

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 津釜 大侑

三量体 G タンパク質 (以下 G タンパク質。G α 、G β 、G γ のサブユニットから構成される) は真核生物に保存された、細胞内信号伝達に関わるタンパク質である。G タンパク質に関する研究は動物において先行しているが、動植物間でのゲノム情報を比較すると、G タンパク質介在性信号伝達に関わる因子の数や種類には違いが見られる。このことから、よく調べられた動物のものとは異なる、植物独自の G タンパク質介在性信号伝達の機構が存在する可能性が想定される。シロイヌナズナの G β サブユニット (AGB1) の欠損変異体は野生型との表現型の違いが顕著であり、AGB1 は重要な生理機能を持つと考えられる。このことから申請者は AGB1 及びその相互作用因子に着目して解析を行い、植物の G タンパク質介在性信号伝達経路の一端を解明することを目指した。

1 章の緒論では、研究の背景、意義と目的について述べた。

2 章では、ブラシノステロイド (BR。植物ホルモンの一つ) の信号伝達経路に対する AGB1 の関与について検討した。

AGB1 の欠損変異体の表現型から AGB1 の BR 応答性への関与は示唆されていたものの、確立された BR 信号伝達のモデルは、特定の型のプロテインキナーゼ・ホスファターゼによるリン酸化のリレーとそれによる下流の BZR ファミリーなる転写因子のリン酸化状態の制御により構成されており、AGB1 がこれら既知の BR 関連因子を制御するか否かは不明であった。

BR 生合成阻害剤のブラシナゾール (BRZ) を用いた解析等により、AGB1 の欠損変異体である *agb1-1* と *agb1-2* の BR 感受性低下を確認した。そして、BZR1 なる BR 応答経路の下流の転写因子と、それに点変異を持つ *bzr1-1* を *agb1-1* に過剰発現させた。野生型における *bzr1-1* の発現は BRZ に対する耐性を付与することが知られていたが、*bzr1-1* の過剰発現により *agb1-1* の遺伝的背景においても BRZ の影響が低減された。また、BZR1 の過剰発現により ABA の影響が低減されることも見出した。BRZ と ABA への応答性に対して、BZR1 又は *bzr1-1* 過剰発現の効果と AGB1 の欠損の効果は相加的であったことや、BZR1 のリン酸化状態及び細胞内局在の解析から、AGB1 は BZR1 と独立に BR 応答を制御することが示唆された。

GSK なる一群のプロテインキナーゼも既知の BR 応答経路の制御因子である。AGB1 のアミノ酸配列には 17 の推定 GSK 修飾サイトがあり、それらの幾つかは AGB1 の推定立体構造の表面に位置したため、GSK の一つである BIN2 と AGB1 との相互作用を解析した。この結果、生理的意義は不明であるものの、AGB1 と BIN2 が *in vitro* で相互作用すること

が明らかになった。

3章では、AGB1の物理的相互作用因子であるbZIPタンパク質VIP1について詳細な解析を行った。

酵母ツーハイブリッド法によりAGB1の物理的相互作用因子を探索し、VIP1が酵母細胞内でAGB1と相互作用することを見出した。更に、プルダウン解析と二分子蛍光相補法(BiFC)により、*in vitro*及び植物細胞でのAGB1とVIP1との相互作用を確認した。この相互作用の生理的意義に関しては不明な点が多く残ったが、BiFCのパターンから、VIP1の浸透圧応答経路における機能(後述)をAGB1が制御する可能性が示唆された。

次にVIP1の機能に関して詳細に解析を行い、細胞の吸水に伴う膨圧の上昇時にVIP1の核局在性が一過的に増大することを見出した。*CYP707A1*と*CYP707A3*(*CYP707A1/3*)なる遺伝子は細胞の吸水に応じて一過的にその転写量が増大することが知られており、その転写量の経時変化が吸水時のVIP1の細胞内局在の経時変化と整合すると考えられたため、VIP1と*CYP707A1/3*との相互作用について解析を行った。この結果、VIP1は*in vitro*、*in vivo*で*CYP707A1/3*のプロモーター領域に結合し、そのプロモーター活性を上昇させることが示された。また、VIP1の過剰発現により高浸透圧ストレス下での成育遅延が促進されることも明らかになり、これらの結果よりVIP1の浸透圧応答経路への関与が強く示唆された。また、VIP1のリン酸化状態を解析し、PP1又はPP2Aなるプロテインホスファターゼによる脱リン酸化がVIP1の核局在性増大に必要であることを示した。更に、複数のVIP1相同因子についても解析を行い、それらをコードする遺伝子がVIP1と同程度に転写されていること、それらの細胞内局在がVIP1と同様の挙動を示すこと、それらがVIP1と二量体を形成しうることを確認し、VIP1とVIP1相同因子が浸透圧応答経路において冗長に機能する可能性を示した。

以上のように、本研究ではヘテロ三量体Gタンパク質とその物理的相互作用因子について詳細な解析を行い、ブラシノステロイド信号伝達へのAGB1の関与と、AGB1の相互作用因子VIP1の機能、特に植物の浸透圧応答経路に対する関与について極めて興味深い結果を得た。本研究で得られた成果は、植物の環境応答を理解する上で非常に重要であり、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委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。