

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成23年度博士課程 進学
氏名 森本 恭子
指導教員名 篠崎 和子

論文題目

シロイヌナズナの環境ストレス誘導性転写因子 DREB2A の活性制御機構の解析
および新規相互作用因子の同定

第 I 章 序論

シロイヌナズナの転写因子 DREB2A (dehydration-responsive element-binding protein 2A) は、乾燥および高温ストレス応答の初期段階から、認識配列である DRE (dehydration-responsive element) を介してそれぞれのストレスに特異的な下流遺伝子群の転写を活性化し、ストレス耐性の獲得に寄与している。DREB2A 遺伝子の機能発現は転写段階に加えて翻訳後段階でも制御されており、これまでに、乾燥および高温ストレス下において、それぞれのストレスに特異的な上流の転写因子によりその発現が誘導されること、および通常条件下において、ユビキチン-プロテアソーム系によって DREB2A タンパク質が選択的に分解される負の制御機構が存在することが示されている。ストレス下における DREB2A の翻訳後の活性制御については、植物体に導入した GFP 融合 DREB2A の蛍光が強く観察されることなどから安定性が向上することが示唆されているが、どのような機構で制御されているのかは明らかにされていない。

った。

本研究では転写因子である DREB2A が、ストレス条件下で標的遺伝子の転写を活性化するための翻訳後の制御機構について、DREB2A の安定化と活性化の二つの制御機構を想定し、DREB2A の蓄積量と標的遺伝子の発現量の両方について解析することによってその関与を明らかにすることを目指した。また、DREB2A が関与する転写制御機構をより詳細に解明するためには、DREB2A の新規相互作用因子を同定する必要があると考え、LC-MS/MS (液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリー) を用いた DREB2A タンパク質複合体解析による相互作用因子の新たなスクリーニング系の確立を目指した。

第 II 章 シロイヌナズナの転写因子 DREB2A の環境ストレスに応答した安定化と活性化に関する解析

野生型シロイヌナズナ植物体において、内在性 DREB2A の蓄積パターンを調べるために、抗 DREB2A 抗体を用いたイムノブロット解析を行ったところ、乾燥ストレス下と高温ストレス下とでは DREB2A の蓄積パターンが異なっていることを見いだした。また、このタンパク質レベルの相違は、*DREB2A* mRNA の誘導性とストレス特異的な DREB2A タンパク質の安定化の両方を合わせた結果であると考えられた。また、核移行シグナルを欠失させた変異型 DREB2A を用いて、DREB2A の局在と安定性の関係について解析したところ、核移行にともなって DREB2A の分解がおこることが示された。また、DREB2A は、ストレスの有無にかかわらず 26S プロテアソーム系により選択的に分解されることが明らかになった。次に DREB2A の分解系で働くことが示されている E3 ユビキチン連結酵素をコードする *DRIP* 遺伝子の欠損変異体を用いて DREB2A の蓄積量を解析し、通常条件下に加えてストレス下の分解制御にも DRIP が関与していることを示した。また、高温ストレスによる遺伝子発現のうち、少なくとも後期においては、DREB2A の分解に関わる別の E3 ユビキチン連結酵素が存在する可能性が示唆された。一方、変異体に GFP 融合型の DREB2A を導入した植物体 (*GFP-DREB2A/dreb2a*) において、乾燥と高温の両方のストレス下での GFP-DREB2A タンパク質の蓄積量と標的遺伝子の発現量との関係について解析し、両者の間には相関関係があり、DREB2A の蓄積量が標的遺伝子の発現量に影響することを明らかにした。さらに、DREB2A タンパク質が安定化するだけで標的遺伝子の転写活性化に十分なのか、それとも別にストレス時特異的な DREB2A の活性化機構が存在するのかを解明する

ために、通常条件下でプロテアソーム阻害剤処理を行い、DREB2A の蓄積量と標的遺伝子の発現量を調べたところ、DREB2A が蓄積しただけでは標的遺伝子の転写はおこらなかった。プロテアソーム阻害剤処理と同時に、高温ストレスを付与すると標的遺伝子の転写が活性化されたことから、標的遺伝子の転写活性化には DREB2A が蓄積するだけでは不十分であり、安定化とは別に活性化の機構が存在する可能性が示唆された。

第 III 章 DREB2A タンパク質複合体解析による新規相互作用因子の単離・同定

シロイヌナズナ植物体から DREB2A タンパク質複合体をアフィニティー精製し、LC-MS/MS 解析に供することで、DREB2A の新規相互作用因子を単離・同定した。この方法でスクリーニングを行うにあたって、転写因子である DREB2A をベイトとして用いることは、植物体における発現量が相対的に低いことため困難であり、スクリーニング系の最適化のために様々な条件検討を要した。細胞分画による核精製、タンパク質複合体を維持したまま精製するためのクロスリンク処理、DREB2A タンパク質複合体の可溶化などを検討した。これらの検討結果を活用した方法で解析したところ、MG132 存在下で高温処理を行った植物体から DREB2A の相互作用因子の候補として、新規の E3 ユビキチン連結酵素など数種のタンパク質が同定された。酵母のツーハイブリッド法により相互作用を検証したところ、このうち 4 種のタンパク質に関して DREB2A との相互作用が確認された。この 4 種のタンパク質は、2 つずつが互いに相同性を示すタンパク質であった。興味深いことに、いずれもこれまで酵母のツーハイブリッドスクリーニングで用いられてきた DREB2A のアミノ末端側断片（開始コドンから 205 残基目までの領域）には相互作用を示さず、負の制御領域であるとして同定されている NRD (negative regulatory domain) 以降のカルボキシル末端側の領域を認識することが明らかになった。また、シロイヌナズナの葉肉細胞を用いた BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) 解析の結果から、2 種類の相同タンパク質のうちそれぞれ 1 つずつは DREB2A と核において相互作用することが確認された。さらに、葉肉細胞中で相互作用を示したタンパク質のうち、1 つの候補タンパク質に関して遺伝子欠損変異体入手して解析したところ、乾燥および高温ストレス下における DREB2A の蓄積量が、野生型と比較して顕著に増加することが明らかになった。したがって、この相互作用タンパク質は DREB2A の安定化を負に制御する機能を持つ可能性が示唆された。

第 IV 章 総括

本研究により、DREB2A による標的遺伝子の発現制御機構は、DREB2A の転写段階の制御に加えて、翻訳後段階の制御が鍵を握っていることが、改めて浮き彫りになった。DREB2A の翻訳後制御には、安定化と活性化の要素が存在し、さらにストレスの種類によってこれらの制御機構が異なっている可能性が考えられた。このように DREB2A の活性化はきわめて複雑な機構によって制御されていることが推察された。

これまでに、NRD を欠失させることによって恒常的な活性型に変換された DREB2A CA (constitutive active form of DREB2A) の過剰発現体が、乾燥や高温ストレスに対して、高い耐性を示す一方で、生育が強く抑制されることが報告されている。これらの結果から、DREB2A 遺伝子の機能発現を微調整する複雑な制御機構が存在することは、植物の環境ストレス下における耐性の獲得と生長制御においてきわめて重要であると推察される。DREB2A は転写因子として環境ストレス時に素早く活性化して標的遺伝子を誘導する役割を持つと同時に、ストレスが解除されたときには分解によって迅速に不活性化することで、刻々と変化する水分環境や温度環境に応じた遺伝子発現の調節を可能にしているのかもしれない。実際に、今回 LC-MS/MS を用いて行った DREB2A タンパク質複合体解析から、ストレスを受けた細胞において DREB2A が受ける複雑な翻訳後制御には、多様なタンパク質-タンパク質間相互作用が関与していることが示唆された。DREB2A の転写調節機構を解明する研究は、過酷な環境ストレス下で、植物が如何にして環境ストレス耐性を獲得するのかを解明する端緒となると考えられる。一方、今日では地球温暖化等の進行に伴い干ばつや熱波による農業被害の報告が急増している。乾燥および高温ストレス応答と耐性の獲得機構において重要な機能をもつ DREB2A に関する研究は、環境ストレス耐性作物の分子育種技術の開発においても役立てていけると期待される。

発表論文

Morimoto, K., Mizoi, J., Qin, F., Kim, J-K., Sato, H., Osakabe, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. Stabilization of *Arabidopsis* DREB2A is required but not sufficient for the induction of target genes under conditions of stress. PLOS ONE, (印刷中)