

論文内容の要旨

論文題目 **Studies on a target gene and functional regulation of RSG,
a bZIP transcriptional factor**

(bZIP 型転写因子 RSG の標的遺伝子の探索及びその制御機構の解析)

氏名 深澤 壽太郎

序論

動植物を問わず、組織の構築や分化および恒常性の維持には遺伝情報の時間的・空間的に統制のとれた発現が不可欠である。RSG (repression of shoot growth)はオーキシンの転写制御に関する DNA 結合タンパク質をスクリーニングする過程で単離されたタバコの転写因子である。残念ながら RSG はオーキシンに関する転写因子ではなかったが、その後の解析で植物の形態形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。RSG は転写の活性化因子であり RSG と相同性の高い数個の遺伝子がタバコのゲノム中に見出された。機能が重複している遺伝子の場合、loss-of-function の変異体の単離や、アンチセンスによる機能抑制が困難と予想される。そこで RSG の植物体における機能を探るため、内在性 RSG の活性を選択的に阻害するドミナントネガティブ型 RSG を発現する形質転換タバコが作製された。ドミナントネガティブ型 RSG を発現する形質転換タバコは、茎の成長が著しく阻害され野生型に比べて背丈が 1/7 程度になった(図 1)。茎の表皮細胞を観察した結果、節間成長の阻害は表層微小管の構造破壊を伴う細胞伸長の阻害が主な原因であることが明らかとなった。

変異体を用いた分子遺伝学的な解析から形態形成に関与する転写因子が数多く同定されてきた。それらの転写因子がいかんして形態を制御しているのかを理解するためには標的遺伝子を明らかにすることが必須である。本研究では、RSG の機能を抑制した形質転換植物におけるジベレリン (GA) 内生量の変化を調べ、その結果を基に RSG の標的遺伝子を探索した。さらに RSG の機能調節機構を転写因子の細胞内局在制御の観点から解析した。

形質転換タバコにおける GA 内生量

RSG の機能を抑制した形質転換タバコに様々な植物ホルモンを投与した結果、GA 処理により、節間成長が回復し、対照植物に近い形態に戻った(図 2)。ブラシノライド、IAA は、効果が認められなかつ

た。過剰の GA を矮化した形質転換植物に投与すると、正常な茎の長さを超え徒長が観察された。RSG の機能を抑制した形質転換タバコでは、GA の受容や、GA 信号伝達は正常であると考えられる。そこでタバコの主要な活性型 GA である GA₁ を対照植物 SR1 と RSG の機能を抑制した形質転換タバコについて定量を行った。その結果、形質転換タバコでは、GA₁ の内生量が SR1 に比べて大きく減少していることが明らかとなった(図 3)。RSG の機能を抑制した形質転換植物では、GA の生合成が抑制されているか又は分解が活性化されていると考えられた。

次に GA₁ 生合成の中間産物と GA₁ の分解物 GA₈ の定量を行った。定量の結果 GA₈ の蓄積は認められず、RSG の機能を抑制した形質転換植物では、GA 分解系が活性化されていない事が明らかになった。活性型 GA はゲラルニルゲラルニリン酸 (GGDP) を材料として合成される。現在までにシロイヌナズナを中心に、5 種類の GA の生合成酵素 *ent-copalyl diphosphate synthase* (CPS), *ent-kaurene synthase* (KS), *ent-kaurene oxidase*, GA 20-oxidase, GA 3β-hydroxylase の遺伝子が単離されている。GA 3β-hydroxylase の基質である GA₂₀ 並びに、GA 20-oxidase の基質である GA₅₃, GA₄₄, GA₁₉ は GA₁ と同様に形質転換タバコで大きく減少していた(図 3)。以上の結果から、RSG の機能を抑制した形質転換タバコでは、20-oxidase が触媒する反応より上流で GA 生合成が抑制されたために活性型 GA が減少し矮化した形質を示したと考えられる。GA の定量は東大農学部・山口五十磨先生と理研・神谷勇治先生との共同研究である。

RSG の標的遺伝子の同定

植物は発生のプログラムに沿い、あるいは環境刺激の受容により植物ホルモンの内生量を調節し形態を変化させる。植物の形づくりを分子レベルで理解するために植物ホルモンの内生量制御機構の解明は必須であるが、その解析は遅れている。RSG は GA の内生量を制御する転写因子であり、その標的遺伝子の同定は特に重要である。またドミナントネガティブ変異を用いた逆遺伝学の問題点の一つは、他の制御因子への副次的な影響の可能性である。RSG は TGA1a など他の植物の bZIP 型転写因子と相互作用しない事が確かめられているが、ドミナントネガティブ型 RSG の発現による GA 内生量の低下が他の転写調節因子への cross-inhibition に起因する可能性を完全には否定できない。RSG の標的遺伝子の同定により RSG が GA 内生量を制御する事が証明されると考えた。

RSG の機能を抑制した形質転換タバコを用いた解析から、RSG の標的遺伝子の候補として GA 20-oxidase より上流に位置する GA の生合成系酵素 CPS, KS, *ent-kaurene oxidase* の遺伝子が挙げられる。これらの酵素をコードするシロイヌナズナ遺伝子のプロモーターを調べた結果、*ent-kaurene oxidase* をコードする GA3 遺伝子プロモーターの TATA box より上流約 400 bp に、RSG 結合配列と類似の配列が認められた。そこで、この領域を含む約 500 bp を最小プロモーター-GUS の上流に接続したレポーター遺伝子とし、全長 RSG をエフェクターとしてトランスアクティベーションの実験を行った。その結果、RSG は GA3 のプロモーターを活性化できることが明らかとなった(図 4)。

RSG の標的遺伝子の一つが、*ent-kaurene oxidase* 遺伝子であるならば、ドミナントネガティブ型 RSG により RSG の機能が抑制された形質転換タバコでは、*ent-kaurene oxidase* 遺伝子の発現量が低下していると考えられる。この遺伝子の発現量を解析するため、タバコの *ent-kaurene oxidase* 遺伝子 *NiKO* の cDNA を degenerate PCR により単離した(図 5)。このタバコの *NiKO* 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR によって調べた結果、対照植物 SR1 に対してドミナントネガティブ型 RSG 発現させた形質転換タバコでは、*NiKO* 遺伝子の発現量が低下していることが明らかとなった(図 5)。

RSG が *NiKO* 遺伝子の発現を直接制御しているのか調べるため、*NiKO* 遺伝子のプロモーターを単離した。*NiKO* プロモーター領域約 750 bp を GUS に接続し、RSG によるトランスアクティベーションの実験を行った。その結果、*NiKO* プロモーターも RSG の発現によって活性化できる事が示された(図 6)。次に *NiKO* プロモーター領域に RSG が結合するかをゲルシフト法により調べた。*NiKO* プロモーター -328 ~ -171 の 158bp の領域をカバーする各 30 bp の 6 つのプロープを用いた解析の結果、*NiKO* プロモーターには、b (-304 ~ -275) 及び、f (-200 ~ -171) の 2 つの RSG 特異的結合領域が存在することが明らかとなった(図 7)。RSG の標的遺伝子の 1 つは、GA 生合成酵素 *ent-kaurene oxidase* の遺伝子であり、そ

の制御は直接であると考えられる。

以上のように RSG の機能が抑制された形質転換タバコでは、標的遺伝子の 1 つである *ent-kaurene oxidase* の遺伝子発現が低下していた。その結果、活性型 GA である GA_1 が減少し矮化した形質を示したと考えられる。

RSG の局在制御機構

RSG を中心とした転写調節系がいかにして発生のプログラムと環境情報を統合し、GA の内生量を調節しているかを明らかにするためには、RSG の機能制御機構を解明する事が重要となる。遺伝子の秩序正しい発現調節には転写因子間の相互作用が重要である。RSG と相互作用する因子の 1 つとして 14-3-3 タンパク質が単離された。14-3-3 との結合には RSG の 114 番目のセリン残基が必須であり、14-3-3 は正の転写因子 RSG の活性を負に制御していることが示された。(五十嵐大亮、修士論文)

14-3-3 による RSG の機能制御を RSG の細胞内局在調節の観点から解析した。RSG は bZIP 型転写因子なので核に局在すると予想された。しかし、GFP との融合タンパク質を用いた解析の結果、RSG は核に局在するのではなく細胞質と核に一樣に分布することが明らかとなった(図 8)。一方、114 番目のセリン残基をアラニン残基に置換し 14-3-3 と結合できない RSG^{S114A} は核に局在していた(図 8)。14-3-3 による RSG の機能制御の実体は RSG の細胞内局在制御であると考えられる。

14-3-3 と RSG の結合は 114 番目のセリン残基のリン酸化によって制御されていると推定されることから 14-3-3 による RSG の機能制御に関して次のようなモデルを立てた。発生のプログラムや環境刺激に応答して、RSG の 114 番目のセリン残基がリン酸化されると RSG は 14-3-3 と結合し細胞質に繫留される。このリン酸基が除去されると RSG は 14-3-3 と解離し、核に局在し標的遺伝子の一つである GA 合成酵素遺伝子の転写を活性化し GA の内生量を上昇させるのではないかと考えられる。

まとめ

1. RSG の機能を抑制した形質転換タバコの矮化の主要な原因は、GA の内生量の低下である。この GA 内生量の低下は GA 20-oxidase が触媒する反応より上流における GA 生合成の抑制に起因することを明らかにした。
2. RSG の標的遺伝子の 1 つは、GA 生合成酵素 *ent-kaurene oxidase* の遺伝子である。
3. 14-3-3 による RSG の機能制御の実体は細胞内の局在調節であることを明らかにした。

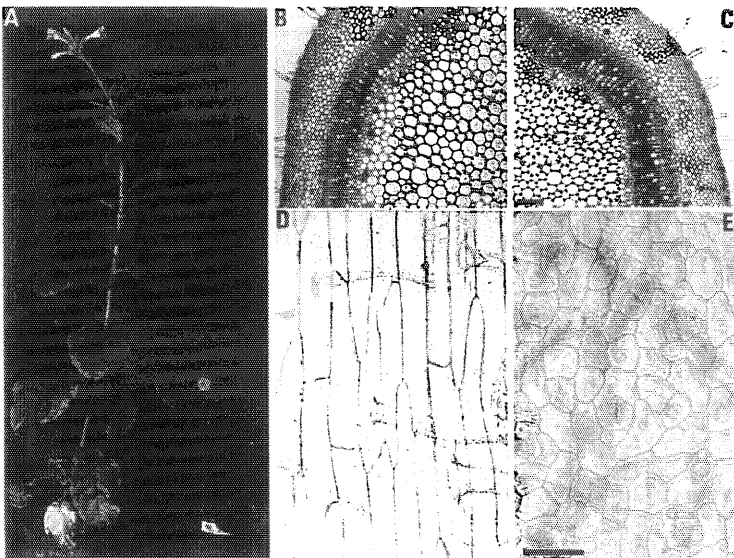


図1 RSG の bZIP ドメインを 35S プロモーターで過剰発現させた形質転換タバコ
A 左側はコントロールの SR1 タバコ、右側はドミナントネガティブ型 RSG を発現させた形質転換タバコ、第 8 節間の横断面 (B は SR1、C は形質転換体)、第 7 節間の表皮細胞 (D は SR1、E は形質転換体)

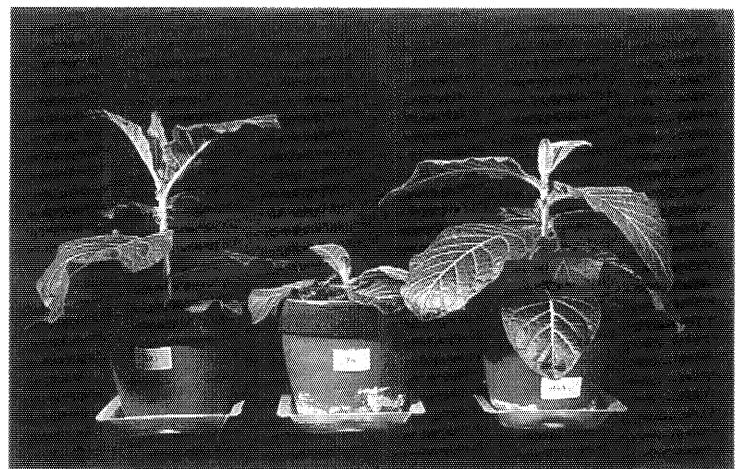


図2 ドミナントネガティブ型 RSG を発現させた形質転換タバコへのジベレリンの投与
左がコントロールの SR1、中央が dnRSG を発現させた形質転換タバコ、右がジベレリン処理を行った形質転換タバコ

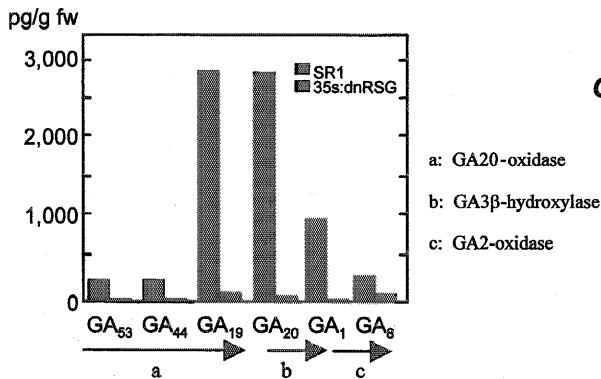


図3 内在性ジベレリン及びその中間体の蓄積量
タバコ活性型ジベレリン GA_1 及びその生合成中間体である GA_{53} , GA_{44} , GA_{19} , GA_{20} , GA_1 の分解物 GA_8 のタバコにおける蓄積量。青色のバーはコントロールのSR1, 赤色のバーはドミナントネガティブRSGを発現させた形質転換タバコの葉における蓄積量を示す。

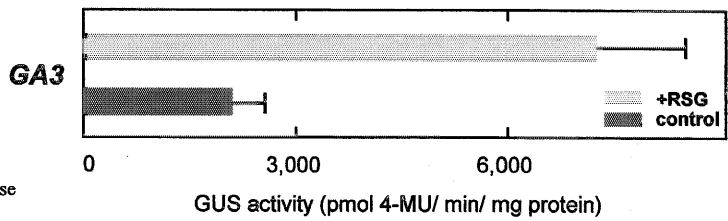


図4 RSGによるアラビドプシス *ent-kaurene oxidase* 遺伝子 $GA3$ のプロモーターの転写活性化

レポーター遺伝子として、528bpからなるアラビドプシス $GA3$ プロモーター ($GA3$ -GUS)を使用した。エフェクターとして、翻訳のエンハンサー- Ω 配列を導入した改変型35SプロモーターによりRSGを発現させた。レポータープラスミド $GA3$ -GUS (3 μ g)とエフェクタープラスミド 35S-RSG (7 μ g)をタバコ葉肉プロトプラスト内で一過的に発現させた。独立した3回の実験の平均値を示した。黄色のバーは、RSGを発現させた時のGUS活性、青色のバーはレポーターのみ。

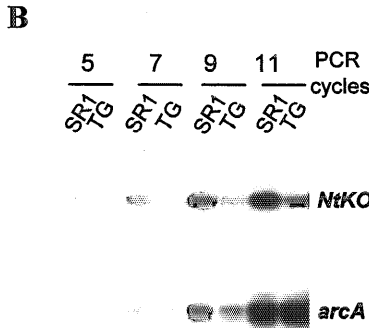
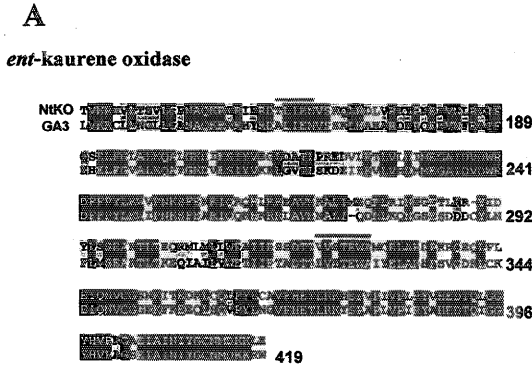


図5 *NtKO* のアミノ酸配列と *NtKO* の発現

A *NtKO*(タバコ)と $GA3$ (アラビドプシス)のアミノ酸配列の比較。同一のアミノ酸は黒白反転表示した。類似アミノ酸は灰色表示した。RT-PCRに用いたプライマーの領域を配列の上に実線で示した。

B RT-PCRによる $NtKO$ mRNA 蓄積量の比較。全RNAを用いRT-PCRにより5,7,9,11サイクルで増幅後、 ^{32}P 標識したcDNAをプローブを用いて、サザンブロット解析を行った。*arcA*は、同一の反応系で増幅し内部標準とした。SR1はコントロールSR1タバコ、TGはドミナントネガティブRSGを発現させた形質転換タバコ。

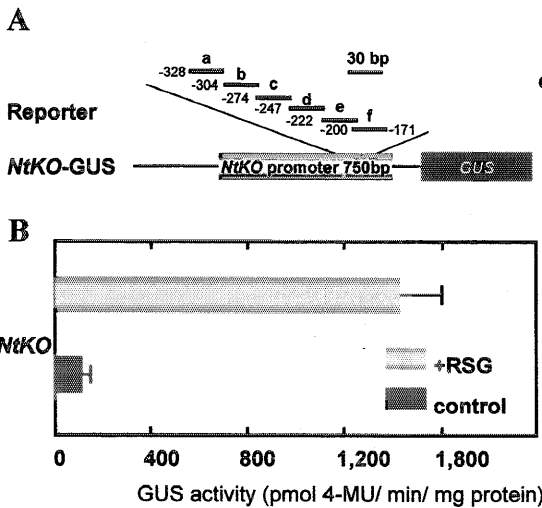


図6 RSGによるタバコ *ent-kaurene oxidase* 遺伝子 *NtKO* プロモーターの転写活性化

A レポーター遺伝子として、タバコ *NtKO* プロモーター 750 bpにGUSを接続したものをを使用した。

B RSGの発現による *NtKO* プロモーターの転写活性化。レポータープラスミド *NtKO*-GUS (3 μ g)とエフェクタープラスミド 35S-RSG (7 μ g)をタバコ葉肉プロトプラスト内で一過的に発現させた。独立した3回の実験の平均値を示した。黄色のバーは、RSGを発現させた時のGUS活性、青色のバーはレポーターのみ。

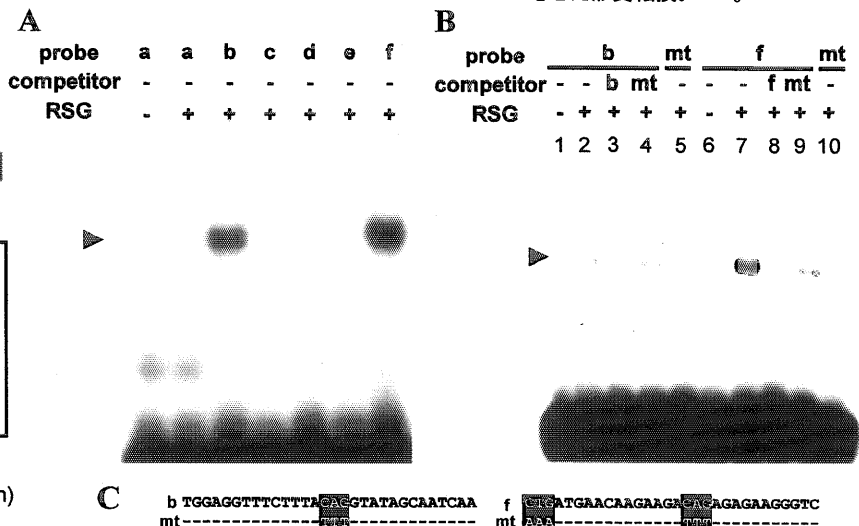


図7 *NtKO*プロモーター(-328~-171)の各30bp断片をプローブとしたゲルシフト解析

A a(-328~-299), b(-304~-275), c(-274~-244), d(-247~-218), e(-222~-192), f(-200~-171)断片をプローブとしたゲルシフト解析。標識したプローブを大腸菌で発現させたRSGタンパク質と反応させポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。黒矢頭はRSG-DNA複合体の位置を表す。

B b, f断片をプローブとしたゲルシフト解析。lane 1~4及び6~9は、それぞれb及びf断片の標識プローブ、lane5及び10は、b及びf断片に変異を導入した標識プローブを、大腸菌で発現させたRSGタンパク質と反応させている。lane3,4,8,9は、それぞれ競合体としてb断片、変異を導入したb断片、f断片、変異を導入したf断片を加えている。

C b, f断片の塩基配列及び、変異を導入したb, f断片 mtの塩基配列。

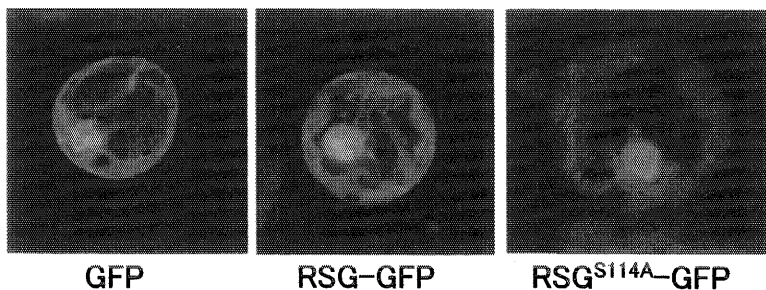


図8 RSG-GFP, RSG^{S114A} タンパク質の細胞内局在
葉肉プロトプラストにおいて改変型 35Sプロモーターにより、GFP, RSG-GFP, RSG^{S114A} -GFPタンパク質を一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。左が、GFP, 中央がRSG-GFP右が、 RSG^{S114A} -GFPを発現させた葉肉プロトプラスト。