

学位論文題名

Studies on control of leaf cell cycle and its expansion  
by Arabidopsis transcriptional co-activator, AtMBF1

(シロイヌナズナ転写コアクチベーター AtMBF1による  
葉の細胞の周期および肥大成長の調節に関する研究)

学位論文内容の要旨

第一章の要旨

Multiprotein Bridging Factor 1 (MBF1) は真核生物全体にそのアミノ酸配列が高度に保存されており、転写因子と TATA-box 結合タンパク質との間に介在し、標的遺伝子の転写を促進する転写コアクチベーターとして知られている。植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) はそのゲノム中に3種類の MBF1 遺伝子 (*AtMBF1a* - *AtMBF1c*) を有している。しかしながら、植物における MBF1 の詳細な機能に関しては不明な点が多い。

そこで我々はその機能を調べるために、AtMBF1 に転写抑制ドメイン SRDX を付与したキメラ遺伝子を過剰に発現する形質転換シロイヌナズナを作製した。SRDX を付与された転写活性化因子は、転写抑制因子として機能することが知られており、内生の転写因子と競合することで標的遺伝子の転写を抑制する。その効果は SRDX を付与した転写因子のみならず同属の転写因子にも及ぶことが知られており、この手法は特に遺伝子ファミリーに属する転写因子の機能を解析する場合に有効であるとされる。AtMBF1-SRDX は転写コリプレッサーとして機能することが予想され、内生の AtMBF1 と競合することでその標的遺伝子の転写を抑制することができると考えられる。

AtMBF1-SRDX を過剰発現する形質転換シロイヌナズナ (AtMBF1-SRDX<sup>OE</sup>) は野生型に比べて非常に小さな葉を呈した。その葉の細部を観察したところ、特に内生の AtMBF1 が強く発現している葉の維管束組織周辺の細胞が野生型に比べて顕著に矮小化していることが観察され、それに加えて葉を構成する細胞数も減少していることが確認された。葉の成長期には葉の細胞数が増加する時期、および細胞が肥大成長する時期の二段階があることが知られている。経時的な葉細胞の大きさの測定結果から、AtMBF1-SRDX<sup>OE</sup> では葉の細胞が肥大成長する時期においてその伸張度合いが野生型に比べて抑制されていることが示された。このことから、過剰発現している AtMBF1-SRDX は葉の肥大成長の制御に影響を及ぼしていることが示唆された。細胞あたりに

含まれる DNA 量の調節が細胞の肥大成長制御に重要な役割を果たすことが知られていたため、その DNA 含量を制御している機構「エンドリデュプリケーション」に関して調査を行った。その結果、AtMBF1-SRDX<sup>OE</sup> では葉の細胞の DNA 含量が野生型と比べて著しく減少しており、いくつかのエンドリデュプリケーションの調節因子の発現の様子も野生型と比べて変化していることが確認された。これらのことから、AtMBF1-SRDX はエンドリデュプリケーションの制御因子に働きかけ、葉細胞における DNA 含量の増加を抑制していることがわかった。ここから、AtMBF1 は細胞内における DNA 含量の調節に関与し、葉の肥大成長に寄与している因子であることが示唆された。

植物細胞の肥大成長に MBF1 が関与していることを示唆した本研究結果は、生物科学的な基礎知識を提供することはもちろんのこと、農学方面において「大きな農作物の作出」といったような観点で応用されることも期待される。

## 第二章の要旨

動物では多くの生理学的プロセスがホルモンによって調節されている。ホルモンは細胞の増殖や分化、機能の調節ばかりでなく、様々な疾患の成因および治療にも深く関与している。一方、動物のホルモン受容体に結合し、ホルモンによる情報伝達機構をかく乱するおそれのある内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)が、排水や農薬として環境中に流出した汚染物質に含まれていることが報告されている。ゆえに、環境中に存在する環境ホルモンを調査、除去することは早急の課題であると言える。また、ホルモン様物質は植物等にも含まれていることが知られており、未知のホルモン様物質が含まれている食品等を知らずに摂取することによる人体への影響も考えられる一方、そのような自然界に存在するホルモン様物質の化学構造の多様性から、創薬という観点からも注目を集めている。

そこで我々は、予期せぬホルモン摂取による健康被害を未然に防ぐため、遺伝子組換え植物を用いて試料中から簡便にホルモン活性をスクリーニングできるシステムの構築を試みた。今回は特に女性ホルモン様物質に着目し、ヒトエストロゲン受容体、およびそれにリガンド依存的に相互作用する転写コアクチベーターを植物に導入し、女性ホルモン依存的にレポーター遺伝子の発現が活性化される系を構築した。この植物はエストロゲン濃度依存的にレポーター遺伝子を発現し、さらには汚水や植物抽出液からも女性ホルモン活性を検出することができた。また本システムを改良することで、甲状腺ホルモンやグルココルチコイドも検出することができた。このことから、当研究によって、本システムがさまざまなホルモン活性を持つ物質を探索する上で非常に有用であることが示された。

以前は調査にかかる費用や手間のために調査すらされていなかったさまざまな環境サンプルや食品、および化学物質のホルモン活性を簡便に測定する事によって、我々の生活環境に隠れたリスクが軽減されること、および有用な薬剤の開発による医療分野への貢献を期待する。

# 学位論文審査の要旨

主 査 准教授 山 崎 健 一

副 査 教 授 森 川 正 章

副 査 教 授 大 原 雅

副 査 教 授 山 口 淳 二 (北海道大学大学院先端

生命科学研究院)

## 学 位 論 文 題 名

# Studies on control of leaf cell cycle and its expansion by *Arabidopsis* transcriptional co-activator, AtMBF1

(シロイヌナズナ転写コアクチベーター AtMBF1による  
葉の細胞の周期および肥大成長の調節に関する研究)

## 要旨

Multiprotein Bridging Factor 1 (MBF1) は真核生物全体にそのアミノ酸配列が高度に保存されており、転写因子と TATA-box 結合タンパク質との間に介在し、標的遺伝子の転写を促進する転写コアクチベーターとして知られている。植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) はそのゲノム中に3種類の MBF1 (*AtMBF1a*, *AtMBF1b*, *AtMBF1c*) を有している。しかしながら、植物における MBF1 の詳細な機能に関しては不明な点が多い。

そこで我々はその機能を調べるために、AtMBF1 に転写抑制ドメイン SRDX を付与したキメラタンパク質 (AtMBF1-SRDX) を過剰に発現する形質転換シロイヌナズナを作製した。SRDX を付与した転写活性化因子は、転写抑制因子として機能することが知られており、内生の転写活性化因子と競合することで標的遺伝子の転写を抑制する。その効果は SRDX を付与した転写因子のみならず、同属の転写因子にも及ぶことが知られており、この手法は特に同一の遺伝子ファミリーに属する転写因子の機能を解析する場合に有効であるとされる。AtMBF1-SRDX は転写コリプレッサーとして機能することが予想され、内生の AtMBF1 と競合することでその標的遺伝子の転写を抑制することができると考えられる。

AtMBF1-SRDX を過剰発現する形質転換シロイヌナズナ (AtMBF1-SRDX<sup>OE</sup>) は野生型に比べて非常に小さな葉を呈した。その葉の細部を観察したところ、特に内生の AtMBF1 が強く発現している葉の維管束組織周辺の細胞が野生型に比べて顕著に矮小化していることが観察され、それに加えて葉を構成する細胞数も減少していることが確認された。葉の成長期には葉の細胞数が増加する時期、および細胞が肥大成長する時期の二段階があることが知られている。葉細胞の大きさの経時的な測定結果から、AtMBF1-SRDX<sup>OE</sup> では葉の細胞が肥大成長する時期においてその伸張度合いが野生型に比べて抑制されていることが示された。こ

のことから、AtMBF1-SRDX の過剰発現は葉の肥大成長の制御に影響を及ぼすことが示唆された。細胞あたりに含まれる DNA 量の調節が細胞の肥大成長制御に重要な役割を果たすことが知られていたため、その DNA 含量を制御している機構「エンドリデュプリケーション」に関して調査した。その結果、AtMBF1-SRDX<sup>OE</sup> では葉細胞の DNA 含量が野生型と比べて著しく減少しており、いくつかのエンドリデュプリケーションの調節因子の発現レベルも野生型と比べて上昇していることが確認された。すなわち、AtMBF1-SRDX はエンドリデュプリケーションの制御因子に作用し、葉細胞における DNA 含量の増加を抑制していることがわかった。以上のことから、AtMBF1 は細胞内における DNA 含量を制御し、葉の肥大成長に関与している因子であることが示唆された。

植物細胞の肥大成長に MBF1 が関与していることを示唆した本研究結果は、生物科学的な基礎知識を提供することはもちろんのこと、「大きな農作物の作出」といったような観点で MBF1 が応用できる可能性も示した。データベースおよび系統解析により MBF1 はほぼ全ての植物がその遺伝子を有していると考えられるため、MBF1 は他植物においても葉の肥大成長制御に関与している可能性がある。MBF1は熱、乾燥および病原菌などへの耐性増加に関与することも報告されていることから、MBF1を利用することで環境ストレスに強く、かつ肥大化した農作物を創出することができる可能性がある。温暖化や人口増加に伴う食糧危機に対して、栽培地域の拡大や単位面積あたりの農作物の収量を増加させる可能性のあるMBF1は大変有効なものであると考えられる。

## 付録の要旨

動物では多くの生理学的プロセスがホルモンによって調節されている。ホルモンは細胞の増殖や分化、機能の調節ばかりでなく、様々な疾患の成因および治療にも深く関与している。一方、動物のホルモン受容体に結合し、ホルモンによる情報伝達機構をかく乱するおそれのある内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)が、排水や農薬に含まれていることが報告されている。ゆえに、環境中に存在する環境ホルモンを調査、除去することは早急の課題であると言える。また、動物ホルモン様物質が植物等にも含まれていることが知られており、未知のホルモン様物質が含まれている食品等を知らずに摂取することによる人体への影響も考えられる一方、そのような自然界に存在するホルモン様物質の化学構造の多様性から、創薬という観点からも注目を集めている。

そこで私は、予期せぬホルモン摂取による健康被害を未然に防ぐため、遺伝子組換え植物を用いて試料中から簡便にホルモン活性物質をスクリーニングできるシステムの構築を試みた。今回は特に女性ホルモン様物質に着目し、ヒト由来エストロゲン受容体、およびそれにリガンド依存的に相互作用する転写コアクチベーターとレポーター遺伝子を植物に導入し、女性ホルモン様物質を検出できる系を構築した。この植物はエストロゲン濃度依存的にレポーター遺伝子を発現し、さらには汚水や植物抽出液からも女性ホルモン活性を検出することができた。また本システムを改良することで、甲状腺ホルモンやグルココルチコイドも検出できた。このことから、本システムがさまざまなホルモン活性を持つ物質を探索する上で非常に有用であることが示された。

調査にかかる費用や手間のために調査すらされていなかったさまざまな環境サンプルや食品および化学物質のホルモン活性を本システムの利用により簡便に測定する事によって、生活環境に隠れたリスクが軽減されること、および新規ホルモン様物質の発見に伴う有用な薬剤の開発による医療分野への貢献が期待される。

審査委員一同は、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、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（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。