

論文審査の結果の要旨

氏名 潘 玲

本論文は3章からなり、第1章は、酵母における Bax 誘導性細胞死の抑制因子の単離、第2章は AtEBP の解析、第3章は植物における AtEBP の解析について述べられている。

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。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*、*Fe-SOD*、*GST* 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* 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。

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。本株は、グルコースからガラクトースを含む培基に移ることにより、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。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。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。

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 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 (21 kDa) 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。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。

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。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。

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。H₂O₂ 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 H₂O₂ 耐性が観察された。

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。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。

本研究は、酵母を用いた細胞死抑制因子の解明に向けて重要な知見であると判断する。したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。尚、本論文は、川合真紀博士、L.H.Yu 博士、K.M.Kim 博士、平田愛子博士、梅田正明博士、内宮博文博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。