

## 植物ホルモン・ブラシノステロイドによる遺伝子発現調節機構に関する生化学的解析

著者	重田 友明
ファイル(説明)	博士論文要旨(English) 博士論文要旨(日本語) 博士論文全文 論文審査の要旨 最終試験結果の要旨
別言語のタイトル	Biochemical analysis of the mechanism for regulation of brassinosteroid-responsive gene expression in Arabidopsis cultured cells
学位授与番号	17701甲連研第811号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10232/21540">http://hdl.handle.net/10232/21540</a>

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	重田 友明
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 鹿児島大学 准教授 岡本 繁久
	副査 佐賀大学 教授 穴井 豊昭
	副査 佐賀大学 教授 鈴木 章弘
	副査 鹿児島大学 教授 岩井 久
審査協力者	鹿児島大学 名誉教授 松尾 友明
実施年月日	平成26年 7月 26日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成26年7月26日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は、申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力および識見を有するものと認めた。</p>	

学位申請者  
氏 名

重田 友明

(質問1) どのような経緯でブラシノステロイドのシグナル伝達における未知の経路を考えたのか。

(回答1) これまで、数千ものブラシノステロイドの標的遺伝子が見出されているが、それらの発現を制御する主要な転写因子は二種しか同定していない。このような背景より、シグナル伝達に関わる未発見のタンパク質が数多く存在していると予想し、本研究を遂行した。

(質問2) ブラシノステロイドに対するT87培養細胞の反応は分化した細胞に反映できるか。

(回答2) T87培養細胞は未分化の細胞種から構成されています。そのため、本研究で得られた結果を植物体のような明確に分化した細胞に完全に反映できるかどうかは今のところ分からない。今後の研究によって、培養細胞で得られた成果が分化した細胞でも共通なのか、それとも異なるのかということの詳細に検討する必要がある。

(質問3) 同定に成功した、クロマチンリモデリングに関わるBR応答性核タンパク質の中で、BES1の下流に存在するものがあるか。

(質問3) 現時点では、実験結果を持ち合わせてないので明確に答えることは出来ない。文献では、BES1とクロマチンリモデリングに関わるタンパク質が複合体を形成することで、遺伝子発現を調節することが報告されており、今回、同定したタンパク質もBES1と協調して働いている可能性はある。

(質問4) 2D-Blue native/SDS-PAGEのウエスタンでBES1は検出できるか？また、HSP90のスポットと一致したか。

(回答4) BES1の検出を試みたが、実験系に問題があるためなのか、良好な結果を得ることができなかった。細胞内でBES1とHSP90は複合体を形成している場合、両者の抗体を使って、分子レベル、細胞レベルの解析を進めれば複合体の正体を明らかにすることが出来ると思われる。

(質問5) 同定したクロマチンリモデリング関連タンパク質はHSP90による制御を受けているのか。

(回答5) そのことは本研究で明らかにされていないので、今後解決すべき課題であると考ええる。興味深いことに、ヒトではHSP90がヒストンの脱メチル化酵素に結合することで、酵素の安定性に寄与していることが知られている。

(質問6) 今回同定した因子の変異体や組み換え体の表現型についての情報はあるのか。

(回答6) いくつかの因子に関しては、情報がある。例えば、*NAPI;2*に関して、シロイヌナズナの欠損変異体は、表現型が現れない。これは、遺伝子の冗長性が原因であると指摘されており、*NAPI;1*、*NAPI;2*、*NAPI;3*の三重変異体では紫外線に対する感受性が増加することが報告されている。

(質問7) なぜ、ゲルダナマイシン処理により*DWF4*の発現が最初に上昇したのか。

(回答7) その結果は、予想外の現象であり、発現が上昇した理由は分からない。*DWF4*の発現を上昇させる転写因子として、*TCP1*が知られているが、これとゲルダナマイシン処理の関係を調べることでより*DWF4*の発現上昇の理由を説明できるかも知れない。

(質問8) *HSP90*の分子種はどのくらいあるのか。

(回答8) シロイヌナズナにおいて、*HSP90*は7種のファミリーが存在する。

(質問9) 同定した核タンパク質の遺伝子発現はどうか。

(回答9) 本研究では調べていない。シロイヌナズナの植物体を用いたマイクロアレイの解析結果をまとめたデータベースで、それらの発現を調べたことがある。大部分の遺伝子はブラシノステロイド処理によって発現が変化しておらず、シグナル伝達に関わるタンパク質を直接解析することの重要性を示唆している。

(質問10) *HSP90*は転写にもクロマチンリモデリングにも関与するタンパクなのか？その仕組みは？

(回答10) *HSP90*は*BES1*と分子間相互作用することで転写に関わっている。しかし、*BES1/HSP90*複合体がどのような仕組みで転写に関与しているかは、明らかではない。*HSP90*がクロマチンリモデリングに関与する可能性も含めて、今後の研究によって調べていきたい。

(質問11) ブラシナゾール処理で細胞壁の形成がうまく行っていないように見えるが。

(回答11) これについてはいくつかの可能性が考えられる。例えば、ブラシノステロイドによって細胞壁の合成や構造維持にはいくつかの遺伝子の発現が促進されることが知られており、これらの発現がブラシナゾールで抑制された結果、細胞壁の形成が異常になった可能性はある。

(質問12) 電顕だけでなく共焦点レーザー顕微鏡などでウェット状態の細胞壁を観察した方がよいのでは。

(回答12) 今後、観察したい。

(質問13) 同定したタンパクがクロマチンリモデリングに関与していることへの実験的証明は。

(回答13) 証明については不十分である。今後、同定したタンパク質の変異体を用いて、ヒストンの修飾状態などクロマチンリモデリングとの関連性を調べたい。

(質問 14) BES1/HSP90 複合体中に、BES1 と HSP90 以外のタンパク質が同定されたのか。

(回答14) タンパク質の量的な問題があるため、他の因子の同定はできていない。HSP90は480 kDa以上もの高分子複合体を形成し、ブラシノステロイドによって変動する結果を得たので、BES1やHSP90をはじめ高分子複合体の構成タンパク質の解析を進めたい。