

論文内容の要旨

申請者氏名 四 方 雅 仁

新規 GATA タイプジンクフィンガーモチーフを持つシロイヌナズナの ZIM は、ジンクフィンガーが DNA 結合に、酸性領域が転写活性化に働くと考えられ、さらに核に局在することが確かめられていることから、転写因子として働くと予測されていた。本論文では、ZIM の特徴付けと、分子としての機能、および植物体内における ZIM の機能予測を行った。シロイヌナズナには、保存されたシステイン間のループ部分のアミノ酸が 20 からなる ZIM と同様のタイプのジンクフィンガーを持つものが ZIM のほかに 2 つ存在しており、配列のみならずドメイン構造も保存されていることからこれらを ZIM-like と名付けた。また、シロイヌナズナ以外の植物にも ZIM と類似した構造を持つタンパク質が見出され、これらは植物特異的な転写因子であることが示唆された。

分子としての働きを知るため、ZIM が転写活性化能を有するかを一過的な発現系を利用し評価した。エフェクターとして酵母の GAL4 DNA 結合領域と ZIM との融合タンパク質を、レポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子上流に GAL4 結合部位を連結したものを用いた。これらをタバコ培養細胞 BY-2 に導入し、一過的なルシフェラーゼ活性の測定を行ったところ、ZIM が転写活性化能を持つことが示された。様々な領域を欠失させたコンストラクトによる解析から、ZIM の N 末端側の酸性領域が転写活性化領域であることが示唆された。

ZIM の植物体内での機能を推測するため、ZIM 過剰発現体(ZIM-ox)の解析を行った。ZIM-ox は胚軸や葉柄が伸長し、水平面に対する葉の角度が上昇するという表現型を示した。胚軸伸長は光質非依存的であり、また葉柄の伸長はブラシノステロイドやジベレリンの生合成阻害剤存在下においても見受けられた。このことから、ZIM-ox の伸長は、伸長の機構に近いところでの制御によるものであると考えられた。さらに ZIM-ox と野生型における遺伝子発現をマイクロアレイにより比較した。その結果、葉において *XTH33* の発現が上昇していることが確認された。これはエンド型キシログルカン転移酵素／加水分解酵素をコードし、細胞壁のキシログルカン架橋の再編に働くと考えられている。このことから *XTH33* が ZIM-ox の伸長表現型の要因であると期待された。*SEP3* と *XTH33* は、ZIM-ox では組織特異的な発現上昇を示し、組織特異的な発現制御の存在が示唆された。以上のことから、ZIM と相互作用する因子が存在し、ZIM はその相手を変えることによって標的遺伝子を変えているのではないかと推測された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 四 方 雅 仁

本論文は、ディファレンシャルスクリーニングにより単離されたシロイヌナズナの ZIM に関して逆遺伝学的解析を行い、新規 GATA タイプジンクフィンガーモチーフを持つその機能解析をおこなった最初の例である。本論文ではまず、相同性検索より、ZIM が持つ新規の GATA タイプジンクフィンガーモチーフは、植物に特徴的に見出されることを明らかにしている。また、このモチーフを持つタンパク質の多くは、酸性領域、機能未知領域、CCT ドメインをも持ち、さらに植物特異的なタンパク質であることを示唆している。これまでも植物特異的な転写因子は報告されているが、本論文による新たな植物特異的な転写因子の同定とゲノム中の遺伝子の分類を正確に行ったことは、今後の植物の転写制御の全体像の理解につながるものとして評価できる。

本論文にて ZIM の転写活性化能を解析することによって転写因子としての機能を検証している。GAL4 との融合タンパク質とルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いた一過的発現解析から、ZIM が転写活性化能を持つことを明らかにした。また、様々な欠失コンストラクトを用いて酸性領域が転写活性化に働くことを示した。これまで転写因子として機能すると構造から予測されていたものの、今回、実験的に示した意義は大きい。

さらに、植物体内での ZIM の機能を推測するため、ZIM 過剰発現体を用いた解析を行っている。過剰発現体を用いることによる利点と欠点が述べられた上での解析であり、適切な評価がなされている。ZIM 過剰発現体では胚軸や葉柄が伸長したという表現型から、ZIM と光や植物ホルモンとの関わりを推測し、その関係を検証する実験から、ZIM 過剰発現体では伸長の機構が正に制御されていることを示唆している。マイクロアレイを用いた遺伝子レベルでの解析から、ZIM 過剰発現体の伸長は XTH 群によるものであることを示唆している。細胞伸長に関わるジベレリンやブラシノステロイドによっても、XTH 群が制御されることが知られているが、ZIM 過剰発現体において発現上昇するものとは異なり、ZIM 過剰発現体の伸長の機構はジベレリンやブラシノステロイドを介さないものであることを述べている。マイクロアレイ解析からは、ZIM 過剰発現体の茎頂において SEP3 の発現上昇も認められ、野生型における SEP3 の発現パターンや、解析中の結果から、これが ZIM の有力な標的遺伝子の候補であることを考察している。

以上のように、本論文は新たに同定された植物特異的な転写因子の機能を示唆するもので、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。