

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 劉 華

三量体 G タンパク質 (以下 G タンパク質。G α 、G β 、G γ のサブユニットから構成される) は真核生物に保存された、細胞内信号伝達に関わるタンパク質である。G タンパク質に関する研究は動物において先行しているが、動植物間でのゲノム情報を比較すると、G タンパク質介在性信号伝達に関わる因子の数や種類には違いが見られる。このことから、よく調べられた動物のものとは異なる、植物独自の G タンパク質介在性信号伝達の機構が存在する可能性が想定される。シロイヌナズナの G β サブユニット (AGB1) の欠損変異体は野生型との表現型の違いが顕著であり、AGB1 は重要な生理機能を持つと考えられる。このことから申請者は AGB1 の相互作用因子に着目して解析を行い、植物の G タンパク質介在性信号伝達経路の一端を解明することを目指した。

第 1 章の緒論では、研究の背景、意義と目的について述べた。

第 2 章では、ヒトの RBM22 と相同性の高い AtRBM22 の核スペckル(nuclear speckle) への移行に関して検討した。

RBM22 は RNA 結合配列を持ち、pre-mRNA のスプライシング因子として機能することが明らかにされている。AtRBM22 は RBM22 と相同性が高く、RNA 結合配列を持つ。酵母ツーハイブリッド法により AGB1 の物理的相互作用因子を探索したところ、AtRBM22 が酵母細胞内で AGB1 と相互作用することを見出した。更に、共免疫沈降法 (Co-immunoprecipitation : Co-IP) と二分子蛍光相補法 (BiFC) により、*in vitro* 及び植物細胞での AGB1 と AtRBM22 との相互作用を確認した。AtRBM22 が細胞内でどこに存在するか解析した結果、核に局在することがわかったが、核内全体に一樣に分布する場合 (P1) と、核スペckルに存在する場合 (P2) の 2 種類のパターンがあることが明らかになった。BiFC では AGB1 と AtRBM22 との相互作用シグナルが核スペckルに検出されること、AGB1 と AtRBM22 とをタマネギ細胞に共導入した時に P2 の割合が増えることから、AGB1 は AtRBM22 の核スペckルへの移行に関与することが示唆された。また、AtRBM22 と相同性の高い F16P2 も AGB1 と核スペckルにおいて相互作用を持つことも分かった。さらに AtRBM22 を bait とした酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより単離した Ntf2 および RBE も核スペckルにおいて AtRBM22 と相互作用を持つことを明らかにし、AtRBM22 の核スペckルへの移行に必要な領域について検討した。

第 3 章では、AtRBM22 の欠失シロイヌナズナ系統および AtRBM22 を過剰に発現する形質転換シロイヌナズナを用いて、シロイヌナズナ植物体の成育における AtRBM22 の機能

について検討した。

AtRBM22 プロモーターの制御下にある GUS 遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを用いて、AtRBM22 の植物体内の発現部位について解析した。GUS の染色は葯および花粉において非常に強く観察された。AtRBM22 の欠失シロイヌナズナ系統 (*atrbm22*) では、野生型と比較して発生する葉数が少なく開花期が早くなり鞘の長さも短くなった。一方 AtRBM22 を過剰に発現する形質転換シロイヌナズナ (AtRBM22OE) では、著しく矮性になり、花卉、雄蕊、雌蕊が短くなるなど花型の異常が認められた。また鞘の長さも短くなった。また *atrbm22* と AtRBM22OE はともにアブシシン酸 (ABA) に対する感受性が低くなること、AtRBM22OE の耐塩性が低下することも明らかになった。

第 4 章ではタイプ 2C のタンパク質脱リン酸化酵素である AtPP2C52 に関する解析を行った。

AtPP2C52 も酵母ツーハイブリッド法により AGB1 と酵母細胞内で AGB1 と相互作用することを見出した。GST プルダウン解析と BiFC により、*in vitro* 及び植物細胞での AGB1 と AtPP2C52 との相互作用を確認した。また BiFC のシグナルが細胞膜に特異的に検出されることから、AGB1 と AtPP2C52 とは細胞膜において相互作用を持つことも明らかになった。AtPP2C52 の予想アミノ酸配列から AtPP2C52 は N 末端がミリストイル化 (myristoylation) されていることが予想された。ミリストイル化部位のアミノ酸を置換したところ、細胞膜への局在性が失われたため、ミリストイル化された N 末端を介して AtPP2C52 は細胞膜へ局在することが明らかになった。AGB1 と AtPP2C52 との相互作用部位については AtPP2C52 への部位特異的変異導入実験により明らかにした。また、AtPP2C52 の基質に関する知見を得るために AtPP2C52 を bait とした酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、AtPP2C52 と相互作用するタンパク質を多数同定した。

以上のように、本研究ではヘテロ三量体 G タンパク質 β サブユニット AGB1 の物理的相互作用因子について詳細な解析を行い、AtRBM22 と AtPP2C52 の機能について極めて興味深い結果を得た。本研究で得られた成果は、植物の環境応答を理解する上で非常に重要であり、学術上、応用上貢献することが少なくない。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。