

学位論文題名

シロイヌナズナの低温ショックドメインタンパク質
AtCSP2の生理機能に関する分子生物学的研究

学位論文内容の要旨

凍結を含む低温ストレスは様々な植物種の生育あるいは生存に影響を与え、地理分布を制限する環境要因の1つである。北海道のような寒冷地帯では冬期に -20°C 以下に気温が低下する場合があるが、このような場所での作物の生産性を向上させるためには、耐凍性強化が必要である。植物には、低温に応答して耐凍性を高める低温馴化というメカニズムが存在する。このメカニズムの解明は、植物の耐凍性向上の鍵であると考えられる。低温は植物に限らず多様な生物種の生長や生存を制限するため、低温適応の分子機構は保存性の高い進化を遂げていると考えられる。しかし、原核生物から動植物まで、高度に保存された低温適応機構はこれまでに知られていない。大腸菌では、低温に曝されると低温ショックタンパク質（CSP）を高蓄積する。CSPは大腸菌が低温下で生育するために必須のタンパク質であり、低温下で形成されるRNAの二本鎖構造を解消するRNAシャペロンである。CSPは低温下において、転写および翻訳の維持または活性化に働くと考えられている。CSPと構造が類似したタンパク質（CSDタンパク質）が高等植物にも見出されたが、それらの機能に関する知見は乏しい。そこで、本研究ではシロイヌナズナのCSDタンパク質の1つであるAtCSP2に着目し、その機能解析を行った。

第2章では、AtCSP2の生化学的機能および発現様式の解析を行った。生化学的解析から、AtCSP2はDNAおよびRNAに結合し、二本鎖核酸を解離することが示され、大腸菌CSPと同様にRNAシャペロンとして機能すると考えられた。また、低温処理により、AtCSP2のmRNAおよびタンパク質が蓄積することから、低温馴化への関与が示唆された。組織特異的発現解析から、AtCSP2は茎頂や根端、胚などの組織で特異的に発現しており、発生や生長への関与も示唆された。さらに、AtCSP2の細胞内局在性は核と細胞質であることから、AtCSP2は核内におけるRNAのプロセッシングあるいは細胞質におけるmRNAの機能発現制御に働く可能性が示唆された。

第2章において、AtCSP2の低温馴化への関与が示唆されたことから、第3章ではAtCSP2の発現が40%程度に低下した*atcsp2-3*変異株およびAtCSP2過剰発現体を用いて、それらの耐凍性の評価を行った。*atcsp2-3*変異株の耐凍性は低温馴化前および馴化後において、野生株と同程度であった。そこで、AtCSP2と最も相溶性が高いAtCSP4との二重変異株（*atcsp2-3 atcsp4-1*）を作出したところ、低温馴化後の耐凍性が顕著に向上することを見出した。一方、AtCSP2過剰発現体の耐凍性を調べると、馴化後の耐凍性が低下していることが判明した。したがって、AtCSP2は低温馴化に依存した耐凍性の負の制御因子であり、その機能はAtCSP4と重複していると推定された。低温馴化の正の制御因子であるCBFの発現を二重変異株および過剰発現体を用いて解析した結果、CBFの発現がAtCSP2により負に制御されることが判明した。興味深いことに、CBFの負の制御因子であるMYB15（転写因子）の発現がAtCSP2過剰発現体で著しく上昇しており、逆に変異株では低下していた。これらの結果から、AtCSP2は

*MYB15*の発現を上昇させることで、耐凍性を負に制御している可能性が考えられた。

*AtCSP2*過剰発現体は、耐凍性の低下に加え、生長および発生の過程で発芽の遅延、植物体サイズの縮小化、長角果の縮小化等の多面的な表現型を示した。そこで、第4章では、発生および生長過程における *AtCSP2* の機能解析を行った。*AtCSP2* 過剰発現体の長角果の縮小化の原因を解明するため、長角果の長さ、長角果あたりの種子数等を解析した結果、*AtCSP2* は種子間隔の負の制御因子であることが示唆された。次に、*AtCSP2* 過剰発現体の発芽遅延の原因を調べるため、ABA および GA 含量の測定、ABA あるいは GA 代謝遺伝子の発現解析を行った。その結果、*AtCSP2* 過剰発現体の ABA 含量は野生株の2倍程度に上昇しており、ABA 生合成遺伝子の発現上昇および分解遺伝子の発現低下が確認された。また、GA 生合成遺伝子の発現は低下していた。したがって、*AtCSP2* は ABA および GA の代謝関連遺伝子の発現を制御することにより、発芽を負に制御している可能性が考えられた。

これらの結果から、*AtCSP2* は低温馴化に加え、植物の様々な生理的プロセスを制御することが明らかとなった。これらの生理的プロセスが *AtCSP2* を介した共通のメカニズムにより制御されているかは、今後の検討として興味深い。発芽過程において、*AtCSP2* は ABA 生合成を正に制御するが、ABA は耐凍性の正の制御因子でもある。本研究の結果は、*AtCSP2* が耐凍性の負の制御因子であることを示唆している。この相違は、*AtCSP2* が耐凍性と発芽を異なったメカニズムで制御していることを示している。また、*CBF* シグナル経路は ABA に制御されないことから、*AtCSP2* による耐凍性制御機構には ABA は関与しないと考えられる。シロイヌナズナの別の CSD タンパク質である *AtCSP3* は、核および細胞質内の RNA プロセシングに関与する様々なタンパク質と相互作用する。したがって、*AtCSP2* も同様な複合体を形成し、RNA プロセシングを介した遺伝子発現制御を行う多機能な調節因子であると推定される。今後、*AtCSP2* が関与する様々な生理的プロセスにおける相互作用タンパク質およびターゲット RNA を同定することが重要である。

学位論文審査の要旨

主 査	客員教授	今 井 亮 三
副 査	教 授	松 井 博 和
副 査	教 授	内 藤 哲 (生命科学院)
副 査	准教授	荒 川 圭 太
副 査	助 教	佐分利 亘

学 位 論 文 題 名

シロイヌナズナの低温ショックドメインタンパク質 AtCSP2の生理機能に関する分子生物学的研究

本論文は序章・終章を含む 5 章からなり、図 30、表 3 を含む総頁数 111 の和文論文である。別に 8 編の参考論文が添えられている。

凍結を含む低温ストレスは様々な植物種の生育あるいは生存に影響を与え、地理分布を制限する環境要因の 1 つである。北海道のような寒冷地帯では冬期に -20°C 以下に気温が低下するため、越冬性作物の生産性の向上には、耐凍性の強化が必要である。植物には、低温に応答して耐凍性を高める低温馴化というメカニズムが存在する。このメカニズムの解明は、植物の耐凍性向上の鍵であると考えられる。大腸菌では、低温に曝されると低温ショックタンパク質 (CSP) を高蓄積する。CSP は大腸菌が低温下で生育するために必須のタンパク質であり、低温下で形成される RNA の二本鎖構造を解消する RNA シャペロンである。CSP は低温下において、転写および翻訳の維持または活性化に働くと考えられている。CSP と構造が類似したタンパク質 (CSD タンパク質) が高等植物にも見出されたが、それらの機能に関する知見は乏しい。そこで、本研究ではシロイヌナズナの CSD タンパク質の 1 つである AtCSP2 に着目し、その機能解析を行った。

第 2 章では、AtCSP2 の生化学的機能および発現様式の解析を行った。生化学的解析から、AtCSP2 は核酸に結合し、二本鎖構造を解離すること等から、大腸菌 CSP と同様に RNA シャペロンであることが示された。また、AtCSP2 の mRNA およびタンパク質が低温により蓄積することから、低温馴化への関与が示唆された。組織特異的発現解析から、AtCSP2 は茎頂や根端、胚などの組織で特異的に発現しており、発生や生長への関与も示唆された。さらに、AtCSP2 の細胞内局在性は核と細胞質であることから、AtCSP2 は核内における RNA のプロセッシングあるいは細胞質における mRNA の機能発現制御に働く可能性が示唆された。

第 3 章では AtCSP2 の発現が低下した *atcsp2-3* 変異株および AtCSP2 過剰発現体を用いて、それらの耐凍性の評価を行った。*atcsp2-3* 変異株の耐凍性は低温馴化前および馴化後において、野生型株と同程度であった。そこで、AtCSP2 と最も相同性が高い AtCSP4 との二重変異株 (*atcsp2-3 atcsp4-1*) を作出し、その低温馴化後の耐凍性が顕著に向上することを明らかにした。一方、AtCSP2 過剰発現体においては、馴化

後の耐凍性が低下していることが判明した。したがって、AtCSP2 は低温馴化に依存した耐凍性の負の制御因子であり、その機能は AtCSP4 と重複すると結論された。低温馴化の正の制御因子である CBF の発現を二重変異株および過剰発現体を用いて解析した結果、CBF の発現が AtCSP2 により負に制御されることが判明した。興味深いことに、CBF の負の制御因子である MYB15 (転写因子) の発現が AtCSP2 過剰発現体で著しく上昇しており、逆に二重変異株では低下していた。これらの結果から、AtCSP2 は MYB15 の発現を上昇させることで、耐凍性を負に制御している可能性が示された。

第4章では、発生および生長過程における AtCSP2 の機能解析を行った。AtCSP2 過剰発現体で観察された長角果の縮小化の原因を解明するため、長角果の長さ、長角果あたりの種子数等を解析した結果、AtCSP2 は種子間隔の負の制御因子であることが示唆された。次に、AtCSP2 過剰発現体の発芽遅延の原因を調べるため、発芽の制御に働く主要な植物ホルモンであるアブシシン酸 (ABA) およびジベレリン (GA) 含量の測定、ABA あるいは GA 代謝遺伝子の発現解析を行った。その結果、AtCSP2 過剰発現体の ABA 含量は野生株の2倍程度に上昇しており、ABA 生合成遺伝子の発現上昇および分解酵素遺伝子の発現低下が確認された。また、GA 生合成遺伝子の発現は過剰発現体で低下していた。したがって、AtCSP2 は ABA および GA の代謝関連遺伝子の発現を制御することにより、発芽を負に制御すると結論された。

以上の結果から、AtCSP2 は低温馴化に加え、植物の様々な生理的プロセスを制御することが明らかとなった。その多面的効果は、別の CSD タンパク質である AtCSP3 と同様に、核および細胞質内において RNA プロセッシングに関与する様々なタンパク質と複合体を形成し、RNA プロセッシングを介した遺伝子発現制御を行うことによりもたらされると考察している。

このように、本論文は、シロイヌナズナの低温ショックドメインタンパク質 AtCSP2 の生理的機能を明らかにし、植物の低温馴化を制御する新たな因子を同定した点で高く評価される。よって、審査員一同は、佐々木健太郎氏が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。