

論文内容の要旨

申請者氏名 八反 順一郎

多細胞生物において、受容体型キナーゼ (RLK) は細胞間シグナル伝達を仲介し、個体の正常な発生分化に不可欠である。シロイヌナズナではゲノム解析によって 600 以上の *RLK* 遺伝子の存在が予想されているが、それらの遺伝子の機能や遺伝子産物が関わるシグナル経路の解明はあまり進んでいない。これまでに、茎頂分裂組織の発生を制御する *RLK* を探索するために、均一化 cDNA ライブラリーを用いたディファレンシャルスクリーニングが実施され、ロイシンリッチリピート型のシロイヌナズナ *RLK*, *inflorescence and root apices receptor-like kinase (IRK)* が単離されている。本論文では、シロイヌナズナ *IRK* のシグナル経路の機能および構成因子を明らかにするために酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ない、キナーゼドメインに対する相互作用タンパク質を単離し、IRK-interacting protein (IRKI) と命名した。試験管内結合アッセイにおいて、IRK-IRKI 相互作用を確認した。発現解析の結果、*IRK*, *IRKI* は分裂組織や花、若い葉等で発現しており、両者の発現パターンは重複していた。GFP:IRKI 融合タンパク質を *IRKI* プロモーターで発現させた株では、GFP:IRKI は細胞膜に局在しており、細胞膜局在の *IRK* との相互作用が示唆された。培養細胞では *IRKI* は発現していなかったことから、*IRKI* の発現には多細胞体制が必要と考えられた。*irk* 変異体や *irk irki2* 重変異体は通常の育成条件で、花茎や葉のサイズがやや小さくなることを見出した。その表現型の背景にある要因として植物ホルモンとの関連を予想し、*irk*, *irki* 変異体のホルモン応答性を調べた。その結果、*irk irki2* 重変異体で、オーキシンやサイトカイニンに対する感受性が高まっていた。また、*IRK*, *IRKI* と糖や窒素などの栄養の利用との関連を予想し、*irk*, *irki* 変異体の糖に対する応答を解析した。その結果、IRK, IRKI は糖の濃度に応じた適正な応答を誘導するのに必要であると予想された。次に、植物体に糖の枯渇を引き起こすような暗黒処理を施し、応答を観察した。*irk* 変異体では、WT に比較して老化が促進された。この表現型は *IRK* 遺伝子を含むゲノム断片により相補された。栄養分のリサイクル、あるいは糖やエネルギーの枯渇といったストレスの応答に必要な、SNF1-related kinase1-1 をコードする *SnRK1-1*, および *AUTOPHAGY8e* 遺伝子等に注目し、暗黒処理中の発現の経時変化を追った。その結果、いずれの遺伝子も WT に比べ *irk* 変異体の茎頂における発現の上昇が顕著であったことから、IRK は栄養ストレス応答に関与していることが示唆された。以上の結果から、IRK は、部分的に IRKI と共同し、栄養シグナルを SAM や若い組織で検出し、茎や葉等の器官形成における効率的な個体統御に寄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 八反 順一郎

細胞間シグナル伝達を仲介する受容体型キナーゼ (RLK) は、多細胞生物の細胞間、組織間、あるいは個体としての調和のとれた発生に重要な役割をもつタンパク質である。シロイヌナズナでは 600 以上の *RLK* 遺伝子の存在が予想されているにもかかわらず、それらの個々の機能解析は遅々として進んでいない。これまでに、発現組織特異性および低発現性を指標として、均一化 cDNA ライブラリーを用いたディファレンシャルスクリーニングを実施し、ロイシンリッチリピート型の *RLK*, *inflorescence and root apices receptor-like kinase* (*IRK*) が単離されていたが、茎頂分裂組織の発生制御との関わりは解析されていなかった。本研究は、*IRK* シグナル経路の機能および構成因子を明らかにすることを目的として、分子や遺伝子の解析と個体生理応答解析が統合的に行なわれている。博士論文として評価できる具体的な点は以下の通りである。

第 1 章では、まず酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ない、*IRK* と相互作用する *IRK*-interacting protein (*IRKI*) の単離を示している。続いて、試験管内結合アッセイによる *IRK*-*IRKI* 相互作用の確認と、タンパク質の細胞内局在を明らかにしている。*IRK*, *IRKI* 両遺伝子の発現組織特異性は類似しており、分裂組織や花、若い葉等において発現していることを示している。さらに、増殖の盛んな培養細胞での実験から、*IRKI* の発現は増殖活性そのものには依存せず、多細胞体制が必要であることも示している。*IRKI* 遺伝子構造を最大限に保った GFP 融合タンパク質の利用による発現と局在解析により、分裂組織における発現を詳細に観察している。

第 2 章では、機能喪失変異体を用いた機能解析から、*IRK* および *IRKI* の役割を推定している。*irk* 変異体や *irk irki 2* 重変異体が通常の育成条件で、花茎や葉のサイズがやや小さくなることを手がかりに細胞と分子レベルの現象の観察を行っている。オーキシンとサイトカイニンへの応答性の違いから *IRK*, *IRKI* と植物ホルモンの関連を示している。また、糖を含む培地での植物の発芽や生育、および糖枯渇を引き起こす暗黒処理に対する生理応答から *IRK*, *IRKI* と糖の利用との関連を見出している。そして、*IRK*, *IRKI* は培地中の糖の濃度に応じた適正な応答を誘導するのに必要であること、さらに、*IRK* は暗黒処理中に栄養分のリサイクルに関わることを示している。更に糖やエネルギーの枯渇といったストレスの応答に必要な、SNF1-related kinase1-1 および *AUTOPHAGY8e* 等をコードする遺伝子の適正な発現に *IRK* が必要であることを示している。これらの結果から、*IRK* は葉からの糖シグナルを茎頂や若い組織で検出し、*IRKI* と部分的に共同して植物の個体統御に寄与することを推定している。

以上のように、本論文は *RLK* およびその相互作用因子が個体としての生長制御に関わることを示したもので、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。