

論文内容の要旨

論文題名 : Analysis of plant genes suppressing Bax-induced cell death in yeast

(酵母の Bax 誘導性細胞死を阻害する植物遺伝子の解析)

氏名 潘 玲

序論

細胞の死は、細胞内情報伝達にかかわる複雑なプロセスにより制御されている。動物の Bax は、Bcl-2 family に属するアポトーシス誘導性タンパク質である。近年 Bax 誘導性の細胞死が酵母で知られている。この系を利用して、Xu & Reed (1998) は、酵母の Bax 誘導性細胞死の抑制因子を動物の遺伝子から同定した。この結果は、酵母の中でも、Bcl-2 関連遺伝子が機能的に細胞死のプロセスを制御していることを示している。本研究では、アラビドプシスの cDNA ライブラリーより酵母の Bax 誘導性細胞死を抑えるものを単離する試みがなされた。その結果、*AtBI-1* (*Arabidopsis Bax Inhibitor-1*)、*Fe-SOD* (*Fe-superoxide dismutase*)、*peroxidase*、*GST* (*glutathione S-transferase*) などの遺伝子が得られた。驚くことに、最も高頻度で得られた遺伝子は *AtEBP* (*Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein*) であった。

申請者は本研究において、これらの結果を考察するとともに、植物における遺伝子発現及びその応答について解析した。

結果と考察

1. 酵母における Bax 誘導性細胞死の植物の抑制因子の単離

アラビドプシスの培養細胞由来の cDNA ライブラリーを酵母の発現ベクターに構築した。YEp51-Bax を BF264-15Dau に導入した酵母株 (QX95001) が用いられた。すなわち、マウスの全長 Bax タンパク質をガラクトース誘導性プロモータ (*GAL 10*) により発現をコントロールした (図 1)。本株は、グルコースからガラクトースを含む培基に移すことにより、Bax 誘導性細胞死を示す。そこで、アラビドプシス由来 cDNA ライブラリーを QX95001

株に導入し、Bax 抵抗性クローンをスクリーニングした。一次スクリーニングの結果、 10^6 クローンより約600コロニーがガラクトース培地の上で生存した。このような酵母から単離した cDNA を QX95001 株に再度導入したところ、最終的に34クローンが得られた。

塩基配列解析の結果、34クローンの中で2クローンが AtBI-1 であった(表1)。他の3クローンは、Fe-SOD、peroxidase、GST をコードした遺伝子であり、活性酸素の消去にかかわっていると予想された。最近、新規の GST/peroxidase がトマトから単離され、酵母内でも H_2O_2 誘導性ストレスに抵抗性を示した。この事は、活性酸素によるストレスが酵母内で Bax 誘導性細胞死の主因である事を示唆する。他に、GTP 結合タンパク質をコードする YPT/rab subfamily の遺伝子が確認された。興味ある事に、全クローンの82%が *AtEBP* 遺伝子であった。本遺伝子は、エチレン誘導性 GCC box 結合因子として知られている。一方、AtBI-1 は、動、植物に共通に認められる膜貫通ドメインを有する因子であった(図 2)。

2. *AtEBP* の解析

AtEBP は GCC box と特異的に結合する AP2 (ERF) ドメインを有する(図 3)。図4A 示したように、*AtEBP* を QX95001 株に導入すると、ガラクトース培地の上でも生存が確認された。この結果から、*AtEBP* が Bax 誘導性細胞死を強く抑制する事が示された。一方、Bax タンパク質(21kDa)はコントロールベクター(pYX112)又は *AtEBP* を有するプラスミド(pYX112-*AtEBP*)を導入した両酵母で検出された(図 4B)。この事は、*AtEBP* は酵母の Bax タンパク質の発現を阻害しない事が確かめられた。*AtEBP* のどの部位が Bax 誘導性細胞死の抑制に関与するかを調べるために、図5Aのような実験を行った。その結果、全長を有するもののみはガラクトース培地上で生存し、全長の配列が必須である事が示された(図 5B)。

酵母内での *AtEBP* の細胞内局在を調べるため、本タンパク質の N-末端或は C-末端に GFP を連結し、QX95001 株で発現させた。両者とも、ガラクトース培基上で、Bax 誘導性細胞死抑制能を有した(図 6)。蛍光顕微鏡で観察したところ、GFP-*AtEBP* 及び *AtEBP*-GFP 共に核に局在した。NLS 配列を削除した *AtEBP* が核に移行しなかった事から、*AtEBP* の核局在が細胞死阻害因子として必須であると考えられる。

次に、Bax と *AtEBP* を有する酵母の細胞形態を観察した。Bax 発現細胞では核や液泡、及び細胞分裂の異常を示した。*AtEBP* は、それらの異常を回復した。

3. 植物における *AtEBP* の解析

AtEBP の植物細胞での機能を調べる目的で、*AtEBP* 遺伝子を過剰発現するタバコ BY-2 細胞が得られた(図 7)。 H_2O_2 に対する応答を Evans blue 処理による死細胞の解析により比較した。その結果、コントロールと比べて、*AtEBP* を過剰に発現する細胞では約2倍の H_2O_2 耐性が観察された(図 7)。

次にエチレン信号伝達アラビドプシス突然変異体を用い、*AtEBP* mRNA 蓄積量を比較した(図 8)。その結果、*AtEBP* の発現は、*ctr1-1* では上昇したが、*etr1*、*ein2* 及び *ein2-1* で低下した。注目されたのは、*ein3-1* で *AtEBP* の発現量が野生型植物と同等したところ、*AtEBP* は EIN2 の下流で、EIN3 の上流に存在する可能性が認められた。

今後、植物の細胞死における *AtEBP* の機能をさらに解析する必要がある。

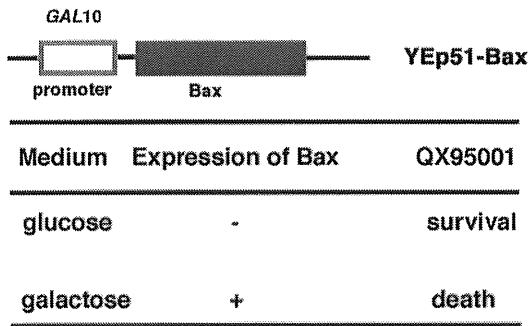


図 1 スクリーニング用ベクターの模式図。スクリーニングの為に、YEp51-Bax を BF264-15 Dau (*MAT α ade1 his2 leu2-3, 112 trp 1-1a ura3*) に導入した *S. cerevisiae* 酵母株 (QX95001) を用いた。マウス *Bax* 遺伝子はガラクトース誘導性プロモータ (*GAL 10*) により発現がコントロールされた。すなわち、グルコースからガラクトースを含む培地に移すことにより、*Bax* タンパク質が蓄積し、酵母細胞は死ぬ。

表 1 *Bax* 誘導性細胞死抑制因子の要約。

Gene	Numbers of cDNA clones
(a) Transcription <i>Ethylene-responsive element binding protein (AtEBP)</i>	28
(b) Membrane protein <i>Bax Inhibitor-1 (AtBI-1)</i>	2
(c) Detoxification of ROS <i>Fe superoxide dismutase (SOD)</i> <i>Peroxidase</i> <i>Glutathione S-transferase (GST)</i>	1 1 1
(d) Vesicle transport <i>Small G-protein (YPT/rab)</i>	1

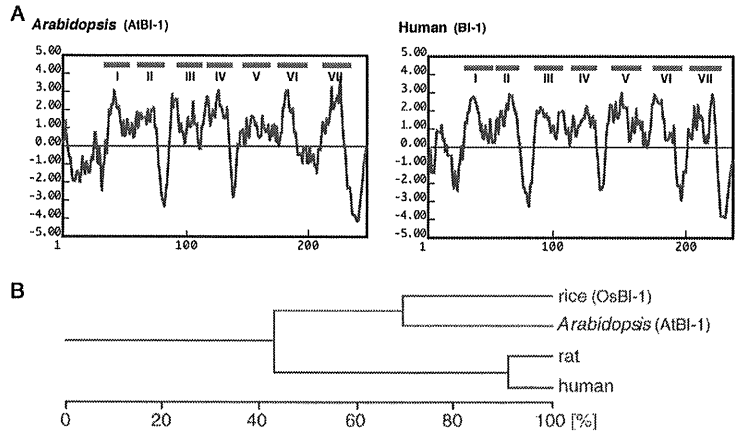


図 2 (A) アラビドプシス及びヒト BI-1 タンパク質の膜貫通ドメインの予想図。(疎水性は、Kyte & Doolittle の方法で予測した。膜貫通ドメインは、SOSUI プログラムで解析した。) (B) UPGMA による植、動物 BI-1 タンパク質の系統関係図。

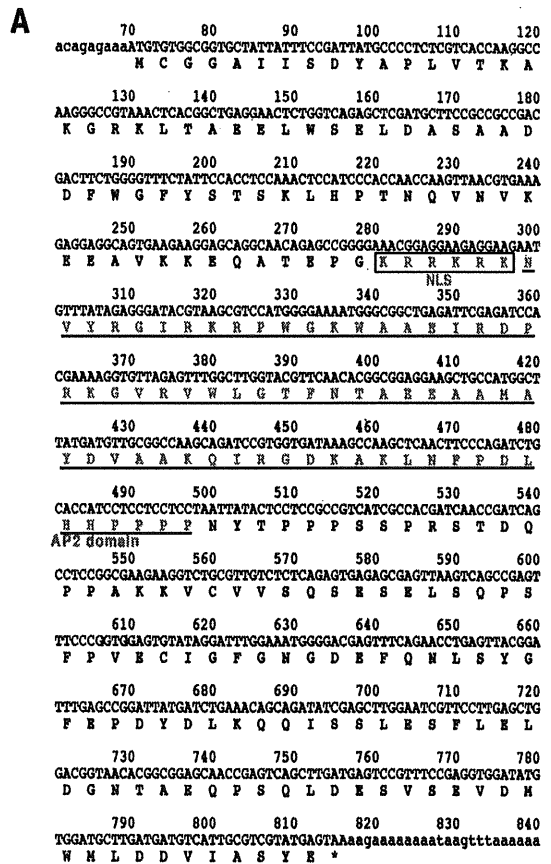


図 3 (A) AtEBP 塩基配列及びアミノ酸配列。予想される核局在シグナル (NLS)。下線は、AP2ドメイン (ある種の PR 遺伝子プロモータに存在する GCC モテーフと結合する)。(B) AtEBP のタンパク質構造。

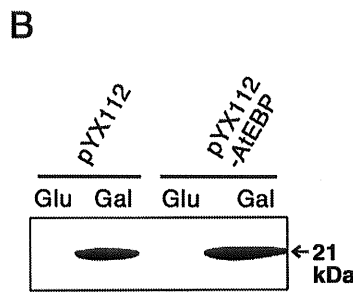
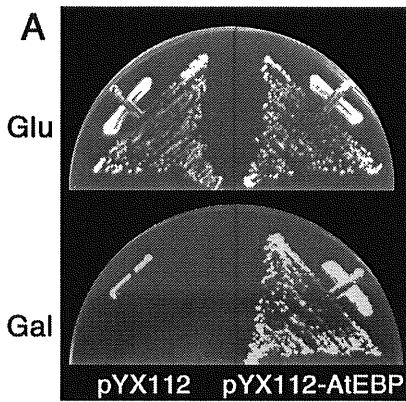


図 4 AtEBPによるBax誘導性細胞死の抑制。(A) コントロールベクター (pYX112) 又はAtEBPを有するプラスミド (pYX112-AtEBP) をQX95001株に導入し、コロニーをグルコース又はガラクトースを含む培地で、30度、3日培養した。(B) AtEBPを発現する酵母株におけるBaxタンパク質の検出。PYX112又はpYX112-AtEBPをQX95001株に導入し、グルコース培地で約12時間培養した。続いて、グルコース又はガラクトースを含む培地で16時間培養した。Baxタンパク質 (21 kDa)。

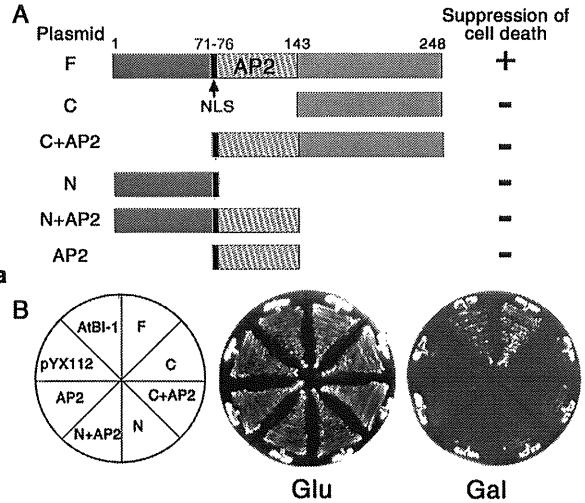


図 5 AtEBP変異体の解析。コントロールベクター (pYX112 & AtBI-1)、全長のAtEBP (F)及びAtEBP欠損体 (C、C+AP2、N、N+AP2 & AP2) をQX95001株に導入し、グルコース又はガラクトース培地で30度3日間培養した (A)。

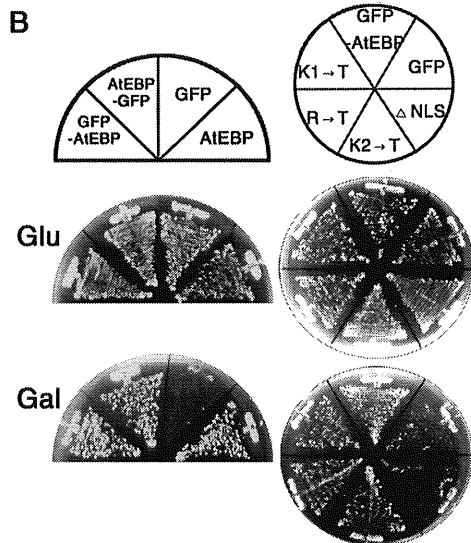
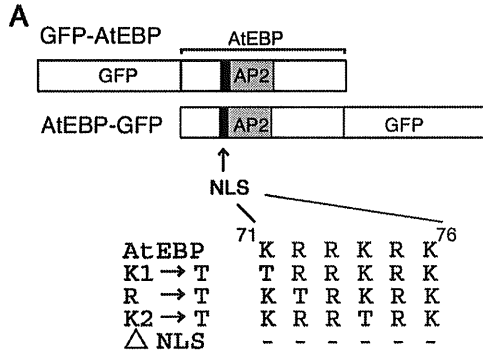


図 6 GFP-AtEBP及びNLS変異体による酵母細胞死の解析。(A) GFP-AtEBP又はAtEBP-GFP、NLS変異体 (K1→T、R→T、K2→T & ΔNLS) を示す。AtEBPのN末端 (GFP-AtEBP) 又はC末端 (AtEBP-GFP) にGFP (m-gfp-ER, ER signal removed) を連結した。GFP-AtEBPを用い、NLS変異体を構築した。(B) Bax遺伝子を有する酵母細胞に各ベクターを導入し、グルコース (Glu) 及びガラクトース (Gal) を含む培地で培養した。

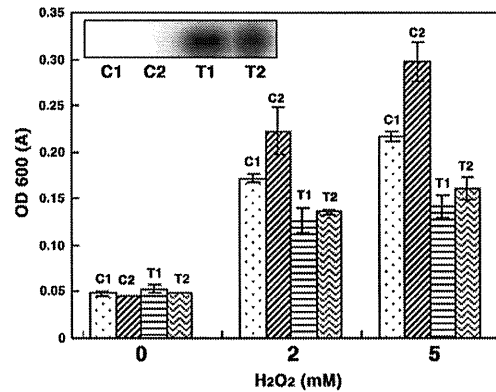


図 7 AtEBP遺伝子を過剰発現するBY-2細胞を用いた過酸化水素の効果。タバコBY-2細胞 (培養10日目) を異なる濃度のH₂O₂で4時間処理し、Evans blue処理した。死細胞に結合する色素を溶解し、吸光度600 nmで測定した。AtEBPをプローブとしたノザン解析の結果 (内図)。C1 & C2, vector control lines; T1 & T2, BY-2 possessing AtEBP lines。

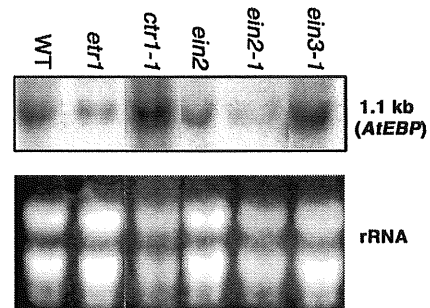


図 8 エチレン信号伝達アラビドプシス突然変異体におけるAtEBP mRNA蓄積量の比較。Wild type (WT)及び変異体 (etr1, ctr1-1, ein2, ein2-1 & ein3-1) から抽出したRNAを用い、AtEBP cDNAをプローブとしたノザン解析結果。