

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 森本 恭子

シロイヌナズナの転写因子 DREB2A は、乾燥及び高温ストレス応答の初期段階から、認識配列である DRE を介して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翻訳後段階でも制御されており、ストレス下において転写が誘導されること、及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る選択的分解を受けることが示されている。しかし、ストレス下における DREB2A の翻訳後制御については明らかにされていなかった。

本研究では DREB2A の翻訳後の活性制御について、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旨とした。また、LC-MS/MS 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。

本研究の背景と目的を述べた第 I 章に続き、第 II 章では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を行った。野生型シロイヌナズナにおいて、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い、乾燥ストレス下と高温ストレス下とでは蓄積パターンが異なっていること、及びその相違は、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ことを見出した。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、核移行に伴って DREB2A の分解が起こることを示した。また、DREB2A はストレス下でもプロテアソーム系により分解されることが明らかになった。DREB2A の分解系で働くユビキチン連結酵素 DRIP の欠損変異体を用いて DREB2A の蓄積量を解析したところ、ストレス下の分解制御にも DRIP が関与するが別のユビキチン連結酵素も関与することが示唆された。一方、DREB2A の欠損変異体に GFP 融合 DREB2A を導入した植物体を用いて、ストレス下での GFP-DREB2A 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。さらに通常条件下でプロテアソーム阻害剤処理を行った植物体を解析し、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された。

第 III 章では LC-MS/MS を用いて DREB2A タンパク質の複合体解析により新規相互作用因子の単離・同定を目指した。スクリーニング系の最適化のために、細胞分画による核精製、クロスリンク処理、可溶化など様々な条件検討を行った。これらを活か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 の相互作用因子として既知の RCD1 及び SRO1 に加えて、新たにユビキチン連結酵素 BPM2 及び BPM4 が同定された。シロイヌナズナの葉肉細胞を用いた BiFC 解析により、RCD1 と BPM2 が DREB2A と核において相互作用することが確認された。RCD1 の欠損変異体入手して解析したところ、乾燥及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示された。一方、酵母のツーハイブリッド法により BPM2 の DREB2A 上の相互作用領域を解析したところ、負の制御領域 (NRD) と NRD 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。したがって、RCD1 及び BPM2 は DREB2A の安定性を負に制御する機能を持つ可能性が示唆された。

第 IV 章では本論文の総括を述べた。DREB2A の関与する転写制御機構は、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と考えられた。DREB2A の翻訳後制御には、安定化と活性化が存在する可能性が示され、DREB2A の機能発現を微調整する複雑な機構が存在することは、植物の環境ストレス耐性獲得と生長制御において重要であると推察された。

以上、本研究は、植物の乾燥及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 の複雑な翻訳後制御を明らかにした研究であり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。