

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 19 年度博士課程 入学
氏名 小平憲祐
指導教員 篠崎和子

論文題目

シロイヌナズナの C2H2 型 zinc-finger タンパク質 AZF1、AZF2 の機能解析

序論

植物は、動物のように自ら移動する手段を持たないため、環境からの種々のストレスにさらされる。環境ストレスには、乾燥、高塩、低温、高温などのストレスが含まれ、これらのストレスは植物の正常な成長と発達を阻害する。植物は、多数の遺伝子群の発現を制御することで環境ストレスを克服している。乾燥、高塩、低温などの浸透圧ストレス下の植物では、多数の遺伝子の発現が誘導または抑制されている。シロイヌナズナの C2H2 型 zinc-finger タンパク質である STZ/ZAT10 は、転写抑制ドメインを持ち、転写抑制因子として機能する。ZAT10 遺伝子を過剰発現させた植物は、矮化し、乾燥や高塩ストレスに対して耐性を示すことが報告されている。ZAT10 は、環境ストレス下の植物の成長制御、および耐性の獲得において重要な役割を担っていると考えられている。シロイヌナズナのゲノムには、ZAT10 に相同性の高い 5 個の遺伝子 AZF1、AZF2、AZF3、ZAT6、ZAT8 が存在する。これらの遺伝子は、シロイヌナズナの浸透圧ストレス応答に関与していると考えられる。

本研究では、ZAT10 に相同性の高い AZF1 と AZF2 に注目して、これらの遺伝子の高塩ストレス下における機能を解析した。また、AZF1 や AZF2 の標的遺伝子の同定を行った。

1. STZ ファミリータンパク質の系統解析および細胞内局在の解析

シロイヌナズナには、ZAT10 に相同性の高い 18 個の C2H2 型 zinc-finger タンパク質が存在した。これらのタンパク質の中で、AZF1、AZF2、AZF3、ZAT6、ZAT8、STZ/ZAT10 は、特に相同性の高いファミリーを形成しており、このファミリーを STZ ファミリーと命名した。STZ ファミリーに相同性の高いタンパク質の配列を用いて、コケ、シダ、裸子、被子植物における C2H2 型 zinc-finger タンパク質の分子系統樹を作成した。STZ ファミリーに相同性の高いタンパク質は、被子植物に広範に保存されており、被子植物の C2H2 型 zinc-finger タンパク質は、大きく 2 つのクラスに分類された。一方のクラスには、STZ ファミリーのみが属しており、STZ ファミリー内におけるタンパク質の機能の類似性が示唆された。

STZ ファミリーにおいて、AZF1、AZF2、AZF3、ZAT10 は、細胞内で核に局在し、転写抑制因子として機能することが報告されている。そこで、全ての STZ ファミリーに関して、GFP 融合タンパク質を用いて細胞内局在を観察した。AZF/ZAT-GFP 融合タンパク質は、細胞内の核で観察され、STZ ファミリータンパク質は、全て核に局在することが示唆された。

2. STZ ファミリー遺伝子のストレス誘導性および組織特異的発現の解析

RNA ゲルブロット法による解析の結果から、ZAT6 と ZAT10 遺伝子の mRNA の蓄積量は、乾燥、高塩、低温、高温の全てのストレスで増加した。AZF3 遺伝子の mRNA の蓄積は、高温ストレスでのみ誘導された。一方、AZF1 や AZF2 遺伝子の mRNA の蓄積量は、主に乾燥および塩ストレスで増加した。ZAT8 遺伝子は、これらすべてのストレスで誘導されなかった。GUS レポーター遺伝子を用いた STZ ファミリー遺伝子のプロモーター解析の結果、AZF1、AZF2、ZAT6、ZAT10 遺伝子は、根の成熟領域で強く発現していることが示された。また、乾燥ストレス下で、AZF2、ZAT6、ZAT10 遺伝子は、植物の本葉で顕著に誘導されることが示唆された。

分子系統解析の結果、STZ ファミリーは、さらに AZF1、AZF2、ZAT8 と、AZF3、ZAT6、ZAT10 の 2 つのクラスに分類されることが示されている。前者のクラスの遺伝子は、高温ストレス応答性を示さず、後者の遺伝子とは異なる機能を持つことが示唆された。乾燥や高塩ストレス下の植物における AZF1、AZF2、ZAT8 遺伝子の機能は解析されていないため、これらの遺伝子の機能解析を行うことにした。

3. AZF1 と AZF2 の機能の重複

GVG 転写誘導系の制御下で導入遺伝子を過剰発現した植物 (*pTA7002:AZF/ZAT*) を用いて、遺伝子発現解析を行った。*AZF1* および *AZF2*、ならびに *ZAT8* 遺伝子を過剰発現した植物を用いたマイクロアレイ解析において、mRNA の蓄積量が 2 倍以上に減少した遺伝子は、それぞれ、468、1670、196 個であった。*AZF1* および *AZF2* 遺伝子の過剰発現体で発現が抑制された遺伝子には、151 個の共通な遺伝子が含まれており、*AZF1* と *AZF2* は、浸透圧ストレス下で共通の下流遺伝子の発現を抑制することが示唆された。*ZAT8* と *AZF1* および *ZAT8* と *AZF2* の下流遺伝子の共通性は非常に低く、*AZF1* と *AZF2* の機能の重複に注目して解析を行った。

4. 植物体における *AZF1* および *AZF2* の組織特異的発現および機能の解析

AZF1 および *AZF2* と GFP の融合タンパク質をそれぞれのプロモーター領域の制御下で発現した植物を用いて、GFP の局在を観察した。*AZF1*-GFP および *AZF2*-GFP の蛍光は、主に根の成熟領域の表皮細胞で観察された。さらに *AZF2*-GFP では、ABA 処理により葉の孔辺細胞で、塩ストレスにより葉の表皮細胞と孔辺細胞で GFP 融合タンパク質が誘導されることが示された。

pTA7002:AZF1 および *pTA7002:AZF2* 植物は、葉柄の湾曲を示し、顕著に矮化した。また、これらの過剰発現体ならびに *RD29A* プロモーターの制御下で *AZF1* および *AZF2* 遺伝子を発現した植物は、顕著な高塩感受性を示した。*AZF2* プロモーターの制御下で *AZF2* 遺伝子を発現した植物 (*AZF2pro:AZF2*) も高塩感受性を示した。

マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果、*AZF2pro:AZF2* 植物では、89 個の遺伝子の発現が 2 倍以上に抑制されていた。一方、*AZF2pro:AZF2* 植物で発現が 2 倍以上に誘導された遺伝子は、27 個と少なかった。*AZF2pro:AZF2*、*pTA7002:AZF1*、*pTA7002:AZF2* 植物で発現が減少した遺伝子には、浸透圧ストレスおよび ABA 処理で mRNA の蓄積量が減少し、オーキシンにより発現が誘導される遺伝子が多数含まれていた。また、これら *AZF1* や *AZF2* の下流遺伝子には、mRNA の転写や糖質、脂質、二次代謝に関与する遺伝子が多く含まれていた。

5. *AZF1* や *AZF2* の標的遺伝子の同定

AZF2pro:AZF2、*pTA7002:AZF2*、*pTA7002:AZF1* 植物で共通に発現が抑制された遺伝子を調べた結果、多数の *SAUR* 遺伝子が、*AZF1* や *AZF2* の共通の下流遺伝子であることが示唆された。シロイヌナズナの *SAUR* 遺伝子には 70 個以上のホモログが存在し、分子系統解析の結果、それらのホモログは大きく 3 つのクラスに分類された。*AZF1* や *AZF2* により発現制御を受ける *SAUR* 遺伝子は、2 つのクラスに局在しており、もう 1

つのクラスのホモログに比べて顕著なオーキシン誘導性を示した。AZF1 と AZF2 の標的候補遺伝子として、*SAUR63* と *SAUR20* を選択した。ゲルシフト法により、AZF1 および AZF2 と MBP の融合タンパク質が *SAUR63* と *SAUR20* のプロモーター領域に結合することを確認した。また、定量 RT-PCR 法により、変異体 *azf1 azf2* において、AZF1 と AZF2 による *SAUR* 遺伝子の発現抑制が低下していることを確認した。

総括

本研究では、シロイヌナズナの C2H2 型 zinc-finger 転写抑制因子である AZF1 と AZF2 の機能を解析した。AZF1 と AZF2 は、浸透圧ストレス下の植物で、ABA で発現が抑制される多数の下流遺伝子の発現を負に制御していることが示された。AZF1 と AZF2 に共通な下流遺伝子には、オーキシン応答性の遺伝子が多数含まれており、オーキシン誘導性を示す *SAUR* 遺伝子の多くは、AZF1 と AZF2 の標的遺伝子であることが示唆された。AZF1 と AZF2 は、転写抑制因子として、浸透圧ストレス下の植物の成長・発達およびストレスの感受性の制御に関与すると考えられた。今後、*AZF1* や *AZF2* とホモログの多重変異体を用いて、表現型の解析を行うことにより、環境ストレス下における STZ ファミリーの生理的機能が解明されると期待される。

発表論文

Kodaira, K., Qin, F., Tran, L.S., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.: Arabidopsis C2H2 Zinc-Finger Proteins AZF1 and AZF2 Negatively Regulate ABA-Repressive and Auxin-Inducible Genes under Abiotic Stress Conditions. *Plant Physiology*, in press.