

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	単細胞紅藻における窒素欠乏応答性転写因子CmMYB1の活性調節機構の解明
Title(English)	
著者(和文)	周柏峰
Author(English)	Baifeng Zhou
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11727号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田中 寛,太田 啓之,若林 憲一,吉田 啓亮,増田 真二,本倉 健,今村 壮輔
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11727号, Conferred date:2022/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	周 柏峰
		氏 名	職 名	
論文審査	主査	田中 寛	教授	若林 憲一
審査員	審査員	今村 壮輔	特定教授	増田 真二
		太田 啓之	教授	吉田 啓亮
		本倉 健	特定教授	

論文審査の要旨（2000 字程度）

本論文は和文で書かれ、「単細胞紅藻における窒素欠乏応答性転写因子 CmMYB1 の活性調節機構の解明」と題し、第一章「序論」、第二章「ルシフェラーゼレポーターアッセイ系の構築」、第三章「CmMYB1 の活性を制御するドメインの同定」、第四章「ND 結合タンパク質の同定及び機能解析」、第五章「総括」の五つの章より構成されている。

第一章「序論」では、高等植物における無機窒素同化経路および窒素同化を制御する転写因子が述べられている。そこで指摘されている、窒素同化に関わる転写因子による遺伝子発現制御に関する不明な点、特に窒素充足時 (+N) における窒素欠乏応答転写因子の抑制機構を明らかにするために、原始的な光合成真核生物である単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* を使用する有用性が述べられている。さらに、*C. merolae* の生物学的特徴と窒素欠乏応答性転写因子 CmMYB1 の機能やその制御機構に関する仮説が先行研究を基に示され、本研究のねらいが明確にされている。

第二章「ルシフェラーゼレポーターアッセイ系の構築」では、*C. merolae* における遺伝子発現調節を簡便に測定可能な方法に関する実験結果が述べられている。ルシフェラーゼ (Luc) レポーターアッセイは優れた感度、時間分解能、および優れた定量特性があるが、*C. merolae* ではこれまで確立されていない技術である。本章ではまず、*Luc* ORF を亜硝酸還元酵素遺伝子 (以下、*CmNIR*) のプロモーターで発現制御される NIR-Luc 株を構築した。次に、NIR-Luc 株を用いた Luc レポーターアッセイ及び定量 PCR 法を用いた解析の結果から、*CmNIR* プロモーターからの転写が、Luc 活性でモニターできることが示されている。そのほか、NIR-Luc 株内で *CmMYB1* を過剰発現させた結果、CmMYB1 依存的な遺伝子発現が +N でも誘導されることが示されている。本章で構築した Luc レポーターアッセイ系は、*CmNIR* プロモーター活性をモニターできるほか、任意のプロモーターを制御する転写因子の同定や CmMYB1 の新規標的遺伝子の探索など、多用途に使用できる可能性について考察されている。

第三章「CmMYB1 の活性を制御するドメインの同定」では、CmMYB1 の機能を制御する機構が、自身の特異的なドメインによって達成されているという仮説を基に実験が展開され、CmMYB1 の活性を制御するドメインの同定とその機能解析の結果が述べられている。まず、CmMYB1 のカルボキシル基末端から徐々に欠損した CmMYB1 が発現する形質転換体を構築し、それぞれの細胞内における CmMYB1 依存的な遺伝子発現を観察した。得られた結果により、+N において CmMYB1 の機能を抑制するドメイン (Negative Domain, ND と命名) が特定されている。その後の ND 欠損株を用いた解析結果により、ND は +N 時に CmMYB1 を細胞質に留めること、CmMYB1 制御下硝酸同化遺伝子群のプロモーター領域への結合を抑制することを通して、硝酸同化遺伝子群の発現を抑制するドメインであることが明らかにされている。

第四章「ND 結合タンパク質の同定及び機能解析」では、CmMYB1 の ND と結合するタンパク質の同定および機能解析の結果が述べられている。まず、第三章で同定された ND を介した CmMYB1 の制御機構を解明することを目的に、ND と結合するタンパク質の同定を試みた。そのために、FLAG タグ融合 ND を過剰発現させた *C. merolae* 株を構築して、FLAG タグに対する抗体を用いたプルダウンアッセイとそれに続く LC-MS/MS 解析を行い、ND 結合タンパク質候補を得た。得られた候補タンパク質に対して、酵母ツーハイブリッド解析を実施した結果、ND と CMR469C (CmNDB1 と命名) が特異的に結合することが明らかになった。*CmNDB1* 欠損株を用いた解析結果から、CmNDB1 は +N 時に CmMYB1 を細胞質に留めること、CmMYB1 制御下硝酸同化遺伝子群のプロモーター領域への結合を抑制することを通して、硝酸同化遺伝子群の発現を抑制するタンパク質であることが明らかにされている。

第五章「総括」では、第二章から第四章で得られた結果をもとに、利用可能な窒素源の状態によって制御される CmMYB1 の制御モデルを提示して結果を総括するとともに、今後の研究の課題や展望が述べられている。ND や CmNDB1 のように、+N 条件で窒素同化遺伝子群の発現を抑制する転写因子ドメインや調節因子の発見とその機構解明は植物系統において初めてであり、本発見の意義についても述べられている。

以上を要するに、本論文は植物の生長を決定づける窒素栄養素の同化調節について、新規の機構を明らかにしたものであり、理學上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士 (理學) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。