモーターと *ETO1* cDNA に特異的なプライマーを用いた PCR によって確認した。

DNA および RNA の解析

ゲノミックDNAはIsoplant II (ニッポンジーン社)を用いて抽出した。トータルRNAはRNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社)を用いて抽出した。*ETO1* 遺伝子の発現レベルはトータルRNAを鋳型としたRT-PCRまたはノーザンハイブリダイゼーションによって解析した。RT-PCRはTitan One Tube RT-PCR System (ロシュ社)を用い、1μgのトータルRNAを鋳型とし、*ETO1* 遺伝子特異的プライマーを用いて行った。内部コントロールとしてグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *LeGAPDH*) 遺伝子を用いた。*ETO1* および *LeGAPDH* 特異的なプライマーセットの両者を同一のチューブに添加し、マルチプレックスPCRを下記の条件で行った。

逆転写反応：50℃、30分

予熱：94℃、2分

第1ラウンド（10サイクル）：変性（94℃、30秒）＋アニーリング（55℃、30秒）＋伸長（68℃、45秒）

第2ラウンド（18サイクル）：変性（94℃、30秒）＋アニーリング（55℃、30秒）＋伸長（68℃、45秒＋5秒/サイクル）

最終伸長反応：68℃、7分

ノーザン解析においては、1レーンあたり10μgのトータルRNAを泳動し、ポジティブチャージのナイロンメンブレン（ロシュ・ダイアグノスティック社）に転写した。ジゴキシゲニン（DIG）でラベルした*LE-ACS3*プローブをインビトロ転写反応（ロシュ・ダイアグノスティック社製キットを使用）によって作成し、CDP-Star（ロシュ・ダイアグノスティック社）でシグナルを検出した。

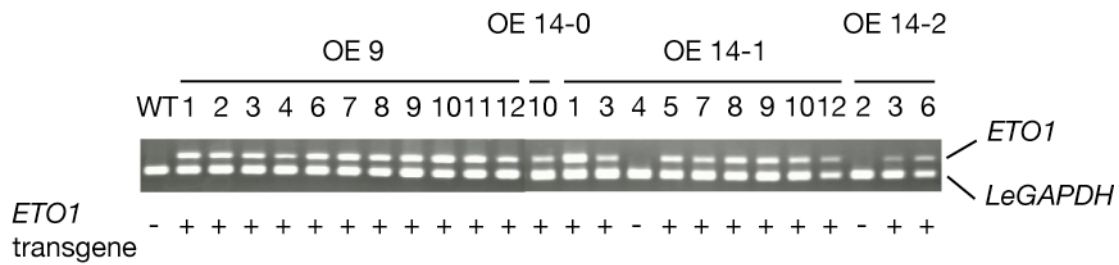
エチレン生合成の測定

T₂世代の35S::*ETO1*遺伝子のホモ系統（14-1-H2）あるいは35S::*ETO1*遺伝子を持たない兄弟系統（14-1-H4）を1gの海砂（和光純薬、20-35メッシュ）と0.5mlの水を含むバイアル瓶（直径10mm、長さ75mm、ゴムキャップ付き）に1バイアル瓶あたり1個体播種し、28℃暗黒下で発芽、生育させた。播種後6日目に2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）を終濃度100μMになるように添加し、さらに生育させた。翌日、蓄積したエチレン量を活性アルミナカラム（60/80メッシュ、3mm x 1.5m）およびFIDを装着したガスクロマトグラフィー（SHIMADZU、モデルGC7A）で測定した。各処理につき、独立した8個体を用い、エチレン生合成量は1個体、1時間あたりの容積（単位：pL）として算出した。

結果

シロイヌナズナの *ETO1* 遺伝子を CaMV 35S プロモーターに連結し、アグロバクテリウム法によってトマトに導入した。カナマイシン耐性によって形質転換体を選抜し、T₁分離世代において、PCR によって *ETO1* 遺伝子の導入を確認した。解析した 24 個体中、22 個体で *ETO1* 遺伝子の導入が確認された（図 27A）。また、これらの系統について、*ETO1* 遺伝子の発現を RT-PCR によって確認したところ、解析した 24 個体中、遺伝子の導入された 22 個体すべてで *ETO1* 遺

A



B

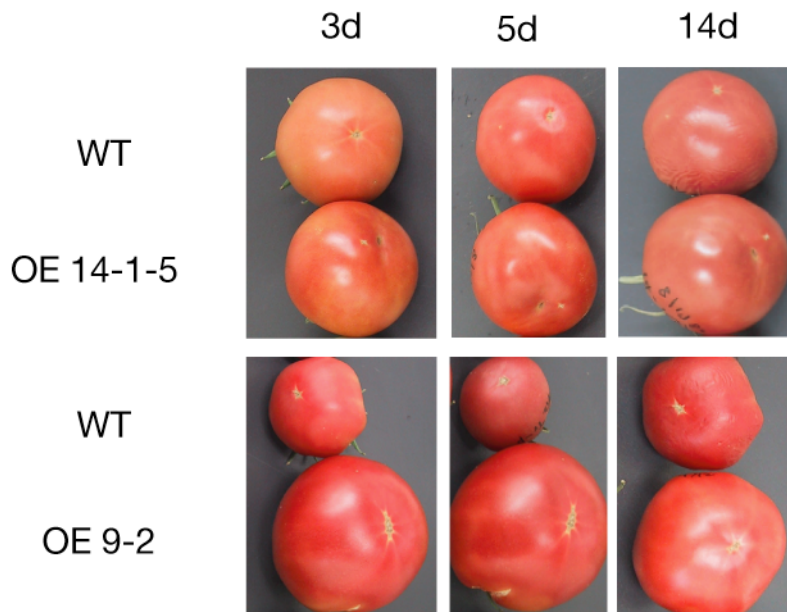


図27. *ETO1*過剰発現トマトでは果実の成熟は変化しない

- A)** T_1 世代個体の葉における *ETO1* 遺伝子の発現を RT-PCR で解析した。
LeGAPDH を内部コントロールとして用いた。各反応につき、 $1\mu\text{g}$ のトータル RNA を用いた。WT ; 野生型 (品種 : 秋玉)、OE9、OE14-0、OE14-1、OE14-2 ; T_0 世代の系統番号。写真の上の番号は各 T_0 系統に由来する T_1 分離世代の個体番号。導入した *ETO1* 遺伝子の各個体における有無を PCR によって確認し、写真の下に + / - で示した。
- B)** *ETO1* 過剰発現トマトの 2 つのライン (#14-1-5 と #9-2) および野生型 (WT) における果実成熟の様子。果実は「breaker」ステージで収穫し、成熟させた。

伝子が発現していた（図 27A）。以下、これらの系統を *ETO1*-OE (*ETO1*-overexpressor) と呼ぶ。

ETO1 と *LE-ACS2* および *LE-ACS4* との植物体内での相互作用について明らかにするため、これら 22 個体の T₁ 世代の *ETO1*-OE を栽培し、果実の成熟過程を解析した。全ての個体において野生型と同じ経過で果実の成熟が進み、最終的には「full-red」と呼ばれる生育段階にまで達し、果実成熟パターンの顕著な変化は観察されなかった（図 27B）。

次に植物体内における *ETO1* と *LE-ACS3* の相互作用を調べるため、*ETO1*-OE をオーキシシン (2,4-D) 処理した際のエチレン生合成の誘導について解析した。*ETO1*-OE のホモ系統 (#14-1-H2; 図 27 には含まれていない) の幼苗を用いて、オーキシシン処理時のエチレン合成量を測定した。*LE-ACS3* はトマト黄化苗のオーキシシン処理によって誘導されることが知られているので (Yip *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 1993)、トマトの黄化苗を合成オーキシシンである 2,4-D で処理し、エチレン合成の誘導について解析した。播種後 6 日目の野生型黄化苗を 100 μ M 2,4-D で 24 時間処理した場合、無処理区に比べて約 2.5 倍のエチレンを合成していた（図 28A）。この時、*LE-ACS3* mRNA が 2,4-D 処理によって誘導されることをノーザン解析によって確認した（図 28B）。一方、*ETO1*-OE を同様に処理した場合には、*LE-ACS3* mRNA は野生型と同等のレベルにまで誘導されるにもかかわらず、エチレン合成量は無処理の場合と比べて約 1.4 倍しか増加しなかった（図 28A）。これらの結果と、先に述べた Y2H 解析の結果をあわせると、*ETO1* 過剰発現シロイヌナズナにおけるサイトカイニン処理時の AtACS5 活性の抑制と同様に、*ETO1*-OE において過剰発現した *ETO1* タンパク質が *LE-ACS3* と相互作用し、その活性を抑制し、エチレン合成量が減少したものと考えられる。

考察

本研究においては、シロイヌナズナの *ETO1* 遺伝子をトマトで過剰発現させることによって、トマト内在性の *LE-ACS3* の活性が転写後段階において抑制されることを示した。Y2H では *ETO1* ファミリータンパク質の相互作用はタイプ 2 ACS に限定されていたが、植物体内においては *ETO1* と *LE-ACS2* および *LE-ACS4* とのタンパク質レベルでの相互作用を確認していないため、*ETO1* による阻害効果がタイプ 2 ACS に限定されるかどうかについては結論づけるこ

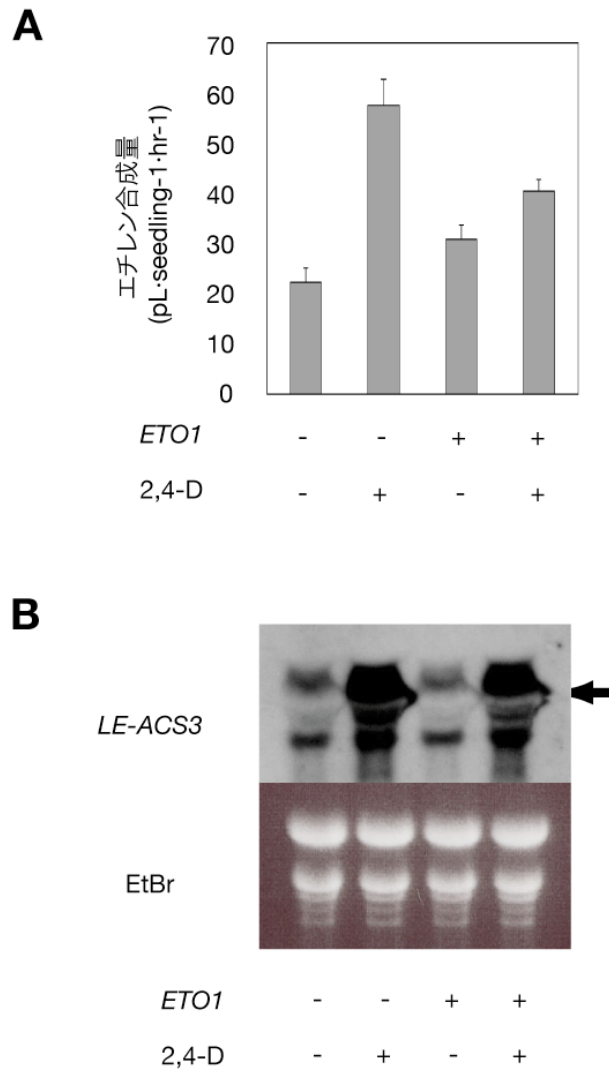


図28. トマトにおいてETO1はオーキシン誘導性エチレン生合成を抑制する

- A)** 発芽6日目の $35S::ETO1$ トマトの T_2 ホモ系統、14-1-H2 ($ETO1 +/+$) および14-1-H4 ($ETO1 -/-$) を $100\mu M$ 2,4-Dの存在下 (+) または非存在下 (-) で1日間処理し、エチレン合成量を測定した。平均 \pm 標準誤差 ($n = 8$) を示した。
- B)** 2,4-Dによる $LE-ACS3$ 遺伝子の誘導。パネルAで示した各系統、処理区の4個体ずつから抽出したトータルRNA ($10\mu g$) を用い、DIGラベルした $LE-ACS3$ プローブでハイブリダイゼーションを行った。矢頭はスプライスされていない機能型転写産物を示す。

とはできない。シロイヌナズナにおいてはタイプ 1 ACSのAtACS6がC末端領域のリン酸化によって安定化することが示されており(Liu and Zhang, 2004)、こうしたリン酸化によってC末端の構造が変化し、ETO1と相互作用できるようになる可能性も除外できない(Kim *et al.*, 2003)。また、トマトのLE-ACS2についてもC末端領域のRLSFモチーフ中のセリン残基のカルシウム依存的リン酸化やC末端の切断など(Tatsuki and Mori, 2001; Yamagami *et al.*, 2003)によって、やはりC末端領域の構造が変化し、ETO1と相互作用する可能性も除外できない。これらの点についてはタイプ 1 ACSのリン酸化状態を識別する抗体を用いたCo-IP実験や、タイプ 1 特異的なC末端領域のペプチドを用いたpull-downアッセイなどによって明らかになるであろう。しかし、本研究においてETO1-OEにおいて果実の成熟過程が変化しなかったことから、ETO1が植物体内においてタイプ 1 のACSであるLE-ACS2の活性を抑制している可能性は低いと考えられる。一方、タイプ 3 ACSはC末端の構造がタイプ 1 やタイプ 2 とはまったく異なるため、ETO1ファミリータンパク質によって制御されないことが示唆される。実際、C末端を変化あるいは欠失させたAtACS5を過剰に発現させた植物体では恒常的な三重反応(Ctr-フェノタイプ)が観察されており(Vogel *et al.*, 1998)、この仮説を支持している。これらの結果を図29にモデルとしてまとめた。

ETO1以外のETO1ファミリータンパク質がタイプ 2 以外のACSと相互作用している可能性についてはどうであろうか。Y2HアッセイにおいてはETO1の2つのパラログEOL1とEOL2はともにタイプ 2 ACSとだけ特異的に相互作用している(未発表データ)。ETO1よりもEOL1と相同性の高いLeEOL1も同様にタイプ 2 ACSとだけ特異的に相互作用している。これらの結果から、ETO1ファミリータンパク質はすべてタイプ 2 ACSとだけ特異的に相互作用することが示唆される。しかし、EOLタンパク質のいずれかが、植物体内で修飾を受けたタイプ 2 以外のACSと相互作用する可能性は除外できない。今後、分子遺伝学および生化学的研究によって、植物細胞内におけるETO1ファミリータンパク質とACSファミリーとの相互作用の様式が明らかにされるであろう。

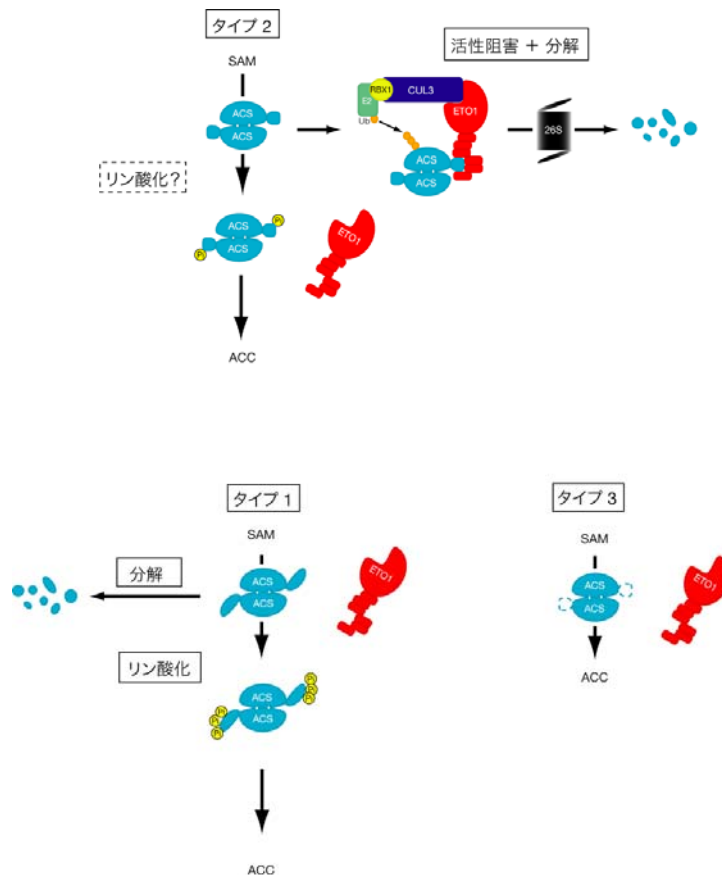


図29. ETO1によるタイプ2特異的なACSの制御機構のモデル

ACSとETO1をそれぞれ水色と赤で示した。ACSのC末端は水色の小さい円または楕円で示した。各ACSは二量体を形成し、活性部位を共有している（二量体1組につき2ポケット）。

上パネル：ETO1がタイプ2 ACS二量体に結合し、その活性を阻害しプロテアソーム依存的分解系へと導く。AtACS5のC末端領域の未知の修飾（リン酸化（黄色の丸）の可能性がある）によって、AtACS5とETO1との結合が阻害され、ACC合成が起きるのかも知れない。

下パネル（左）：タイプ1 ACSはETO1との相互作用に必要なC末端構造を持たないため、ETO1とは相互作用しないが、未知のメカニズムによって分解される。MAPKによるC末端領域の三重リン酸化によってタイプ1 ACS二量体が安定化し、SAMからACCを合成する。

下パネル（右）：タイプ3 ACSはETO1との結合に必要な特異的なC末端構造を持たないため、ETO1と結合しない。

IV. ETO1 ファミリータンパク質の標的配列の解析

トマトを用いた解析により、ETO1 ファミリータンパク質が広く植物一般に存在し、タイプ2 ACS と特異的に相互作用することが明らかとなった。また、シロイヌナズナの ETO1、EOL の解析結果と合わせて、これら ETO1 ファミリータンパク質はタイプ2 ACS によるエチレン合成を転写後レベルで抑制する機能を持つと考えられた。タイプ2 ACS は C 末端に WVF、RLSF、R/D/E-リッチ領域からなる特異的な TOE 配列を持っており、これが ETO1 ファミリータンパク質の標的となるものと考えられる。TOE 配列の変異によって AtACS5 や AtACS9 などのタイプ2 ACS が安定化することから、TOE が ETO1 との相互作用に必要であることが示唆されるが、TOE が ETO1 ファミリータンパク質によるタイプ2 ACS の分解を引き起こすのに十分なシグナル配列として機能するのかどうかは明らかでない。そこで本研究では、シグナル配列としての TOE の機能を明らかにするため、レポーター遺伝子である *GFP* (オワンクラゲの緑色蛍光タンパク質遺伝子) に TOE を連結し、植物細胞内における mRNA、タンパク質の安定性を解析した。

材料及び方法

供試植物

イネ (*Oryza sativa* L.、品種：日本晴) およびシロイヌナズナ (Col-0および *eto1-4*変異体) を用いた。

GFPの安定性解析

トマトLE-ACS3のC末端14アミノ酸 (TOE^{LE-ACS3} ; WVFRLSFNDRQRER) またはイネOsACS1のC末端16アミノ酸 (TOE^{OsACS1} ; WALRLTPSIADRKAER) がオワンクラゲ緑色蛍光タンパク質 (GFP) のC末端にインフレームに連結するようにベクターを構築した。このキメラ遺伝子をCaMV 35Sプロモーター下に連結し、バイナリーベクターpZH2B (中央農業総合研究センター・北陸研究センター 黒田昌治博士より分譲) にクローニングした。これをアグロバクテリウム法によってイネ胚盤由来カルスに導入し、ハイグロマイシン抵抗性によって形質転換細胞を選抜した(Oikawa *et al.*, 2004)。野生型 *GFP* をCaMV 35Sプロ

モーター下に連結したものをコントロールとして用いた。ハイグロマイシン抵抗性のT₁カルスを50mg/Lのハイグロマイシンを含むN6培地で選抜し、これらのカルスの蛍光を蛍光実体顕微鏡（ライカ社）で観察した。それぞれの転写産物量は、LightCycler（ロシュ・ダイアグノスティック社）を用いた定量的RT-PCRによって解析した。イネ・カルス内におけるGFPタンパク質の蓄積量は、抗GFP抗体（クロンテック社）とECL Plusウェスタンブロッティング検出システム（GEヘルスケア バイオサイエンス社）を用いて検出し、NIH ImageJプログラムを用いてシグナル強度を解析した。シロイヌナズナの根におけるGFP蛍光は、LUMAR蛍光顕微鏡（カールツァイス社）を用いて観察した。シロイヌナズナのすべての蛍光像は、同一の倍率および露光時間で独立した12〜24個体について撮影した。MG132（50μM、30分間）処理には、GFP-TOE^{LE-ACS3}を発現している播種後7日目の野生型のシロイヌナズナを用いた。8個体の独立した形質転換体について、根端の蛍光をLSM510共焦点顕微鏡（カールツァイス社）で観察した。

結果

前章の結果から、多くの植物種に ETO1 オルソログが見出され、ETO1 ファミリータンパク質によるタイプ 2 ACS の分解は植物全般に共通であることが示唆されたことから、TOE が植物細胞中でタンパク質分解シグナルとしての活性を有するかについて検討した。LE-ACS3 の C 末端 14 アミノ酸 (TOE^{LE-ACS3}) をインフレームに GFP に融合し、35S プロモーターに連結してイネに導入した。イネには3つの ETO1 オルソログ OsEOL1/2/3 が存在するため（図 24）、もしも TOE^{LE-ACS3} がタンパク質分解シグナル活性を持つのであれば、イネ細胞中の OsEOL1/2/3 の働きにより、GFP-TOE^{LE-ACS3} のタンパク質レベルが低下することが期待される。コントロールとして用いた 35S::GFP（野生型）のカルスに比べ、GFP-TOE^{LE-ACS3} カルスの蛍光は明らかに弱かった（図 30A）。この蛍光の低下が導入遺伝子の転写量の低下によるものでないことを確認するため、形質転換イネカルスにおける GFP-TOE^{LE-ACS3} および野生型 GFP の転写産物量をリアルタイム RT-PCR によって測定して比較した。測定には各導入遺伝子につき独立した3系統のカルスを用いた。その結果、GFP-TOE^{LE-ACS3} の転写量は野生型の GFP の約 1/3 程度であった（図 30B）。次に、これらの形質転換カルスにおける GFP-TOE^{LE-ACS3} および GFP のタンパク質量を調べるため、抗 GFP

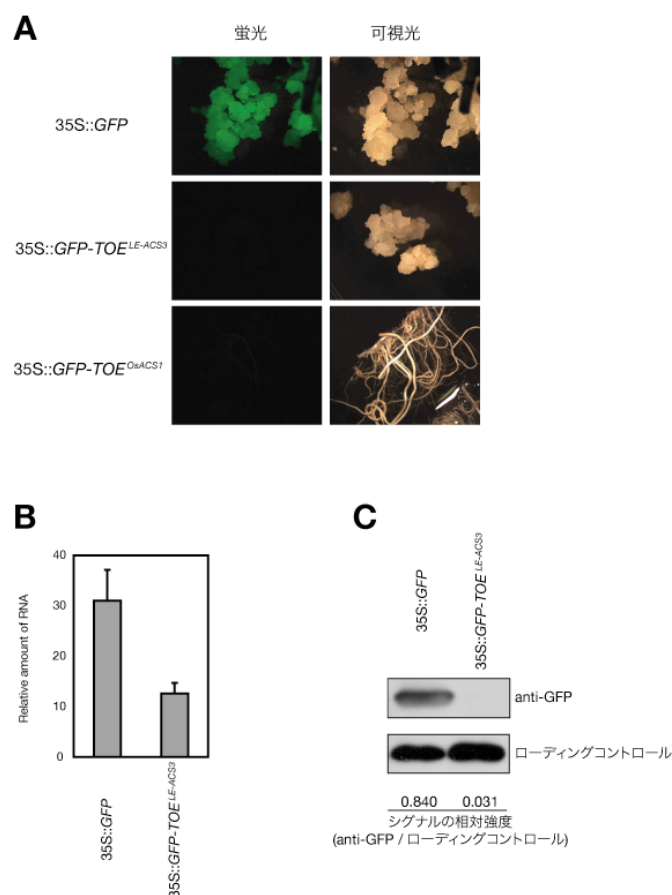


図30. TOEは植物細胞におけるタンパク質脱安定化シグナルとして働く

A) TOE^{LE-ACS3}とTOE^{O_sACS1}の付加によるイネ細胞におけるGFP蛍光の消失。

35S::GFPまたは35S::GFP-TOE^{LE-ACS3}を導入したイネのカルス、または35S::GFP-TOE^{O_sACS1}を導入したイネの幼根を観察した。

B) 形質転換イネカルスにおけるGFPまたはGFP-TOE^{LE-ACS3}の転写産物量のRT-PCR解析。各導入遺伝子につき、3系統の独立した形質転換カルスを解析した。アクチン遺伝子の転写産物に対して標準化を行い、標準誤差 ($n = 3$) をエラーバーで示した。

C) TOE^{LE-ACS3}の付加によるGFPタンパク質量の低下。

上パネル：抗GFP抗体でGFPまたはGFP-TOE^{LE-ACS3}を検出した。抗GFP抗体による非特異的バンドをローディングコントロールとした。

下パネル：各バンドの強度の相対値。ImageJプログラムで定量化したバンドの強度をローディングコントロールに対して標準化した値を示す。

抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。野生型 GFP が明確に検出できたのに対し、GFP-TOE^{LE-ACS3} はほとんど検出されなかった。オートラジオグラフィで検出したバンドの濃さで比較すると、形質転換イネカルス内において GFP-TOE^{LE-ACS3} は野生型 GFP の約 1/27 程度しか蓄積していなかった (図 30C)。タンパク質レベルの低下の程度 (1/27) が mRNA レベルの低下 (1/3) に比べてはるかに著しかったため、TOE^{LE-ACS3} の付加によって標的タンパク質 (この場合は GFP) の植物細胞内での安定性が著しく低下することを強く示唆している。GFP-TOE^{LE-ACS3} の安定性の低下はイネ細胞中の OsEOL タンパク質によって引き起こされた可能性が高いと考えられるので、イネのタイプ 2 ACS のひとつと考えられる OsACS1 (Zarembinski and Theologis, 1993) に由来する TOE (TOE^{OsACS1}; OsACS1 の C 末端 16 アミノ酸) (図 31) の効果も TOE^{LE-ACS3} の場合と同様の方法で検討した。TOE^{OsACS1} は、保存性の高い WVF モチーフ中のフェニルアラニン (F) がロイシン (L) に、RLSF モチーフ中のセリン (S) とフェニルアラニンがそれぞれスレオニン (T) とプロリン (P) に変化しており、トマトやシロイヌナズナの TOE コンセンサス配列と一致しない箇所があるが、TOE^{OsACS1} を付加した場合にも TOE^{LE-ACS3} と同様に GFP の蛍光は著しく低下した (図 30A)。この結果は、単子葉植物と双子葉植物のどちらにおいてもタイプ 2 ACS の C 末端がタンパク質分解シグナルとしての活性を持っていることを強く示唆している。次に、TOE^{LE-ACS3} の付加による GFP の不安定化が ETO1 に依存するかどうかを確かめるため、35S::GFP および 35S::GFP-TOE^{LE-ACS3} を野生型 (Col-0) または *eto1-4* バックグラウンドのシロイヌナズナに導入し、幼植物の根における蛍光を観察した。野生型バックグラウンドにおいては GFP-TOE^{LE-ACS3} の蛍光は野生型 GFP に比べて著しく低下していた。一方、*eto1-4* バックグラウンドにおいては GFP-TOE^{LE-ACS3} の蛍光が野生型 GFP と同等に観察された (図 32A)。これらの結果から、シロイヌナズナの細胞内における GFP-TOE^{LE-ACS3} の蛍光の低下には ETO1 が必要であることが明らかとなった。第 2 章で、シロイヌナズナにおいて ETO1 がプロテアソーム経路を介して AtACS5 の分解を促進することを示した。そこで、ETO1 による GFP-TOE^{LE-ACS3} の安定性の低下もプロテアソーム経路によって制御されているかどうかを確かめるため、35S::GFP-TOE^{LE-ACS3} を導入した野生型シロイヌナズナの根端を 50 μ M の MG132 (プロテアソームの特異的阻害剤) で処理し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。MG132 処理は GFP-TOE^{LE-ACS3} の蛍光を著

タイプ 1

LE-ACS1A: CFANMDETMRIALKRISYTMRIALKRISYFVLQPKGLNNIAAIKKQCSRRKLQISLSFRRLDHEFMNSPAHSPMNSPLVRT
 LE-ACS1B: CFANMDETMRIALRRIRNFVLQTKGLNNIAAIKKQCSRS-----KLQISLSFRRLDDFNSPAHSPMNSPLVRT
 LE-ACS6 : CFANMDDATMKIALRRIRHFVYLQPNKGVEVATKKQYCRTRSKLEI-----SLSFRRLDDFMNSPHSPMSSPMVQARN
 OsACS2 : CHANMDETMVALGRIHDFVRQHQQRRVKAERWAANRQL-----RLSLPHHHHLSPAHLSSPLALLSPQSPMVRATS
 AtACS1 : CFANMDEDTLQIALERIKDFVVGDRANKNKNKNCICNNKRENKKRKSFKKNL---KLSLSSMRYYEEHVRSPKLMSPHSPLLRA
 AtACS2 : CFANMDDTLHVALGRIQDFVSKNKNKIVEKASENDQVIQNSAKKLKWTQTNL-RLSFRRLYEDGLSSPGIMSPHSPLLRA
 LE-ACS2 : CFANMDDGTVDIALARIRRFVGVEKSGDKSSMEKKQWKKNNL-----RLSFSKRMVDESVLSPSSPIPPSPLVR
 AtACS6 : CFANMDHKTMETALERIRVFTSQLBEETKPMMAATTMAKKKKKCWQSNL-----RLSFSDDRFRDGFSPHSVPVPSPLVRAQT

タイプ 2

AtACS4 : CFANMIDETLKLALKRLKMLVDDENSRRRCQKSKSERLNGSRKKTMSNVSN-WVFRLSFHDREAEER
 AtACS8 : CFANLSEETLKVALDRLKRFVDGSPSTRSQSEHQRLKLNLRKMKVSN----WVFRLSFHDREPEER
 AtACS5 : CFANMSEDTLDLALKRLKTFVESTDCGRMISRSSHRLKSLRKKTVSN---WVFRVSWTDRVPDER
 AtACS9 : CFANMSEDTLDLAMKRLKEYVESTDSRRVISKSSHRIKSLRKRRTVSN---WVFRVSWTDRVPDER
 LE-ACS3 : CFANMSEDTLDLAMRRIKDFVESTAPNATNHQNNQSNANSKKKSFSK---WVFRLSFNDRQER
 LE-ACS7 : CFANMSEDTLNIAIQRLKAFVDSRVNNKDDIQNNQCSNKKKSFSK---WVFRLSFNERQER
 LE-ACS8 : CFANMSEDTLNLAIQRIKSFVDSVDVIGINVDQSNQNTSTSPKKLFAKWGFRLSFNDRER

 OsACS1 : CFANMSAKTLDVAMQRLRSFVDSATGGGDNAALRRAAVPVRVSVSCPLAIK-WALRLTHSIADRKAER
 LE-ACS5 : CFANMSKETLDLAMQRINNPFVDFRDIHRQQLRFVTGAGSRRRTIAN--WVVKFSSGDGRDR

?

タイプ 3

LE-ACS4 : CFANIDDQTMELARIRMFMDAYNNVNKNGVMKNKHNGRGTTYDLTPQMGSTMKMLLA
 OsACS4 : CFANMSLATLDVALERISRMDAWCKATIGKFNHLQPNRCEVNYFALERYQGHVQQ
 OsACS5 : CFANMSLDTLDLALHRISRMDTWNGTKQQASCQQEQEQ
 OsACS3 : CFANMSLETLDVALHRLGCFIKKWEQEQHEN
 AtACS7 : CFANMSENTLEIALKRIHEFMDRRRRF

図31. トマト、シロイヌナズナ、イネのACSのC末端アミノ酸配列のアライメント

C末端アミノ酸配列の類似性により、各ACSアイソフォームを3つのタイプに分類した。タイプ1とタイプ2 ACSに共通なRLSFモチーフを青で、タイプ2 特異的なWVFモチーフとR/D/Eリッチ領域をそれぞれ赤と緑で示した。タイプ2 ACSのC末端コンセンサス配列に完全に一致しないが、類似した配列を持つものを四角で囲み「？」マークを付して示した。

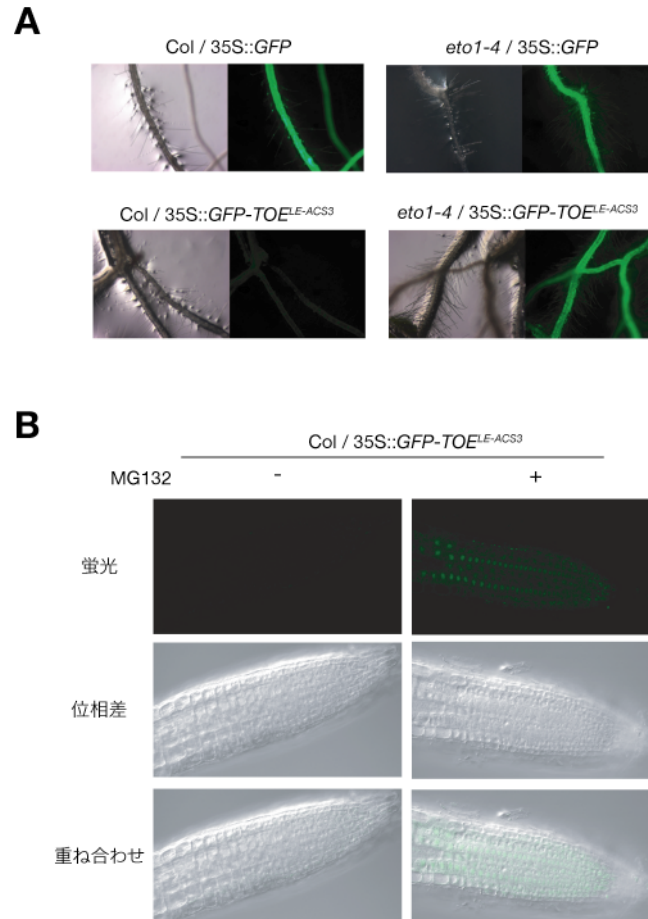


図32. TOEはETO1およびプロテアソーム依存的タンパク質分解シグナルとして働く

- A)** *eto1-4*変異体においてはGFP-TOE^{LE-ACS3}の蛍光が回復する。35S::GFPまたは35S::GFP-TOE^{LE-ACS3}形質転換体の幼根を観察した。各系統につき、12〜24個体を観察した。写真は同倍率、同露光時間で撮影した。
- B)** プロテアソーム阻害剤MG132はGFP-TOE^{LE-ACS3}を安定化する。35S::GFP-TOE^{LE-ACS3}形質転換体の幼根をMG132 (50μM) で処理し、観察した。

しく上昇させたため、GFP-TOE^{LE-ACS3} タンパク質の安定性はプロテアソーム活性に依存して制御されていることが明らかとなった (図 32B)。

考察

前章において、WVF、RLSF の両モチーフおよび R/D/E-リッチ領域からなる TOE 配列が ETO1 ファミリータンパク質との相互作用を媒介するのに十分なユニットであることを示した。本研究においては、トマトおよびイネの TOE 配列を GFP タンパク質に融合させたときに、ETO1 およびプロテアソーム依存的に GFP の分解を促進する機能があることを示した。また、双子葉植物であるシロイヌナズナおよび単子葉植物であるイネのいずれにいてもこの活性は検出されたため、TOE を持つ標的タンパク質 - ETO1 - CUL3 - プロテアソームという一連の経路が多く植物種において保存されていることが示唆された。

ACS の中には WVF モチーフ-RLSF モチーフ-R/D/E リッチ領域という TOE コンセンサス配列に完全には一致しないものの、いくつかの類似のアミノ酸を含むものが存在する (図 31)。たとえば、ともに ETO1 の標的タンパク質と考えられるシロイヌナズナの AtACS5 と AtACS9 は RLSF モチーフの代わりに RVSW を持つ。これらにおけるアミノ酸置換は、疎水性のロイシン (L) からやはり疎水性のバリン (V) への置換と、バルキーで芳香性のフェニルアラニン (F) からやはりバルキーで芳香性のトリプトファン (W) への置換であり、アミノ酸の性質を保存した置換であるため、TOE 内での分子構造に対する影響は小さいと想像できる。これに対して、イネの OsACS1 は WVF の代わりに WAL を、RLSF の代わりに RLTP を持っており、LE-ACS5 は WVF の代わりに WVV を、RLSF の代わりに KFSS を持っている。これらのアミノ酸置換も比較的保存性の高い置換ではあるものの、AtACS5 や AtACS9 の例と比較するとやや性質の異なるアミノ酸への置換となっているが、OsACS1 がイネ細胞内で GFP を不安定化させた結果 (図 30A) から、これらの配列も TOE としての活性を持っていると考えられる。LE-ACS5 や OsACS1 を含む多様な ACS について ETO1 ファミリータンパク質との相互作用を解析することによって、これらのタンパク質と ETO1 ファミリータンパク質が果たす役割について、さらに詳細な知見が得られるであろう。

V. 総合考察

エチレンはさまざまなストレスに応答して迅速に合成が誘導されるため、植物のストレスホルモンとも呼ばれる(Kende, 1993; Wang *et al.*, 2002)。ストレスに応答したエチレンの生合成やシグナル伝達は非常にすばやいため、動物のように移動することができず、周囲からの攻撃から逃げるできない植物にとっては非常に重要な適応手段のひとつであると考えられる。エチレンはまた植物の多くの生育現象に関与することが知られており、こうした生育現象を限定された時間や空間において適切に引き起こすためにも、エチレン生合成やエチレン反応の正確かつ迅速な制御が重要であると考えられる。エチレン生合成においては、*ACS* 遺伝子の発現誘導が重要な役割を果たしていることが、数多くの研究によって示されてきた(Bleecker and Kende, 2000)。しかし、いくつかの証拠によって転写後レベルにおける何らかの制御がエチレン生合成、おそらくはより迅速な合成反応に関わっていることが強く示唆されていたが、その分子的基盤は不明であった(Spanu *et al.*, 1994; Vogel *et al.*, 1998; Woeste *et al.*, 1999)。本研究においては、植物がエチレン生合成を転写後レベルで制御する機構のひとつを明らかにした。第II章においては植物固有の BTB/TPR/CC ドメインタンパク質である ETO1 が AtACS5 の C 末端に結合し、その酵素活性を阻害するとともに、プロテアソーム依存的分解を促進することを明らかにした。また第III章では ETO1 ファミリータンパク質が広く植物に存在することを明らかにするとともに、ACS ファミリータンパク質群の C 末端構造を詳細に解析することによって ACS タンパク質をタイプ 1～3 の 3 つのタイプに分類し、ETO1 ファミリータンパク質が「タイプ 2 ACS」に特異的に結合してその活性を転写後レベルで抑制することを明らかにした。さらに第IV章においては ETO1 の標的配列である TOE 配列を同定し、TOE が ETO1 の標的タンパク質をプロテアソーム依存的分解へと導くシグナル配列であることを示した。本研究によって得られた知見によって、エチレンの生合成制御に関する理解は新たな段階に進んだと言える。

1. *eto*変異体におけるエチレン過剰合成の分子機構

eto1、*eto2-1*、*eto3*のすべての変異体は黄化苗においてはエチレンを過剰に合

成するが、成葉・花・莢 (silique) 等では野生型と同等量のエチレンしか合成しない(Kieber *et al.*, 1993; Woeste *et al.*, 1999)。なぜこのように表現型の現れる生育ステージや組織が偏っているのであろうか。*ETO1*遺伝子の機能欠失がエチレン過剰合成をもたらすのに対し、*EOL1*や*EOL2*などの*ETO1*パラログの機能欠失変異体においてはエチレン過剰合成に関与する表現型が観察されない(データ未発表)。このことから、少なくとも黄化苗においては*ETO1*のみが機能しており、*EOL1/2*は重要な役割を果たしていないことが示唆される。また、黄化苗以外においては複数の*ETO1*ファミリー遺伝子が重複して発現しているため、単一の遺伝子の変異によっては表現型が現れないと考えられる。*ETO1*ファミリー遺伝子群の発現パターンの組み合わせによって、植物のさまざまな生育段階や組織においてエチレン生合成が制御されていると考えられる。*eto1*、*eol1*、*eol2*の二重あるいは三重突然変異体を作成することによって、植物のライフサイクル全体に渡っての*ETO1*ファミリー遺伝子群の機能が明らかになるであろう。しかし、*ETO1*ファミリー遺伝子の発現パターンの特異性だけでは、*eto2-1*や*eto3*においても黄化苗だけでエチレン過剰合成が観察されることを説明できない。*eto2-1*や*eto3*の原因遺伝子である*AtACS5*や*AtACS9*が黄化苗だけで発現しているならばこれを説明できるが、レポーター遺伝子による解析結果などは、これらの遺伝子が黄化苗以外の時期・組織においても発現していることを示唆している(Tsuchisaka and Theologis, 2004)。黄化苗以外においては*AtACS5*や*AtACS9*の発現よりも他の*ACS*遺伝子の発現が強く、これらを抑制する分子機構の活性が強いために、変異型の*AtACS5^{eto2-1}*や*AtACS9^{eto3}*等のタンパク質が他の*ACS*とヘテロ二量体を形成して分解されれば上記を説明できる。これに対して、黄化苗においては*AtACS5*や*AtACS9*以外の*ACS*遺伝子の発現およびそれらを抑制する分子機構の活性が弱いのかも知れない。Yamagamiらによれば、*AtACS9*および*AtACS5*の比活性はすべての*ACS*アイソフォームの中でそれぞれ1番目、4番目に高いので、ひとたびタンパク質が安定化したときに産生するエチレンの量が高くなり、表現型としてとらえやすいのかも知れない(Yamagami *et al.*, 2003)。今後、タイプ1 *ACS*を制御する分子機構が明らかになり、さらには*ETO1*および*ACS*ファミリー遺伝子群の発現パターンや機能欠失型変異体を用いた解析が進むにつれて、エチレン生合成の転写後制御機構の分子ネットワークの全貌が明らかにされるであろう。

2. 植物のエチレン生合成と応答の転写後制御機構

トマトやパセリの培養細胞に分裂酵母などに由来するエリシターを添加すると、わずか数分後からフェニルプロパノイド合成系遺伝子、ファイトアレキシン合成系遺伝子、抗菌性タンパク質遺伝子などを含む抵抗性遺伝子群の発現誘導が始まる(Hedrick *et al.*, 1988; Hahlbrock *et al.*, 1995)。トマトだけでなく多くの植物において感染応答時にエチレンの生合成が急速に誘導され、エチレンが抵抗性遺伝子群の発現を誘導することから、エチレンが感染応答時における重要なシグナル物質として作用すると考えられている(Kozaka and Teraoka, 1977; Chappell *et al.*, 1984; Ecker and Davis, 1987; Sasaki *et al.*, 2004)。転写レベルでのACSの発現調節に関しては、エリシター処理によって修飾を受けたシステインプロテアーゼのひとつLeCPが核に移行して*LE-ACS2*プロモーターに結合し、同遺伝子の転写を介してエチレン生合成を誘導するとの報告がある(Avni *et al.*, 1994; Matarasso *et al.*, 2005)。しかし、エリシター処理過程で、mRNA合成阻害剤であるcordycepinを添加すると、ACOの活性は阻害されるもののACSの活性は変化しないため、ACOについては転写レベルでの制御が重要であるが、ACSについてはむしろ転写後レベルの制御が重要であると考えられる(Chappell *et al.*, 1984; Felix *et al.*, 1991)。プロテインキナーゼやホスファターゼの阻害剤処理による実験結果から、タンパク質のリン酸化がACSの転写後制御に関与することが示唆されていた(Felix *et al.*, 1991; Felix *et al.*, 1994; Spanu *et al.*, 1994)。トマトの*LE-ACS2*はC末端領域のRLSFモチーフ内のセリン残基がカルシウム依存的にリン酸化されるものの、リン酸化自体によっては活性に変化がないことから、C末端領域のリン酸化がACSの安定性の維持に関与することが示唆された(Tatsuki and Mori, 2001)。近年、シロイヌナズナのAtACS6とAtACS2は感染応答時に活性が誘導されるMAPキナーゼのひとつであるAtMPK6によってC末端領域がリン酸化され、このリン酸化によってAtACS6/2タンパク質が安定化し、エチレン合成が誘導されることが示され、リン酸化を介したACSタンパク質の安定性制御がストレス誘導性のエチレン生合成において重要な役割を果たすことが証明された(Liu and Zhang, 2004)。ETO1タンパク質はyeast two-hybridアッセイにおいて*LE-ACS2*やAtACS6/2とは顕著に相互作用しないため、ETO1が直接的に感染応答時のエチレン生合成制御に関与するとは考えづらい。これらのACSアイソフォームがタイプ2 ACSとヘテロ二量体を形成することによってETO1に間接的に制御されている可能性も考

えられるが、*eto1*、*eto2-1*、*eto3*のいずれの変異体も黄化苗以外でエチレン過剰合成の表現型を示さないことから、ETO1ファミリータンパク質はタイプ2 ACSが関与するエチレン生合成を特異的に制御するために機能しており、タイプ1 ACSを介したエチレン生合成はETO1以外の因子による制御機構によって制御されている可能性が高いと考えられる。これまでシロイヌナズナでは、個々のACS遺伝子の発現が散発的に報告されてきたが、近年、*GUS*および*GFP*レポーター遺伝子を用いた機能ゲノム学的アプローチによって全ACS遺伝子の発現パターンが明らかにされた(Tsuchisaka and Theologis, 2004)。また、個々のACSが異なる至適pHや酵素活性を持つことが報告されているが(Yamagami *et al.*, 2003)、本研究で提唱した各タイプが一定の傾向の発現パターンや酵素活性を持つわけではなさそうである。さらにはこれらのアイソフォームはさまざまな組み合わせでヘテロ二量体を形成し(Tsuchisaka and Theologis, 2004)、一方ではETO1ファミリー遺伝子も異なる発現パターンを示すと考えられる。ACSの発現パターン、酵素活性、ヘテロ二量体形成とその活性、ETO1ファミリーの発現パターンやその抑制解除機構などの数多くの因子が複雑に組み合わさることによって、植物におけるエチレン生合成を精密に制御していることが示唆される。

ETO1のようにプロテアソームを介した制御は、内外からの刺激に対して迅速に対応することを可能にしていると考えられる。植物のエチレン反応においては生合成系だけではなく、転写因子であるEIN3やおそらくはそのパラログであるEILタンパク質群の安定性もF-boxタンパク質であるEBF1/2を介してプロテアソーム依存的に制御されている(Guo and Ecker, 2003; Potuschak *et al.*, 2003)。さらにEBF1/2のmRNAの安定性はEIN5遺伝子がコードするエキソリボヌクレアーゼXRN4によって制御されている(Olmedo *et al.*, 2006; Potuschak *et al.*, 2006)。エチレンの生合成および応答経路はこれらの転写後制御ネットワークを駆使して極めて厳密に制御されており、必要な時だけに迅速に合成を開始するとともに反応経路を活性化するものと考えられる。

3. ETO1によるタイプ2 ACSの抑制を解除する機構

本研究においてはETO1がAtACS5を抑制する機構について明らかにしたが、エチレンを合成すべき時にETO1による抑制を解除する作用機作については明らかになっていない。先に述べたように、タイプ1およびタイプ2 ACSのC末端領域のRLSFモチーフに含まれるセリン残基(S)がカルシウム依存的にリン

酸化されることが報告されているため、Spanuらの阻害剤実験の結果と併せて考えると、このセリン残基のリン酸化-脱リン酸化によってACSとETO1との相互作用が制御されている可能性が考えられる(Spanu *et al.*, 1994; Tatsuki and Mori, 2001)。eto3変異体においては、AtACS9のWVFモチーフ中のバリニン (V) が荷電性のアスパラギン酸 (D) に置換していることから、ETO1とAtACS9との相互作用が起きなくなったためにAtACS9が安定化し、エチレンを過剰合成するようになったものと考えられる(Chae *et al.*, 2003)。TPRドメインは静電的相互作用と疎水的相互作用とによって特異的に標的タンパク質を認識して結合することから(Scheufler *et al.*, 2000)、タイプ2 ACSのC末端の疎水性領域がリン酸化されて荷電することによってETO1タンパク質との相互作用が阻害されることが示唆される。また、Chaeらはサイトカイニン処理によってタイプ2 ACSであるAtACS5が安定化することを報告しており、サイトカイニン処理によってカルシウムイオンの流動が起き(Schumaker and Gizinski, 1993)、それが引き金となってCDPKが活性化され、タイプ2 ACSタンパク質をリン酸化し、安定化させる、という一連のメカニズムが想定される(Chae *et al.*, 2003)。TOE配列のさまざまなアミノ酸置換シリーズを作成し、ETO1との相互作用について解析することによって、ETO1とタイプ2 ACSの相互作用の維持や解除のメカニズムが明らかにされるであろう。また一方では、CDPKがこの制御に重要な役割を果たしていることが強く示唆されるため、CDPKの機能欠失変異体などを用いた解析も必要であろう。TOEでタグをしたGFPを用いた実験系は、これらの解析においても極めて有用なツールとなると考えられる。

4. 農作物における ETO1 とタイプ 2 ACS の役割

ETO1 ファミリータンパク質およびタイプ2 ACS は農業においてどのような役割を果たしているのだろうか。トマトにおいては LE-ACS3、LE-ACS7、LE-ACS8 などがタイプ2 ACS であると考えられるが、これらをコードする遺伝子は、冠水 (LE-ACS3、LE-ACS 7)、傷害 (LE-ACS 7) などのストレスに応答して発現する。また、タイプ2 ACSに類似したC末端配列を持つLE-ACS5もエリシターに応答して発現が誘導されるなど、トマトのタイプ2 ACSはストレスに応答して発現が誘導されるものが多いようであるが、LE-ACS3は果実においても発現しているとの報告もある(Olson *et al.*, 1991; Yip *et al.*, 1992; Oetiker *et al.*, 1997; Nakatsuka *et al.*, 1998; Shiu *et al.*, 1998; Barry *et al.*,

2000)。また、*LeEOL1*は多くの組織や生育ステージにおいて発現しており、トマトにおいて ETO1 ファミリータンパク質とタイプ 2 ACS はさまざまな生育・ストレス応答に関与していることが示唆される。今後、トマトにおけるさまざまなゲノム情報の充実と MicroTom 等のモデルトマトを利用した新たな実験系の確立により、これらの遺伝子の役割が明らかにされると考えられる。

イネは冠水時にエチレンを合成し、さらにエチレンがアブシジン酸の蓄積量を減少させることによってジベレリンへの感受性を高め、茎葉部を伸長させると考えられている(Kende *et al.*, 1998; Jackson and Ram, 2003)。また、冠水時に節から生じる不定根の形成もエチレンによって誘導されている(Mergemann and Sauter, 2000)。さらには冠水ストレス耐性遺伝子のひとつである *Sub1A* はエチレン応答性転写因子である EREBP をコードすることが明らかになり、イネの冠水ストレス応答においてエチレンは重要な役割を果たすと考えられている(Xu *et al.*, 2006)。イネにおいては *OsACS1* が唯一のタイプ 2 ACS であるが、*OsACS1* 遺伝子は茎葉部においてオーキシンと嫌気ストレスによって誘導され、長期的な冠水応答に関与すると考えられている(Zarembinski and Theologis, 1993; Van Der Straeten *et al.*, 2001)。一方では、より短期的な冠水応答にはタイプ 3 ACS である *OsACS5* が関与すると考えられており(Van Der Straeten *et al.*, 2001)、イネの冠水応答性のエチレン生合成はこれらの *OsACS* と *OsEOL* タンパク質との相互作用ネットワークによって制御されていると考えられる。

他の作物のタイプ 2 ACS をデータベースから検索してみると、リンゴ (*Md-ACS1*) (Dong *et al.*, 1991)、セイヨウナシ (*Pc-ACS1a*、*Pc-ACS1b*) (Lelievre *et al.*, 1997; El-Sharkawy *et al.*, 2004)、ナシ (*PPACS1*) (Itai *et al.*, 1999)、カキ (*DK-ACS1*) (Nakano *et al.*, 2003)、バナナ (*MACS1*) (Huang *et al.*, 2006)、キウイフルーツ (GenBank accession No. BAA31137) 等の果実から単離された ACS の cDNA が見出される。リンゴの *Md-ACS1* は果実の成熟過程で発現する遺伝子であるが、「ふじ」などのように成熟時のエチレン合成量が低く日持ちの良い品種に特異的な *Md-ACS1-2* アリルにおいては、そのプロモーター領域にトランスポゾン挿入などの変異が起き、同遺伝子の発現量が低下し、エチレン合成量が低下していると考えられる(Sunako *et al.*, 1999)。この *Md-ACS1-2* アリルは果実の軟化と遺伝的相関を示し、果実成熟時のエチレン合成量および果実の軟化に関連すると考えられる(Oraguzie *et al.*, 2004)。セイヨウナシはトマトなどと同様に成熟過程でエチレンの作用を必要とする。このエ

チレン合成を誘導するために、0℃で3ヵ月にも及ぶ低温処理を必要とする品種と低温処理を必要としない品種とがある。*Pc-ACS1a* と *Pc-ACS1b* は同一遺伝子のアレルであるが、低温処理を要する品種では *Pc-ACS1a* が低温処理時およびその後の成熟時に発現する。これに対して、*Pc-ACS1b* は低温処理を要さない品種の成熟時においてのみ発現し、やはり果実の成熟とタイプ2 ACSの機能とが密接に関連している(El-Sharkawy *et al.*, 2004)。ナシにおいてもエチレン生産量と果実の日持ちや品質との間に相関が見られ、*PPACS1* 遺伝子がエチレンを多く合成する品種に特異的に保持されている(Itai *et al.*, 1999)。カキの果実の成熟過程においては、収穫後の水分の減少に従ってヘタの部分でまずタイプ1 ACSである *DK-ACS2* が発現し、エチレン合成を引き起こし、そのエチレンに誘導されて二次的に *DK-ACS1* 遺伝子が強く誘導を受け、果実の成熟を促進すると考えられる(Nakano *et al.*, 2003)。バナナにおいては、エチレン誘導性の *MACS1* 遺伝子が果実の成熟に関連すると考えられる(Huang *et al.*, 2006)。キウイフルーツの成熟におけるタイプ2 ACSの役割は不明であるが、エチレン処理した果実からタイプ2 ACS遺伝子の cDNA が単離されているため、成熟において何らかの役割を果たしていることが示唆される。このように、さまざまな園芸作物の果実の成熟にタイプ2 ACSが関連することが示唆されているが、それらの転写後の制御についての知見は全くない。今後はこれらの遺伝子の転写後制御機構についても解析を深めることによって、果実成熟のより精密な制御が可能となるであろう。たとえば、リンゴ、ナシ、カキ、バナナなどのようにタイプ2 ACSによるエチレン生合成によって果実の成熟が進みすぎてしまい、商品価値が下がるような場合においては、ETO1 ファミリータンパク質を高発現させるか、その制御を解除させないようするための技術の開発が有用であろう。逆に、セイヨウナシやキウイフルーツのように、果実を軟化させて食用とするためにタイプ2 ACSの活性が必要な場合には、ETO1 ファミリータンパク質の発現を抑制したり、その制御を解除したりするための技術の開発が有用と考えられる。

ETO1 やタイプ2 ACSを直接利用することの他に、ETO1 の標的配列である TOE 配列をある種の分子スイッチとして利用することも有用であろう。TOE をあるタンパク質に付加することによってそのタンパク質は分解される。しかし、何らかの解除シグナルによってそのタンパク質を安定化し、機能させることが可能になるはずである。また、タイプ1 ACSのC末端を同様の分子スイッチ

として利用することも有用かも知れない。タイプ1 ACS である AtACS6 は病原菌感染によって C 末端が MAP キナーゼによってリン酸化され、安定化することが示されている(Liu and Zhang, 2004)。もしも AtACS6 の C 末端が TOE と同様に独立した分子シグナルとして機能するならば、病原菌の感染時などに特異的に外来タンパク質を安定化させることが理論上可能であり、ストレス耐性の遺伝子組換え植物の開発などにおいて、大いに有用なツールとなることが期待される。今後、タイプ1 およびタイプ2 ACS の安定性制御機構がより詳細に解明されることを待ちたい。

5. ETO1 ファミリータンパク質とタイプ2 ACS による制御機構の進化

ETO1 ファミリータンパク質が多く植物種に見出され、動物や原核生物に存在しないとすれば、ETO1 ファミリータンパク質によってエチレン合成を制御するシステムは植物が分化した後で誕生したと考えられる。そもそもエチレンは裸子植物では ACC を介して合成されることが示されているが(Reynolds and John, 2000)、コケ植物、シダ植物などにおいては、その生理活性が報告され、内生ホルモンとして同定されてはいるものの(Thomas *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 2000)、ごく一部の例外を除いては ACC を介さずにエチレンを合成すると考えられている(Chernys and Kende, 1996; Osborne *et al.*, 1996; Reynolds and John, 2000; Arshad and Frankenberger, 2002)。たとえば、水生シダの仲間である *Regnellidium diphyllum* と *Marsilea quadrifolia* (ともにデンジソウ科のシダ植物) では内生の ACC および ACS が存在するものの、ACC を与えてもエチレン合成量が増加しないことから、ACC を合成する経路は存在するが、ACC を酸化してエチレンを合成することはできないと考えられる(Chernys and Kende, 1996)。現時点の GenBank などのデータベース中には、コケ植物やシダ植物の ACS ホモログを見出すことができない。ACS はピリドキサル 5-リン酸 (PLP) 依存性アミノトランスフェラーゼ (AT) のサブグループ I と類似しており(Mehta *et al.*, 1993)、裸子植物の出現と相前後して AT から ACS が進化したと考えるのが妥当であろう。本研究において ACS を 3 つのタイプに分類したが、単子葉、双子葉のどの植物にもそれぞれのタイプの ACS が存在することから、ACS は少なくとも単子葉植物と双子葉植物が分化する以前に各グループを分化していたと考えられる。一方、リチャードミズワラビ (*Ceratopteris richardii*) から見出された *ETO1* に相同性を示す EST (GenBank accession No.

BE642306) は ETO1 ファミリーの TPR ドメインに相同性を示す部分配列であるが、開始コドンや BTB ドメインを含まないため、これが ETO1 と同じドメイン構造を持ち同等の機能を有するタンパク質をコードするかどうかは不明である。しかし、TPR ドメインにおいては SPINDLY などの他の TPR ドメインタンパク質よりも OsEOL2、LeEOL1、OsEOL3、ETO1 等の一連の ETO1 ファミリータンパク質と極めて高い相同性を示すことから、少なくともこのタンパク質は ETO1 ファミリーのひとつの祖先型タンパク質であると考えられる。このタンパク質は ACS 以外の基質を認識しこれを制御しているのであろうか、それとも未知の ACS と相互作用し、エチレン生合成の抑制に関与しているのであらうか。まもなく、シダ植物のイヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*) やコケ植物のヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) の全ゲノム配列が明らかになるという。こうした情報により、ACS ファミリータンパク質や ETO1 ファミリータンパク質の進化について、より詳細な理解が進むことを期待する。

6. 結語

なぜ植物は ETO1 ファミリータンパク質によってエチレン生合成を抑制する必要があるのだろうか。これまで繰り返し述べてきたように、植物は必要時にエチレンを合成する必要があるが、必要以上のエチレンは植物の生育を阻害するため、好ましくない。たとえば、発芽にとってエチレンは重要ではあるものの、*eto* 変異体の表現型は黄化苗で観察されるので、野生型の植物においてはエチレンの合成が ETO1 によって抑制されていることが分かる。過剰量のエチレンがあまりに長期間にわたって合成されれば、幼植物は通常は発芽以降に消失するはずの三重反応に類似した表現型を示し続け、生育が著しく阻害されるであらう。エチレンはまた、さまざまなストレスに応答する際にも重要であるが、不要時に合成されることはない。植物は生理的・生育的に不必要な状態においてエチレンを過剰に合成して生育障害を受けてしまうことを避け、必要な時にだけ必要量のエチレンを合成するために、ETO1 とタイプ 2 ACS のシステムや、MAP キナーゼとタイプ 1 ACS のシステムなどによる厳重なエチレン生合成制御系を進化させてきたのであろう。

謝辞

本論文を取りまとめるにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科教授長戸康郎博士にご指導とご校閲をいただいた。また、元東京大学大学院農学生命科学研究科教授武田元吉博士、元北海道農業試験場長稲葉忠興博士、同作物開発部長番場宏治博士、同地域基盤研究部長（現神戸大学遺伝子実験センター教授）大野清春博士、同地域基盤研究部長（現北海道大学大学院農学研究科教授）大澤勝次博士、同地域基盤研究部長（現筑波大学大学院生命環境科学研究科教授）奥野員敏博士、元中央農業総合研究センター北陸研究センター北陸地域基盤研究部長（現作物研究所所長）黒田秧博士、同北陸地域基盤研究部長（現中央農業総合研究センター研究管理監）田中宥司博士、同研究管理監寺島一男博士には終始ご指導と激励をいただいた。これらの方々に謹んで深く感謝の意を表する。

本研究は 1998 年～2004 年にペンシルベニア大学、北海道農業試験場（現北海道農業研究センター）、中央農業総合研究センター北陸研究センターにおいて行った。ソーク生物学区研究所教授（元ペンシルベニア大学生物学科教授）Joseph R. Ecker 博士には本研究を通じて適切なご指導を頂き、実験遂行の機会を与えられるとともに、そのための格別のご配慮を頂いた。また、元ペンシルベニア大学およびソーク研究所（現台湾中央研究院植物微生物学研究所）Kevin Long-Chi Wang 博士、元ペンシルベニア大学（現 INRA）Claire Lurin 博士、野菜茶業研究所永田雅靖博士、北海道農業研究センター斎藤浩二博士、中央農業総合研究センター北陸研究センター森浩一氏、同内田英史氏、台湾中央研究院植物微生物学研究所 Chia-Man Chang 氏には共同研究者として多くのご指導と有益なご助言を頂いた。名古屋大学大学院生命農学研究科森仁志教授にはトマト *ACS* 遺伝子の cDNA クローンを、中央農業総合研究センター北陸研究センター黒田昌治博士には植物形質転換用ベクターを分譲いただいた。また、元ペンシルベニア大学（現理化学研究所）平山隆志博士には *ETO1* 遺伝子マッピング用の交雑種子を分譲頂くとともに、研究を通じて貴重なご助言と温かい励ましを頂いた。これらの方々に心から感謝の意を表する。

北海道農業研究センター加藤明博士、元中央農業総合研究センター北陸研究センター（現作物研究所）芦川育夫博士、中央農業総合研究センター北陸研究

センター川田元滋博士、同矢頭治博士には本研究の機会を与えられるとともに、実験遂行のためのご配慮をいただいた。田淵宏朗氏、林敬子氏、大森伸之介氏、及川鉄男博士、木水真由美氏、松村葉子氏、姚善国博士ならびに元北海道農業試験場育種工学研究室、元中央農業総合研究センター北陸研究センター稲遺伝解析研究室、同稲組換え研究チームの職員の方々には同じ研究室・研究グループのメンバーとして多大なるご協力と暖かい励ましをいただいた。これらの方々に深く感謝する。

元北海道農業試験場藤井江梨子氏、野菜茶業研究所渡瀬智子氏、中央農業総合研究センター北陸研究センター横田恵美子氏、塚田久美子氏、小竹剛志氏、廣川誠氏、市橋正則氏には形質転換トマトおよびイネの作出、栽培および解析において、多大なるご協力とご指導を頂いた。また、本論文をとりまとめるにあたり、中央農業総合研究センター北陸研究センター稲遺伝子技術研究北陸サブチームの職員の方々には多大なるご協力をいただいた。

本研究はこれらの方々の暖かいご協力の賜である。ここに記して深く感謝する。

なお、*ETO1* 遺伝子のクローニングは科学技術庁長期在外研究員制度により、*ETO1* 導入トマトの解析の一部は農林水産省「組換えクローン」プロジェクトによって行った。

引用文献

- 1 Abel, S., Nguyen, M. D., Chow, W. and Theologis, A. 1995. *ACS4*, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin. *J Biol Chem* **270**: 19093-19099.
- 2 Adams, D. O. and Yang, S. F. 1977. Methionine metabolism in apple tissue: Implication of *S*-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiol* **60**: 892-896.
- 3 Adams, D. O. and Yang, S. F. 1979. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 170-174.
- 4 Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Ecker, J. R. 1999. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 2148-2152.
- 5 Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. and Ecker, J. R. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657.
- 6 Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Solano, R., Wisman, E., Ferrari, S., Ausubel, F. M. and Ecker, J. R. 2003. Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak

ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 2992-2997.

7 Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.

8 Arimura, G., Ozawa, R., Nishioka, T., Boland, W., Koch, T., Kuhnemann, F. and Takabayashi, J. 2002. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *Plant J* **29**: 87-98.

9 Arshad, M. and Frankenberger, W. T.: Ethylene, Agricultural Sources and Applications, pp. 36-50. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2002).

10 Arteca, J. M. and Arteca, R. N. 1999. A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS6) in mature *Arabidopsis* leaves. *Plant Mol Biol* **39**: 209-219.

11 Avni, A., Bailey, B. A., Mattoo, A. K. and Anderson, J. D. 1994. Induction of ethylene biosynthesis in *Nicotiana tabacum* by a *Trichoderma viride* xylanase is correlated to the accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase transcripts. *Plant Physiol* **106**: 1049-1055.

12 Barry, C. S., Fox, E. A., Yen, H., Lee, S., Ying, T., Grierson, D. and Giovannoni, J. J. 2001. Analysis of the ethylene response in the *epinastic* mutant of tomato. *Plant Physiol* **127**: 58-66.

13 Barry, C. S. and Giovannoni, J. J. 2006. Ripening in the tomato *Green-ripe* mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7923-7928.

- 14 **Barry, C. S., Llop-Tous, M. I. and Grierson, D.** 2000. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol* **123**: 979-986.
- 15 **Baskin, T. I. and Bivens, N. J.** 1995. Stimulation of radial expansion in arabidopsis roots by inhibitors of actomyosin and vesicle secretion but not by various inhibitors of metabolism. *Planta* **197**: 514-521.
- 16 **Baulcombe, D. C., Saunders, G. R., Bevan, M. W., Mayo, M. A. and Harrison, B. D.** 1989. Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* **321**: 446-449.
- 17 **Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F. and Giraudat, J.** 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* **12**: 1103-1115.
- 18 **Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G.** 1993. *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis* plants. *C R Acad Sci Paris Life Sci* **316**: 1194-1199.
- 19 **Bekman, E. P., Saibo, N. J., Di Cataldo, A., Regalado, A. P., Ricardo, C. P. and Rodrigues-Pousada, C.** 2000. Differential expression of four genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Lupinus albus* during germination, and in response to indole-3-acetic acid and wounding. *Planta* **211**: 663-672.
- 20 **Bell, C. J. and Ecker, J. R.** 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**: 137-144.
- 21 **Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S.** 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783-795.

- 22 **Bleecker, A. B., Estelle, M. A., Somerville, C. and Kende, H.** 1988. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **241**: 1086-1089.

- 23 **Bleecker, A. B. and Kende, H.** 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 1-18.

- 24 **Botella, M. A., Xu, Y., Prabha, T. N., Zhao, Y., Narasimhan, M. L., Wilson, K. A., Nielsen, S. S., Bressan, R. A. and Hasegawa, P. M.** 1996. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol* **112**: 1201-1210.

- 25 **Burg, S. P. and Burg, E. A.** 1966. Auxin-induced ethylene formation: its relation to flowering in the pineapple. *Science* **152**: 1269.

- 26 **Burg, S. P. and Burg, E. A.** 1967. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol* **42**: 144-152.

- 27 **Capitani, G., Hohenester, E., Feng, L., Storici, P., Kirsch, J. F. and Jansonius, J. N.** 1999. Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. *J Mol Biol* **294**: 745-756.

- 28 **Chace, E. M. and Denny, F. E.** 1924. Use of ethylene in the coloring of citrus fruit. *Industrial and Engineering Chemistry* **16**: 339-.

- 29 **Chae, H. S., Faure, F. and Kieber, J. J.** 2003. The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell* **15**: 545-559.

- 30 Chang, C., Kwok, S. F., Bleecker, A. B. and Meyerowitz, E. M. 1993. *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**: 539-544.
- 31 Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W. and Ecker, J. R. 1997. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* **89**: 1133-1144.
- 32 Chappell, J., Hahlbrock, K. and Boller, T. 1984. Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia lyase. *Planta* **161**: 475-480.
- 33 Chernys, J. and Kende, H. 1996. Ethylene biosynthesis in *Regnellidium diphyllum* and *Marsilea quadrifolia*. *Planta* **200**: 113-118.
- 34 Clark, D. G., Gubrium, E. K., Barrett, J. E., Nell, T. A. and Klee, H. J. 1999. Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiol* **121**: 53-60.
- 35 Collins, T., Stone, J. R. and Williams, A. J. 2001. All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. *Mol Cell Biol* **21**: 3609-3615.
- 36 Das, A. K., Cohen, P. W. and Barford, D. 1998. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* **17**: 1192-1199.
- 37 Dill, A., Thomas, S. G., Hu, J., Steber, C. M. and Sun, T. P. 2004. The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**: 1392-1405.
- 38 Dolan, L., Duckett, C., Grierson, C., Linstead, P., Schneider, K., Lawson,

E., Dean, C., Poethig, S. and Roberts, K. 1994. Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* **120**: 2465-2474.

39 Dong, J. G., Kim, W. T., Yip, W. K., Thompson, G. A., Li, L., Bennett, A. B. and Yang, S. F. 1991. Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. *Planta* **185**: 38-45.

40 Ecker, J. R. and Davis, R. W. 1987. Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 5202-5206.

41 El-Sharkawy, I., Jones, B., Gentzbittel, L., Lelievre, J.-M., Pech, J. C. and Latche, A. 2004. Differential regulation of ACC synthase genes in cold-dependent and -independent ripening in pear fruit. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1197-1210.

42 Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**: 1005-1016.

43 Emanuelsson, O., Nielsen, H. and von Heijne, G. 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* **8**: 978-984.

44 Felix, G., Grosskopf, D. G., Regenass, M., Basse, C. W. and Boller, T. 1991. Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells: Characterization and use as a bioassay for elicitor action. *Plant Physiol* **97**: 19-25.

45 Felix, G., Grosskopf, D. G., Regenass, M. and Boller, T. 1991. Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 8831-8834.

- 46 **Felix, G., Regenass, M., Spanu, P. and Boller, T.** 1994. The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins as revealed by pulse labeling with [³³P]phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 952-956.
- 47 **Fields, S. and Song, O.** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245–247.
- 48 **Fu, X., Richards, D. E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N. and Harberd, N. P.** 2004. The *Arabidopsis* mutant sleepy1^{gar2-1} protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**: 1406-1418.
- 49 **Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M.** 2000. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**: 393-404.
- 50 **Fujino, D. W., Burger, D. W., Yang, S. F. and Bradford, K. J.** 1988. Characterization of an ethylene overproducing mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cultivar VFN8). *Plant Physiol* **88**: 774-779.
- 51 **Furukawa, M., He, Y. J., Borchers, C. and Xiong, Y.** 2003. Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol* **5**: 1001-1007.
- 52 **Galil, J.** 1968. An ancient technique for ripening sycamore fruit in East-Mediterranean countries. *Econ Bot* **22**: 178-190.
- 53 **Gane, R.** 1934. Production of ethylene by some fruits. *Nature* **134**: 1008.
- 54 **Geyer, R., Wee, S., Anderson, S., Yates, J. and Wolf, D. A.** 2003.

BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* **12**: 783-790.

55 Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y. and McCourt, P. 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 1117-1126.

56 Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A. and Schiestl, R. H. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425.

57 Goehl, M. and Yanagida, M. 1991. The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem Sci* **16**: 173-177.

58 Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and Estelle, M. 2001. Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**: 271-276.

59 Guo, H. and Ecker, J. R. 2003. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF^{EBF1/EBF2}-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**: 667-677.

60 Guzman, P. and Ecker, J. R. 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* **2**: 513-523.

61 Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nurnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W. R. and Schmelzer, E. 1995. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4150-4157.

62 Hamilton, A. J., Lycett, G. W. and Grierson, D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* **346**: 284 - 287.

- 63 Hedrick, S. A., Bell, J. N., Boller, T. and Lamb, C. J. 1988. Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding, and infection. *Plant Physiol* **86**: 182-186.
- 64 Hellmann, H. and Estelle, M. 2002. Plant development: regulation by protein degradation. *Science* **297**: 793-797.
- 65 Hirayama, T. and Alonso, J. M. 2000. Ethylene captures a metal! Metal ions are involved in ethylene perception and signal transduction. *Plant Cell Physiol* **41**: 548-555.
- 66 Hirayama, T., Kieber, J. J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J. M., Dailey, W. P., Dancis, A. and Ecker, J. R. 1999. RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **97**: 383-393.
- 67 Hua, J., Chang, C., Sun, Q. and Meyerowitz, E. M. 1995. Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis ERS* gene. *Science* **269**: 1712-1714.
- 68 Hua, J. and Meyerowitz, E. M. 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**: 261-271.
- 69 Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q. G., Bleecker, A. B., Ecker, J. R. and Meyerowitz, E. M. 1998. *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1321-1332.
- 70 Huai, Q., Xia, Y., Chen, Y., Callahan, B., Li, N. and Ke, H. 2001. Crystal structures of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase in complex with aminoethoxyvinylglycine and pyridoxal-5'-phosphate provide new insight into catalytic mechanisms. *J Biol Chem* **276**: 38210-38216.

- 71 **Huang, F. C., Do, Y. Y. and Huang, P. L.** 2006. Genomic organization of a diverse ACC synthase gene family in banana and expression characteristics of the gene member involved in ripening of banana fruits. *J Agric Food Chem* **54**: 3859-3868.
- 72 **Itai, A., Kawata, T., Tanabe, K., Tamura, F., Uchiyama, M., Tomomitsu, M. and Shiraiwa, N.** 1999. Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase genes controlling the ethylene level of ripening fruit in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Mol Gen Genet* **261**: 42-49.
- 73 **Jackson, M. B. and Osborne, D. J.** 1970. Ethylene, the natural regulator of leaf abscission. *Nature* **225**: 1019-1022.
- 74 **Jackson, M. B. and Ram, P. C.** 2003. Physiological and molecular basis of susceptibility and tolerance of rice plants to complete submergence. *Ann Bot (Lond)* **91 Spec No**: 227-241.
- 75 **Kende, H.** 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 283-307.
- 76 **Kende, H., van der Knaap, E. and Cho, H. T.** 1998. Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. *Plant Physiol* **118**: 1105-1110.
- 77 **Kidd, F. and West, C.** 1924. The course of respiratory activity throughout the life of an apple. *Ann. Rept. Food Invest. Board, London* 27-32.
- 78 **Kidd, F. and West, C.** 1945. Respiratory activity and duration of life of apples gathered at different stages of development and subsequently maintained at a constant temperature. *Plant Physiol* **20**: 467-504.

- 79 Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A. and Ecker, J. R. 1993. *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**: 427-441.
- 80 Kim, C. Y., Liu, Y., Thorne, E. T., Yang, H., Fukushige, H., Gassmann, W., Hildebrand, D., Sharp, R. E. and Zhang, S. 2003. Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell* **15**: 2707-2718.
- 81 Kim, J. H., Cho, H. T. and Kende, H. 2000. Alpha-expansins in the semiaquatic ferns *Marsilea quadrifolia* and *Regnellidium diphyllum*: evolutionary aspects and physiological role in rachis elongation. *Planta* **212**: 85-92.
- 82 Klimyuk, V. I., Carroll, B. J., Thomas, C. M. and Jones, J. D. 1993. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *Plant J* **3**: 493-494.
- 83 Knight, L. I. and Crocker, W. 1913. Toxicity of smoke. *Bot Gaz* **55**: 337-371.
- 84 Kobe, B. and Kemp, B. E. 1999. Active site-directed protein regulation. *Nature* **402**: 373-376.
- 85 Konieczny, A. and Ausubel, F. M. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* **4**: 403-410.
- 86 Kozaka, T. and Teraoka, T. 1977. Ethylene evolution by rice plants infected with *Pyricularia oryzae* Cav. in relation to the stunting of diseased plants. *Ann Phytopath Soc Japan* **43**: 549-556.

- 87 Lamb, J. R., Tugendreich, S. and Hieter, P. 1995. Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* **20**: 257-259.
- 88 Langston, B. J., Bai, S. and Jones, M. L. 2005. Increases in DNA fragmentation and induction of a senescence-specific nuclease are delayed during corolla senescence in ethylene-insensitive (*etr1-1*) transgenic petunias. *J Exp Bot* **56**: 15-23.
- 89 Larsen, P. B. and Chang, C. 2001. The *Arabidopsis eer1* mutant has enhanced ethylene responses in the hypocotyl and stem. *Plant Physiol* **125**: 1061-1073.
- 90 Lelievre, J. M., Tichit, L., Dao, P., Fillion, L., Nam, Y. W., Pech, J. C. and Latche, A. 1997. Effects of chilling on the expression of ethylene biosynthetic genes in Passe-Crassane pear (*Pyrus communis* L.) fruits. *Plant Mol Biol* **33**: 847-855.
- 91 Li, H., Johnson, P., Stepanova, A., Alonso, J. M. and Ecker, J. R. 2004. Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **7**: 193-204.
- 92 Li, N. and Mattoo, A. K. 1994. Deletion of the carboxyl-terminal region of 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid synthase, a key protein in the biosynthesis of ethylene, results in catalytically hyperactive, monomeric enzyme. *J Biol Chem* **269**: 6908-6917.
- 93 Liang, X., Shen, N. F. and Theologis, A. 1996. Li⁺-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **10**: 1027-1036.
- 94 Lieberman, M., Kunishi, A., Mapson, L. W. and Wardale, D. A. 1966. Stimulation of ethylene production in apple tissue slices by methionine. *Plant Physiol* **41**: 376-382.

- 95 **Lincoln, J. E., Campbell, A. D., Oetiker, J., Rottmann, W. H., Oeller, P. W., Shen, N. F. and Theologis, A.** 1993. *LE-ACS4*, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Expression in *Escherichia coli*, structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis. *J Biol Chem* **268**: 19422-19430.
- 96 **Liu, Y. and Zhang, S.** 2004. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 3386-3399.
- 97 **Lizada, M. C. and Yang, S. F.** 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal Biochem* **100**: 140-145.
- 98 **Lupas, A.** 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**: 375-382.
- 99 **Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A. J., King, G. J., Giovannoni, J. J. and Seymour, G. B.** 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet* **38**: 948-952.
- 100 **Masucci, J. D. and Schiefelbein, J. W.** 1994. The *rh6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiol* **106**: 1335-1346.
- 101 **Matarasso, N., Schuster, S. and Avni, A.** 2005. A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression. *Plant Cell* **17**: 1205-1216.

- 102 **Mehta, P. K., Hale, T. I. and Christen, P.** 1993. Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur J Biochem* **214**: 549-561.
- 103 **Mergemann, H. and Sauter, M.** 2000. Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. *Plant Physiol* **124**: 609-614.
- 104 **Miyazaki, J. H. and Yang, S. F.** 1987. Metabolism of 5-methylthioribose to methionine. *Plant Physiol* **84**: 277-281.
- 105 **Mori, H., Nakagawa, N., Ono, T., Yamagishi, N. and Imaseki, H.:** Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. Kluwer Academic Publishers (1993).
- 106 **Nagata, M., Mori, H., Tabei, Y., Sato, T., Hirai, M. and Imaseki, H.** 1995. Modification of tomato fruit ripening by transformation with sense or antisense chimeric 1-aminocyclopropane-1 carboxylate synthase genes. *Acta Horticulture* **394**: 213-218.
- 107 **Nakai, K. and Horton, P.** 1999. PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**: 34-35.
- 108 **Nakano, R., Ogura, E., Kubo, Y. and Inaba, A.** 2003. Ethylene biosynthesis in detached young persimmon fruit is initiated in calyx and modulated by water loss from the fruit. *Plant Physiol* **131**: 276-286.
- 109 **Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y. and Inaba, A.** 1998. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol* **118**: 1295-1305.

- 110 Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J. and Pepper, A. E. 1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J* **14**: 387-392.
- 111 Neljubow, D. N. 1901. Über die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer Pflanzen. *Beitrage und Botanik Zentralblatt* **10**: 128–139.
- 112 Oeller, P. W., Lu, M. W., Taylor, L. P., Pike, D. A. and Theologis, A. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* **254**: 437-439.
- 113 Oetiker, J. H., Olson, D. C., Shiu, O. Y. and Yang, S. F. 1997. Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Mol Biol* **34**: 275-286.
- 114 Oikawa, T., Koshioka, M., Kojima, K., Yoshida, H. and Kawata, M. 2004. A role of *OsGA20ox1*, encoding an isoform of gibberellin 20-oxidase, for regulation of plant stature in rice. *Plant Mol Biol* **55**: 687-700.
- 115 Olmedo, G., Guo, H., Gregory, B. D., Nourizadeh, S. D., Aguilar-Henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P. and Ecker, J. R. 2006. *ETHYLENE-INSENSITIVE5* encodes a 5'→3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 13286-13293.
- 116 Olson, D. C., Oetiker, J. H. and Yang, S. F. 1995. Analysis of *LE-ACS3*, a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expressed during flooding in the roots of tomato plants. *J Biol Chem* **270**: 14056-14061.

- 117 Olson, D. C., White, J. A., Edelman, L., Harkins, R. N. and Kende, H. 1991. Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5340-5344.
- 118 Oraguzie, N. C., Iwanami, H., Soejima, J., Harada, T. and Hall, A. 2004. Inheritance of the *Md-ACS1* gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Theor Appl Genet* **108**: 1526-1533.
- 119 Osborne, D. J., Walters, J., Milborrow, B. V., Norville, A. and Stange, L. M. C. 1996. Evidence for a non-ACC ethylene biosynthesis pathway in lower plants. *Phytochemistry* **42**: 51-60.
- 120 Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Wei, N. and Deng, X. W. 2000. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**: 462-466.
- 121 Peck, S. C. and Kende, H. 1998. Differential regulation of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase in etiolated pea seedlings: effects of indole-3-acetic acid, wounding, and ethylene. *Plant Mol Biol* **38**: 977-982.
- 122 Peiser, G. and Yang, S. F. 1998. Evidence for 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid being the major conjugate of aminocyclopropane-1-carboxylic acid in tomato fruit. *Plant Physiol* **116**: 1527-1532.
- 123 Pintard, L., Willems, A. and Peter, M. 2004. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* **23**: 1681-1687.
- 124 Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J. L., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P. E., Tyers, M., Bowerman, B. and Peter, M. 2003. The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3

ubiquitin-ligase. *Nature* **425**: 311-316.

125 Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., Koncz, C. and Genschik, P. 2003. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* **115**: 679-689.

126 Potuschak, T., Vansiri, A., Binder, B. M., Lechner, E., Vierstra, R. D. and Genschik, P. 2006. The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3047-3057.

127 Resnick, J. S., Wen, C. K., Shockey, J. A. and Chang, C. 2006. *REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1*, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7917-7922.

128 Reynolds, E. A. and John, P. 2000. ACC oxidase is found in seedlings of two (Coniferales, Gnetales) of the four gymnosperm orders. *Physiol Plant* **110**: 38-41.

129 Rodriguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E. and Bleecker, A. B. 1999. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* **283**: 996-998.

130 Roje, S. 2006. S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* **67**: 1686-1698.

131 Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J. J., Rothenberg, M. and Ecker, J. R. 1995. Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics* **139**: 1393-1409.

132 Sakai, H., Hua, J., Chen, Q. G., Chang, C., Medrano, L. J., Bleecker, A.

B. and Meyerowitz, E. M. 1998. *ETR2* is an *ETR1*-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5812-5817.

133 Sasaki, K., Iwai, T., Hiraga, S., Kuroda, K., Seo, S., Mitsuhashi, I., Miyasaka, A., Iwano, M., Ito, H., Matsui, H. and Ohashi, Y. 2004. Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. *Plant Cell Physiol* **45**: 1442-1452.

134 Sato, T. and Theologis, A. 1989. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6621-6625.

135 Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U. and Moarefi, I. 2000. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**: 199-210.

136 Schneider, S., Buchert, M. and Hovens, C. M. 1996. An *in vitro* assay of beta-galactosidase from yeast. *Biotechniques* **20**: 960-962.

137 Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. and Ponting, C. P. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5857-5864.

138 Schumaker, K. S. and Gizinski, M. J. 1993. Cytokinin stimulates dihydropyridine-sensitive calcium uptake in moss protoplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10937-10941.

139 Shibuya, K., Barry, K. G., Ciardi, J. A., Loucas, H. M., Underwood, B. A., Nourizadeh, S., Ecker, J. R., Klee, H. J. and Clark, D. G. 2004. The central role of PhEIN2 in ethylene responses throughout plant development in petunia. *Plant Physiol* **136**: 2900-2912.

- 140 Shiu, O. Y., Oetiker, J. H., Yip, W. K. and Yang, S. F. 1998. The promoter of *LE-ACS7*, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato, is tagged by a *Sol3* transposon. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10334-10339.
- 141 Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q. and Ecker, J. R. 1998. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev* **12**: 3703-3714.
- 142 Spanu, P., Grosskopf, D. G., Felix, G. and Boller, T. 1994. The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Physiol* **106**: 529-535.
- 143 Staswick, P. E. and Tiryaki, I. 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2117-2127.
- 144 Stepanova, A. N., Hoyt, J. M., Hamilton, A. A. and Alonso, J. M. 2005. A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 2230-2242.
- 145 Sunako, T., Sakuraba, W., Senda, M., Akada, S., Ishikawa, R., Niizeki, M. and Harada, T. 1999. An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol* **119**: 1297-1304.
- 146 Tarun, A. S., Lee, J. S. and Theologis, A. 1998. Random mutagenesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase: a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9796-9801.

- 147 **Tarun, A. S. and Theologis, A.** 1998. Complementation analysis of mutants of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase reveals the enzyme is a dimer with shared active sites. *J Biol Chem* **273**: 12509-12514.
- 148 **Tatsuki, M. and Mori, H.** 2001. Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region. *J Biol Chem* **276**: 28051-28057.
- 149 **Thomann, A., Dieterle, M. and Genschik, P.** 2005. Plant CULLIN-based E3s: phytohormones come first. *FEBS Lett* **579**: 3239-3245.
- 150 **Thomas, R. J., Harrison, M. A., Taylor, J. and Kaufman, P. B.** 1983. Endogenous auxin and ethylene in *Pellia* (Bryophyta). *Plant Physiol* **73**: 395-397.
- 151 **Tigchelaar, E. C., Tomes, M., Kerr, E. and Barman, R.** 1973. A new fruit ripening mutant, *non-ripening* (*nor*). *Rep Tomato Genet Coop* **23**: 33.
- 152 **Trusov, Y. and Botella, J. R.** 2006. Silencing of the ACC synthase gene *ACACS2* causes delayed flowering in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. *J Exp Bot* **57**: 3953-3960.
- 153 **Tsuchisaka, A. and Theologis, A.** 2004. Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the *Arabidopsis* gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2275-2280.
- 154 **Tsuchisaka, A. and Theologis, A.** 2004. Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiol* **136**: 2982-3000.
- 155 **Van Der Straeten, D., Zhou, Z., Prinsen, E., Van Onckelen, H. A. and Van Montagu, M. C.** 2001. A comparative molecular-physiological study of

submergence response in lowland and deepwater rice. *Plant Physiol* **125**: 955-968.

156 van Loon, L. C., Geraats, B. P. and Linthorst, H. J. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **11**: 184-191.

157 Vogel, J. P., Schuerman, P., Woeste, K., Brandstatter, I. and Kieber, J. J. 1998a. Isolation and characterization of *Arabidopsis* mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics* **149**: 417-427.

158 Vogel, J. P., Woeste, K. E., Theologis, A. and Kieber, J. J. 1998b. Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene *ACS5* of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4766-4771.

159 Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W. and Giovannoni, J. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato *ripening-inhibitor* (*rin*) locus. *Science* **296**: 343-346.

160 Wang, K. L.-C., Li, H. and Ecker, J. R. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* **14**: S131-151.

161 Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Clark, D. G., Bleecker, A. B., Chang, C., Meyerowitz, E. M. and Klee, H. J. 1997. A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nat Biotechnol* **15**: 444-447.

162 Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Yen, H. C., Giovannoni, J. J. and Klee, H. J. 1995. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *never-ripe*. *Science* **270**: 1807-1809.

163 Woeste, K. E., Ye, C. and Kieber, J. J. 1999. Two *Arabidopsis* mutants

that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Plant Physiol* **119**: 521-530.

164 Xu, K., Xu, X., Fukao, T., Canlas, P., Maghirang-Rodriguez, R., Heuer, S., Ismail, A. M., Bailey-Serres, J., Ronald, P. C. and Mackill, D. J. 2006. *Sub1A* is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* **442**: 705-708.

165 Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T. H., Vidal, M., Elledge, S. J. and Harper, J. W. 2003. BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* **425**: 316-321.

166 Yamada, K., Lim, J., Dale, J. M., Chen, H., Shinn, P., Palm, C. J., Southwick, A. M., Wu, H. C., Kim, C., Nguyen, M., Pham, P., Cheuk, R., Karlin-Newmann, G., Liu, S. X., Lam, B., Sakano, H., Wu, T., Yu, G., Miranda, M., Quach, H. L., Tripp, M., Chang, C. H., Lee, J. M., Toriumi, M., Chan, M. M., Tang, C. C., Onodera, C. S., Deng, J. M., Akiyama, K., Ansari, Y., Arakawa, T., Banh, J., Banno, F., Bowser, L., Brooks, S., Carninci, P., Chao, Q., Choy, N., Enju, A., Goldsmith, A. D., Gurjal, M., Hansen, N. F., Hayashizaki, Y., Johnson-Hopson, C., Hsuan, V. W., Iida, K., Karnes, M., Khan, S., Koesema, E., Ishida, J., Jiang, P. X., Jones, T., Kawai, J., Kamiya, A., Meyers, C., Nakajima, M., Narusaka, M., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Tamse, R., Vaysberg, M., Wallender, E. K., Wong, C., Yamamura, Y., Yuan, S., Shinozaki, K., Davis, R. W., Theologis, A. and Ecker, J. R. 2003. Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome. *Science* **302**: 842-846.

167 Yamagami, T., Tsuchisaka, A., Yamada, K., Haddon, W. F., Harden, L. A. and Theologis, A. 2003. Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the *Arabidopsis* gene family. *J Biol Chem* **278**: 49102-49112.

- 168 Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K. and Yokoyama, S. 2005. Solution structure of the major DNA-binding domain of *Arabidopsis thaliana* ethylene-insensitive3-like3. *J Mol Biol* **348**: 253-264.
- 169 Yang, S. F. and Hoffman, N. E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* **35**: 155-189.
- 170 Yip, W. K., Moore, T. and Yang, S. F. 1992. Differential accumulation of transcripts for four tomato 1-aminocyclopropane-1- carboxylate synthase homologs under various conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2475-2479.
- 171 Zaat, S. A. J., Brussel, A. A. N., Tak, T., Lugtenberg, B. J. J. and Kijne, J. W. 1989. The ethylene-inhibitor aminoethoxyvinylglycine restores normal nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar. viciae on *Vicia sativa* subsp. nigra by suppressing the 'Thick and short roots' phenotype. *Planta* **177**: 141-150.
- 172 Zacarias, L. and Reid, M. S. 1990. Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol Plant* **80**: 549-554.
- 173 Zarembinski, T. I. and Theologis, A. 1993. Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Biol Cell* **4**: 363-373.
- 174 Zarembinski, T. I. and Theologis, A. 1994. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Mol Biol* **26**: 1579-1597.

摘要

エチレンは果実の成熟や病原菌感染応答などの形質を制御する重要な植物ホルモンのひとつである。エチレンの前駆体である 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) の合成反応がエチレン生合成の律速段階となっているが、この反応を触媒する ACC 合成酵素 (ACS) は、遺伝子の転写時だけでなく、その転写後においても制御を受けることが知られている。シロイヌナズナにおいては、現在 3 つのエチレン過剰合成変異体 *eto1*, *2*, *3* (*ethylene-overproducer1*, *2*, *3*) が報告されており、*ETO2* 遺伝子は ACS アイソフォームのひとつ AtACS5 を、*ETO3* 遺伝子は AtACS9 をコードし、いずれもカルボキシ末端 (C 末端) 領域における変異がエチレン過剰合成の原因である。*eto2-1* および *eto1* 変異体において AtACS5 タンパク質が過剰に蓄積することから、AtACS5 の C 末端領域が *ETO1* およびプロテアソームを介した制御系の標的部位であることが示唆されている。一方、*eto1* は劣性突然変異体であり、*ETO1* 遺伝子はエチレン生合成の負の制御因子と考えられるが、その機能の詳細は不明である。そこで、本研究においてはシロイヌナズナのエチレン過剰合成変異体 *eto1* から原因遺伝子を単離し、分子遺伝学および生化学的手法によってイネやトマトを含む高等植物における ACC 合成酵素の転写後制御機構を明らかにすることを目的とした。

1. シロイヌナズナのエチレン生合成を抑制する *ETO1* 遺伝子の解析

マップベースクローニングにより *ETO1* 遺伝子を単離したところ、*ETO1* はアミノ末端 (N 末端) 側に BTB、C 末端側に TPR および coiled-coil (CC) という 3 種類のタンパク質間相互作用モチーフを持つ新規のタンパク質をコードしていた。シロイヌナズナのゲノム中には 2 つの *ETO1* パラログ *EOL1* (*ETO1-LIKE1*) および *EOL2* が存在していた。また、*ETO1* と相同な配列は他の植物種にも広く見出されたが、動物や微生物などには存在せず、*ETO1* は植物に固有のタンパク質であると考えられた。*eto1* 変異体の 9 つのアリルのうち、7 つで TPR ドメインの欠失もしくはアミノ酸置換が起きており、TPR ドメインが *ETO1* タンパク質の機能に必須であることが示唆された。

yeast two-hybrid 法、*in vitro* pull-down 法、免疫共沈降法による解析の結果、*ETO1* と AtACS5 は直接相互作用し、*eto1-1* 変異を模倣した *ETO1* の C 末端の

TPR モチーフの欠失、あるいは *eto2-1* 変異を模倣した AtACS5 の C 末端 12 アミノ酸の欠失によって、この相互作用は消失することがわかった。さらに、*ETO1* と *AtACS5* の両遺伝子に loss-of-function 変異を持つ二重突然変異体 *eto1 eto2-2* は、エチレン過剰合成の表現型を示さなかったため、*eto1* 変異体のエチレン過剰合成には AtACS5 の活性が必要であると考えられ、植物体内における ETO1 と AtACS5 との相互作用が支持された。

ACC 要求性の大腸菌株における発現系および *in vitro* 酵素アッセイを用いて、AtACS5 の酵素活性に対する ETO1 ファミリータンパク質の影響を調べたところ、ETO1 ファミリータンパク質は直接の相互作用を介して AtACS5 の酵素活性を阻害することがわかった。このことは ETO1 を過剰発現する形質転換シロイヌナズナにおいて AtACS5 によるエチレン生合成が抑制されたことによって支持された。

一方、植物細胞内における AtACS5 タンパク質の蓄積量は、*eto1* 変異、AtACS5 の C 末端 12 アミノ酸の欠失、プロテアソーム阻害剤処理によって増加し、ETO1 の高発現によって減少した。さらに、*in vitro* pull-down 法による解析の結果、ETO1 の BTB ドメインは E3 ユビキチンリガーゼの構成因子である CUL3 と特異的に相互作用した。これらのことから、ETO1 は AtACS5 を E3 ユビキチンリガーゼへと導き、分解を促進する基質特異的アダプタータンパク質として機能すると考えられた。

以上の一連の結果より、ETO1 ファミリータンパク質は、AtACS5 の酵素活性を直接阻害するとともにプロテアソーム依存的タンパク質分解系へと導く、という 2 つの機能によって、高等植物のエチレン生合成を転写後レベルで制御することが明らかとなった。

2. トマトにおける ETO1 ファミリータンパク質の機能解析

yeast two-hybrid 法により、シロイヌナズナの ETO1 とトマトの 3 つの ACS アイソフォームとの相互作用を解析したところ、果実の主要 ACS である LE-ACS2、LE-ACS4 とは相互作用しなかったが、オーキシン誘導性の LE-ACS3 とは強く相互作用した。そこで、シロイヌナズナおよびトマトの既知の ACS アイソフォームについて ETO1 の標的部位と考えられる C 末端のアミノ酸配列を比較したところ、その構造によって 3 つのタイプに分類でき、ETO1 と相互作用する AtACS5 および LE-ACS3 はいずれも特異的な C 末端アミノ酸配列を持

つタイプ2に属していた。一方、ETO1と相互作用しなかったLE-ACS2はタイプ1に、LE-ACS4はタイプ3に分類された。

ETO1と相互作用するLE-ACS3および相互作用しないLE-ACS2の間でキメラタンパク質を作出し、yeast two-hybrid法によってETO1との相互作用を解析したところ、ETO1との相互作用にはWVFモチーフ、RLSFモチーフ、およびR/D/Eリッチ領域からなるタイプ2 ACS特異的なC末端配列が必要であることがわかった。

さらに、トマトにおけるETO1ファミリータンパク質の機能を明らかにするため、トマトの*ETO1*オルソログである*LeEOL1*のcDNAを単離した。*LeEOL1*はETO1と同様にN末端側にBTB、C末端側にTPRおよびCCモチーフを持っており、ETO1と同様にエチレン生合成を抑制する機能を持つことが強く示唆された。RT-PCR解析の結果、*LeEOL1*は新鮮な葉、老化葉、茎、根および花で発現していたが、蕾では発現レベルが極めて低かった。果実の成育過程においては、*LeEOL1*はクリマクテリックなエチレン生合成量が急速に低下していく「full-ripe」ステージで発現していたが、それ以前の「immature green」、「mature green」、「turning」、「pink」、「red」の各ステージでは発現が検出されず、*LeEOL1*がトマト果実の成熟時におけるエチレン生合成の制御に関わっている可能性が示唆された。

yeast two-hybrid法による解析の結果、*LeEOL1*もETO1と同様にタイプ2 ACSと特異的に相互作用し、その相互作用にもタイプ2 ACS特異的なC末端配列が必要であったため、この配列をTOE (target of *ETO1*) 配列と名付けた。

シロイヌナズナの*ETO1*遺伝子をトマトで過剰発現させたところ、果実形質に顕著な変化は見られなかったのに対し、オーキシシン処理した幼苗においては*LE-ACS3* mRNAの転写が野生型と同程度に誘導されたにも関わらず、エチレン生合成量が減少した。このことから、ETO1がLE-ACS3を転写後レベルで抑制することがわかった。

以上の結果から、ETO1ファミリータンパク質はトマトにおいても特異的にタイプ2 ACSを転写後レベルで抑制すると考えられた。

3. ETO1ファミリータンパク質の標的配列の解析

シグナル配列としてのTOEの普遍的な機能を明らかにするため、トマトのLE-ACS3由来のTOEをGFPに連結してイネカルスに導入したところ、GFP

による蛍光が消失した。*GFP-TOE* 導入カルスと野生型 *GFP* 導入カルスとで mRNA およびタンパク質の蓄積量を比較した結果、TOE の付加によって GFP タンパク質の蓄積量が低下したことが蛍光消失の原因であることがわかった。イネの OsACS1 由来の TOE を付加した場合にも GFP による蛍光が消失したことから、TOE は高等植物に普遍的なタンパク質分解シグナルとして機能すると考えられた。

GFP-TOE を *eto1* 変異体で発現させたところ、蛍光が観察されたことから、野生型植物においては GFP-TOE は ETO1 の機能によって分解されたものと考えられた。また、GFP-TOE を過剰発現する植物体をプロテアソーム阻害剤で処理すると、やはり蛍光が観察されたことから、この分解はプロテアソームによって触媒されていると考えられた。

以上の結果から、広く高等植物において ETO1 ファミリータンパク質は TOE 配列を持つタンパク質を認識し、プロテアソームに導くことによってその分解を促進することがわかった。

以上、本研究は、エチレン過剰合成変異体を用いた分子遺伝学および生化学的解析を行い、ETO1 ファミリータンパク質によるエチレン生合成系酵素 ACS の転写後制御機構を明らかにしたものである。