

論文内容の要旨

申請者氏名 川邊 陽文

維管束植物は、水や無機塩類を輸送するために道管を発達させている。道管の基本単位は道管細胞であり、厚い二次細胞壁を発達させ、プログラム細胞死を起こすことで水輸送の機能を担う。これまでに道管細胞分化のマスター制御因子として、*VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN (VND)* ファミリーが同定されている。シロイヌナズナゲノムには7つの *VND* ファミリー遺伝子が存在するが、これらの中でも *VND7* はとくに強い道管細胞分化誘導活性を持つことが報告されている。さらに、*VND7* の上流因子や下流因子、相互作用因子の探索と機能解析の結果、*VND7* は二次細胞壁肥厚とプログラム細胞死に関わる遺伝子群の発現を正に発現しうることで、さらに *VND7* はエピジェネティクスな発現制御だけでなく、タンパク質レベルの翻訳後制御など、緻密な機能調節制御下にあることが示唆されてきた。しかしながら、その実態は未解明であり、本研究では、*VND7* が制御する道管細胞分化に関する新たな分子メカニズムを順遺伝学的に明らかにするため、*VND7* の制御下で誘導される道管細胞分化が異常となった新規変異体の解析を行った。

順遺伝学的解析の材料としては、*VND7* 機能をグルココルチコイド依存的に誘導し、異所的な道管細胞分化を全身的に誘導可能なシロイヌナズナ形質転換体 *VND7-VP16-GR* ラインを用いた。このラインのエチルメタンスルホン酸処理変異体プールから、*VND7* 機能誘導による異所的な道管細胞分化が抑圧された劣性変異体として得られた 2B-8 ラインを研究対象とした。表現型解析の結果、2B-8 ラインでは、特に芽生え地上部器官における異所的な道管細胞分化の抑制と顕著な生育障害が観察された。さらに、*VND7* の直接的制御下にあることが分かっている遺伝子 *LBD30* および *MYB46* (転写因子)、*CesA4*、*CesA7* および *CesA8* (セルロース合成酵素遺伝子)、*IRX8* および *IRX10* (ヘミセルロース合成酵素遺伝子)、および *XCP1* (細胞死に関わるプロテアーゼ遺伝子) の発現レベルを RT-qPCR で調べたところ、2B-8 ラインではすべての遺伝子の発現誘導が顕著に抑制されていた。2B-8 の責任遺伝子は、*S-NITROSOGLUTATHIONE REDUCTASE 1 (GSNOR1)* であった。*GSNOR1* は、*S-nitrosoglutathione (GSNO)* 還元酵素であり、翻訳後タンパク質機能制御機構の一つである、*S*-ニトロシル化修飾の制御に関わっている。そこで、*VND7* が *S*-ニトロシル化修飾制御のターゲットである可能性を調べるため、組換え *VND7* タンパク質を調製し、ビオチンスイッチ法によって *S*-ニトロシル化修飾の有無を調べたところ、*VND7* の転写活性化ドメインに位置する 264 番目と 320 番目の Cys が *S*-ニトロシル化修飾を受けることを突き止めた。また、*GSNO* を供与する、あるいは、擬似 *S*-ニトロシル化修飾を行った *VND7* を用いた、一過性発現実験により *VND7* の活性化能を評価したところ、有意に抑制されていた。

以上の結果を通して、本研究では、*GSNOR1* による *S*-ニトロシル化修飾制御の道管形成における重要性を新たに明らかにした。さらに *GSNOR1* の道管形成における役割の一つが *VND7* の *S*-ニトロシル化修飾による分子機能制御にある可能性を示した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 川邊 陽文

水や無機塩類を輸送する道管細胞は、その分化過程で起こる厚い二次細胞壁の形成とプログラム細胞死により特徴付けられる。これまでにこの過程を制御するのマスター転写因子として、VNDファミリーが同定されている。なかでもシロイヌナズナのVND7に関する研究が進み、その上流因子や下流因子、相互作用因子が見いだされ、VND7を中心とした道管分化の分子メカニズムが明らかになってきた。また、VND7の機能が翻訳後調節を受けている可能性が予想されてきたが、その実態は未解明であった。そこで申請者はVND7が制御する道管細胞分化に関する新たな分子メカニズムを順遺伝学的に明らかにするため、VND7の制御下で誘導される道管細胞分化が異常となった新規変異体の解析を行い、以下に示す知見を得た。

1. VND7機能誘導によって異所的な道管細胞分化を全身的に誘導可能なシロイヌナズナ形質転換体VND7-VP16-GRラインのエチルメタンスルホン酸処理変異体プールから得られた異所的道管細胞分化が抑圧された劣性変異体2B-8ラインを研究対象とし、詳細解析を行ったところ、地上部器官における分化抑制と顕著な生育阻害とVND7の直接ターゲット遺伝子LBD30およびMYB46(転写因子)などの発現レベルの顕著な抑制が見いだされた。

2. 2B-8の責任遺伝子が、翻訳後タンパク質機能制御機構の一つである、S-ニトロシル化修飾の制御に関わるS-nitrosoglutathione(GSNO)還元酵素をコードするGSNOR1であることを明らかにした。さらに、VND7がS-ニトロシル化修飾制御のターゲットであるか否かを解析し、VND7の転写活性化ドメインに位置する264番目と320番目のCysがS-ニトロシル化修飾を受けることを突き止めた。また、GSNOを供与する、あるいは、擬似S-ニトロシル化修飾によって、VND7の活性化能が有意に抑制されることを見いだした。

以上の結果を通して、本研究では、GSNOR1によるS-ニトロシル化修飾制御の道管形成における重要性を新たに明らかにした。さらにGSNOR1の道管形成における役割一つがVND7のS-ニトロシル化修飾による分子機能制御にある可能性を示した。

以上のように、本論文は、道管細胞分化の過程に鍵転写因子であるVND7のS-ニトロシル化修飾が関わることを初めて示したもので、道管細胞分化のメカニズムに一端を明らかにしたことから、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。