

報告番号	※ 第 号
------	-------

主論文の要旨

論文題目 Analysis of nuclear factors regulating root growth under salinity conditions in rice (塩ストレス条件下におけるイネの根成長制御に関わる核内因子の研究)

氏名 戸田 陽介

論文内容の要旨

陸上植物の根は地上部を支えるとともに、地中より水分や栄養を吸収し地上部へ輸送する役割を担う。根は根端で分裂してできた細胞が分化し、組織を形成しながら成長してゆく。根の成長は環境条件に適するよう細密に調節されているが、外環境の感知やその情報伝達には根端が重要な役割を果たす。例えば、根が重力や光を感知した時には、根端組織においてオーキシンの濃度分布に偏りが生じることで根の伸長方向が決定される。必須栄養源であるリン酸の欠乏時には、根の分枝パターンが変化するが、その制御には根端細胞での情報伝達が関与する。

一般に、植物細胞が塩ストレスを受けると、高浸透圧ストレスがかかると同時に、細胞質内のナトリウムイオン濃度が上昇し、タンパク質の機能阻害が起きる。こうした細胞では適合溶質が細胞質内に蓄積するほか、イオン輸送体によりナトリウムイオンが細胞質から細胞外や液胞内へと輸送される。一方、塩ストレス環境下におかれた根組織では、細胞の分裂と伸長の阻害が起こるとともに、細胞壁の組成や可塑性が変化する。しかしながら、塩ストレスに対する細胞レベルでの応答と組織・器官レベルでの成長がどのようなバランスのもとに制御されているかについてはよく理解されていない。そこで本研究では、単子葉穀物のモデルであるイネを材料として、塩ストレス環境下での根の成長を支えるメカニズムを分子遺伝学的手法により解明することを目的とした。とくに、塩ストレス条件下において顕著な根の成長阻害を呈する劣性の変異体 *rss3* (*rice salt sensitive3*) に着目し、根の成長や形態の異常を調べるとともに、その変異の原因を解明し、ストレス応答と成長制御との調和に関わる機構を分子レベルで紐解くことを目指した。

rss3 変異体を塩ストレス非存在下で生育させると、野生型イネに比べて軽度ながら根の生育遅延が認められる。さらに変異体の根端を詳細に調べると、分裂領域の細胞の数や大きさには野生型との差異が認められないものの、伸長領域では細胞が短くな

っていた。一方、変異体を塩ストレス存在下で生育させた場合には、野生型に比べて根が極度に短くなるとともに、組織の剛直化がみられた。とくに伸長領域において細胞が顕著に短くなり、根組織全体では細胞の不規則な膨潤や細胞列の乱れが観察された。これらの結果から、*RSS3* 遺伝子が根の細胞長の制御に関与すること、また塩ストレスに適応した根成長に必要とされることが示された。

ポジショナルクローニングにより同定した *RSS3* 遺伝子は、458 アミノ酸からなる機能未知のタンパク質をコードしていた。*RSS3* タンパク質は、植物に特有な R/B-like bHLH 型転写因子の制御ドメインと高い相同性を示すが、bHLH ドメインや他の DNA 結合性ドメインを有さない因子であった。また、*rss3* 変異が 47bp の欠失変異であること、変異体では 21 アミノ酸の欠失をもつタンパク質をコードした mRNA が生成することが判明した。さらに *RSS3* が根端の特に分裂領域において強く発現すること、伸長領域に移行するに従い発現レベルが低下すること、*RSS3* が分裂領域では細胞内の核内に、分裂領域近傍の伸長領域では細胞質と核の両方に存在することが示された。これらの結果より、*RSS3* は根端組織の細胞において機能すること、また何らかの DNA 結合性因子を介して転写制御に関わるものと考えられた。

RSS3 の分子機能に関する知見を得るため、yeast two-hybrid 法を用いて *RSS3* の相互作用因子を探索した。その結果、bHLH 型転写因子である bHLH089 および bHLH094、ジャスモン酸 (JA) シグナル経路において機能する JAZ タンパク質である JAZ9 および JAZ11 が *RSS3* と結合することが判明した。また、二分子蛍光相補 (BiFC) 法や蛍光共鳴エネルギー測定 (apFRET) 法により、植物細胞の核内で *RSS3* とこれらの因子との相互作用が起きることが示された。さらにまた、yeast three-hybrid 法および BiFC-apFRET 法により、*RSS3*、bHLH094、JAZ9 が複合体を形成できることを示した。一方、*rss3* 変異による 21 アミノ酸欠失を導入した変異型 *RSS3* を用いた場合には、三者による複合体形成はみられなかった。

アラビドプシスでは、JAZ タンパク質が R/B-like bHLH 型転写因子である MYC2 と結合してその活性を抑制すること、また JA シグナルの受容に伴って JAZ タンパク質が分解され、MYC2 の脱抑制が起こることが報告されている。この際、タンパク質ユビキチン化酵素複合体である SCF^{COI1} に JA 誘導体である JA-Ile と JAZ タンパク質が結合することで、JAZ タンパク質がユビキチン化され、26S プロテアソームによって分解される。*RSS3* と結合するイネの JAZ9 と JAZ11 も、COI1 との結合に必要とされる機能ドメインを有することから、同様に JA シグナル依存的な分解制御を受けると推察された。一方、bHLH094 は DNA 結合性の bHLH ドメインを持つものの、R/B-like bHLH 型転写因子に保存された制御ドメインを持たない核内因子であった。これらのことから、*RSS3* は JAZ タンパク質による bHLH094 の機能抑制を仲介する役割をもつのではないかと考えられた。この可能性を検証するために、さらに下記の実験を行なった。

イネプロトプラストの一過的発現系において bHLH094 は、bHLH 型転写因子の認識配列 (E-Box) をプロモーターにもつレポーター遺伝子の発現を活性化させた。こ

の活性化は RSS3 と JAZ9 をさらに共発現させることで抑制されたが、RSS3 もしくは JAZ9 のみを共発現させた場合や、変異型 RSS3 を用いた場合には抑制されなかった。これらの結果は、bHLH094、RSS3、JAZ9 の複合体形成が bHLH094 の活性抑制に関与することを示唆した。

RSS3 の機能に関してさらに知見を得るため、*rss3* 変異体と野生型の根端組織における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析により比較した。二因子分散分析 (two-way ANOVA) の結果、塩ストレスの有無により発現変動する遺伝子群のうちのおよそ半数の遺伝子の発現が、*rss3* 変異によって変動することが判明した。しかしながら、これらの遺伝子の塩応答性は *rss3* 変異により変化しなかった。したがって、RSS3 は塩応答性遺伝子の発現制御に関わるものの、塩応答機構の一部として機能するのではないと考えられた。また変異体では、ジャスモン酸誘導性遺伝子群の一部について発現上昇がみられることが判明した。さらに、根端における遺伝子発現の JA による誘導レベルが、変異体では野生型よりも高くなることが判った。このことは、RSS3 が JA に応答した遺伝子発現に抑制的にはたらくことを強く示唆した。さらにまた、低濃度の JA 存在下で育成した野生型イネの根では、*rss3* 変異体の根端で観察されたのと同様に、細胞分裂活性の抑制はみられないものの、細胞伸長の抑制が観察された。

以上の研究により、RSS3 が核内において JAZ タンパク質および bHLH 型転写因子と複合体を形成し、JA 応答性遺伝子を負に制御すること、ならびに多くの塩応答性遺伝子の発現制御に関わることが明らかにされた。また、RSS3 は JA 応答性遺伝子の活性化を制限し、塩応答性遺伝子の発現を適切なレベルに調節することで、生育環境に応じた根の成長に寄与するものと推察された。