

論文審査の結果の要旨

氏名 中曾根 光

本論文は、3章から構成され、第1章は新奇オーキシン関連変異体 *antiauxin resistant1 (aar1)* の解析とその原因遺伝子 *SMALL ACIDIC PROTEIN 1 (SMAP1)* の同定、第2章は *SMAP1* の発現解析と機能解析、第3章は *SMAP1* の相同遺伝子 *SMAP2* の機能解析について述べられている。

植物ホルモンオーキシンは、植物の中で多様な生理作用を調節しており、長年にわたって様々な側面から研究が進められてきたが、その機能を果たすうえでのシグナル伝達機構の詳細は未だに解明されていない。これまでの研究から、シロイヌナズナを用いての解析が有効であることが示されており、オーキシン耐性変異体から明らかにされた、*AUXIN RESISTANT 1 (AXR1)* や *AtCULLIN 1 (AtCUL1)* 遺伝子、またオーキシン処理によってユビキチン依存的に分解される AUX/IAA タンパク質群などの解析により、オーキシンはユビキチン-プロテアソーム分解系を通じてそのシグナルが伝達されると考えられている。本論文提出者の中曾根光は、シロイヌナズナの新奇オーキシン関連変異体の解析から、オーキシンのシグナル伝達に関与する *SMAP1* 遺伝子を単離した。また、*SMAP1* タンパク質の機能解析を行い、このタンパク質が CSN と相互作用し、オーキシンのユビキチン-プロテアソーム分解系を制御する小さなタンパク質 RELATED TO UBIQUITIN 1 (*RUB1*) タンパク質の着脱を介してシグナル伝達に影響を及ぼしている可能性も見いだした。これはオーキシンのシグナル伝達およびユビキチン-プロテアソーム系の調節機構を理解するうえで、極めて有意義な情報である。

第1章では、新奇のオーキシンシグナル伝達に関わる変異体を効率よく得るため、オーキシンそのものや輸送阻害剤を用いた従来の方法ではなく、抗オーキシン剤 *p-chlorophenoxyisobutyric acid (PCIB)* を用いて選抜を行い、新奇変異体 *antiauxin resistant (aar)* を複数単離し、その中の一つ、*aar1* の解析とその原因因子の特定を行った。根の伸長解析や、オーキシン誘導性レポーター *DR5* の発現解析で野性型植物と *aar1* 変異体を比較した結果、*aar1* では合成のオーキシン 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) に対する感受性が低下している

ことが確認されたが、天然のオーキシシン indole-3-acetic acid (IAA)や他の合成オーキシシン 1-naphthaleacetic acid (NAA)に対する感受性は野性型と同じであることを見いだした。また、オーキシシン処理によって分解される AUX/IAA タンパク質の一つ AXR3 の分解を *HS::AXR3NT-GUS* を導入した野性型と *aar1* を用いて観察し、2,4-D 低感受性を確認し、*AAR1* がオーキシシンシグナル伝達系の AUX/IAA 分解ステップの上流で機能していることも示した。ポジショナルクローニングにより、*aar1* の原因因子 *SMAP1* を特定した。*SMAP1* にコードされるタンパク質は、既知の機能モチーフを持たないが、C 末端のフェニルアラニン(F)とアスパラギン酸(D)を多く含む領域 (F/D 領域と名付けた) を保有しており、類似の配列をもつ遺伝子が動植物に広く存在していた。

第2章では、遺伝学的手法(掛け合わせ)により、*SMAP1* がオーキシシンのシグナル伝達機構で機能することが知られている *AXR1* と関連した機能を持つことが示された。また、GFP タグを付加し可視化された *SMAP1* タンパク質を観察することにより、*SMAP1* が核に局在していること、その局在には F/D 領域が必須であることが示された。また、GFP タグを用いてプルダウンアッセイを行い、*SMAP1*-GFP と相互作用するタンパク質を単離し、LC-MS/MS 解析を行ったところ、COP9 signalosome (CSN)のサブユニットが同定された。この結果により、*SMAP1* は CSN と相互作用しているということが示された。*AXR1* と CSN は、オーキシシン情報伝達機構において中心的な役割をになうユビキチン・リガーゼのサブユニット AtCUL1 に RUB1(動物においては NEDD8)という小さなタンパク質を着脱することにより、共にオーキシシンシグナル伝達を制御しており、*SMAP1* もこの RUB 修飾サイクルに機能しているのではないかと考えられた。抗 AtCUL1 抗体で、野性型、*axr1-12* 変異体、*axr1-12* の形質が緩和された *35S::SMAP1-GFP/axr1-12* 植物個体を用いて Western 法で解析したところ、*SMAP1* を導入した *axr1-12* では AtCUL1 の NEDD 化が促進されていることが確認され、*SMAP1* が RUB サイクルに関与していることが示された。

第3章では、新規遺伝子 *SMAP1* の相同遺伝子 *SMAP2* の機能解析が行われた。Northern 法と RT-PCR 法を用いて解析した結果、シロイヌナズナにおいて、*SMAP1* が広く発現しているのに対し、*SMAP2* では莢と雄しべに発現が限られていることが分かった。また、*SMAP2* の過剰発現植物体を使用した実験では、*SMAP2* の過剰発現が *SMAP1* 欠失変異体 *aar1* を相補することより、*SMAP2* も *SMAP1* 同様に合成

オーキシシ 2,4-D の応答に関与していることが示された。

なお、本論文第1章はAbidur Rahman、Tory Chhun、大浦千春、Kamal Kanti Biswas、内宮博文、鶴見誠二、Tobias I. Baskin、田中淳、大野豊 各氏との共同研究、本論文第3章は川合真紀、清末知宏、鳴海一成、内宮博文、大野豊 各氏との共同研究で、共著論文として論文発表をしているが、本論文提出者の寄与が十分であると判断する。また、本論文第2章も、大野豊氏との共同研究であるが、これも本論文提出者の寄与が十分であると判断できる。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。