

氏名(本籍)	市村和也(新潟県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第2,016号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Molecular Analysis of a MAP Kinase Cascade Involved in Environmental Stress Response in <i>Arabidopsis thaliana</i> (環境ストレス応答におけるシロイヌナズナMAPキナーゼカスケードに関する分子生物学的解析)		
主査	筑波大学客員教授	理学博士	篠崎 一雄 (理化学研究所)
副査	筑波大学教授	理学博士	鎌田 博
副査	筑波大学併任教授	農学博士	地神 芳文 (工業技術院生命工学工業技術研究所)
副査	筑波大学教授	理学博士	高橋 三保子
副査	筑波大学教授	理学博士	林 純一

論文の内容の要旨

MAPキナーゼカスケードは、MAP kinase (MAPK), MAPK kinase (MAPKK), MAPKK kinase (MAPKKK) からなるリン酸化カスケードである。酵母及び動物細胞において複数のMAPキナーゼカスケードが存在し、細胞増殖やストレス応答を含めた様々な情報伝達系において重要な役割を果たしていること、それぞれのカスケードにおいてMAPKはMAPKKと、MAPKKはMAPKKKと特異的に相互作用し、カスケード間のクロストークは非常に少ないことが知られている。

本論文では高等植物における環境ストレスの情報伝達についてMAPキナーゼカスケードに着目して分子生物学的研究を行った。高等植物のMAPKカスケードに関する研究では、これまで植物の因子間でのタンパク質間相互作用の有無、上流因子による下流因子活性化の有無に関する報告は皆無だった。シロイヌナズナではATMEKK1 (MAPKKK) 遺伝子の発現が、低温、塩ストレス、接触刺激により顕著に応答することから、環境ストレスのシグナル伝達において、ATMEKK1が何らかの役割を果たす可能性が示唆されていた。著者はATMEKK1の上流因子・下流因子を単離するため、酵母two-hybrid法を利用して結合タンパク質を検索した。結果として、1) ATMKK2 (新規MAPKK), 2) ATMPK4 (MAPK), 3) 機能不明である新規なタンパク質の計3種類を同定した。このことから、ATMEKK1, ATMKK2, ATMPK4がMAPキナーゼカスケードを構成する可能性が考えられた。この可能性を検証すべく、既に単離している因子について、1) 酵母two-hybrid法を用いたタンパク質間相互作用の検討、2) 酵母MAPキナーゼカスケード突然変異体の植物因子の共発現による機能相補実験を行った。その結果、1) ATMEKK1 (MAPKKK), MEK1 (MAPKK), ATMKK2 (MAPKK), ATMPK4 (MAPK) の4者の中で特異的な相互作用が存在すること、2) ATMEKK1とMEK1, または、ATMEKK1とATMKK2の共発現は、*pbs2* 変異体 (MAPKK) を相補すること、MEK1とATMPK4の共発現は *mpk1* 変異体 (MAPK) を相補することを明らかにした。このことから、ATMEKK1, MEK1/ATMKK2, ATMPK4がMAPキナーゼカスケードを構成する可能性が考えられた。

酵母を用いた解析により推定したカスケードから、1) ATMPK4がATMEKK1の下流で機能すること、2) ATMPK

4が環境ストレスにより活性化する可能性が考えられた。環境ストレス条件下でのATMPK4のプロテインキナーゼ活性を解析するため、ATMPK4を特異的に認識するペプチド抗体を作製し、種々の刺激に対する活性の変動を生化学的に解析した。その結果、1)ATMPK4は低温、乾燥、接触、傷害ですみやかにかつ一過的に活性化されること、2)熱ショック、植物ホルモンABAではATMPK4は活性化されないこと、3)ATMPK4の転写レベルおよび翻訳レベルは、上記の刺激により変動しないことを明らかにした。このことから、ATMPK4はリン酸化などの翻訳後修飾により活性化されると考えられる。

本研究では高等植物における環境ストレスの情報伝達においてMAPキナーゼカスケードが重要な役割を果たしていること明らかにした。本研究により、シロイヌナズナではMAPキナーゼカスケード(ATMEKK1→MEK1/ATMKK2→ATMPK4)が低温、乾燥、接触、傷害により活性化し、環境ストレスの情報伝達において役割を果たしていることを示した。さらに高等植物では環境ストレスにより複数のMAPKカスケードが活性化されることを明らかにした。本研究により同定できたMAPキナーゼカスケードは、他のMAPキナーゼカスケードやMAPK以外の情報伝達系と協調的に機能することで環境ストレスに応答した特異的な遺伝子発現や機能タンパク質の活性調節に関与しているものと考えられる。

審査の結果の要旨

生物の外的刺激に対する応答においては刺激特異的な遺伝子発現や機能タンパク質のリン酸化による活性変化などが重要な役割を果たしており、それらを制御する情報伝達系の解明が生物学的に重要である。本論文はそのような立場から、環境刺激に対し明確に応答し、高等植物の中でも遺伝学的生理学的知見の最も蓄積しているシロイヌナズナを用いて、環境ストレス応答に関連したMAPキナーゼカスケードの因子間相互作用及び機能に関して研究を行ったものである。

本研究では一連のMAPキナーゼカスケードを構成する可能性の高い因子を、タンパク質間相互作用と酵母変異株における共発現により同定した。さらに、上記で明らかにしたカスケードの構成因子のMAPキナーゼATMPK4が低温、乾燥、接触、障害などの環境ストレスにより活性化されることを示した。高等植物では、MAPキナーゼカスケードを構成する上での対応関係を明らかにしたのは本研究が最初である。高等植物における情報伝達では、これまで遺伝子発現でのみ生理機能が議論されてきた。本研究では、ATMPK4の生体内での活性変動を生化学的に明らかにした点においても評価できる。さらにATMPK4が複数の環境ストレスにより活性化されることを示した点も高等植物での環境ストレスの情報伝達においては新規の発見であり高く評価できる。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。