

論文内容の要旨

申請者氏名 田村 泰造

道管は水の輸送を担う通水組織であり、その分化過程は二次壁肥厚と、プログラム細胞死に大別される。シロイヌナズナにおけるこの2つの素過程は、NAC型転写制御因子 VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN (VND) 1~VND7により制御されており、中でも VND7 はとくに強い道管細胞分化誘導能を持つこと、全ての道管細胞で発現が見られることなどから、集中的に解析が進められてきた。とくに、VND7 を起点とした道管細胞分化における転写制御機構の解析が進んでおり、道管分化時に特徴的に発現する二次細胞壁形成とプログラム細胞死に関連する遺伝子のプロモーター上の共通配列として TERE (11 bp) が、VND7 およびそのホモログを含む NAC 型転写制御因子が直接的に結合するプロモーターのコンセンサス配列として SNBE (19 bp) が同定された。さらに、VND7 の直接標的遺伝子である *XCP1* 遺伝子プロモーター上の X1E1 領域 (53 bp) に VND7 が直接結合することが示されている。TERE は SNBE に内包され、いずれも X1E1 上に存在することから、VND7 がこの配列を介して道管細胞特異的発現を制御していることが示唆されたが、その詳細は不明であった。

本研究ではまず、前述の *XCP1* X1E1 領域内の VND7 の結合配列を同定した。本研究では、ゲルシフト解析などの従来からの定性的なシス同定法に加え、蛍光相関分光法 (FCS) に基づく定量的な分子間相互作用解析により、一塩基レベルで X1E1 上の配列と VND7 間の結合親和性を定量評価し、結合に寄与する塩基を高解像度で同定した。その結果、VND7 は X1E1 上の 18 bp からなる配列 (CTTTGCTTCAAAGCCAAT; X1E1-18bp) に対して高い結合親和性をもつことが示された。次に、SELEX 法によって VND7 の結合配列を探索した。そして、前述の TERE と SNBE とともに、X1E1-18bp 配列と比較することで、VND7 が X1E1 上の 2 セットのパリンδροーム構造 CTTNNNNNNNAAG に高い親和性で結合する可能性、そして、VND7 が CTTNNNNNNNA 配列を強く認識する可能性を見出した。さらに、これらの配列に塩基置換を行った *XCP1* プロモーターを用いて、シロイヌナズナ培養細胞での一過的発現解析およびシロイヌナズナ植物体での GUS レポーター発現解析を行うことで、これらの配列が植物細胞と植物体でも道管細胞分化特異的な発現に重要であることを示した。さらに、CTTNNNNNNNA 配列をヒメツリガネゴケの *XCP1* ホモログ遺伝子のプロモーターが持つことを示した。そして、これらの結果と既知の NAC 型転写制御因子の結合配列解析とタンパク質構造解析の知見とをもとに、X1E1 上では、4 分子の VND7 が 2 つのホモダイマーを形成して 2 セットの CTTNNNNNNNA 配列に結合するとのモデルを提唱した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 田村 泰造

道管細胞の分化は、NAC型転写制御因子 VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN (VND) 1~VND7により制御されている。これまでの研究から、VND7が道管細胞分化時に特徴的に発現する遺伝子群のプロモーター上のコンセンサス共通配列 TERE (11 bp) および SNBE (19 bp) に結合すること、VND7の直接標的遺伝子である *XCP1* 遺伝子プロモーター上の X1E1 領域 (53 bp) に VND7 が直接結合することが示されているが、詳細な結合配列と結合様式については不明であった。

申請者は本研究において、この点を明らかにするために、主に蛍光相関分光法 (FCS) を用いた結合親和性解析を行い、以下の成果を得た。

1. FCS法に基づく定量的な分子間相互作用解析により、一塩基レベルで X1E1 上の配列と VND7 間の結合親和性を定量評価することで、VND7 が X1E1 上の 18 bp からなる配列 (CTTTGCTTCAAAGCCAAT; X1E1-18bp) に対して高い結合親和性をもつことを示した。
2. SELEX法によって VND7 の結合配列を探索することで、18 bp のコンセンサス配列 C(G/T)TNNNNNTNA(C/A)GNNNNN を見出した。そして、前述の TERE と SNBE とともに、X1E1-18bp 配列と比較することで、VND7 が X1E1 上の 2 セットのパリンドローム構造 CTTNNNNNNNAAG に高い親和性で結合する可能性、そして、VND7 が CTTNNNNNNNA 配列を強く認識する可能性を示した。
3. 上記の配列に塩基置換を行った *XCP1* プロモーターを用いて、シロイヌナズナ培養細胞での一過的発現解析およびシロイヌナズナ植物体での GUS レポーター発現解析を行い、これらの配列が植物細胞と植物体でも道管細胞分化特異的な発現に重要であることを示した。
4. CTTNNNNNNNA 配列をヒメツリガネゴケの *XCP1* ホモログ遺伝子のプロモーターが持つことを示した。
5. 以上の結果と既知の NAC 型転写制御因子の結合配列解析とタンパク質構造解析の知見とをもとに、X1E1 上では、4 分子の VND7 が 2 つのホモダイマーを形成して 2 セットの CTTNNNNNNNA 配列に結合するとのモデルを提唱した。

以上のように、本論文は、道管細胞分化における VND7 による下流遺伝子の発現制御メカニズムの解明に向けて、極めて重要な知見を提供するものであり、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 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。