

氏名(本籍)	たか はし ふみのり 高橋史憲(福島県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4307号		
学位授与年月日	平成19年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Functional Analysis of a Novel MAP Kinase Cascade in Jasmonate Signaling in <i>Arabidopsis thaliana</i></b> (ジャスモン酸シグナル伝達に関与するシロイヌナズナ新規 MAP kinase カスケードの機能解析)		
主査	筑波大学教授(連携大学院)	理学博士	篠崎 一雄
副査	筑波大学教授	理学博士	鎌田 博
副査	筑波大学教授	理学博士	佐藤 忍
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細胞の増殖、分化、ストレス応答に関与することが動物や酵母で報告されており、高等植物においても環境ストレスや病原菌感染などに対して重要な役割を果たすことが示唆されている。シロイヌナズナゲノム中にはMAPKKK遺伝子が60、MAPKK遺伝子が10、MAPK遺伝子が20個存在することが明らかとなっているが、ストレスに応答するシロイヌナズナのMAPキナーゼカスケードは、未だ2経路しか明らかとなっていない。そこで本研究では、MAPKKの一つで植物特異的な構造を持つMKK3に着目し、新規MAPキナーゼ「MKK3-MPK6」カスケードを同定するとともに、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析や、遺伝学的、生化学的解析から、MKK3-MPK6カスケードはジャスモン酸(JA)のシグナル伝達として機能していることを明らかとした。

最初に、MAPKKによるMAPKの活性化を解析するための*in vitro*での解析系を構築した。GST融合MAPKタンパク質を作製し、*in vitro*における活性化を検討した結果、MKK3はMPK6を特異的に活性化することを明らかとした。次に、植物体でのMAPKKによるMAPKの活性化を解析するための遺伝子導入系を構築した。デキサメタゾン処理によりMKK3を過剰発現させるシロイヌナズナ植物体を用いて、植物体においてもMKK3-MPK6カスケードが機能することを示した。MPK6はMKK4によっても活性化されることが報告されており、本研究はMPK6を介した植物MAPキナーゼカスケードのクロストークが存在することを示唆した。

MKK3-MPK6カスケードの生理機能を探索する目的でマイクロアレイ解析を行った結果、MKK3カスケードは傷害誘導性遺伝子、JA誘導性遺伝子を多数制御していることが明らかとなった。この結果から、MKK3-MPK6カスケードはMKK4-MPK6カスケードと異なり、JAのシグナル伝達に関与する可能性が示唆された。*mpk6*遺伝子破壊変異体、MPK6過剰発現植物体を用いた解析から、MPK6がJAで活性化されることを初めて明らかとした。また、*mkk3*遺伝子破壊植物体とJA非感受性植物体*coil*では、JAによるMPK6の活性化が低下していることを示した。さらに、MKK3、MPK6過剰発現植物体はJAによる根の伸

長阻害に非感受性を示し、*mkk3*, *mpk6* 遺伝子破壊植物体は感受性を示すことを明らかとした。以上の結果から、MKK3-MPK6 カスケードは JA シグナル伝達経路を制御し、JA による根の伸長阻害に関わる事を示した。

JA 特異的経路には転写因子である *AtMYC2* が存在し、マーカー遺伝子である *PDF1.2* や *VSP2* の発現が *AtMYC2* によって制御されている。MKK3, MPK6 過剰発現植物体, *mkk3*, *mpk6* 遺伝子破壊変異体, *mkk3/atmyc2* 二重変異体を用いた解析から、MKK3-MPK6 カスケードの下流で *AtMYC2* が機能し、MKK3 カスケードは JA による *AtMYC2* の発現量を負に制御することを明らかとした。またこの結果から、JA による *AtMYC2* の発現は正と負の相対する制御により調節されていることを初めて明らかとした。

以上、本研究において同定された新規 MKK3-MPK6 カスケードは、JA シグナル伝達を制御するプロテインキナーゼカスケードであること、および、この JA シグナル伝達に関わる MAP キナーゼカスケードの詳細な機能が世界で初めて本論文で明らかにされた。MPK6 は様々な刺激により異なった MAPKK (MKK2, MKK3, MKK4/5) を介して活性化されるが、それぞれが適切な MAP キナーゼ複合体を形成することで、上流からの異なったシグナルを適正に伝達している可能性が本研究により示唆され、植物の MAP キナーゼカスケードの機能、および JA シグナル伝達における MAP キナーゼカスケードの役割の両面に於いて新規の知見を与えた。

## 審査の結果の要旨

本研究は、新規 MAP キナーゼカスケードとして MKK3-MPK6 を同定し、その生理機能がジャスモン酸 (JA) のシグナル伝達に関わることを、生化学的解析や逆遺伝学的解析によって初めて明らかにしたものである。さらに、マイクロアレイを用いた解析により JA 特異的経路において重要な転写因子である *AtMYC2* を下流因子として制御し、JA シグナル伝達の負の制御機構として MKK3-MPK6 カスケードは機能していることを世界で初めて分子レベルで明らかにした。

本研究は、植物特異的な MAP キナーゼカスケードに着目して、*in vitro* の系と遺伝子導入植物の系の両方で新規 MAP キナーゼカスケード MKK3-MPK6 を同定し、さらに逆遺伝学的手法やマイクロアレイによる遺伝子発現解析法を用いてその生理機能を解析した点が独創的である。また、JA シグナル伝達における初めてのプロテインキナーゼカスケードを同定した点、さらに植物の MAP キナーゼカスケードにおけるクロストークが存在することを示した点が高く評価される。また、遺伝子破壊変異体を用いて転写因子である JA による遺伝子発現に重要な役割を果たす *AtMYC2* が MKK3-MPK6 カスケードの下流因子として機能することを明らかにした点もこれまで未知であった JA による新規のシグナル伝達系を明らかにしたものであり高く評価される。

以上のことから、本研究は、高等植物における MAP キナーゼカスケードの機能と JA シグナル伝達における生理機構の研究の進展に大きく貢献するものとして高く評価される。

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。