

論文内容の要旨

論文題目 **A study of Small Acidic Proteins that are involved
in plant hormone responses**

(植物ホルモン応答に関わる**Small Acidic
Protein**の研究)

氏 名 中曾根 光

<序論>

オーキシンは、細胞分裂・細胞伸長など、植物にとって必須な生理機構を制御する植物ホルモンである。近年の研究より、細胞内におけるオーキシン情報伝達は、ユビキチン E3 リガーゼ SCF^{TIR1/AFBs} を中心としたユビキチン依存的なタンパク質分解機構を介して行われることが知られてきた。SCF^{TIR1/AFBs} は、オーキシン受容体である F-BOX タンパク質 TRANSPORT INHIBITOR 1/AUXIN SIGNAING F-BOX PROTEINS (TIR1/AFBs)が構成要素となっている。オーキシンと結合した TIR1/AFBs は、分解基質 AUX/IAAs を認識し、AUX/IAAs へのユビキチンの付加を促進する。オーキシン誘導性遺伝子の転写活性調節を行う Auxin Response Factors (ARFs)は、AUX/IAAs が SCF^{TIR1/AFBs} によってユビキチン化され分解されると、下流遺伝子に情報伝達を行う。この SCF を介したユビキチン依存性タンパク質分解機構は、更に AUXIN RESISTANT 1 (AXR1)や COP9 SIGNALOSOME (CSN) によって制御される CUL1 への RELATED UBIQUITIN 1 (RUB1)の着脱 (RUB 化・脱 RUB 化)を通して活性制御を受けている。一連のオーキシン情報伝達制御機構の詳細は、RUB のオーキシン情報伝達における役割など、解明されていない点も多く、新奇の変異体を得て解析を進めてゆくことが必要である。

新しいスクリーニングの手段として抗オーキシン剤 *p*-chlorophenoxyisobutyric acid (PCIB)に着目し、根において PCIB 耐性を示す変異体 *anti-auxin resistant (aar)*の獲得を行なった。本研究では、オーキシン情報伝達機構の上流で機能する新たなオーキシン関連遺伝子のシロイヌナズナ変異体を得、その遺伝子がコードするタンパク質の機能解析を行った。

<結果・考察>

第1章 新奇オーキシン関連変異体 *aar1-1* の解析と原因遺伝子のクローニング

抗オーキシン剤 PCIB を用いたスクリーニングにより新奇オーキシン関連変異体を取得した。そのうちの一つ、*aar1* 変異体は、合成オーキシン 2,4-D に耐性を示し、胚軸が長いなどの特徴が見られた(図1)。また、*aar1-1* ゲノムには 44kbp の欠失があり、変異の原因遺伝子はその欠失領域に位置する *SMAP1* (*Small Acidic Protein 1*) 遺伝子であることが相補実験と RNAi 実験より示された。オーキシン輸送阻害剤を使用した実験やオーキシン関連のレポーター遺伝子の解析から、*SMAP1* タンパク質はオーキシン情報伝達の上流で機能するのではないかと予想された。また、この遺伝子は動植物で広く保存されているため、*SMAP* が植物ホルモンの応答機構のみならず、動植物共通に重要な機構において機能を果たしているのではないかと考えられた。この遺伝子の機能を解析することで、オーキシン情報伝達機構の新たな一面の解明につながることを期待された。

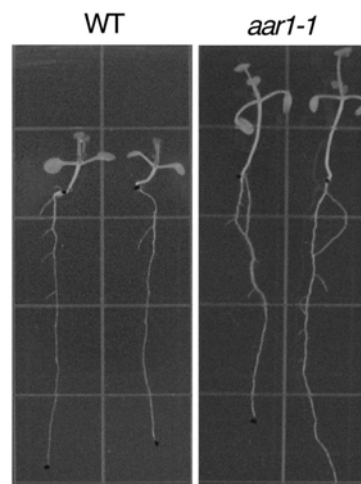


図1. 野生型植物と PCIB によって選抜された新奇オーキシン変異体 *aar1-1* の発芽7日目目の幼苗の写真。

第2章 *SMAP1* の発現解析と機能解析

SMAP1 は 62 アミノ酸からなるタンパク質である。データベース上では、類似遺伝子が動植物ゲノムに広く存在するものの、これらにおいても機能解析が全くなされていなかった。また、既知の機能ドメインなども見つからなかった。そこで、*SMAP1* の機能を明らかにするために発現解析とドメイン解析を行った。

2-1. *SMAP1* の発現解析

まず、*SMAP1* とシロイヌナズナゲノム中の *SMAP1* 相同性遺伝子 *SMAP2* の各器官における発現を、Northern 法と Reverse Transcriptase (RT)-PCR 法により解析した。Northern 法の結果では、*SMAP1* はロゼッタ葉、側葉、乾燥種子では発現が弱いものの、植物体全体で発現しているのに対し、*SMAP2* は果実(莢)に限定的に発現していることが示された。更に詳細なデータを得るために、花器官の RT-PCR 解析も試みた。その結果、*SMAP1* は Northern 法の結果同様に各花器官においても恒常的な発現が見られたが、*SMAP2* では葯と果実(莢)において発現していることが示された(図2)。

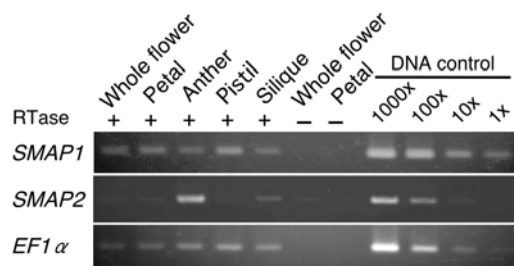


図2. 花器官における *SMAP* 遺伝子発現解析
RT-PCR により *SMAP1* および *SMAP2* の発現解析を行った。

次に、*SMAP1* プロモーターの発現を組織化学的に観察するため、*SMAP1* 遺伝子の転写開始点上流 5 kbp のゲノム断片にレポーター遺伝子 *GUS* を連結して形質転換体を作り、*GUS* の発現パターンを観察した。その結果、*PSMAP1::GUS* では、恒常的な発現が見られたが、胚軸の上部や葉柄下部における発現は *P35S::GUS* に比べ弱かった。また *PDR5::GUS* との比較から、*SMAP1* プロモーターはオーキシン活性が低いと考えられている領域でも活性が高く、より恒常的な発現を示した。

2-2. *SMAP1* の遺伝学的解析

SMAP1 とオーキシン情報伝達機構との関係を遺伝学的観点から明らかにするため、*aar1* とオーキシン情報伝達に関係するいくつかの変異体とを交配し、二重変異体の作出を試みた。その結果、*axr1-12* と *aar1-1* の二重変異体は致死となることが分かった。また、*axr1-12* において *SMAP1* 遺伝子を過剰発現させると、*axr1-12* の形態異常が緩和された。これらの結果から、*SMAP1* の機能は *AXR1* の機能と強く関連していることが示唆された。

2-3. *SMAP1* アミノ酸の一次構造と機能解析

SMAP1 のC末端側に有る動植物共通で保存されている領域は、フェニルアラニン(F)とアスパラギン酸(D)に富んでおり、これを F/D 領域と名付けた。この F/D 領域に着目し、この保存領域と *SMAP1* の関係を調べた。*SMAP1* の全長と *GFP* を *SMAP1* プロモーター下流で連結させたコンストラクト、C末端保存領域 F/D を欠失させたコンストラクト、N末端から 20、36、44 アミノ酸欠失させたコンストラクト *PSMAP1::SMAP1-GFP* (略して *SMAP1-GFP*)、*PSMAP1::SMAP1ΔF/D-GFP* (同 *SMAP1ΔF/D-GFP*)、*PSMAP1::ΔSMAP1-1-GFP* (同 *D1*)、*PSMAP1::ΔSMAP1-2-GFP* (同 *D2*)、*PSMAP1::ΔSMAP1-3-GFP* (同 *D3*) を作製し、*SMAP1* 欠失変異体 *aar1-1* に導入した。まず、*SMAP1* の細胞内局在を調べたところ、F/D 領域を欠失している *SMAP1ΔF/D-GFP/aar1-1* 以外の *SMAP1* は核に局在し、この局在は F/D 領域の有無に依存することが分かった。また、2,4-D 培地で生育した 10 日目植物の根を観察

したところ、*SMAP1-GFP/aar1-1* と *D1/aar1-1* は根の生育が阻害され、*aar1-1* の変異形質を相補したが、他の形質変換体では相補しなかった。この結果より、FD 領域は *SMAP1* の局在に必要であり充分であるが、*SMAP1* が機能するためには N 末端側の始めの 20 アミノ酸を除いた、少なくとも 42 アミノ酸が必要であることが明らかとなった。

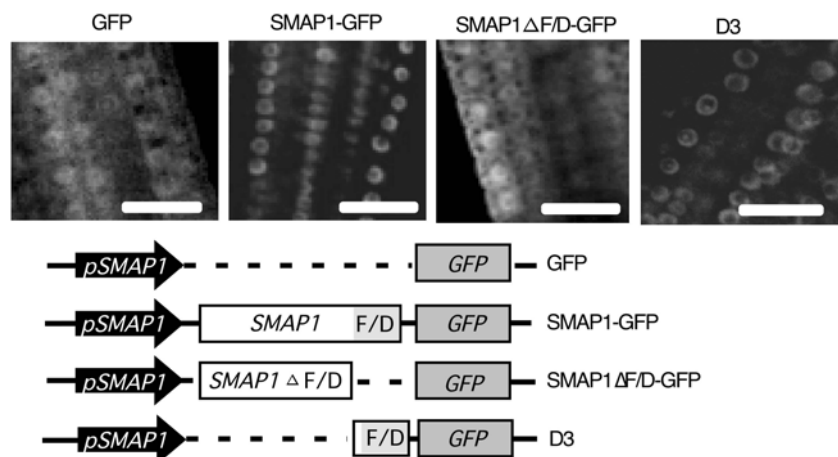


図3. *PSMAP1::SMAP1-GFP/aar1-1* 形質変換体各種を用いた *SMAP1* の局在解析。根の根端部において *SMAP1-GFP* タンパク質は核局在している、その局在には C 末端の F/D 領域が重要であった。

2-4. *SMAP1* 相互作用タンパク質の探索

タンパク質の機能を探索する上で、相互作用して機能するタンパク質を同定することは非常に有効である。そこで、2-3 における実験で使用した形質変換体を用いて *GFP* 抗体によるプルダウン実験を行った。*GFP*、*SMAP1-GFP*、*SMAP1ΔF/D-GFP* の *aar1-1* 形質変換体から、総タンパク質を抽出し、*GFP*、*SMAP1-GFP*、または *SMAP1ΔF/D-GFP* と相互作用するタンパク質複合体をそれぞれ精製後 SDS-PAGE で分離し、比較した。F/D 領域特異的に相互作用しているタンパク質バンドを特定し、質量分析で同定した結果、*CSN* のサブユニットが複数同定された(図4)。また、大腸菌で発現させた *GST-SMAP1* 各種と *aar1-1* 植物の総タンパク質を用い、*in vitro* 系で *GFP* プルダウン実験を行った。抗 *CSN4* 抗体を用いた Western 法で解析した結果、*CSN4* のバンドが検出されたことから、*GST-SMAP1* と *CSN* との相互作用が確認された。また、F/D 領域の存在が *CSN* と相互作用において必要充分条件であることが示唆された。

以上の研究で SMAP1 との関係が示された AXR1 と CNS は、共に SCF 複合体の構成サブユニットである CUL1 の RUB 修飾に関わる因子であることが分かっている。そこで、野生型、*axr1-12* の変異形態を緩和した形質変換体 *axr1-12/35S::SMAP1-GFP*、および *axr1-12* 植物を用い、それぞれの植物における CUL1 の RUB 化状態を抗 AtCUL1 抗体を用いた Western 法で解析した。その結果、*axr1-12* で減少している RUB-CUL1 の存在量が *35S::SMAP1-GFP* を導入した植物では回復している事が示された。以上の結果から、SMAP1 は CSN を介し、RUB 化・脱 RUB 化に関連した機能を保持している事が推察された。

第3章 SMAP1 の相同性遺伝子 SMAP2 の機能解析

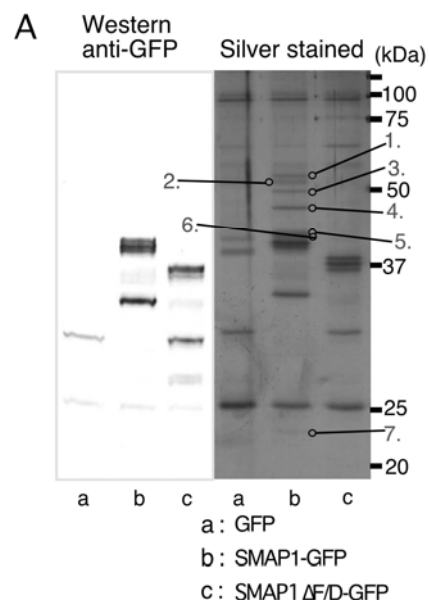
シロイヌナズナゲノムには *SMAP* 遺伝子が2つ存在しており、その一つ *SMAP2* 遺伝子は先述のように、非常に発現が弱く、葯や莢で特異的な発現をしていた。そこでこの遺伝子が *SMAP1* 同様にオーキシン情報伝達に関与する能力が有るかどうかを調べるために、*SMAP2* 遺伝子を *35S* プロモーターの下流で強制発現させるコンストラクトを作製し、*aar1-1* へ導入した。その結果、*SMAP1* の過剰発現と同様に *SMAP2* でも *aar1-1* の 2,4-D 感受性が回復し、*SMAP2* もオーキシン情報伝達に関与することが示された。オーキシンは果実や葯の発達や成熟に機能していることが知られており、同器官で発現がある *SMAP2* は、それらの器官に特異的なオーキシン情報伝達に関係が有る可能性がある。

<結論>

新奇オーキシン関連変異体、*aar1-1* の原因因子は *SMAP1* タンパク質であることが示された。AXR1 変異体を用いた遺伝学的な解析から、*SMAP1* が AXR1 と機能的に関係が強いことが示された。*SMAP1* の核局在や機能には保存されている C 末端の F/D 領域が重要であり、F/D 領域を介して CSN 複合体と相互作用することが明らかとなった。CSN は脱 RUB 化、AXR1 は RUB 化にそれぞれ機能することで、オーキシン上流の情報伝達機構を制御しているが、*SMAP1* もこれらの因子とともに RUB 修飾の調節機構に機能していることが示唆された。

<発表論文>

1. A. Rahman, A. Nakasone, T. Chhun, C. Ooura, K. K. Biswas, H. Uchimiya, S. Tsurumi, T. I. Baskin, A. Tanaka and Y. Oono. (2006). "A small acidic protein1 (SMAP1) mediates responses of the Arabidopsis root to the synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid." *The Plant Journal* 47: 788-801.
2. A. Nakasone, M. Kawai-Yamada, T. Kiyosue, I. Narumi, H. Uchimiya, and Y. Oono, (2009). "A gene encoding SMALL ACIDIC PROTEIN 2 potentially mediates the response to synthetic auxin, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, in Arabidopsis thaliana." *J of Plant Physiol.* 166:1307-1313.



B

Identified proteins	Accession number	Estimated mass (kDa)
1. CSN1	(At3g61140)	51.1
2. CSN2	(At2g26990)	51.5
3. CSN4	(At5g42970)	45.2
4. CSN3	(At5g14250)	48.2
5. CSN5A	(At1g22920)	39.8
6. GAPC2	(At1g13440)	37.0
7. CSN8	(At4g14110)	22.7

図4. SMAP1 と相互作用するタンパク質の探索。A. GFP タグを使用してブルダウン後、SDS-PAGE を行い、Western 法と銀染色を行った。F/D 領域特異的に検出したバンドを1～8まで番号で示した。B. 切り出したタンパク質をトリプシン消化でペプチド化し、LC-MS/MS 解析を行ってペプチド配列を同定した。配列データを Mascot データベースで解析したところ、CSN のサブユニットが同定された。