

学位論文題名

Molecular genetic and physiological studies
on transcriptional co-activators multiprotein bridging
factor 1s (MBF1s) from *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナ転写情報仲介因子 MBF1 の分子遺伝学生理学的研究)

学位論文内容の要旨

全ての生物において、転写制御はゲノム情報を発現するための最も重要なステップである。転写因子は遺伝子の転写調節領域に結合し、その遺伝子の転写を正または負に調節することで、複雑な生物学的プロセスを制御している。転写のコアクチベーターは、遺伝子特異的な転写活性化因子と普遍的な転写因子とを結びつけることやクロマチン構造や転写因子の修飾によって、転写をさらに活性化することが知られている。シロイヌナズナのゲノム配列が明らかとなり、植物は酵母や動物よりも全遺伝子に比べて転写因子の遺伝子の占める割合が多いことがわかり、このことは植物において転写のプロセスは他の生物に比べより複雑であることを示唆している。しかしながら、植物における転写の分子メカニズム、特に転写コアクチベーターの機能については不明な点が多い。

転写コアクチベーターの一種である multiprotein bridging factor 1 (MBF1)は転写活性化因子、主に basic region/leucine zipper (bZIP)型転写因子と TATA box binding protein (TBP)との間を橋渡しすることによって転写を活性化することが酵母や動物で知られている。MBF1 のアミノ酸配列は真核生物の間で高度に保存されているので、全ての真核生物にとって重要度の高いタンパク質の一つであると考えられる。しかし、植物の MBF1 の研究はほとんどなされていなかった。従って、植物の MBF1 を研究することは植物における MBF1 の生理機能を知るとともに、植物の転写メカニズムの解明にもつながると考えられる。

植物の MBF1 に関していくつかの報告がされている。トマトでは ER24 と呼ばれる MBF1 ホモログがエチレン処理によって誘導され、ジャガイモでは病原菌のエリシターや傷害、サリチル酸やエチレンの前駆体などで mRNA の蓄積量の増大が見られる。また、砂漠に育つ植物である *Retama raetam* では熱ストレスによって誘導され、タバコでは熱ストレスと乾燥ストレスを同時に与えることによって誘導される。このように植物の MBF1 は様々なストレスで誘導されることからストレス応答に関わる因子なのではないかという推測がなされている。

私はゲノム配列が明らかとなっているシロイヌナズナに注目した。データベース解析により、シロイヌナズナには3つの MBF1 ホモログ (AtMBF1a, AtMBF1b, AtMBF1c) が存在する

ことがわかり、アミノ酸配列を比較したところ、AtMBF1a と AtMBF1b との相同性は 90% 以上と高く保存され、AtMBF1c とはそれぞれ 50%程度と低いことが分かり、シロイヌナズナの MBF1 は2つのグループに分けられることを示した。これまでは、ほとんどの種では一種類の MBF1 しか報告がなかったので、シロイヌナズナにおいて複数の遺伝子が見つかったことは大変興味深い発見である。私はこれらの3つのシロイヌナズナ MBF1 ホモログが MBF1 としての機能を保持していることを、酵母の *mbf1* 欠損変異株を用いての相補性試験で確かめた。また、ゲルシフトアッセイやファーウェスタンアッセイを用いて3つのシロイヌナズナ MBF1 全てが酵母の bZIP 型転写活性化因子である GCN4 と普遍的転写因子である TBP とに結合して橋渡しする能力があることを確かめた。これは植物における MBF1 の機能を示した初めての報告である。シロイヌナズナの各組織から全 RNA を抽出し、ノーザン法によってそれぞれの MBF1 の発現プロファイルを調べたところ、AtMBF1a や AtMBF1b は花組織での発現が比較的高く、AtMBF1c は葉や根で発現が高く花組織では比較的低いことが分かった。また、AtMBF1 が関わるプロセスを明らかにすることを目的に、様々な植物ホルモンを与え、その結果蓄積された mRNA 量をノーザン法により調べた。その結果、AtMBF1a や AtMBF1b はホルモン処理によって mRNA 量の変動は見られなかったが、AtMBF1c はアブシジン酸によって誘導されることが明らかとなった。このことからシロイヌナズナの MBF1 は2つのグループに分けられることが示され、それはアミノ酸配列解析の結果と一致していた。

私はシロイヌナズナの MBF1 を解析することで植物における MBF1 の機能を調べていくことを目的としていたが、ここまでの研究では植物の MBF1 機能の全体の把握までには至っていなかった。そこで、植物の MBF1 を構造的に比較することで分類した。現在報告がある 30 種の真核生物のアミノ酸配列を用いて、系統樹を作成したところ、植物の MBF1 は AtMBF1a と AtMBF1b が属する Plant group I と AtMBF1c が属する Plant group II に分類されることが分かった。両グループの遺伝子の存在が報告されているのは現在のところシロイヌナズナだけであるので、シロイヌナズナの MBF1 の詳細な発現解析を行うことは、グループの発現特性、グループ特異的な機能の解明に至るのではないかと考えた。そこで、シロイヌナズナの MBF1 のそれぞれのプロモーター領域をクローニングし、その下流にレポーター遺伝子として GUS 遺伝子をつなぎ、これらの遺伝子を植物体に導入した。GUS 遺伝子産物の活性をもとにして、それぞれの MBF1 の転写活性を調べたところ、AtMBF1a や AtMBF1b では葯や莢の中の種子で発現が高いことが分かった。このことはシロイヌナズナにおいて AtMBF1a と AtMBF1b は花粉形成や種子形成に関与している可能性を示唆するものである。一方、AtMBF1c では幼植物体ではその発現はあまり見られず、成長とともに全身で発現してくることが分かった。

これまでの報告や私の研究から植物の MBF1 は様々なストレスに応答して発現することが知られているが、植物における MBF1 の発現パターンの統一的な見解は得られていない。そこで、両方のグループの遺伝子を保持しているシロイヌナズナにおける MBF1 のストレス応答を調べることで、植物の MBF1 のストレスに対する応答様式をはっきりと定義できるのではないかと考えた。シロイヌナズナに様々なストレスを与え、それらの植物から全

RNA を回収し、ノーザン法により mRNA の蓄積量を調べた。その結果、AtMBF1a や AtMBF1b は様々なストレスにいずれも顕著な応答を示さなかった。ところが、AtMBF1c は熱ストレスや乾燥ストレス、過酸化水素による酸化ストレスで顕著な応答が見られた。乾燥ストレスや ABA は酸化ストレスを引き起こすことが知られているため、これらの結果より AtMBF1c は酸化ストレスにおいて何らかの役割を持っていることが示唆された。

シロイヌナズナに実験材料とすることによって、植物における MBF1 は 2 グループに分けられ、それぞれ別の役割を持っている可能性を示すことができたと考える。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 山 崎 健 一
副 査 教 授 森 川 正 章
副 査 教 授 田 中 歩
副 査 教 授 山 本 興 太 朗

(北海道大学大学院理学研究科)

学 位 論 文 題 名

Molecular genetic and physiological studies on transcriptional co-activators multiprotein bridging factor 1s (MBF1s) from *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナ転写情報仲介因子 MBF1 の分子遺伝学生理学的研究)

全ての真核生物において、転写のコアクチベーターは、遺伝子特異的な転写活性化因子と普遍的な転写因子とを結びつけることやクロマチン構造や転写因子の修飾によって、転写をさらに活性化することが知られている。転写コアクチベーターの一種である multiprotein bridging factor 1 (MBF1) は転写活性化因子、主に basic region/leucine zipper (bZIP) 型転写因子と TATA box binding protein (TBP) との間を橋渡しすることによって転写を活性化することが酵母や動物で知られている。MBF1 のアミノ酸配列は真核生物の間で高度に保存されている重要なタンパク質である。

植物の MBF1 に関していくつかの報告がされている。トマトの MBF1 がエチレン処理によって誘導され、ジャガイモの MBF1 では病原菌のエリシターや傷害、サリチル酸やエチレンの前駆体などで mRNA の蓄積量の増大が見られる。また、砂漠に育つ植物である *Retama raetam* では熱ストレスによって誘導され、タバコの MBF1 では熱ストレスと乾燥ストレスを同時に与えることによって誘導される。このように植物の MBF1 は様々なストレスで誘導されることからストレス応答に関わる因子なのではないかと考えられている。

津田君はゲノム配列が明らかとなっているシロイヌナズナのデータベース解析により、3つの MBF1 ホモログ (AtMBF1a, AtMBF1b, AtMBF1c) が存在することを明らかにし、アミノ酸配列を比較したところ、AtMBF1a と AtMBF1b との相同性は 90% 以上と高く保存され、AtMBF1c とはそれぞれ 50% 程度と低いことが分かり、2つのグループに分けられることを示した。これまでは、ほとんどの種では一種類の MBF1 しか報告がなかったので、シロイヌナズナにおいて複数の遺伝子が見つけれられたことは大変興味深い発見である。津田君はこれらの3つのシロイヌナズナ MBF1 ホモログが MBF1 としての機能を保持していること

を、酵母の *mbf1* 欠損変異株を用いての相補性試験で確かめた。また、ゲルシフトアッセイやファーウェスタンアッセイを用いて3つのシロイヌナズナ MBF1 全てが酵母の bZIP 型転写活性化因子である GCN4 と普遍的転写因子である TBP とに結合して橋渡しする能力があることを確かめた。これは植物における MBF1 の機能を示した初めての報告である。

現在報告がある30種の真核生物の MBF1 のアミノ酸配列を用いて、系統樹を作成したところ、植物の MBF1 は AtMBF1a と AtMBF1b が属する Plant group I と AtMBF1c が属する Plant group II に分類されることが分かった。両グループの遺伝子の存在が報告されているのは現在のところシロイヌナズナだけであるので、シロイヌナズナの MBF1 の詳細な発現解析を行うことは、グループの発現特性、グループ特異的な機能の解明に至るのではないかと考えた。そこで、シロイヌナズナの MBF1 のそれぞれのプロモーター領域をクローニングし、その下流にレポーター遺伝子として GUS 遺伝子をつなぎ、これらの遺伝子を植物体に導入した。GUS 遺伝子産物の活性をもとにして、それぞれの MBF1 の転写活性を調べたところ、AtMBF1a や AtMBF1b では葯や莢の中の種子で発現が高いことが分かった。このことはシロイヌナズナにおいて AtMBF1a と AtMBF1b は花粉形成や種子形成に関与している可能性を示唆するものである。

これまでの報告や津田君の研究から植物の MBF1 は様々なストレスに応答して発現することが知られているが、植物における MBF1 の発現パターンの統一的な見解は得られていない。そこで、シロイヌナズナに様々なストレスを与え、それらの植物から全 RNA を回収し、ノーザン法により mRNA の蓄積量を調べた。その結果、AtMBF1a や AtMBF1b は様々なストレスにいずれも顕著な応答を示さなかった。ところが、AtMBF1c は熱ストレスや乾燥ストレス、過酸化水素による酸化ストレスで顕著な応答が見られた。乾燥ストレスや ABA は酸化ストレスを引き起こすことが知られているため、これらの結果より AtMBF1c は酸化ストレスにおいて何らかの役割を持っていることを示唆した。シロイヌナズナを実験材料とすることによって、植物における MBF1 は2グループに分けられ、それぞれ別の役割を持っている可能性を示した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。