

論文の内容の要旨

論文題目 高等植物におけるエチレン生合成系酵素の転写後制御機構に関する
分子遺伝学的解析

氏 名 吉 田 均

エチレンは果実の成熟や病原菌感染応答などの形質を制御する重要な植物ホルモンのひとつである。エチレンの前駆体である 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) の合成反応がエチレン生合成の律速段階となっているが、この反応を触媒する ACC 合成酵素 (ACS) は、遺伝子の転写時だけでなく、その転写後においても制御を受けることが知られている。シロイヌナズナにおいては、現在 3 つのエチレン過剰合成変異体 *eto1*, 2, 3 (*ethylene-overproducer1*, 2, 3) が報告されており、*ETO2* 遺伝子は ACS アイソフォームのひとつ *AtACS5* を、*ETO3* 遺伝子は *AtACS9* をコードし、いずれもカルボキシ末端 (C 末端) 領域における変異がエチレン過剰合成の原因である。*eto2-1* および *eto1* 変異体において *AtACS5* タンパク質が過剰に蓄積することから、*AtACS5* の C 末端領域が *ETO1* およびプロテアソームを介した制御系の標的部位であることが示唆されている。一方、*eto1* は劣性突然変異体であり、*ETO1* 遺伝子はエチレン生合成の負の制御因子と考えられるが、その機能の詳細は不明である。そこで、本研究においてはシロイヌナズナのエチレン過剰合成変異体 *eto1* から原因遺伝子を単離し、分子遺伝学および生化学的手法によってイネやトマトを含む高等植物における ACC 合成酵素の転写後制御機構を明らかにすることを目的とした。

1. シロイヌナズナのエチレン生合成を抑制する *ETO1* 遺伝子の解析

マップベースクローニングにより *ETO1* 遺伝子を単離したところ、*ETO1* はアミノ末端 (N 末端) 側に BTB、C 末端側に TPR および coiled-coil (CC) という 3 種

類のタンパク質間相互作用モチーフを持つ新規のタンパク質をコードしていた。シロイヌナズナのゲノム中には2つの *ETO1* パラログ *EOL1* (*ETO1-LIKE1*) および *EOL2* が存在していた。また、*ETO1* と相同な配列は他の植物種にも広く見出されたが、動物や微生物などには存在せず、*ETO1* は植物に固有のタンパク質であると考えられた。*eto1* 変異体の9つのアレルのうち、7つでTPRドメインの欠失もしくはアミノ酸置換が起きており、TPRドメインが*ETO1* タンパク質の機能に必須であることが示唆された。

yeast two-hybrid 法、*in vitro* pull-down 法、免疫共沈降法による解析の結果、*ETO1* と *AtACS5* は直接相互作用し、*eto1-1* 変異を模倣した *ETO1* のC末端のTPRモチーフの欠失、あるいは *eto2-1* 変異を模倣した *AtACS5* のC末端12アミノ酸の欠失によって、この相互作用は消失することがわかった。さらに、*ETO1* と *AtACS5* の両遺伝子に loss-of-function 変異を持つ二重突然変異体 *eto1 eto2-2* は、エチレン過剰合成の表現型を示さなかったため、*eto1* 変異体のエチレン過剰合成には *AtACS5* の活性が必要であると考えられ、植物体内における *ETO1* と *AtACS5* との相互作用が支持された。

ACC 要求性の⁺大腸菌株における発現系および *in vitro* 酵素アッセイを用いて、*AtACS5* の酵素活性に対する *ETO1* ファミリータンパク質の影響を調べたところ、*ETO1* ファミリータンパク質は直接の相互作用を介して *AtACS5* の酵素活性を阻害することがわかった。このことは *ETO1* を過剰発現する形質転換シロイヌナズナにおいて *AtACS5* によるエチレン生合成が抑制されたことによって支持された。

一方、植物細胞内における *AtACS5* タンパク質の蓄積量は、*eto1* 変異、*AtACS5* のC末端12アミノ酸の欠失、プロテアソーム阻害剤処理によって増加し、*ETO1* の高発現によって減少した。さらに、*in vitro* pull-down 法による解析の結果、*ETO1* の BTB ドメインは E3 ユビキチンリガーゼの構成因子である *CUL3* と特異的に相互作用した。これらのことから、*ETO1* は *AtACS5* を E3 ユビキチンリガーゼへと導き、分解を促進する基質特異的アダプタータンパク質として機能すると考えられた。

以上の一連の結果より、*ETO1* ファミリータンパク質は、*AtACS5* の酵素活性を直接阻害するとともにプロテアソーム依存的タンパク質分解系へと導く、という2つの機能によって、高等植物のエチレン生合成を転写後レベルで制御することが明らかとなった。

2. トマトにおける *ETO1* ファミリータンパク質の機能解析

yeast two-hybrid 法により、シロイヌナズナの *ETO1* とトマトの3つの ACS アイソフォームとの相互作用を解析したところ、果実の主要 ACS である *LE-ACS2*、*LE-ACS4* とは相互作用しなかったが、オーキシン誘導性の *LE-ACS3* とは強く相

相互作用した。そこで、シロイヌナズナおよびトマトの既知の ACS アイソフォームについて ETO1 の標的部位と考えられる C 末端のアミノ酸配列を比較したところ、その構造によって3つのタイプに分類でき、ETO1 と相互作用する AtACS5 および LE-ACS3 はいずれも特異的な C 末端アミノ酸配列を持つタイプ 2 に属していた。一方、ETO1 と相互作用しなかった LE-ACS2 はタイプ 1 に、LE-ACS4 はタイプ 3 に分類された。

ETO1 と相互作用する LE-ACS3 および相互作用しない LE-ACS2 の間でキメラタンパク質を作出し、yeast two-hybrid 法によって ETO1 との相互作用を解析したところ、ETO1 との相互作用には WVF モチーフ、RLSF モチーフ、および R/D/E リッチ領域からなるタイプ 2 ACS 特異的な C 末端配列が必要であることがわかった。

さらに、トマトにおける ETO1 ファミリータンパク質の機能を明らかにするため、トマトの *ETO1* オルソログである *LeEOL1* の cDNA を単離した。*LeEOL1* は ETO1 と同様に N 末端側に BTB、C 末端側に TPR および CC モチーフを持っており、ETO1 と同様にエチレン生合成を抑制する機能を持つことが強く示唆された。RT-PCR 解析の結果、*LeEOL1* は新鮮な葉、老化葉、茎、根および花で発現していたが、蕾では発現レベルが極めて低かった。果実の成育過程においては、*LeEOL1* はクリマクテリックなエチレン生合成量が急速に低下していく「full-ripe」ステージで発現していたが、それ以前の「immature green」、「mature green」、「turning」、「pink」、「red」の各ステージでは発現が検出されず、*LeEOL1* がトマト果実の成熟時におけるエチレン生合成の制御に関わっている可能性が示唆された。

yeast two-hybrid 法による解析の結果、*LeEOL1* も ETO1 と同様にタイプ 2 ACS と特異的に相互作用し、その相互作用にもタイプ 2 ACS 特異的な C 末端配列が必要であったため、この配列を TOE (target of ETO1) 配列と名付けた。

シロイヌナズナの *ETO1* 遺伝子をトマトで過剰発現させたところ、果実形質に顕著な変化は見られなかったのに対し、オーキシン処理した幼苗においては *LE-ACS3* mRNA の転写が野生型と同程度に誘導されたにも関わらず、エチレン生合成量が減少した。このことから、ETO1 が *LE-ACS3* を転写後レベルで抑制することがわかった。

以上の結果から、ETO1 ファミリータンパク質はトマトにおいても特異的にタイプ 2 ACS を転写後レベルで抑制すると考えられた。

3. ETO1 ファミリータンパク質の標的配列の解析

シグナル配列としての TOE の普遍的な機能を明らかにするため、トマトの *LE-ACS3* 由来の TOE を GFP に連結してイネカルスに導入したところ、GFP による蛍光が消失した。*GFP-TOE* 導入カルスと野生型 *GFP* 導入カルスとで mRNA およびタンパク質の蓄積量を比較した結果、TOE の付加によって GFP タンパク質の

蓄積量が低下したことが蛍光消失の原因であることがわかった。イネの OsACS1 由来の TOE を付加した場合にも GFP による蛍光が消失したことから、TOE は高等植物に普遍的なタンパク質分解シグナルとして機能すると考えられた。

GFP-TOE を *eto1* 変異体で発現させたところ、蛍光が観察されたことから、野生型植物においては GFP-TOE は ETO1 の機能によって分解されたものと考えられた。また、GFP-TOE を過剰発現する植物体をプロテアソーム阻害剤で処理すると、やはり蛍光が観察されたことから、この分解はプロテアソームによって触媒されていると考えられた。

以上の結果から、広く高等植物において ETO1 ファミリータンパク質は TOE 配列を持つタンパク質を認識し、プロテアソームに導くことによってその分解を促進することがわかった。

以上、本研究は、エチレン過剰合成変異体を用いた分子遺伝学および生化学的解析を行い、ETO1 ファミリータンパク質によるエチレン生合成系酵素 ACS の転写後制御機構を明らかにしたものである。