

論文内容の要旨

申請者氏名 田嶋 紘美

BiP は細胞質型 HSP70 タンパク質と類似した構造を持ち小胞体タンパク質の品質管理において重要な働き持ち、小胞体でのタンパク質の高次構造形成異常により強く誘導される。この反応は小胞体ストレス応答と呼ばれ分子機構は酵母や動物で研究が進んでいるが、植物ではシロイヌナズナでは BiP 遺伝子が 3 個あることなどから不明な点も多い。本研究では、シロイヌナズナの BiP に着目し、糖に対する遺伝子発現機構を調べるとともに、小胞体ストレス応答時の BiP の誘導に関わる新規転写因子の同定と機能解析をおこなった。

BiP1 と BiP2 は構造、発現様式が良く似ているが、BiP3 は遺伝子の構造やプロモーターも相違が見られる。BiP2 プロモーターと BiP3 プロモーターに GUS 遺伝子を連結し、シロイヌナズナに導入したところいずれも糖鎖合成阻害剤ツニカマイシンにより顕著な誘導が認められた。ストレスを与えずに GUS 染色を行うと、BiP2 プロモーターの場合、花粉や未熟種子で GUS 活性が見られたが、BiP3 プロモーターの場合は、殆ど GUS 活性が検出されず、非ストレス下では BiP3 の発現レベルは非常に低いと考えられた。ペプチド抗体を用いたタンパク質レベルの解析でも同様の結果が得られた。

糖による BiP の発現を調べたところ、糖飢餓ではなく、糖添加によって BiP2 の転写産物は増加した。BiP2 プロモーターに GUS を連結した遺伝子を導入した植物では、GUS の発現は糖により誘導されたが、BiP2 プロモーター上の小胞体ストレス応答に関わるシス配列である P-UPRE に GUS あるいはルシフェラーゼ遺伝子を連結した場合は、糖欠乏によりレポーター遺伝子の発現が誘導された。つまり P-UPRE は糖欠乏に応答するが BiP2 プロモーター上には P-UPRE とは異なる糖に応答して転写を活性化する領域が存在すると考えられた。

動物の ATF6 の制御機構に着目し、膜貫通領域を有する 3 個の bZIP 型転写因子について解析した。そのうち AtbZIP28 の膜貫通ドメイン以降を決失させた領域 (AtbZIP28 Δ C) は BiP プロモーターを顕著に活性化した。さらに AtbZIP28 Δ C は小胞体ストレス応答に関与するシス配列の下流のレポーター遺伝子も活性化した。また、GFP に AtbZIP28 全長を連結し、培養細胞で発現させた。その結果、非ストレス下では蛍光が小胞体由来の構造に観察され、この細胞をツニカマイシンあるいは DTT で処理すると蛍光が核に移行した。また、AtbZIP28 に対する抗体を作成したところツニカマイシン処理により、切断を受けたと思われるバンドが検出された。つまり、小胞体ストレス依存的に AtbZIP28 が切断を受けて、核へ移行し転写因子として機能すると考えられた。しかし、動物の ATF6 の切断に関与するプロテアーゼ、S1P, S2P の遺伝子破壊株においても AtbZIP28 の切断が見られた。従って、AtbZIP28 の切断には S1P, S2P 以外のプロテアーゼが関与していると考えられた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 田嶋 紘美

本論文は小胞体シャペロン BiP の発現制御機構をモデル植物であるシロイヌナズナを用いて解析した結果をまとめたもので、内容は3部構成となっている。

第1部では、植物には酵母や動物とは異なり複数の BiP の分子種が存在することに着目し、解析をおこなった。シロイヌナズナには3個の BiP 遺伝子が存在するが、BiP1 と BiP2 は非コード領域を含め非常に保存性が高いことから、区別することなく、若干構造の異なるもう1個の遺伝子 BiP3 との比較をおこない、BiP1 と BiP2 が恒常的にも発現しているのに比べて BiP3 が小胞体ストレスを加えた時にのみ特異的に発現することを明らかとした。このような特別な発現様式を示す BiP 遺伝子をシロイヌナズナが有することは植物における小胞体ストレスの意義を考える上で興味深い。加えて BiP3 の発現を調べることで小胞体ストレスを感度良く検知できることが示された。

第2部では、植物の BiP の発現が様々な環境要因で制御されるという報告がある一方で、哺乳動物で観察される糖欠乏による誘導が調べられていない点に着目し、糖による BiP の発現制御に絞って解析をおこなった。その結果、シロイヌナズナの BiP は糖欠乏により発現量が減少し、糖の再添加により再び発現が誘導された。つまり、BiP の発現という点では動物で見られた反応と逆の結果が見られた。しかし、BiP プロモーター上の小胞体ストレス応答に必要なシス配列の下流に連結したレポーター遺伝子は糖欠乏により活性化された。つまり、シロイヌナズナ BiP プロモーターは小胞体ストレス応答に必要なシス配列に加えて糖により活性化される配列を含むと考えられ、BiP が複雑な制御を受けることが示された。

第3部は、本論文の最も中心的な内容を含む部分である。シロイヌナズナの BiP の発現制御に関わる因子として AtbZIP60 が報告されているが、他の転写因子の存在が推定されていた。本論文では、シロイヌナズナのゲノム情報を利用することで BiP の発現制御に関わる転写因子として AtbZIP28 を単離した。AtbZIP28 は、膜貫通ドメインを有し、膜貫通ドメイン以降を欠失した AtbZIP28 が3個の BiP 遺伝子を活性化し、AtbZIP28 の遺伝子欠損株では BiP の発現誘導が抑制されることから、AtbZIP28 が BiP の発現制御に関わる転写因子であること示された。さらに、タンパク質レベルで切断を受け、核へ移行し転写因子として機能する興味深い制御を受けるタンパク質であると示唆された。実際、GFP と AtbZIP28 の融合タンパク質を発現させた細胞では、小胞体ストレス処理より GFP 蛍光、すなわち AtbZIP28 タンパク質が小胞体膜から核へと移行する様子が観察され、前述の仮説が裏付けられた。

以上のように、本論文は植物の小胞体ストレス応答の分子機構に新たな知見を加えるもので、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。