

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉田 均

重要な植物ホルモンのひとつであるエチレンの生合成において、前駆体である ACC の合成反応が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、転写時だけでなく、転写後においても制御を受ける。シロイヌナズナにおいて 3 つのエチレン過剰合成変異体 *eto1*, *2*, *3* が報告されており、*ETO2* は AtACS5 を、*ETO3* は AtACS9 をコードし、いずれも ACS のカルボキシ末端 (C 末端) における変異がエチレン過剰合成をもたらす。*eto2-1* および *eto1* で AtACS5 が過剰に蓄積することから、AtACS5 の C 末端が ETO1 およびプロテアソームによる転写後制御の標的部位と考えられるが、*ETO1* の機能の詳細は不明である。本研究は、*ETO1* 遺伝子を単離し、高等植物における ACS の転写後制御機構を解明することを目的として行ったものである。本論文の内容は、主に 3 つの章から構成されている。

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

ETO1 は BTB、TPR および 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植物固有の新規タンパク質をコードしていた。*eto1* の 7 つのアリルで 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* の機能に必須と考えられた。

ETO1 と AtACS5 は相互作用し、*ETO1* の TPR モチーフあるいは AtACS5 の C 末端の欠失によって相互作用は消失した。さらに、*ETO1* と AtACS5 の両遺伝子に機能欠失変異を持つ *eto1 eto2-2* はエチレン過剰合成の表現型を示さず、*eto1* のエチレン過剰合成には AtACS5 の活性が必要と考えられた。

大腸菌および *in vitro* のアッセイ、*ETO1* 過剰発現植物の解析により、*ETO1* ファミリータンパク質が AtACS5 の酵素活性を直接阻害することがわかった。

一方、植物細胞内の AtACS5 タンパク質量は、*eto1* 変異、AtACS5 の C 末端の欠失、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、*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も機能すると考えられた。

2. トマトにおける ETO1 ファミリータンパク質の機能解析

ETO1 はトマトの LE-ACS3 と強く相互作用したが、LE-ACS2、LE-ACS4 とは相互作用しなかった。C末端の構造によって ACS を 3 つのタイプに分類したところ、タイプ 2 ACS の C 末端に特異的な WVF モチーフ、RLSF モチーフ、および R/D/E リッチ領域が ETO1 との相互作用に必要であることがわかった。

トマトの ETO1 オルソログである *LeEOL1* は新鮮葉、老化葉、茎、根、花で発現していたが、蕾では発現が弱かった。また、クリマクテリックなエチレン生合成量が急速に低下する「full-ripe」ステージの果実で発現していたが、それ以前の果実では発現が検出されなかった。*LeEOL1* もタイプ 2 ACS と特異的に相互作用したため、タイプ 2 ACS 特異的な C 末端配列を TOE (target of ETO1) 配列と名付けた。

オーキシン処理した ETO1 過剰発現トマトの幼苗では、LE-ACS3 mRNA は野生型と同等に誘導されたが、エチレン生合成の増加が抑制されていた。

3. ETO1 ファミリータンパク質の標的配列の解析

LE-ACS3 およびイネの OsACS1 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 タンパク質の蓄積量低下により蛍光が減少し、TOE は高等植物のタンパク質分解シグナルとして機能すると考えられた。また、*eto1* 変異、プロテアソーム阻害剤処理によって GFP-TOE の蛍光が回復することから、野生型植物では ETO1 とプロテアソームの活性によって GFP-TOE が分解されると考えられた。

以上、本研究は、分子遺伝学および生化学的解析により、高等植物の ETO1 ファミリータンパク質が、TOE 配列を持つタイプ 2 ACS の酵素活性を阻害するとともに分解を促進することにより、エチレン生合成を抑制することを明らかにしたものであり、学術上、応用上価値が高い。よって、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。