

論文内容の要旨

申請者氏名 村田 純

植物は光や病原など様々なシグナルに応答する遺伝子発現制御メカニズムを有する。GT-1 は植物以外の他の種において類例のない DNA 結合モチーフ、trihelix を持つ DNA 結合タンパク質で、RBCS (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) など光応答性遺伝子のプロモーター中に存在する LRE (light-responsive element) へ結合することから、光応答性の転写に関わる制御スイッチのコンポーネントと考えられている。本研究はシロイヌナズナを材料に、LRE へ結合し、trihelix 構造を有する GT ボックス結合タンパク質群の転写制御機構における役割を明らかにすることを目的とした。

新規 GT ボックス結合タンパク質、GT-4 及び GT-5 の *in vitro* 解析

まず GT-1 と相同性を有する遺伝子の単離を試み、2つの新規な GT ボックス結合タンパク質、GT-4、GT-5 の全長 cDNA を RACE 法によりクローニングした。GT-1 とアミノ酸一次配列を比較した結果、GT-4 及び GT-5 は共に trihelix 構造を有すること、転写活性化との関連が示唆されるプロリン、グルタミンに富む領域を有することが明らかになった。組換えタンパク質を用いたゲルシフトアッセイの結果から GT-4、GT-5 は GT1-box をはじめとする種々の GT ボックスへ結合すること、また GT-1 とほぼ同一の DNA 結合特異性を持つことが明らかになった。BY-2 プロトプラストを用いた一過的発現系において GT-4 は GT-1 と同程度の転写活性化能を示したが、GT-5 は明瞭な転写活性化を誘導しなかった。さらに GT-4、GT-5 と GFP との融合タンパク質をタマネギ表皮細胞に一過的に発現させた結果、GT-1 と同じく核局在性を示した。従って、GT-4 は GT-1 と同じく正の転写制御因子であること、一方 GT-5 は GT-1、GT-4 による転写活性化を競合阻害する可能性が示唆された。以上の結果から、GT-4、GT-5 は転写制御因子としての必要条件である、DNA 結合活性、核局在性、転写活性化（抑制化）能を有することが示された。

GT-4 並びに GT-5 の mRNA 発現解析から、GT-4 は調査した全ての器官（花、花芽、葉、茎、根、長角果）において発現する一方 GT-1 mRNA の蓄積量は長角果において、また GT-5 mRNA の蓄積量は花芽においてのみ低いことを見出した。さらに、比較した GT-1、GT-4、GT-5 のなかで GT-4 mRNA のみが暗条件から明条件に移した芽生えにおいて光応答性発現を示すことを見出した。以上の結果から GT ボックス結合タンパク質群が器官特異的な転写制御、また光に対する初期応答、二次応答など様々なレベルの転写制御に関与する可能性が示唆された。

GT-1 の DNA 結合活性は CaMKII によるリン酸化を介して制御される。そこで GT-4、GT-5 についても DNA 結合活性制御とリン酸化との関連について調査し、GT-1 との比較をおこなった。その結果、CaMKII によるリン酸化によって GT-4 の DNA 結合活性は促進され、反対に GT-5 の DNA 結合活性は抑制された。以上の結果から GT-1、GT-4 と GT-5 とは、CaMKII を介したリン酸化により相反する方向に DNA 結合活性が制御されることが明らかになった。

in vivoにおける GT ボックス結合タンパク質の性状解析

タンパク質の核輸送の特異性は一般に核移行シグナル (NLS) と NLS を認識する Importin α とによって決定される。光抑制性遺伝子のシス制御因子に結合する転写制御因子で、GT-1 と相同性を有する GT-2 は典型的な 2 分節型の NLS を有することが示されているが、GT-1、GT-4 及び GT-5 には既知の NLS と相同性を有する配列は見出されない。そこで GT-1 を材料に、核局在活性に必要な領域の同定を試みた。GT-1 に対する欠失変異、アラニン置換の導入をおこない、GFP (Green Fluorescent Protein) をレポーターとして GT-1 と GFP の融合タンパク質の細胞内局在を調べた。その結果、trihelix 構造のほぼ中央部分の KMREK なる塩基性アミノ酸に富む領域が GT-1 の核局在に必要な十分な NLS であることを明らかにした。この新規な NLS は GT-4 及び GT-5 においても高度に保存されていることから、GT-1、GT-4、GT-5 の核-細胞質輸送は類似した制御システム下にあることが予想された。

一方 GT ボックス結合タンパク質の結合配列を有する新規遺伝子を見出すことを目的に、TIP (transcription factor immunoprecipitation) 法により *in vivo* における結合 DNA 配列の同定を試みた。シロイヌナズナ植物体をパラホルムアルデヒドで固定し、核タンパク質を粗精製した後、GT-1、GT-4、GT-5 に対する特異抗体を用いた免疫沈降法により *in vivo* 結合配列を有するゲノミック DNA 断片を精製した。これを鋳型にして、GT-1 の結合配列を有する CAB1、CAB2 (chlorophyll a/b binding protein) 遺伝子プロモーター領域を PCR により増幅し、精製過程を確認した。また、CAB1、CAB2 プロモーターへ GT-1、GT-4、GT-5 がそれぞれ特異的な結合プロファイルを示すことを検出した。さらに新規結合配列の取得を目的に、TIP 法により得たゲノミック DNA 断片のうちアガロースビーズに固定した GT-1 組換えタンパク質と結合する断片を選抜し、塩基配列決定をおこなった。その結果 GT-1 の *in vivo* 結合配列を有する新規遺伝子として、GER3 (germin-like protein 3) を同定した。GER3 は細胞外マトリックスに蓄積し、発芽やストレス応答との関連が示唆される germin と相同性を有する。以上の結果は新規な *in vivo* 結合配列の探索における TIP アッセイの有効性を示すと共に、GT-1 の多様な機能を示唆するものである。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 村田 純

本論文では高等植物固有のDNA結合ドメインをもつ転写因子であるGTボックス結合タンパク質の特徴付けに関する研究を行い、多くの有意義な知見を得ている。特に既知の光応答性シス制御配列(light-responsive element; LRE)に結合するGT-1と類似した結合配列特異性を示す新規なGTボックス結合タンパク質をコードする可能性のあるGT-4およびGT-5の2種類のcDNAを単離同定し、組換えタンパク質を用いて*in vitro*における結合配列を詳細に検討している。GTボックス結合タンパク質は不安定で、組換えタンパク質の調製も困難であるため、これまでに結合配列に関する知見が得られているGTボックス結合タンパク質はGT-1とGT-2の2種類のみであり、本論文の実験結果は非常に重要な知見である。さらに、GT-4とGT-5の性状を検討する目的で転写活性化と核移行に関する詳細な研究を行い、それらが転写制御因子として機能することを示している。特に核移行シグナルに関する一連の実験で、GT-1は新規な核移行シグナルを持つことを示し、それらはGT-4とGT-5にも共通の配列であることを指摘しているが、これは転写制御の一段階として核内輸送が関与する可能性を考慮すると興味深い知見である。また、GT-4とGT-5はリン酸化修飾を受けることを示し、GT-5はリン酸化によりLRE結合活性が低下することを見出しているが、GT-1は同様なリン酸化によりLRE結合活性が上昇するという知見とあわせて考えると、GT-1とGT-5によるLRE結合の相互制御が想定される。今後さらに検証が必要ではあるが、リン酸化による光遺伝子発現制御機構の具体的モデルとして重要な研究事例である。以上の研究は主に*in vitro*の実験系を用いた転写制御因子の特徴付けであるが、本論文では*in vivo*のGTボックス結合タンパク質群の挙動に関する知見を得ることを目的として、TIP法などの高度な実験系を駆使した興味深い研究を展開している。具体的には、CAB遺伝子プロモーターへの結合状況を調べ、GT-1が明条件において結合し、GT-5が暗条件で結合活性が高まることが示唆される結果を得ている。これは、*in vitro*での相互結合の結果と符合しており、前述のモデルを支持するものである。さらに、シロイヌナズナゲノム配列から新規なGT-1結合配列を同定することにも成功している。

以上のように、本論文は植物固有の転写制御因子の特徴付けに関するもので、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。