

塩ストレス下で見られる植物の成長抑制と抑制型 MYB3R
を介した細胞周期制御

名古屋大学大学院生命農学研究科
生命技術科学専攻

分化情報制御研究室

奥村 徹

2021 年 3 月

目次

・ 略号	04
・ 第1章 序論	06
・ 第2章 塩ストレス下における抑制型 MYB3R の働き	
2-1. 緒言	18
2-2. 結果	20
2-3. 結言と考察	35
2-4. 図表	39
・ 第3章 塩ストレスと MYB3R を結ぶ仕組みの探索	
3-1. 緒言	62
3-2. 結果	65
3-3. 結言と考察	71
3-4. 図表	77

• 第 4 章 成長抑制因子 DELLA と抑制型 MYB3R との関連	
4-1. 緒言	84
4-2. 結果	87
4-3. 結言と考察	93
4-4. 図表	98
• 第 5 章 結論と展望	109
• 研究材料及び実験方法	118
• 参考文献	132
• 謝辞	144

略号

AP2	APETALA2
CDK	cyclin-dependent kinase
Col	Columbia
Brz	brassinazole
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ERF	ethylene-responsive factor
GA	gibberellin
GFP	green fluorescent protein
GUS	β -glucuronidase
Ler	Landsberg
MAPK	mitogen-activated kinase
MAPKK	MAPK kinase
MS	Murashige Skoog
MSA	mitosis-specific activator
PAC	paclobutrazol
PEO-IAA	2-(1H-Indol-3-yl)-4-oxo-4-phenyl-butyric acid
PCR	polymerase chain reaction

PI	propidium iodide
Rb	Retinoblastma
RNA-seq	RNA Sequencing
RT-PCR	reverse transcription PCR
SMR	siamese-related
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide

第1章 序論

(1) 環境ストレスと成長抑制

固定された生活様式をとる植物は、高温、乾燥、高塩濃度などの様々な環境ストレスに曝される機会が多く、周囲の環境変動に対して柔軟に応答するための多様な機構を進化させてきた。このような植物の環境応答機構は、古くから植物生理学上の中心的な課題であるだけでなく、応用面においても、ストレス環境に強い作物の開発に繋がることから、これまでに非常に多くの研究が行われてきた。中でも塩耐性や乾燥耐性などに関する分子メカニズムの理解は、ここ十数年の間に大きく進展している (Farooq *et al.*, 2009, Golldack *et al.*, 2011)。このようなストレス耐性に関する研究は、致死的な強いストレスに曝された植物の生存を評価したものがほとんどである。一方で、実際に自然環境下で生きている植物は、致死的なストレスよりも、生存には影響を与えないような弱いストレスを頻繁に経験していると考えられる。このような弱いストレス下において、植物は自らの成長を積極的に抑制することが知られているが、その仕組みの理解はこれまでにほとんど進められて来なかった。近年の研究から、弱いストレス下での成長と致死的な環境下における生存とはほとんど関連性が無いことが示されている。Skirycz ら (Skirycz *et al.*, 2011) は、異なる強度の乾燥ストレス下における植物の成長と生存をシステマティックに解析し、両者の違いについて考察してい

る。彼らは、これまでに乾燥耐性が付与されたこと（致死的な乾燥条件下での生存率が高いこと）が報告されているシロイヌナズナの変異体や過剰発現体の中から 25 個をランダムに選抜し、ストレス耐性と成長抑制の評価を行っている。先ず、強い乾燥ストレス下での生存率が野生型植物よりも上昇していることを確認し、さらに、マイルドな乾燥条件下における成長について解析を行った結果、ストレス耐性を持つ植物の成長は、いずれも野生型植物と同じか、むしろ低下していることが示された (Skirycz *et al.*, 2011)。具体例としては、気孔開口に関するシグナル伝達経路を制御する *Calcium dependent kinase4 (CPK4)* 遺伝子を欠失した変異体では強い乾燥ストレス下での生存率が低下するが、*CPK4* 遺伝子の過剰発現体では反対に生存率が上昇することから、ストレス耐性を制御する遺伝子であることが報告されている (Zhu *et al.*, 2007)。しかし、Skirycz らがマイルドな乾燥条件下でこの *CPK4* 過剰発現体の成長解析を行った結果、野生型植物と同程度に成長が抑制されることが明らかになった。この結果は、弱いストレス下での成長とストレス耐性、すなわち致死的な条件下での生存には、ほとんど関連性がなく、それらは異なったメカニズムに支配されていることを示している。

(2) 積極的な応答としての成長抑制

マイルドなストレス下の植物で見られる成長の低下は、単にストレスによる

負の効果ではなく、植物が自身の成長を積極的に抑制した結果であることが指摘されている。つまり、植物は弱いストレスに対する応答反応として、成長を抑制するための仕組みを持っているという考えである。この考えは Achard ら (Achard *et al.*, 2006) により、遺伝学的な根拠と共に報告され、この分野の研究に大きな影響を与えた。この研究では、ジベレリン情報伝達因子として知られる DELLA タンパク質を欠く多重変異株と野生型のシロイヌナズナを塩ストレス下で生育させて、ストレスの影響が遺伝子型によりどのように異なるのかを観察している。DELLA は GRAS ファミリーに属する転写因子として知られており、成長の抑制因子として働くが、ジベレリンの作用によりこれらのタンパク質が分解され、植物の成長抑制が解除される (Sun *et al.*, 2004)。DELLA を欠く多重変異体を弱い塩ストレス下 (100 mM NaCl) で生育させると、野生型植物が示すような顕著な成長の低下が見られず、野生型植物よりも早く成長することが示されている。つまり、DELLA はストレスと成長抑制との間に位置する成長抑制因子であり、これを欠くことでストレス下での成長抑制を引き起こすことができなかつたと解釈されている。Achard らは、さらに、DELLA の多重変異株は致死的な濃度の塩ストレス下 (200 mM NaCl) では、野生型植物よりも生存率が低下することを示した。この結果から、植物はストレス下で特定の因子を介した積極的なメカニズムにより成長を抑制すること、そして、このような成長抑制が強い

ストレス下での生存に取って重要な意味を持つことが示されている。Achard らの結果と関連して、近年では、浸透圧ストレス下における葉の成長が MAPKK (Kumari *et al.*, 2014) や AP2/ERF 型転写因子 ERF5/6 (Dubois *et al.*, 2013) によって積極的に抑制されていることが相次いで報告された。このような一連の報告から、ストレスに応答して成長を抑制することにより、植物は本来成長に用いるべき資源やエネルギーをストレスに対する抵抗性の獲得のために振り分けることができるのではないかという指摘がなされている。しかし、このようなストレス下での成長抑制が、細胞レベルの挙動としてどのような変化を伴うのか、また、そこでどのような分子メカニズムが働いているのかについてはほとんど明らかになっていない。

(3) 細胞レベルから見た器官成長とストレス下での成長抑制

植物の個体や器官のサイズは、構成する細胞の数とその大きさにより決定される。このため、器官サイズの拡大、すなわち器官の成長は、細胞分裂により新たな細胞が作られ、そこで生じた細胞がサイズを拡大すること（細胞成長）で駆動している。一般に、細胞分裂の活性は器官発生の時間軸に沿って減少していくことが知られている。葉の発生を例にとると、その初期において茎頂メリステムから派生した葉原基では、ほとんど全ての細胞が活発な分裂を行い、急速に器官

サイズを増大させる。その後、発生の進行に伴い葉の先端から分裂を停止し始め、やがて一部の細胞を除いて完全に細胞分裂が停止する。多くの植物種では、このような細胞分裂の停止に続いて、分裂を伴わない DNA 複製 (エンドリプリケーション) が生じ、細胞当たりの DNA 量 (プロイディレベル) を倍加させることが知られている (図 1)。プロイディレベルの増加は、細胞サイズを増大と関連することから、エンドリプリケーションは分裂後の細胞成長のための植物の戦略であると考えられている (De Veylder *et al.*, 2011)。このような観察から、器官発生は、細胞の分裂、成長の活性が異なる 3 つのステージに分けて考えられている。すなわち、分裂期 (活発な細胞分裂が生じるステージ)、伸長期 (分裂を停止し、細胞サイズを拡大するステージ)、および成熟期 (細胞が分化し、分裂と成長を停止するステージ) である (Beemster *et al.*, 2005)。根の発生においても、静止中心に接した幹細胞の分裂により生み出された細胞が、同様のステージを移行していくことにより、発生の時間軸に対応した形で、先端から基部にかけて細胞が空間的に配置する。すなわち、成長中の根は、先端から分裂領域、伸長領域、成熟領域の 3 つの領域に分けて考えられている (Ivanov *et al.*, 2013)。

葉や根などの成長は、器官全体を統制する仕組みによって制御されていると考えられるが、発生過程で見られる細胞分裂活性の低下は、最終的には器官を構成する個々の細胞の細胞周期を通じて制御されている。そして、このような細胞

レベルでの制御は、サイクリンやサイクリン依存性キナーゼ (CDK) のような細胞周期制御因子の働きにより決定されている。植物の器官の成長は、このような発生的な制御のほか、環境要因によっても支配されており、とくに植物にとって好ましくないストレス条件では、細胞分裂とそれによる器官成長を抑制することが知られている。このような環境変動に伴う成長の制御も、個々の細胞の細胞周期制御から説明する必要がある。

(4) ストレスが与える細胞レベルでの変化

ストレスに曝されると、植物は多くの遺伝子の発現を変化させ、ストレスに対する抵抗性の獲得に向けた変化を引き起こすことが知られている。このようなストレス応答的な遺伝子発現に関する研究は、近年精力的に行われ、非常に多く成果を生み出してきた (Urano *et al.*, 2010)。しかし、一方でストレス下での成長抑制とそれに関連した遺伝子発現変化に関する研究は限られた数の報告しかなくされていない (Achard *et al.*, 2006, 2008, Claeys *et al.*, 2012, Dubois *et al.*, 2013)。

初期の研究としては、ストレス下での細胞周期制御因子の発現に関する報告がいくつかなされている。シロイヌナズナの根に塩ストレスを与えると、処理後 6 時間程度で CDK 活性が減少すること、またこのとき *CYCBI;2* 遺伝子のプロモーター活性が低下することが示されている (West *et al.*, 2004)。 *CYCA2;1* など

他のサイクリンについても、塩ストレスに曝されたシロイヌナズナにおいてダウンレギュレーションが起きることが示されている (BursSENS *et al.*, 2000)。さらに、CDK/サイクリン複合体に結合して、CDK 活性を抑制する機能を持つ細胞周期阻害因子 KRP2 がアブシジン酸(ABA)処理により発現が上昇すること (Wang *et al.*, 1998)、植物特異的な CDK 阻害タンパク質として知られる SIAMESE-RELATED (SMR) ファミリーの遺伝子は、塩や浸透圧などのストレス条件、及びストレス性誘導性ホルモンにより、転写産物量が増加することが報告されている (Peres *et al.*, 2007)。これらの研究は、ストレス下での遺伝子発現と細胞分裂の抑制との関連を提案するものであったが、これらの遺伝子発現の変化がストレス下の細胞周期の抑制に実際に寄与しているかどうか、またどのようなメカニズムで遺伝子発現が変化しているのかについては明らかではなかった。

ストレスが細胞分裂に与える影響については、古くから多くの研究がなされている。塩ストレスに曝されたシロイヌナズナの根では、分裂細胞の減少や細胞サイズの低下、また分裂領域の縮小が引き起こされることが報告されている (BursSENS *et al.*, 2000, West *et al.*, 2004)。また、浸透圧ストレスに曝されたシロイヌナズナの葉では、分裂期での細胞分裂活性の低下、細胞サイズの低下、エンドリプリケーションへの早期移行によるプロイディレベルの上昇が観察されている (Skiryecz *et al.*, 2011)。これらの表現型について、経時的な解析を行った結果か

ら、浸透圧ストレス処理により、比較的早い段階で細胞分裂が停止し、その後、ストレスが持続するとエンドリプリケーションへの移行が誘導されることが示されている (Skirycz *et al.*, 2011)。このような研究から、一般にストレスに曝された植物では、個々の細胞の細胞周期が抑制され、エンドリプリケーションへの早期移行を誘導するような機構が働いていると予想される。

(5) G2/M 期制御と MYB3R 転写因子

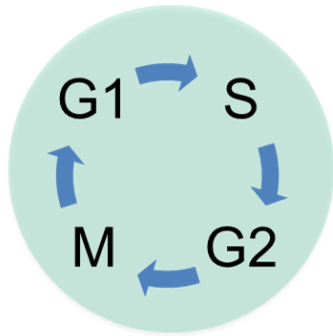
発生プログラムや環境応答による細胞分裂の制御は、主に分裂期にある細胞の分裂を止めてエンドリプリケーションへ移行するステップに作用していると考えられている (Skirycz *et al.*, 2011; West *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2012)。この細胞分裂からエンドリプリケーションへの移行は、M 期を伴う細胞周期から M 期をスキップするサイクルへの変換を意味しており、ここには細胞周期の G2/M 期制御が重要な意味を持っている (Boudolf *et al.*, 2004, Verkest *et al.*, 2005)。

所属研究室では、これまでに植物の細胞周期、中でも G2/M 期の制御について、遺伝子の転写制御に着目した研究が行われてきた。細胞周期の G2/M 期には、M 期サイクリンや植物に特異的な *CDKB2* をはじめとする多くの G2/M 期特異的な遺伝子 (以下、G2/M 期遺伝子) が発現することが知られている。このような G2/M 期遺伝子の多くは、プロモーター領域に共通のシスエレメントを持

つことがわかっている (Ito *et al.*, 1998, Haga *et al.*, 2011)。Mitosis-specific activator (MSA) エlementと名付けられたこのシスElementに結合する転写因子として、R1R2R3 型の MYB 転写因子 (MYB3R) が同定されている (Ito *et al.*, 2001)。一般に MYB 遺伝子は N 末端側に存在する MYB ドメインと呼ばれる保存された DNA 結合ドメインにより特徴付けられる。植物の MYB の多くは、2 回の繰り返し配列からなる MYB ドメインを持ち、R2R3-MYB と呼ばれるタイプに属している。しかし、これらの多くの植物の MYB とは異なり、MSA Element に結合する MYB は脊椎動物において癌遺伝子産物として知られる c-MYB と同様に、MYB ドメインの中に 3 回の繰り返し配列を持つ R1R2R3 型の MYB (MYB3R) 転写因子であった。シロイヌナズナには 130 個以上の MYB 遺伝子が存在しているが、このうち、R1R2R3 型の MYB をコードする遺伝子は *MYB3R1*-*MYB3R5* の 5 個のみであることが分かっている (Stracke *et al.*, 2001)。所属研究室ではこれまでに、シロイヌナズナ *MYB3R* 遺伝子の研究を進めており、T-DNA 挿入変異体を用いた解析から、*MYB3R4* が転写活性化因子として、*MYB3R3* 及び *MYB3R5* が転写抑制因子としての機能を持つことを明らかにしている (Haga *et al.*, 2007, 2011, Kobayashi *et al.*, 2015a) また、*MYB3R1* は転写活性化と抑制の両方の働きを弱く持っており、これらの *MYB3R* の働きが組み合わせることにより G2/M 期特異的な転写を実現していることが明らかにされている (Haga *et al.*,

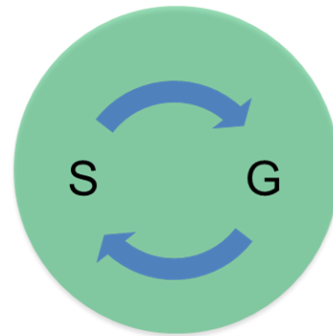
2007, 2011, Kobayashi *et al.*, 2015a)。

本研究では、このような MYB3R を介した細胞周期制御と植物のストレス応答との関連について検討を行い、その結果、塩ストレスによって引き起こされる成長抑制において MYB3R を介した細胞周期制御が伴っている事を明らかにした。



Mitotic cell cycle

Transition



Endoreplication

図 1. Mitotic cell cycle と Endoreplication

細胞増殖期では G1, S, G2, M の 4 個のフェイズから構成される通常の細胞周期 (Mitotic cell cycle)により、分裂を行い、細胞の数を増加させる。発生の進行に伴って分裂期の細胞が分裂を停止していく過程では、Mitotic cell cycle から M 期をスキップした特殊な細胞周期、すなわち核内倍加 (Endoreplication) へと移行し、それに伴いプロイディの増加と細胞サイズの拡大が引き起こされる。

第2章 塩ストレス下における抑制型 MYB3R の働き

2-1. 緒言

ストレス下において見られる植物の成長抑制は、ストレスに応答した積極的な抑制とストレスによる負の効果の両方が影響した結果として観察される。また、ストレスによる積極的な成長抑制の経路も、おそらく1つではなく、複数の経路が同時に働いていると予想されるため、特定の因子がストレスによる成長抑制に働いているかどうかを明確に示すことは、多くの場合容易ではない。特定の経路がストレスにより影響を受けているかどうかを、成長抑制以外の表現型としてモニターすることができれば、ストレスと対象とする因子との間の関連をより直接的に結びつけることができると考えられる。*myb3r4* 変異体は、特徴的な細胞質分裂の異常を弱く示すことが知られており (図 2A,B, Haga *et al.*, 2007)、この異常の程度が MYB3R 経路の活性に応じて変化することから、この変異体が示す細胞質分裂の異常をモニターすることにより、ストレスによる MYB3R 経路への影響をより直接的に評価することが可能であると考えられる。以下に、本研究で用いた *myb3r4* 変異体が示す細胞質分裂の異常と、その特性の背景について説明する。

転写活性化因子である MYB3R1 と MYB3R4 を欠損した二重変異体では、多

くの G2/M 期遺伝子の発現が低下すること、また、不完全な細胞質分裂を高頻度で引き起こし、多核の細胞や細胞壁のギャップなどの異常を示すことが明らかにされている (Haga *et al.*, 2007)。このような細胞質分裂の異常は特に気孔において顕著に観察される。通常は孔辺母細胞の分裂により生じる 2 つの娘細胞が孔辺細胞に分化し、ペアとなって気孔を形成するが、*myb3r1 myb3r4* 二重変異体では孔辺母細胞の分裂の際に細胞質分裂を正常に完了することができず、高頻度で 1 つの孔辺細胞だけからなる異常な形態の気孔を形成する (図 2A,B, Haga *et al.*, 2007)。また、この不完全な細胞質分裂は、細胞板形成に必須なシンタキシン様タンパク質をコードする *KNOLLE* 遺伝子のダウンレギュレーションが主な原因となり生じていることが示されている (Haga *et al.*, 2007)。MYB3R1 と MYB3R4 の間には機能重複があることが明らかになっているが、*myb3r4* 単独変異体にも細胞質分裂に関する表現型、特に気孔の形態異常が弱く生じることがわかっている。この *myb3r4* 単独変異の背景に、*myb3r1* や *knolle* の変異をヘテロに加えることで、気孔の形態異常が強く促進されることから、*myb3r4* の弱い表現型は G2/M 期遺伝子の発現量の低下に対して敏感に反応し、異常の程度を変化させていると考えられる (Haga *et al.*, 2007)。実際に、所属研究室において *myb3r4* 変異体の異常を促進するエンハンサー変異体のスクリーニングが行われ、G2/M 期遺伝子の発現制御に関わる新規因子が同定されている (Iwata *et al.*, 2011)。

2-2. 結果

(1) *myb3r4* 変異体が生ずる細胞質分裂異常は塩ストレスによって促進する

環境ストレスに応答して引き起こされる植物の成長抑制の一因として、負の細胞周期制御が予想される。また、このような負の細胞周期制御の経路の一つとして MYB3R を介した G2/M 期遺伝子の発現制御が関わっている可能性が考えられる。この仮説について検討するため、*myb3r4* 単独変異体が生ずる弱い細胞質分裂の異常を利用することにした。ある種のストレス条件下において、細胞周期が MYB3R を介して負に制御されているのであれば、*myb3r4* 単独変異体にストレスを与えた場合に、細胞質分裂の異常に影響し、その程度に応じて表現型が促進されるのではないかと予想される。そのため、本研究ではまず *myb3r4* 変異体を様々な環境ストレスに曝し、この変異体が生ずる気孔の形態異常を促進するようなストレス条件があるかどうか検討した。同時に、種々のストレス性ホルモンについても同様の解析を行い、異常の促進が見られるかどうか解析を行った。

myb3r4 変異体の種子を、塩化ナトリウム（塩ストレス）、マンニトール（浸透圧ストレス）、過酸化水素（酸化ストレス）、Zeocin (DNA ストレス)、Flagellin 22（病害ストレス）を含む 1/2MS 培地に播種した。*myb3r4* 変異体を、ストレス下、またはホルモン存在下で 14 日間生育させ、芽生えにおける細胞質分裂の異常を解析した。また、この条件で育成させた植物体の成長を、本葉の大きさを指標と

して測定すると、処理の濃度によって程度は異なるものの、いずれの処理でも顕著な成長抑制が引き起こされていることが確認された (図 3A)。不完全な細胞質分裂による気孔の形態異常は、本葉よりも子葉において顕著に観察されるため(図 2B)、この表現型の観察には子葉を用いることとした。透明化処理を行った子葉をノマルスキー顕微鏡で観察し、特徴的な形態異常を示す気孔の割合を求めた。その結果、塩ストレスによって *myb3r4* 変異体に生じる異常な気孔の頻度が顕著に増加することがわかった (図 3B)。また、この塩ストレス処理による細胞質分裂の異常は、頻度は低いものの野生型の植物においても観察されることも分かり(図 4A)、従ってこの異常は *myb3r4* 変異体で限定的に観察される現象ではなく普遍的なものであると考えられる。

(2) 塩ストレスによる細胞質分裂の異常は抑制型 MYB3R の欠失により緩和する

MYB3R には、転写活性化因子として働く MYB3R1 と MYB3R4 のほかに、転写抑制因子として働く MYB3R1, MYB3R3 および MYB3R5 が存在する。この抑制型の MYB3R が塩ストレス下による細胞質分裂異常に関わっているのか検討を行うために、転写抑制型の *MYB3R* 遺伝子全てを破壊した三重変異体 *myb3r1,3,5* を用いて塩ストレス下における細胞質分裂異常を調査した。まず、野生型植物の種子を異なる濃度の NaCl を含む培地に播種し、18 日間育成させ

た後、子葉における気孔を観察し、異常の頻度を測定した。その結果、野生型植物を高い NaCl 濃度の条件で育成させると、気孔の異常の頻度も高くなること、つまり細胞質分裂の異常は塩ストレスの強さに依存して起きていることがわかった (図 4A)。同様の塩ストレス条件下において、*myb3r4* 変異体及び *myb3r1,3,5* 三重変異体を生育し、子葉における気孔の異常を測定した。*myb3r4* 変異体は、非ストレス条件下では野生型と同様に気孔の形態異常をほとんど示さないが、塩ストレス条件では、どの濃度の NaCl 存在下でも野生型よりも高頻度で気孔の形態異常が観察された。反対に、抑制型 MYB3R が欠損した *myb3r1,3,5* 三重変異体では塩ストレス下において野生型よりも形態異常を示す気孔の頻度が顕著に低下していることがわかった (図 4A,B)。以上のことから、野生型で見られる塩ストレス下での細胞質分裂の異常に対して、活性化型 MYB3R および抑制型 MYB3R の変異が影響を示し、それぞれの変異はこの異常に対して反対の方向へ働くことが分かった。従って、塩ストレスにより引き起こされる細胞質分裂の異常には MYB3R の活性が密接に関わっていると考えられる。また、特に重要なのは、*myb3r1,3,5* 三重変異によりこの異常が緩和されるという観察であり、この結果から、塩ストレスにより誘導される不完全な細胞質分裂は、抑制型 MYB3R を介した細胞周期の抑制により引き起こされることが示唆された。

(3) *myb3r1,3,5* 三重変異体では塩ストレスによる成長抑制も緩和される

塩ストレス下で見られる孔辺細胞での細胞質分裂異常は、植物が成長を抑制するために細胞周期を負に制御した結果だと考えられる。また、前述した通り、この細胞質分裂の異常は抑制型 MYB3R を介して引き起こされていると予想されるため、次に、塩ストレス下に成長抑制に対する抑制型 MYB3R の変異の影響について検討を行った。野生型植物と *myb3r1,3,5* 三重変異体の種子を様々な濃度の NaCl を含む培地で 18 日間生育させ、植物体を観察し、葉の枚数や葉の面積について測定を行った。その結果、野生型植物では培地に含まれる NaCl 濃度が高いほど、植物体のサイズがより低下することが分かった (図 5A)。一方で、*myb3r1,3,5* 三重変異体では、塩ストレス下 (特に 60-100 mM NaCl 存在下) において野生型植物と比較して植物体のサイズ低下が緩和されていた。また、植物の成長のパラメーターである葉の枚数や面積について測定を行うと、同様に野生型では葉の枚数と面積が塩濃度に依存して低下していくが、*myb3r1,3,5* 三重変異体ではそれが大きく緩和されることが示された (図 5B,C)。加えて、塩ストレス下における根の長さや側根の数に関しても測定を行ったが、やはり *myb3r1,3,5* 三重変異によって塩ストレスによる根の成長抑制が緩和されることが分かった (図 5D,E)。

以上のことから、抑制型 MYB3R は塩ストレスにより引き起こされる細胞質

分裂の異常だけでなく、器官の成長を示す様々な指標に強く影響していることが明らかとなり、塩ストレス下における成長抑制に、抑制型 MYB3R を介した細胞周期制御が関係することが強く示唆された。

(4) 塩ストレス下では抑制型 MYB3R を介して細胞分裂が抑えられる

塩ストレスによる個体や器官の成長抑制についてより詳細な解析を行うため、次に、塩ストレスによる成長抑制を細胞レベルで観察を行った。まず、塩ストレス条件下で生育した植物の第 1,2 葉の細胞数についてカウントを行った結果、塩ストレス下では葉 1 枚当たりの柵状細胞の数が減少することが分かった (図 6A)。従って、細胞数の減少が塩ストレスによる成長抑制の一因であり、細胞周期が負に制御され、細胞分裂が抑えられた結果引き起こされていると予想された。塩ストレスの細胞周期への影響を確認するために、次に野生型植物及び *myb3r1,3,5* 三重変異体を用いてプロイディ解析を行った。若い葉 (1 mm 以下) では、細胞分裂が盛んに行われているため、ほとんどが 2C の核相を示す細胞であるが、塩ストレス条件下の野生型植物では 4C の核相を示す細胞が増加していることが分かった(図 6B)。4C の核相を示す細胞は DNA の複製が行われる S 期から分裂期(M 期)との間、すなわち G2 期にあると予想され、この結果は塩ストレスによって G2 期から M 期への移行に遅延が起き、細胞分裂の遅延が発生していることを

示唆している (図 6B)。

CYCBI;*1* はシロイヌナズナの M 期サイクリンの 1 つであり、G2/M 期特異的な転写と周期依存的なタンパク質分解により、分裂中の細胞特異的に発現することが知られる代表的な細胞周期制御因子である。CYCBI;*1*-GUS は、CYCBI;*1* 自身のプロモーターと、ユビキチン化の標的配列であるデストラクションボックス (D-box) を含んでおり、GUS 融合タンパク質が G2/M 期特異的発現を示すマーカーである (Colon-Carmona *et al.*, 1999)。植物において最初に報告された細胞分裂のマーカーでもあり、シロイヌナズナの発生過程における分裂活性の指標として非常に多くの研究に用いられている。このマーカーを、野生型植物と *myb3r1,3,5* 三重変異体に導入し、塩ストレス下および非ストレス条件で育成させ、GUS の発現を解析した。非ストレス条件では CYCBI;*1*-GUS の発現は分裂が盛んな根端や若葉において観察された(図 6D, 7A)。一方で塩ストレス処理後に経時的に発現を観察すると、処理後 12 時間以内の早い段階で GUS の発現を示す細胞数が顕著に減少していることがわかった(図 7A)。このことから、地上部及び地下部においても塩ストレスにより分裂期にある細胞の数が減少していることが示された。また、根のメリステムについて観察を行うと、塩ストレスに曝された野生型植物ではメリステムサイズが顕著に減少しており(図 7B,C)、塩ストレス下では細胞分裂の抑制とそれに伴ったエンドリプリケーションへの早期移行が

引き起こされていると考えられる。一方で、これらの野生型植物で見られた塩ストレスによるプロイディレベルの上昇や、分裂細胞数やメリステムサイズの減少は *myb3r1,3,5* 三重変異によって緩和されていた(図 6, 7)。

これらの結果から、塩ストレス下では抑制型 MYB3R を介して細胞周期の抑制が引き起こされており、その結果、細胞分裂の遅延が引き起こされていると予想された。一方で、エンドリプリケーションの早期移行に関しては、抑制型 MYB3R に依存しないと考えられる。若い葉を用いたプロイディ解析によって塩ストレス下では G2 期の遅延により 2C 細胞が増加し、細胞分裂が抑えられていることを示したが、成熟した葉を用いて同様の解析を行った場合では、塩ストレス下によって 8C,16C 等の高い核相を示す細胞が増加し、エンドリプリケーションへ移行した細胞の数が増加することが分かった(図 6C)。しかしながら、*myb3r1,3,5* 三重変異によってこの 8C,16C 細胞の増加が緩和することは無かった。塩ストレス下における根のメリステムサイズの解析結果では抑制型 MYB3R の欠失はエンドリプリケーションの移行を緩和することができたが、葉のエンドリプリケーションへの早期移行に対して影響を示さなかった。従って、塩ストレスによるエンドリプリケーションへの早期移行は抑制型 MYB3R とは異なった何らかの因子に依存して制御されていると予想される。

(5) 抑制型 MYB3R が塩ストレス下における G2/M 期遺伝子の発現抑制を担う

塩ストレス下では、根や葉などの器官の成長抑制と細胞周期の抑制が起こること、また、この細胞周期の抑制は、抑制型 MYB3R の変異体では顕著に緩和されることが示された。このような細胞周期に及ぼす影響は、MYB3R による G2/M 期遺伝子の転写制御を通じて生じていると推測することができる。そこで、細胞周期に関わる G2/M 期遺伝子の発現が塩ストレスにより影響を受けているかどうか、また、それに対して MYB3R の変異がどのように影響するのかについて qRT-PCR 解析により検討を行った。CYCB1;2 及び KNOLLE 遺伝子は代表的な G2/M 期遺伝子であると共に MYB3R の標的であることが知られている。野生型植物及び *myb3r4* 変異体、*myb3r1,3,5* 三重変異体を種々の濃度の NaCl を含む 1/2MS 培地にて 10 日間生育することで塩ストレスに曝した後、CYCB1;2 及び KNOLLE 遺伝子の発現について測定を行った。その結果、野生型植物と *myb3r4* 変異体においては塩ストレスによって両遺伝子の発現の低下が顕著に見られたが、*myb3r1,3,5* 三重変異体では、そのような低下がほとんど見られなかった(図 8A)。野生型植物と *myb3r1,3,5* 三重変異体との間で、G2/M 期遺伝子の発現に差が確認された NaCl (75 mM)処理後 10 日目の植物を用いて、次に RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った(図 8B-D)。その結果、野生型では 1,346 遺伝子の発現が有意に上昇し、その中には G2/M 期遺伝子が 1 遺伝子含まれていた。一

方で1,838 遺伝子の発現が塩ストレスにより低下しており (adjusted P-value < 0.01)、このうち 40 個の遺伝子が G2/M 期遺伝子だった(図 8B)。 *myb3r1,3,5* 三重変異体においては、野生型で確認された塩ストレスによる G2/M 期遺伝子の発現低下は緩和されており、有意な発現低下を示した遺伝子の数も野生型植物の 40 遺伝子に比べ、28 遺伝子と大きく減少していた。また、塩ストレスによる G2/M 期遺伝子の発現変動の大きさ (Fold Change)を元にして、ランクオーダープロット解析を行うと、野生型植物と比較してやはり *myb3r1,3,5* 三重変異体では塩ストレスによる G2/M 期遺伝子の発現低下が顕著に緩和されていることが分かった(図 8C)。加えて、個々の G2/M 期遺伝子の発現について塩ストレス処理による発現変動 (Fold change) をヒートマップにより表示すると、野生型植物において発現低下した 40 個の G2/M 期遺伝子の多くが、*myb3r1,3,5* 三重変異体では低下の程度が減少したり、低下が見られなくなっている様子が示された(図 8D)。以上の結果から塩ストレス下の成長抑制には実際に G2/M 期遺伝子の発現低下が伴っている事が分かり、一部の G2/M 期遺伝子の発現低下は抑制型 MYB3R により引き起こされていると考えられた。

(6) 塩ストレス応答初期において G2/M 期遺伝子の発現が顕著に抑制される

前項の G2/M 期遺伝子の発現解析は、種子を播種してから測定するまでの間、

長期間にわたり塩ストレスに曝され続けた植物を用いて行った実験である。一方、細胞周期制御遺伝子の発現の変化は塩ストレス応答の初期段階でより顕著に観察されることが報告されている (Burssens *et al.*, 2000; West *et al.*, 2004)。そのため、次に塩ストレス応答の初期における G2/M 期遺伝子の制御について注目した。まず、野生型植物及び *myb3r1,3,5* 三重変異体を非ストレス条件下において 7 日目まで生育した後、塩ストレスに曝し、代表的な G2/M 期遺伝子、*CYCB1;2* と *KNOLLE* 遺伝子の発現の変動を qRT-PCR 法によって経時的に解析した。その結果、塩ストレス(150 mM NaCl)に曝してから 24 時間で、両遺伝子の急速な発現低下が観察され、その後、低い発現レベルのまま維持された(図 9A)。続いて、この短期間(24 時間)の塩ストレス条件で見られる G2/M 期遺伝子の発現低下に対する塩濃度の違いによる影響について観察を行ったが、野生型植物において G2/M 期遺伝子の発現が低下したのは 150 mM のみであり、150 mM より低い 50, 100 mM の NaCl 濃度では、発現の低下は確認されなかった(図 9B)。しかし、*myb3r1,3,5* 三重変異体を同様に処理した場合には、150 mM NaCl の条件においても有意な発現の低下が見られなくなった。一方、乾燥や塩ストレスに対して応答することが知られる *RD29A* 遺伝子 (Shinozaki *et al.*, 1993) の発現を調べたところ、*myb3r1,3,5* 三重変異体においても野生型植物と同様に、*RD29A* 遺伝子の上昇が観察されることから(図 9B)、*myb3r1,3,5* 三重変異体はストレス応答に鈍感に

なっている訳ではなく、G2/M 期遺伝子特異的に発現抑制が働かなくなっていると考えられる。次に、*CYCB1;2*、*KNOLLE* 以外の G2/M 期遺伝子 *CYCB1;4*、*IMK2*、*EDE1* についても 150 mM NaCl, 24 時間の塩ストレス条件にて遺伝子発現解析を行った。その結果、ほとんどの G2/M 期遺伝子がやはり塩ストレス応答初期において有意に発現低下しており、*myb3r1,3,5* 三重変異体ではそれが緩和されていた(図 9C)。これらの結果から、塩ストレスに曝されてから早い段階で G2/M 期遺伝子の発現が低下すること、この塩ストレス応答初期の G2/M 期遺伝子の発現抑制にも抑制型 MYB3R が必須の働きをすることが分かった。そこで、長期間塩ストレス処理を受け続けた植物において行った解析と同様に、短期間の塩ストレス処理 (150 mM NaCl, 24 時間) を施した植物においても、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、野生型植物においては 3,173 遺伝子の発現が上昇し、1,735 遺伝子の発現が低下することが分かった(adjusted P-value < 0.01)。また、180 遺伝子存在する G2/M 期遺伝子群の中で、67 遺伝子の発現低下が確認され、持続的な塩ストレス条件(75 mM NaCl, 10 日間)と比較してより多くの G2/M 期遺伝子が顕著に発現低下することが明らかになった(図 10A)。短時間の塩ストレス処理の場合(150 mM NaCl, 24 時間)と塩ストレス処理を長期間持続した場合(75 mM NaCl, 10 日間)の G2/M 期遺伝子の発現低下を、スキャッタープロットにより比較すると、はっきりとした相関が見られることから、これら両条

件で確認された G2/M 期遺伝子の発現低下は同じ応答・制御によるものであると予想される (図 10B)。また、この短期間の塩ストレス処理により、野生型植物では 68 個の G2/M 期遺伝子が発現低下を示したが、*myb3r1,3,5* 三重変異体では、それが 35 個に留まっていた(図 10A)。加えて、塩ストレス応答の初期に見られる G2/M 期遺伝子の発現低下について、野生型植物と *myb3r1,3,5* 三重変異体との比較をランクオーダープロットやスキャッタープロットにより行くと、両解析の結果からも *myb3r1,3,5* 三重変異によって塩ストレス応答初期に見られる G2/M 期遺伝子の発現低下が緩和されることが示された (図 10C,D)。以上の結果から、塩ストレスに曝された植物は比較的早い段階で、多くの G2/M 期遺伝子の発現が顕著に低下することが分かり、これらの応答は持続的に塩ストレスに曝された植物で見られたものと同様の応答であると考えられた。また、*myb3r1,3,5* 三重変異体では塩ストレス応答初期における G2/M 期遺伝子の発現低下についても緩和されたことから、抑制型 MYB3R は塩ストレスの初期とその後の G2/M 期遺伝子の発現抑制の両者において機能していると考えられる。

(7) 塩ストレス下において MYB3R の発現量の変化は見られない

これまでの結果から塩ストレスによって細胞周期が負に制御され、葉や根などの器官の成長抑制が引き起されており、また、この細胞周期の抑制は抑制型

MYB3R を介した G2/M 期遺伝子の発現低下により実現していることが示された。一方で、塩ストレス下におけるこの抑制型 MYB3R の機能がどのように制御されているのかは不明であった。そこで、先ず、塩ストレスによって MYB3R の転写産物量が増加しているのか qRT-PCR 解析により確認を行った。しかしながら、塩ストレス応答の初期段階(150 mM NaCl、24 時間)や長期的に塩ストレスに曝された場合 (75 mM NaCl、10 日間)において、活性化型 MYB3R である MYB3R4 発現量の低下がわずかに見られるのに対して、抑制型 MYB3R では発現量の変化は観察されなかった (図 12A,B)。

最近、所属研究室と奈良先端大学 梅田教授の研究室との共同研究によって、抑制型 MYB3R が DNA ストレスや高温ストレス条件においても働く事が明らかにされており、抑制型 MYB3R の欠失変異体では両条件における成長抑制が緩和することが示されている(Chen *et al.*, 2017, Takahashi *et al.*, 2019)。また、DNA ストレス及び高温ストレス条件下では根において抑制型 MYB3R のタンパク質量が増加することも示しており、NAC 型転写因子である ANAC044 と ANAC085 の発現上昇によって、抑制型 MYB3R タンパク質が安定化すると説明されている(Takahashi *et al.*, 2019)。

当研究の RNA-seq による塩ストレス下での発現解析の結果では、ANAC085 の発現は非常に弱く、発現変動のある遺伝子としては同定できなかったが、

ANAC044 の発現は塩ストレスによる上昇が確認された。従って、塩ストレス下においても抑制型 MYB3R が ANAC を介したタンパク質安定化制御を受けている可能性が考えられた。

MYB3R のタンパク質レベルでの発現量について、*MYB3R3-GFP* 及び *GFP-MYB3R4* 形質転換株を用いて解析を行った(図 11C)。*MYB3R3-GFP* 及び *GFP-MYB3R4* 系統は、それぞれの全長タンパク質を GFP と融合した形で発現するコンストラクトであり、いずれも自身のプロモーターの制御下で発現するように作成されている。150 mM NaCl, 24 時間の塩ストレス処理の後、分裂が盛んな根端において抑制型の *MYB3R3-GFP* の蛍光について観察を行ったが、非ストレス条件と比較して変化は見られなかった。一方で、活性化型の *GFP-MYB3R4* は G2/M 期特異的な発現をするため、一部の細胞でのみ蛍光が見られるようなパッチ状の発現が見られるが、塩ストレス下では蛍光を示す細胞の数が減少することが分かった(図 11C)。

以上の様に、抑制型 MYB3R の転写産物量及びタンパク質量はほとんど変化が見られない事から、塩ストレス下において抑制型 MYB3R は DNA ストレス及び高温ストレスで見られるような量的な制御は受けておらず、何らかの質的な制御を受けていると予想された。活性化型 MYB3R は塩ストレスによる転写産物量の低下が観察されたが、*GFP-MYB3R4* の蛍光強度自体には塩ストレスによ

る変化が見られないことから、活性化型 MYB3R に関しては、塩ストレスによる細胞分裂が抑制され、G2/M 期にある細胞数が減少したため、みかけ上、総転写産物量が減少したものと予想される。

2-3. 結言と考察

ストレスによる積極的な成長抑制には、細胞周期の負の制御が関わっていると考えられていたが、どのような細胞周期制御因子が関わっているのかについては非常に限られた情報があるのみであった。本研究では、塩ストレスと成長抑制を繋ぐ経路として MYB3R 経路が位置することを示し、細胞周期制御を担う MYB3R 転写因子が G2/M 期遺伝子の発現を制御することで、細胞分裂が抑えられ、塩ストレスによる植物の成長抑制が引き起こされることを明らかにした。

塩ストレスに曝された植物では、葉や根などの成長抑制、細胞分裂の抑制、それに伴った細胞数の低下、細胞質分裂の異常、メリステムサイズの低下や G2/M 期遺伝子の発現低下が観察された。また、これらの塩ストレスによる作用が全て、抑制型 MYB3R の変異によって緩和されることから、塩ストレス下では抑制型 MYB3R を介して G2/M 期遺伝子の発現低下が引き起こされ、その結果、細胞分裂の抑制とそれに伴った成長抑制が観察されると予想される。

一方で、抑制型 MYB3R 自身の塩ストレス下での制御については、塩ストレス下において抑制型 MYB3R の mRNA 量やタンパク質量に顕著な変化は見られないことから、DNA ストレスや高温ストレス下のような量的な制御ではなく、翻訳後の制御、例えばリン酸化などの修飾や他のタンパク質との相互作用が塩ストレス下での抑制型 MYB3R の機能において重要であると予想された。

抑制型 MYB3R の相互作用因子は既に所属研究室において報告されており、免疫沈降実験により、MYB3R が他の複数の転写因子を同時に含む大きなタンパク質複合体を形成することを明らかにしている(Kobayashi *et al.*, 2015b)。動物における MYB3R として知られる B-MYB は G1/S 期遺伝子の転写制御に重要な E2F 転写因子や Rb 関連タンパク質の他、複数の DNA 結合性転写因子を含む 10 個以上のタンパク質により形成される巨大な複合体 DREAM complex を形成することが過去に報告されており (Sadasivam and Decaprio, 2013)、この超複合体が細胞周期に関連する遺伝子発現を、細胞の状態に応じて制御していることが示唆されている。しかし、このような大きなタンパク質複合体に、同時に複数の転写因子が存在することの本質的な意義はまだ明らかになされていない。所属研究室では、シロイヌナズナにおいても MYB3R と E2F 転写因子を同時に含む DREAM complex によく似た複合体が存在していることを明らかにしている。一方で、動物における DREAM complex を形成する因子の中には、植物にホモログが存在しないものがあるため、植物の DREAM complex の構成因子は動物とは異なっており、その機能にも違いがあるのではないかと予想されている。現段階では推測の部分が大きいですが、このような複合体の形成やその機能に塩ストレスが何らかの影響を与え、抑制型 MYB3R や他の E2F などの転写因子の働きを変化させている可能性がある。つまり、自身の成長を周囲の環境に合わせて制御する

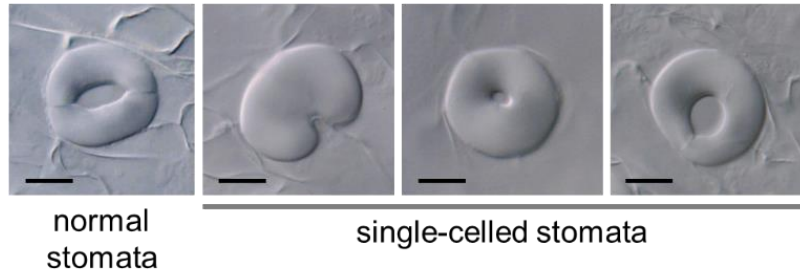
必要がある植物では、環境からの刺激に応答して細胞周期制御が柔軟かつ厳密に行われる必要があり、環境刺激により G1/S 期および G2/M 期に関わる下流因子を包括的に制御し、細胞周期を調節する仕組みが存在する可能性が考えられる。

抑制型 MYB3R の質的な制御には植物ホルモンが関わっている可能性も考えられる。植物のストレス応答は一般的に種々の植物ホルモンから成るネットワークによって制御されていると考えられており (Colcombet *et al.*, 2008)、抑制型 MYB3R がこのような植物ホルモンにより制御を受けている可能性がある。前述した通り、塩ストレス下での成長抑制においては、ジベレリン情報伝達系で働く成長抑制因子 DELLA が中心的な役割を担うことが明らかにされている (Achard *et al.*, 2006)。Achard らの報告では、DELLA の欠失変異体では塩ストレスによる成長抑制が見られない事や、塩ストレスによって DELLA タンパクが蓄積することが示されている (Achard *et al.*, 2006)。また、この塩ストレス下での DELLA タンパクの蓄積は、内在性のジベレリン量の低下やエチレン量の増加によって引き起こされることが説明されており (Achard *et al.*, 2006)、これらの DELLA を中心としたジベレリン情報伝達系やエチレン情報伝達系とのネットワークが塩ストレス下での成長抑制において重要な働きを担っていると考えられている。以上のことから、塩ストレスと抑制型 MYB3R を介した G2/M 期遺伝子

制御の間に、DELLA を中心としたジベレリンやエチレンの信号伝達系が機能している可能性が予想された。このため、次章では塩ストレス下での抑制型 MYB3R を介した細胞周期制御と植物ホルモンの関連について着目し研究を行った。

2-4. 図表

A



B

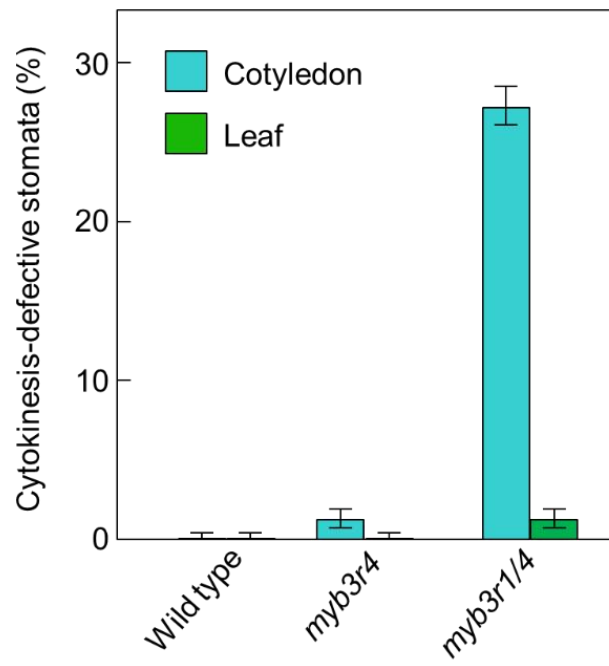


図 2.

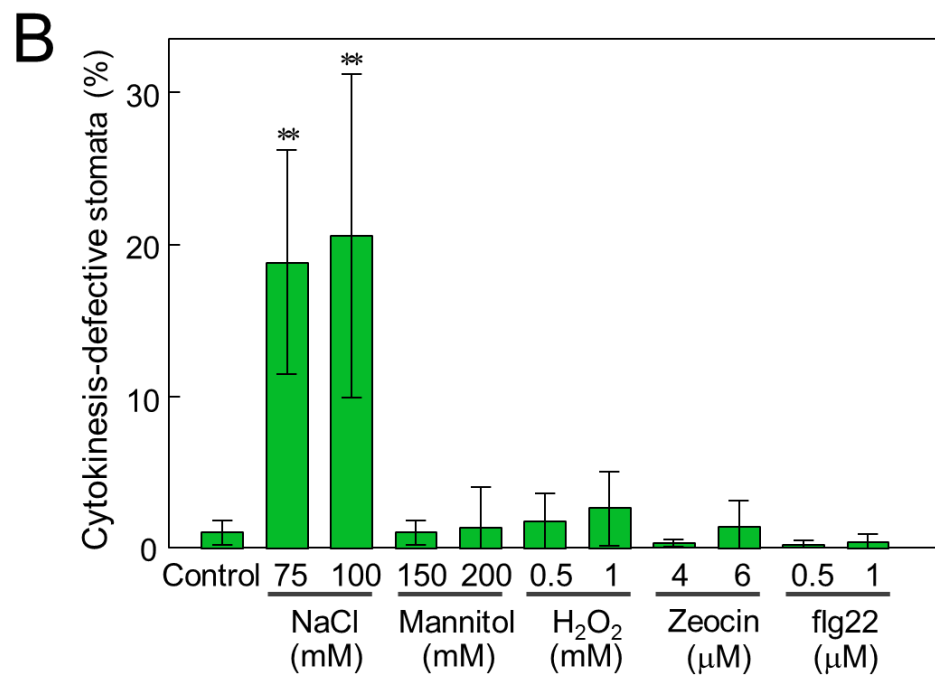
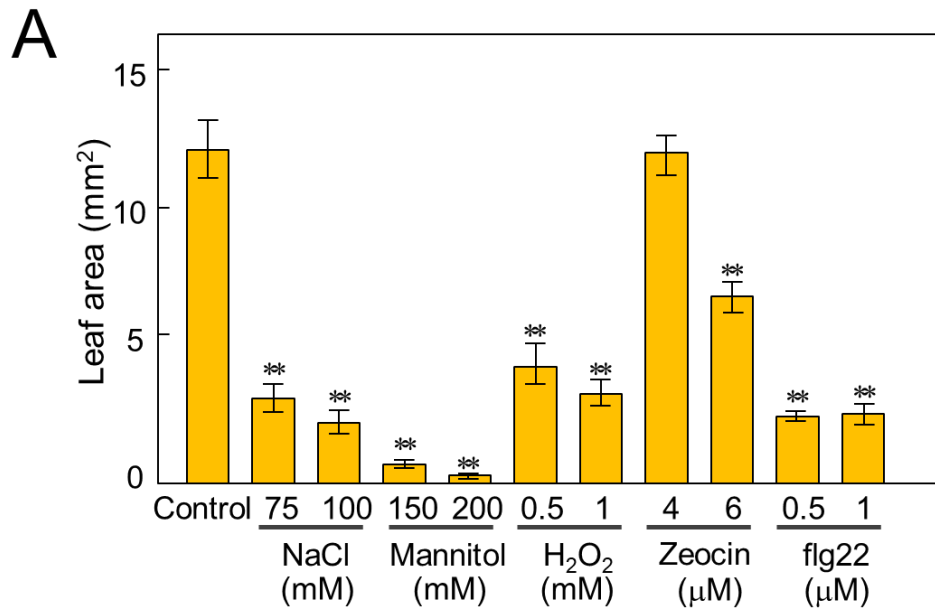
図 2. 活性化型 MYB3R の変異体に生じる細胞質分裂の異常

(A) 不完全な細胞質分裂により生じる気孔の形態異常

14 日間生育した *myb3r1 myb3r4* 二重変異体の子葉を透明化処理し、ノマルスキー顕微鏡を用いて観察した。正常な気孔は一对の孔辺細胞により形成されるが、*myb3r1 myb3r4* 二重変異体では孔辺母細胞が不完全な細胞質分裂を起こすため、高頻度で 2 個の核を持つ孔辺細胞 1 個が生じ、異常な形態の気孔が形成される。スケールバーは 10 μm を示している。

(B) 形態異常を示す気孔の頻度

14 日間生育した野生型植物、*myb3r4* 変異体及び *myb3r1 myb3r4* 二重変異体の子葉と第 1,2 葉を透明化処理し、ノマルスキー顕微鏡を用いて表皮の表現型を観察した。特徴的な形態異常を示す気孔の頻度を測定した ($n = 5$)。エラーバーは標準偏差を示している。



☒ 3.

図 3. 種々の環境ストレス処理を受けた植物の細胞質分裂異常

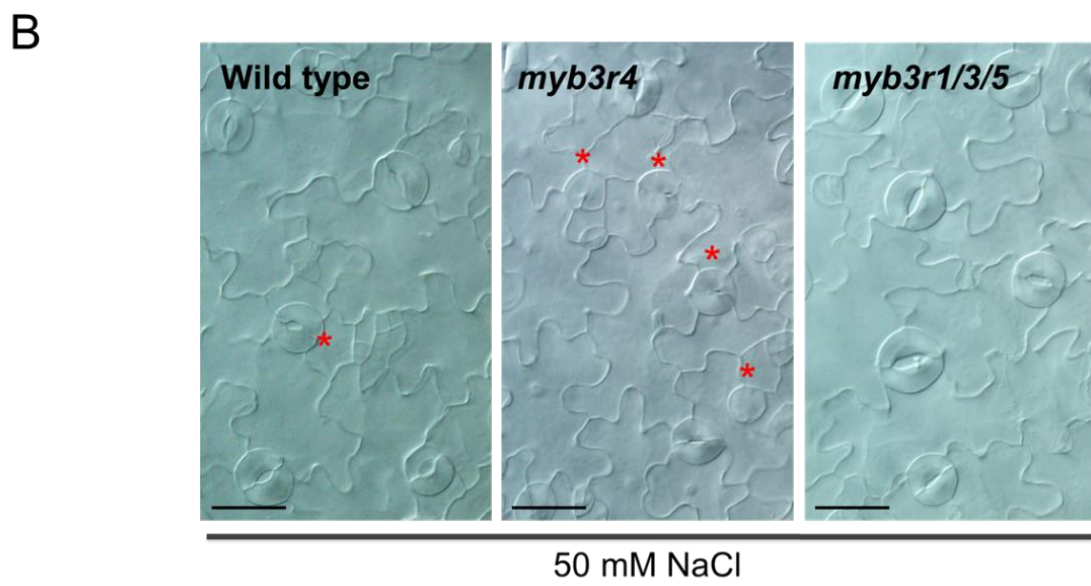
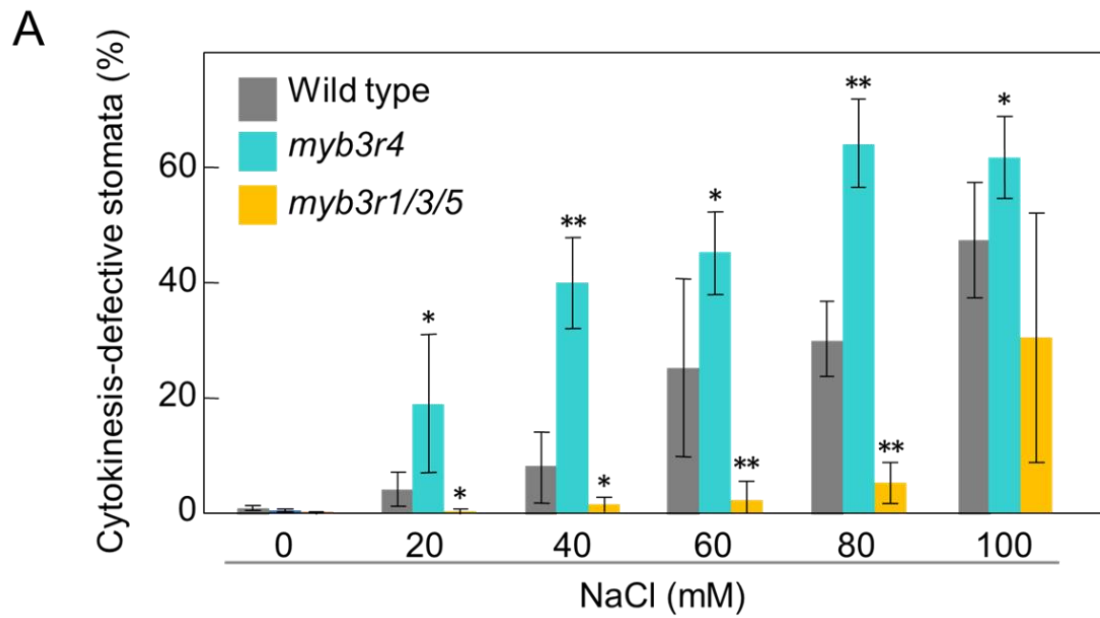
myb3r4 変異体を各々のストレス条件下で 14 日間生育し、葉の大きさと細胞質分裂の異常により生じる気孔の形態異常を解析した。

(A) 葉の大きさ

植物の第 1,2 葉をサンプリングし、画像解析ソフト Image J を用いて葉の表面積を測定した($n = 5$)。

(B) 形態異常を示す気孔の頻度

特徴的な形態異常を示す気孔の頻度を測定し、細胞質分裂の異常を示す指標として用いた($n = 10$)。エラーバーは標準偏差を示しており、*は $p < 0.05$, **は $p < 0.01$ を表している。



☒ 4.

図 4. 塩ストレス下で育成した *myb3r* 変異体における細胞質分裂の異常

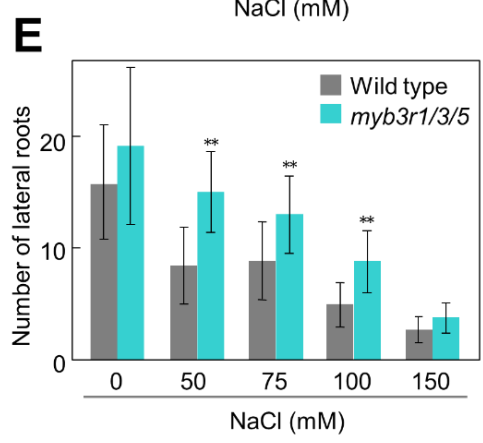
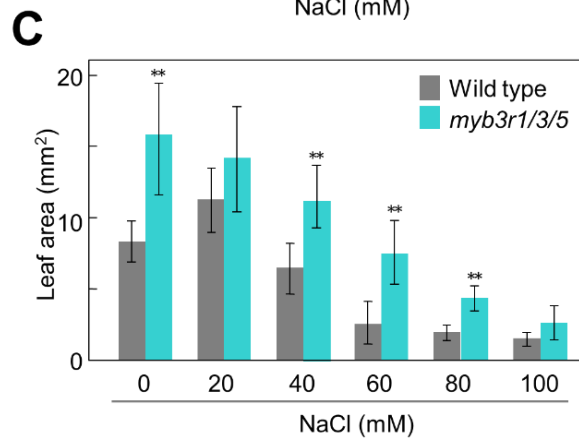
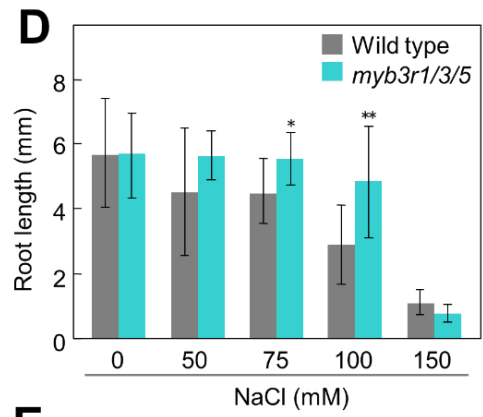
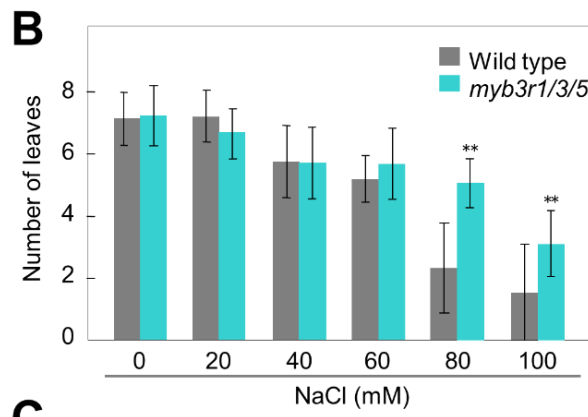
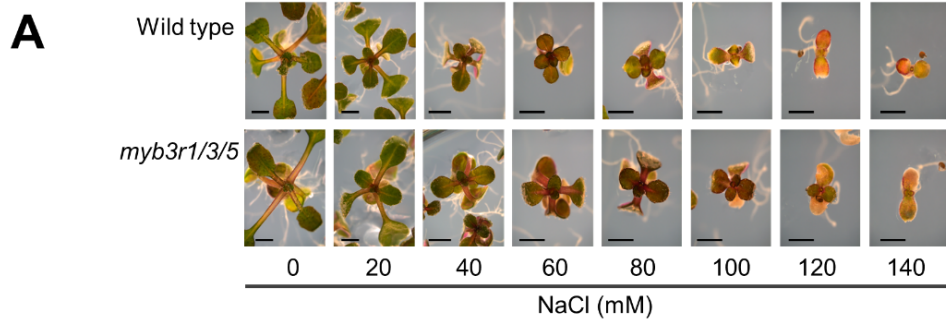
野生型植物、*myb3r4* 変異体、及び *myb3r1,3,5* 三重変異体の種子を様々濃度の NaCl を含む培地に播種し、18 日間生育した。子葉を透明化した後、形態に異常を示す気孔の観察を行った。

(A) 各 NaCl 濃度における形態異常を示す気孔の頻度

野生型植物、*myb3r4* 変異体、および *myb3r1,3,5* 三重変異体において形態異常を示す気孔の頻度を測定した($n = 8$)。エラーバーは標準偏差を示している。*は $p < 0.05$, **は $p < 0.01$ を表している。

(B) 各遺伝子型の植物に生じた気孔の形態異常

野生型植物、*myb3r4* 変異体、および *myb3r1,3,5* 三重変異体を NaCl (50 mM) 存在下で育成した。子葉を透明化し、表皮組織を観察した。*は不完全な細胞質分裂により生じた形態が異常な気孔を示している。



☒ 5.

図 5. 塩ストレス下における抑制型 *myb3r1,3,5* 三重変異体の成長解析

塩ストレス下における野生型植物及び *myb3r1,3,5* 三重変異体の成長パラメータの解析を行った。(A)(B)(C) では、種々の塩濃度下で 18 日間植物を生育させた。(D)(E) では植物を 1/2MS 培地で 7 日間生育した後、各々の塩濃度の培地に移し、5 日間生育させた。

(A) 塩ストレス処理を行った植物体の様子

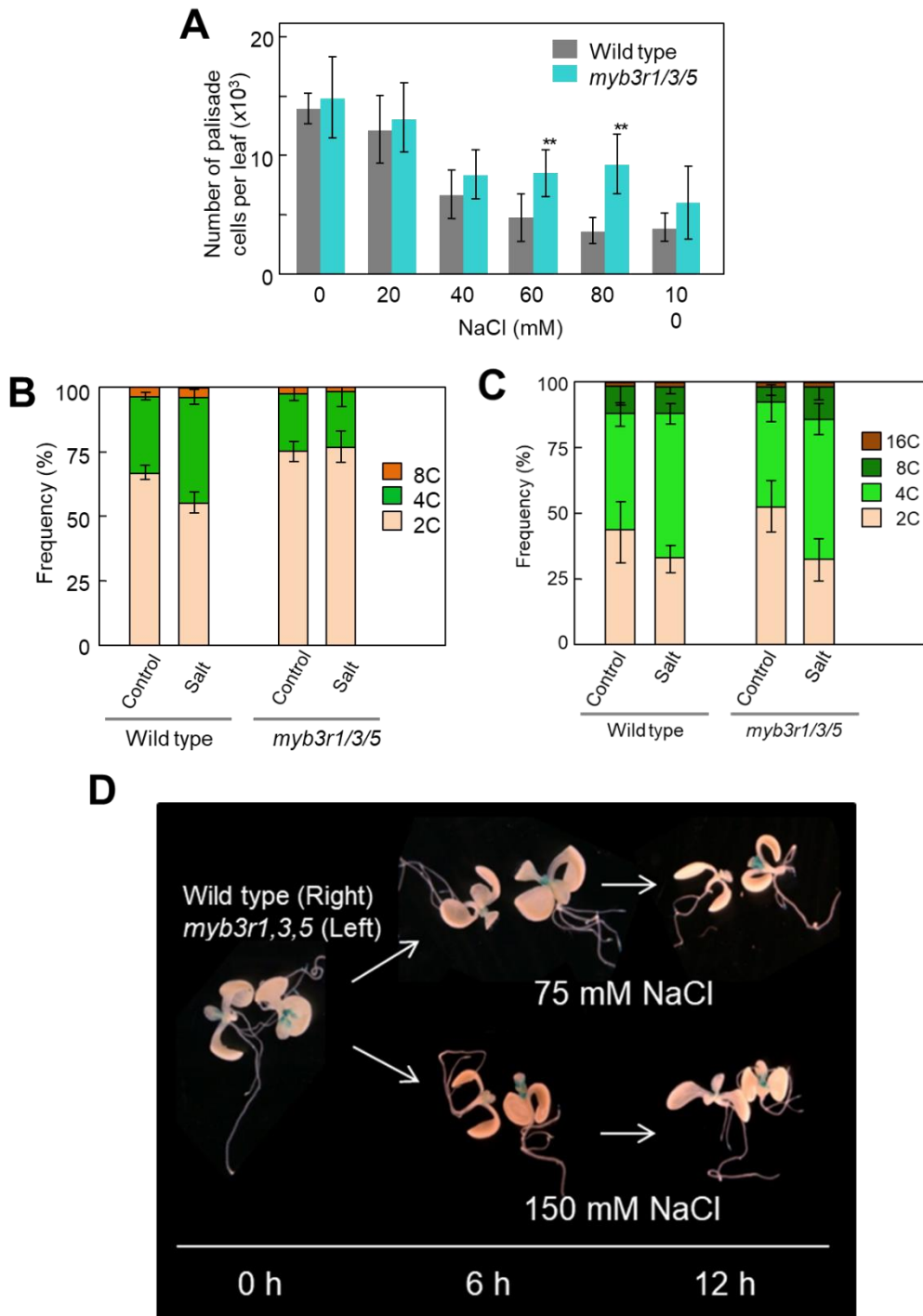
(B) 葉の枚数

(C) 第 1,2 葉の面積

(D) 根の長さ

(E) 側根の数

エラーバーは標準偏差を示しており、*は $P < 0.05$, **は $P < 0.01$ を表している。スケールバーは 2 mm を示している。



☒ 6.

図 6. 葉の細胞分裂に及ぼす塩ストレスの影響

(A) 第 1,2 葉における柵状細胞の数

野生型植物と *myb3r1,3,5* 三重変異体を種々の濃度の NaCl を含む 1/2MS 培地に播種し、15 日間生育した後、第 1,2 葉における柵状細胞数を測定した。($n \geq 6$)

(B) 若い葉のプロイディレベル

植物を 1/2MS 培地で 3 日間生育した後、75 mM NaCl 培地に 5 日間置いた。1 mm 以下の若い第 3,4 葉を用いてプロイディ解析を行った。

(C) 成熟した葉のプロイディレベル

植物を 1/2MS ± 75 mM NaCl 培地で 12 日間生育した後、成熟した第 3,4 葉をサンプリングし、プロイディ解析を行った。

(D) 野生型及び *myb3r1,3,5* 三重変異体における *CYCB1:1-GUS* の発現

野生型及び *myb3r1,3,5* 三重変異体背景の *CYCB1:1-GUS* 系統を 1/2MS 培地にて 8 日間生育させた後、75 mM または 150 mM NaCl を含む 1/2MS 液体培地へ移した。その後、6 時間と 12 時間後にサンプリングを行い、X-Gluc 染色によって *CYCB1:1-GUS* の発現を観察した。

エラーバーは標準偏差を示しており、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表している。

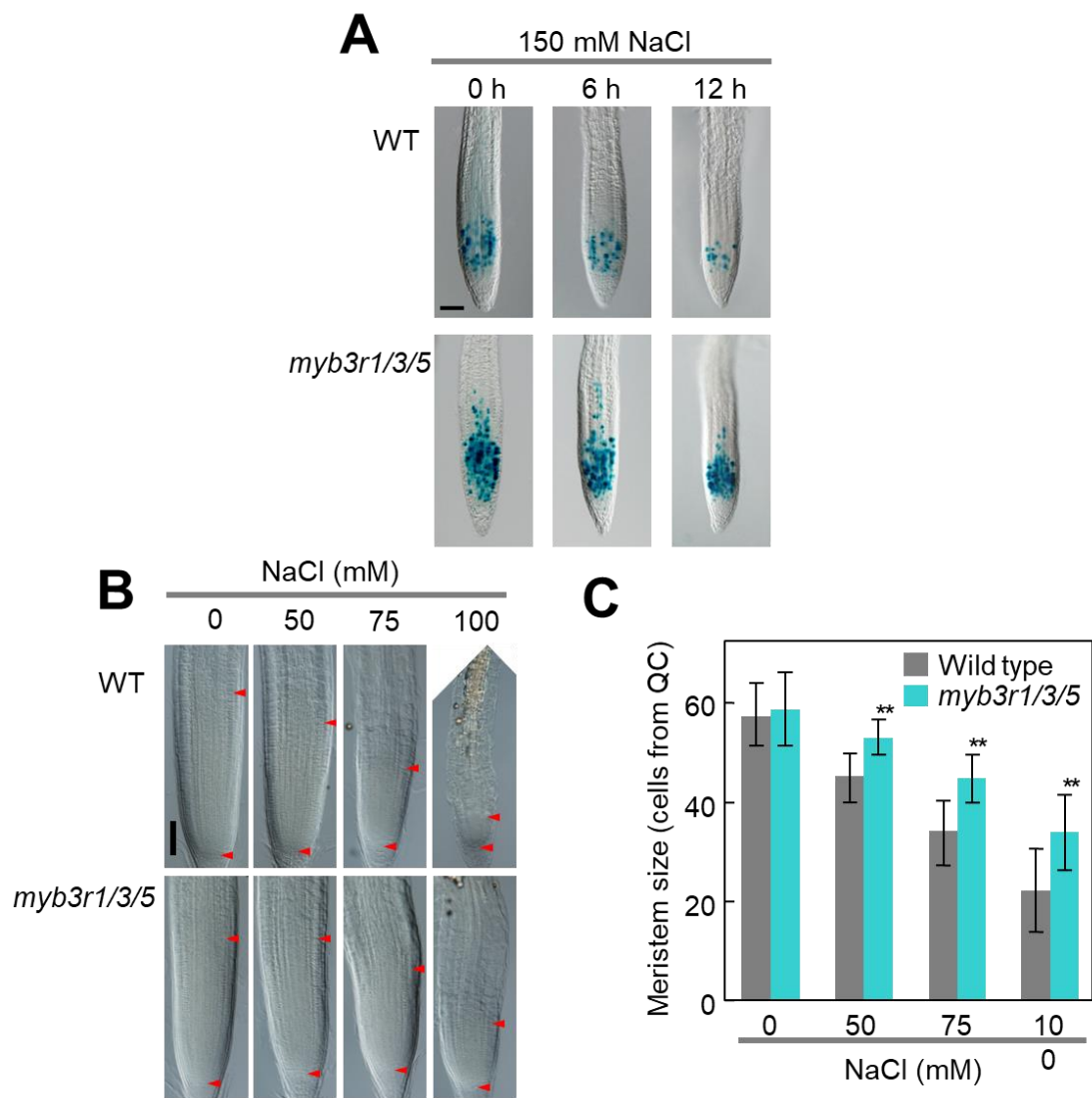


图 7.

図 7. 根メリステムの細胞分裂に及ぼす塩ストレスの影響

(A) 野生型植物及び *myb3r1,3,5* 三重変異体における *CYCB1:1-GUS* の発現

野生型及び *myb3r1,3,5* 三重変異体背景の *CYCB1:1-GUS* 系統を 1/2MS 培地にて 8 日間生育させた後、150 mM NaCl を含む 1/2MS 液体培地へ移した。その後、6 時間と 12 時間後にサンプリングを行い、X-Gluc 染色により *CYCB1:1-GUS* の発現を観察した。

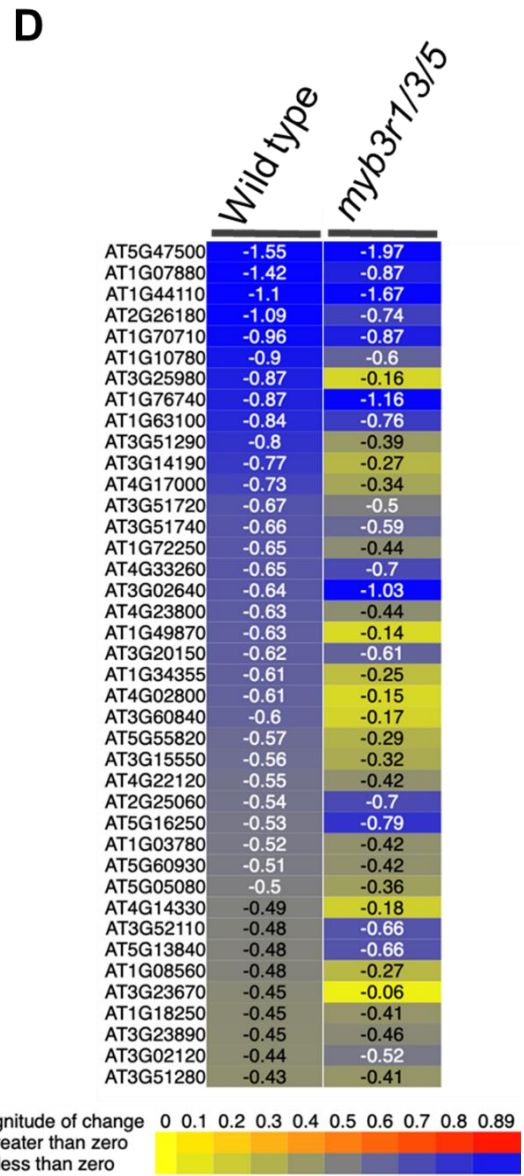
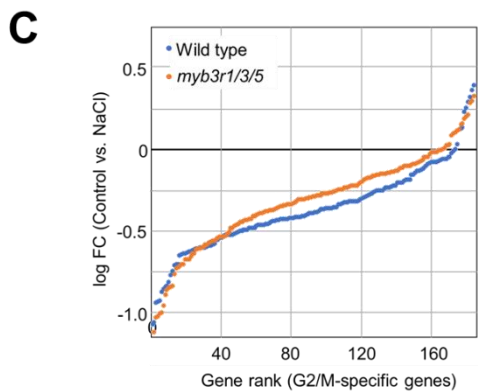
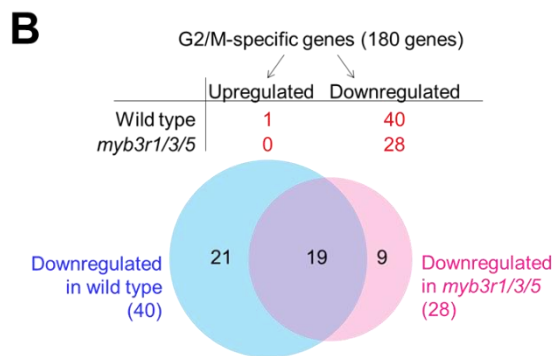
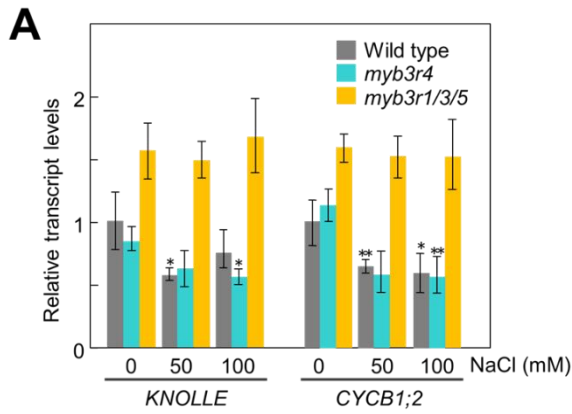
(B) 塩ストレスを受けた根メリステムの様子

野生型植物、および *myb3r1,3,5* 三重変異体を 1/2MS 培地で 7 日間生育した後、図で示されている濃度の NaCl を含む 1/2MS 培地に移し、4 日間育成した。赤い矢頭は静止中心 (QC) とメリステムの上端の位置を示している。

(C) メリステムサイズの定量的解析

植物を(B)と同様の条件で育成し、メリステムの長さを測定した($n \geq 10$)。

エラーバーは標準偏差を示しており、*は $p < 0.05$, **は $p < 0.01$ を表している。



8.

図 8. 長期間の塩ストレスを受けた植物における G2/M 期遺伝子の発現解析

(A) qRT-PCR による G2/M 期遺伝子の発現解析

野生型植物、*myb3r4* 変異体および *myb3r1,3,5* 三重変異体を種々の濃度の NaCl を含む 1/2MS 培地にて 10 日間生育した後、qRT-PCR により G2/M 期遺伝子の発現解析を行った。*ACT2* 遺伝子の発現を内部標準として用い、それぞれの遺伝子の転写産物量を相対値で示している。エラーバーは標準偏差を示しており、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表している(n=5)。

(B)-(D) 野生型植物と *myb3r1,3,5* 三重変異体を NaCl (75 mM)を含む 1/2MS 培地および NaCl を含まない 1/2MS 培地にて 10 日間生育し、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。

(B) 塩ストレス処理により発現が低下する G2/M 期遺伝子のベンダイアグラム解析

野生型植物および *myb3r1,3,5* 三重変異体それぞれにおいて、塩ストレス処理により発現が有意に(adjusted P-value < 0.01)低下する G2/M 期遺伝子群を同定し、それらの間の重複をベンダイアグラムにより解析した。

(C) G2/M 期遺伝子のランクオーダープロット解析

非ストレス下と塩ストレス下での発現量の比(log2 値)を用いて、全 G2/M 期遺伝子のランクオーダープロットを作成した。縦軸は非ストレス下と塩ストレス下

での発現量の比(log₂ 値)を示し、各々のドットが個々の遺伝子を示している。野生型植物及び *myb3r1,3,5* 三重変異体それぞれについて、全ての G2/M 期遺伝子を発現量の比の小さいものから並べて示している。

(D) 塩ストレスが G2/M 期遺伝子に及ぼす影響を示すヒートマップ解析

非ストレス下と塩ストレス下での発現量の比(log₂ 値)に基づいてヒートマップを作成した。野生型植物において塩ストレス処理により発現低下を示した 40 個の G2/M 期遺伝子を、発現量の比(log₂ 値)の小さなものから順に並べて示している。野生型及び *myb3r1,3,5* 三重変異体に対してそれぞれヒートマップを作出して比較した。

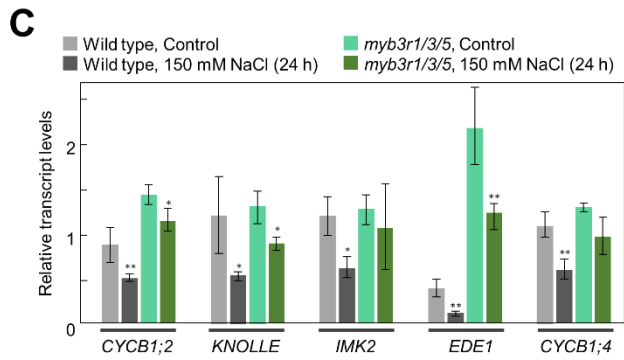
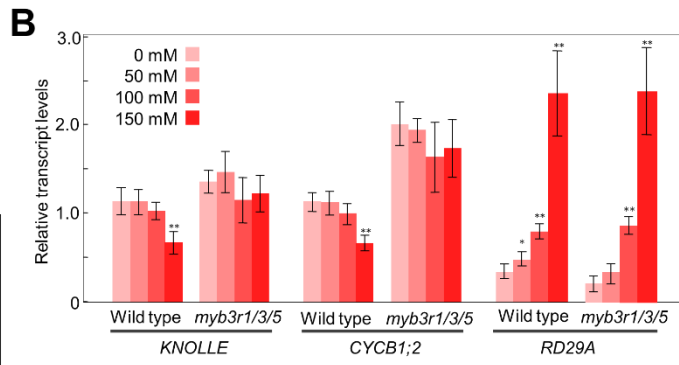
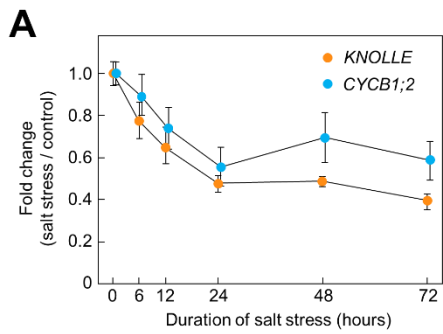


図 9. 塩ストレス応答初期におけ G2/M 期遺伝子の発現解析

(A) 塩ストレス開始後の経時的な G2/M 期遺伝子の発現変化

1/2MS 培地上で 7 日間生育した野生型植物を 150 mM NaCl を含む培地に移した。経時的にサンプリングを行い、qRT-PCR によって G2/M 期遺伝子

(*KNOLLE* 及び *CYCBI;2*) の発現解析を行った($n=3$)。転写産物量は 0 時間を基準とした相対値で表している。

(B) 種々の NaCl 濃度による G2/M 期遺伝子の発現変化

野生型植物と *myb3r1,3,5* 三重変異体を非ストレス条件にて 10 日間生育した後、種々の濃度 (0, 50, 100 および 150 mM) の NaCl を含む培地に移し、24 時間後にサンプリングした。qRT-PCR により、G2/M 期遺伝子 (*KNOLLE* 及び *CYCBI;2*) およびストレス応答性遺伝子 *RD29A* の発現解析を行った($n=3$)。

(C) 種々の G2/M 期遺伝子の塩ストレス下での発現解析

野生型植物と *myb3r1,3,5* 三重変異体を非ストレス条件にて 10 日間生育した後、150 mM NaCl を含む培地上で 24 時間処理した。コントロールとして、NaCl を含まない培地に移した植物を用いた。qRT-PCR により、G2/M 期遺伝子 (*KNOLLE*, *CYCBI;2*, *IMK2*, *EDE1* 及び *CYCBI;4*) の発現解析を行った($n=3$)。*ACT2* 遺伝子の発現を内部標準として用い、それぞれの遺伝子の転写産物量を相対値で示している。エラーバーは標準偏差を示しており、*は $p < 0.05$, **

は $p < 0.01$ を表している。

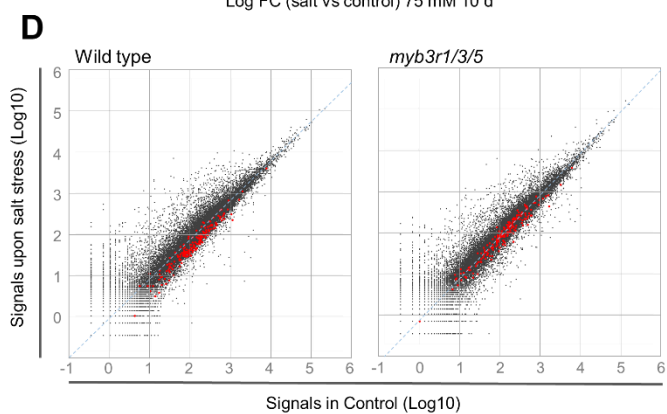
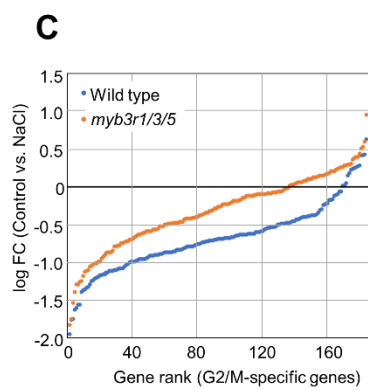
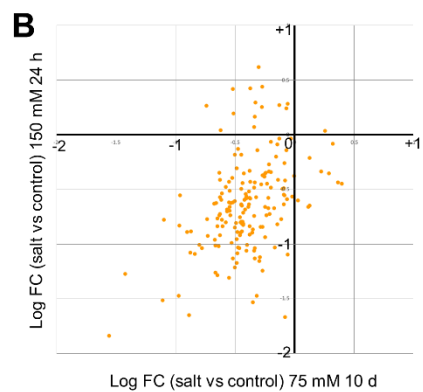
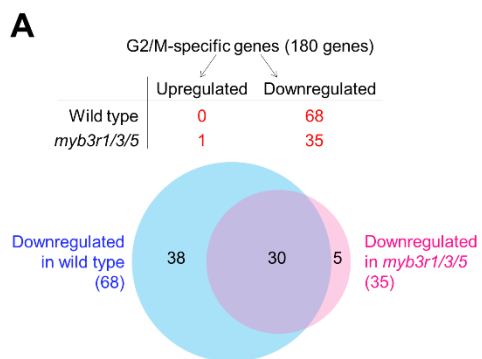


図 10. 塩ストレス応答初期における G2/M 期遺伝子の網羅的な発現解析

野生型植物と *myb3r1,3,5* 三重変異体を 1/2MS 培地にて 7 日間生育させた後、150 mM NaCl を含む培地に移し、24 時間処理した。コントロールとして NaCl を含まない培地に移した植物を用いた。これらの植物における網羅的な遺伝子発現解析を RNA-seq により行った。

(A) 塩ストレス処理により発現が低下する G2/M 期遺伝子のベンダイアグラム解析

塩ストレス処理により発現が低下する G2/M 期遺伝子を野生型植物と *myb3r1,3,5* 三重変異体の間で比較し、それらの重複についてベンダイアグラムにより解析を行った。

(B) 長期および短期の塩ストレス処理を行った植物における G2/M 期遺伝子の発現

野生型植物における G2/M 期遺伝子の発現変化を長時間の持続的塩ストレス処理 (75 mM NaCl、10 日間) と短時間の処理 (150 mM NaCl、24 時間) の間で比較した。それぞれのストレス処理における RNA-seq 解析データを用いて、スキャッタープロットを作成した。縦軸は短時間の塩ストレス処理による発現変化 (\log_2 値) を、横軸は持続的塩ストレス処理による発現変化をそれぞれ示している。各々のドットは個々の G2/M 期遺伝子を示している。

(C) G2/M 期遺伝子のランクオーダープロット解析

非ストレス下と塩ストレス下での発現量の比(log2 値)を用いて、全 G2/M 期遺伝子のランクオーダープロットを作成した。縦軸は非ストレス下と塩ストレス下での発現量の比(log2 値)を示し、各々のドットが個々の遺伝子を示している。野生型植物及び *myb3r1,3,5* 三重変異体それぞれについて、全ての G2/M 期遺伝子を発現量の比の小さいものから並べて示している。

(D) G2/M 期遺伝子のスキッタープロット解析

野生型植物と *myb3r1,3,5* 三重変異体それぞれについて、塩ストレス処理およびコントロール処理の遺伝子発現を比較するスキッタープロットを作成した。縦軸は塩ストレス下での発現レベルを、横軸はコントロールにおける発現レベルを示している。各々のドットは個々の遺伝子を示し、G2/M 期遺伝子を赤色のドットで示している。

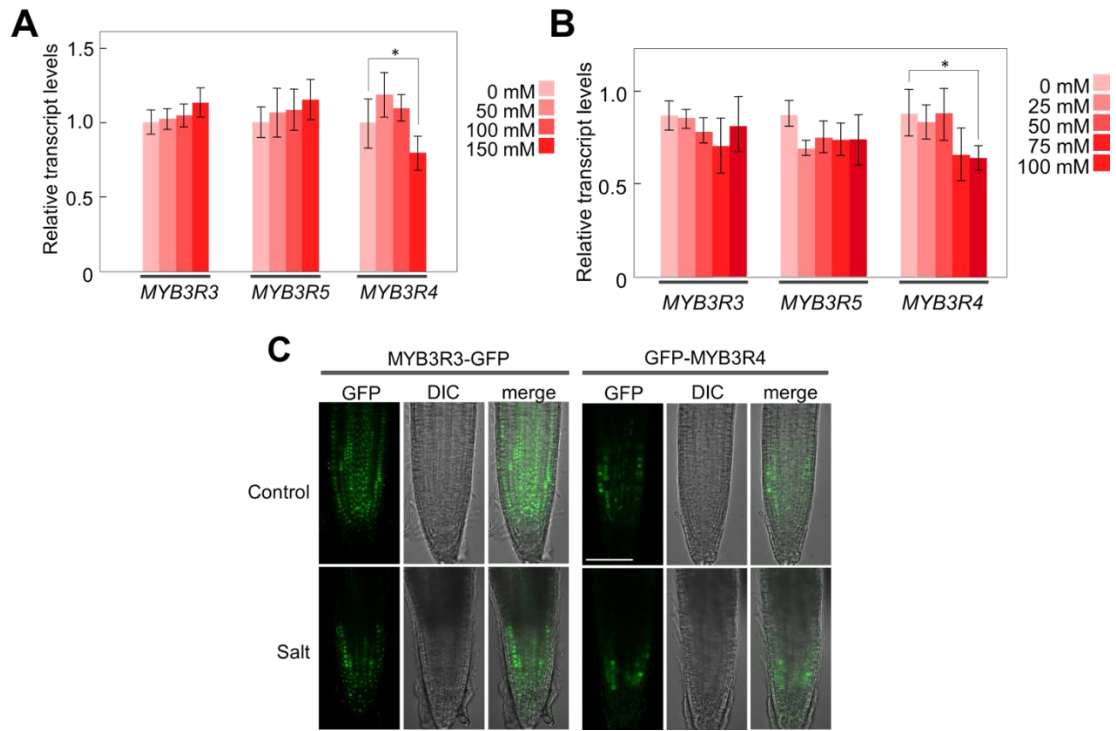


図 11. 塩ストレス下における MYB3R の発現量の解析

(A) 持続的な塩ストレス処理が MYB3R の発現に及ぼす影響

野生型植物を 75 mM NaCl を含む 1/2MS 培地にて 10 日間生育した。コントロールとして NaCl を含まない培地で同様に育成した植物を用いた。qRT-PCR により *MYB3R3*, *MYB3R4* および *MYB3R5* の発現解析を行った($n = 3$)。

(B) 短時間の塩ストレス処理が MYB3R の発現に及ぼす影響

野生型植物を 1/2MS 培地にて 7 日間生育し、150 mM NaCl を含む 1/2MS 培地へ移した後、24 時間後にサンプリングを行った。コントロールとして NaCl を含まない培地へ移した植物を用いた。qRT-PCR により *MYB3R3*, *MYB3R4* および *MYB3R5* の発現解析を行った($n = 3$)。ACT2 遺伝子の発現を内部標準として用い、それぞれの遺伝子の転写産物量を相対値で示している。エラーバーは標準偏差を示しており、*は $p < 0.05$, **は $p < 0.01$ を表している。

(C) 塩ストレス処理が MYB3R のタンパク質レベルに及ぼす影響

GFP-MYB3R4 及び MYB3R3-GFP 系統を 1/2MS 培地にて 3 日間生育した後、150 mM NaCl を含む培地に移し、24 時間後に共焦点顕微鏡を用いて根端における GFP の蛍光観察を行った。コントロールとして NaCl を含まない培地へ移した植物を用いた。GFP は蛍光観察、DIC は微分干渉観察により取得した図を示している。スケールバーは 100 μm を示している。

第3章 塩ストレスと MYB3R を結ぶ仕組みの探索

3-1. 緒言

塩ストレスに曝された植物では細胞周期が負に制御され、その結果、成長抑制や細胞質分裂の異常が見られる事が本研究によって明らかになった。また、塩ストレス下での細胞周期の抑制には抑制型 MYB3R を介した G2/M 期遺伝子の制御が関わることも示した。一方で、MYB3R の発現量自体は塩ストレス処理によって変化しないことから、他の因子との相互作用や翻訳後修飾など、MYB3R に何らかの質的な変化を生じている可能性が予想された。このような分子メカニズムを解明するためのアプローチとして、塩ストレスと MYB3R を結びつける仕組みの探索を行った。

植物のストレス応答の制御には植物ホルモンによる信号伝達のネットワークが重要な役割を持つと考えられており (Colcombet *et al.*, 2008)、塩ストレスの受容と MYB3R との間で働く因子の候補として植物ホルモンが働いている可能性が考えられた。前述した通り、塩ストレス下においては、成長抑制因子 DELLA が積極的な成長抑制に対して重要な働きを持つことが報告されている。DELLA はジベレリン情報伝達経路において中心的な働きを担う GRAS ファミリーの転写因子であり、植物の成長を負に制御することが知られている。ジベレリン受容

体である GID1 はジベレリンと結合すると DELLA を認識し結合する。この結合により、DELLA とユビキチンリガーゼ複合体である SCF(Skip, Cullin, F-box)複合体との結合が可能となり、DELLA はユビキチン化を受け、プロテアソームによるタンパク質分解系へと誘導される (Ueguchi *et al.*, 2007)。シロイヌナズナには DELLA をコードする遺伝子が 5 個 (GAI, RGA, RGL1, RGL2 および RGL3) が存在し、このうち GAI と RGA にはジベレリン非感受性を引き起こす優性変異が知られている。これらの変異タンパク質は、ジベレリン存在下でも GID1 と結合することができず、ジベレリン依存的な分解から免れることにより安定化していることが知られている (Willige *et al.*, 2007)。このように DELLA はジベレリン依存的な分解を受ける成長抑制因子であり、ジベレリンは DELLA の分解を誘導することによりこの抑制を解除する作用を持つ植物ホルモンである (Locascio *et al.*, 2013)。

Achard らの報告では、塩ストレスに曝された植物ではジベレリン量の低下が見られ、これに伴って DELLA タンパクが安定化/蓄積することにより成長抑制が引き起こされると説明されている (Achard *et al.*, 2006)。一方で、植物のストレス性ホルモンとして知られるエチレンは塩ストレスによって増加することが示されており、これによって DELLA がさらに安定化しジベレリン依存的な分解を受けにくくなることが明らかにされている (Achard *et al.*, 2006)。これらのことか

ら、塩ストレスと MYB3R を介した細胞周期制御の間に、ジベレリンやエチレン情報伝達系や、そこで中心的に機能する DELLA が働いている可能性が考えられた。そこで、本章では塩ストレス下での MYB3R による細胞周期制御及と種々の植物ホルモン、中でもジベレリン情報伝達系及び DELLA との関連を中心に解析した。

3-2. 結果

(1) 塩ストレス下の細胞質分裂異常にはジベレリン情報伝達経路が関与する

ストレス応答性のホルモンとして知られているエチレン、ABA、サリチル酸、ジャスモン酸などは、いずれも成長を抑制する作用が知られている。先ず始めにこれらのストレス性ホルモンが細胞質分裂の異常にどのように影響するのかの検討を行った。その結果、特にジャスモン酸(JA)及びサリチル酸(SA)により有意に異常が見られるが、ほとんどのホルモン処理条件において *myb3r4* 変異体における細胞質分裂の異常を促進すること、また野生型植物にも細胞質分裂の異常を引き越すことが明らかになった(図 12A)。つまり、多くのストレス性ホルモンは MYB3R を介した細胞周期制御に干渉しているものと考えられる。しかし、ほとんどのストレスホルモン処理によって細胞質分裂の異常が同程度に観察されたため、MYB3R の上流で直接的に働いている経路を特定するには至らなかった。おそらくストレス性ホルモンを直接植物に投与した場合には、種々のストレスホルモン同士のクロストークが引き起こされてしまうと予想され、投与したホルモンの単独の影響を確認することができていないと考えられた。そこで、次にストレス性ホルモンの生合成や感受性に欠損を持つ変異体を収集し、塩ストレス下での細胞質分裂の異常に影響を与えるホルモンについて探索を行った。エチレンに関連した変異体としては、エチレン感受性の低下を引き起こす *ethylene*

response1-1 (etr1-1) (Chang *et al.*, 1993)、*ethylene insensitive2-50 (ein2-50)* (Alonso *et al.*, 2003)、*ein3-1* (Chao *et al.*, 1997) や恒常的エチレン応答性株である *constitutive triple response1-1 (ctr1-1)* (Kiebar *et al.*, 1993) を、ABA に関連した変異体としては、ABA の欠乏を引き起こす *aba deficient3-1 (aba3-1)* (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996)、ABA 非感受性株である *aba insensitive4-1 (abi4-1)* (Finkelstein *et al.*, 1994) を、サリチル酸に関連した変異体としては、サリチル酸の欠乏を引き起こす *SA induction deficient2-2 (sid2-2)* (Dewdney *et al.*, 2000) を、ジャスモン酸に関連した変異体としては、ジャスモン酸の欠乏を引き起こす *allene oxide synthase (aos)* (Song *et al.*, 1993) とジャスモン酸を過剰生産する *JA over expressing1 (joe1)* (Jensen *et al.*, 2002) を用いた。これらの変異体を塩ストレス下にて生育し、子葉の気孔を観察することにより細胞質分裂の異常の頻度を測定した(図 12A,B)。ストレス性ホルモンが塩ストレス下での成長抑制において MYB3R の上流に位置していると仮定すると、これらのホルモンに関連した変異は MYB3R の発現や機能に影響を与え、結果として細胞質分裂の異常に強く影響すると考えられる。塩ストレス下における細胞質分裂の異常に対する影響を観察した結果、恒常的エチレン応答性株である *ctr1-1* では塩ストレス下において *myb3r4* 変異体と同程度の細胞質分裂の異常を引き起こすことが明らかになった (図 12B)。反対に、エチレン感受性の低下を引き起こしている *ein3-1* では異常がほとんど見られな

かった(図 12B)。これらの結果は、塩ストレスとそれにより引き起こされる細胞質分裂異常を結ぶ仕組みに、エチレン情報伝達経路が機能している事を示している。

Achard らの報告によると塩ストレス下では内在性のエチレン量の増加に加えて、ジベレリン量の低下も見られ、これらがそれぞれ DELLA タンパクの安定化/蓄積に繋がり、成長抑制を引き起こすと説明されている(Achard *et al.*, 2006)。塩ストレスによる細胞質分裂の異常に対してエチレン情報伝達系が影響を示したことから、ジベレリン情報伝達系や DELLA が塩ストレス下で細胞質分裂異常を引き起こす仕組みに関わっている可能性が考えられた。

先ず、塩ストレス下で見られる細胞質分裂異常に対するジベレリン情報伝達系の影響について検討するため、塩ストレス下で生育した野生型植物及び *myb3r4* 変異体に対して外生的なジベレリン処理を行った。その結果、ジベレリンを外的に加えることによって、塩ストレスによる細胞質分裂の異常が緩和されることが分かった(図 12C)。また、内在性のジベレリン量が増加することが知られている *q-GA2ox* 変異体(Rieu *et al.*, 2008)及び *p35S::GA20ox* 過剰発現体(Coles *et al.*, 1999)を用いて塩ストレス下での細胞質分裂異常の頻度を測定すると、外的に GA 処理した場合と同様に塩ストレスによる細胞質分裂異常が野生型植物に比べ緩和されることが明らかになった(図 12D)。このことから、塩ストレスによ

る細胞質分裂の異常には、ジベレリン量の低下が一因となっていると考えられた。また、エチレン関連の変異が塩ストレスによる細胞質分裂異常に影響を与えることも踏まえると、Achard らにより報告された塩ストレス下で働く DELLA を中心としたジベレリン・エチレン情報伝達による成長抑制機構は、細胞周期の制御を介して行われている可能性が考えられた。

(2) 塩ストレス下では DELLA タンパクの蓄積により細胞質分裂異常が起きる

Achard らは塩ストレスによるエチレン量の増加及びジベレリン量の低下は結果として、ネットワークの中心に位置する DELLA タンパクの蓄積に繋がると報告している (Achard *et al.*, 2006)。そこで、次にこの DELLA タンパクの蓄積によって、塩ストレス下で見られる細胞質分裂の異常を再現することできるかどうか解析した。Paclobutrazol (PAC)はジベレリン生合成の阻害剤であり、PAC 処理された植物では内在性の GA 量が減少することが知られており、それに伴って DELLA タンパクの蓄積が引き起こされることを確認している(図 13A)。この PAC 処理条件において野生型植物を生育し、観察を行うと細胞質分裂の異常が顕著に引き起こされることが分かった。一方で、ジベレリン以外の植物ホルモンの関与について調べるため、オーキシン受容体の阻害剤である PEO-IAA、ブラシノステロイドの生合成阻害剤であるブラシナゾール(Brz)の効果についても検討を

行ったが、細胞質分裂の異常は見られなかった(図 13B)。また、Dexamethasone (DEX) /グルココルチコイド受容体(GR)を利用した誘導系により DELLA が制御された *p35S::gai-GR* 系統(Claeys *et al.*, 2012)を用いて、細胞質分裂の異常について解析を行った場合においても、DEX 含有培地にて DELLA の機能を誘導することにより、細胞質分裂の異常が引き起こされた(図 13B)。これらの結果から、やはり、DELLA タンパクの蓄積が細胞質分裂の異常の原因であると考えられた。

また、DELLA をコードする 5 個の遺伝子全てが欠損した五重変異体 (Achard *et al.*, 2006) を用いて塩ストレス下での細胞質分裂の異常の解析を行った。その結果、*della* 五重変異体では塩ストレス下における細胞質分裂の異常がほとんど見られないことが分かった (図 13D)。尚、実験に用いた *della* 変異体は Ler を背景とする変異体であるが、塩ストレスによる細胞質分裂異常の表現型は野生型 Ler においても観察された。また、5 回の戻し交配により作成した Ler 背景の *myb3r4* 変異体においても、Col 背景の場合と同様に、塩ストレス下での細胞質分裂の異常を強く促進する効果を持つことが確認された (図 13D)。従って、Ler 背景においても Col 背景の際と同様の現象を観察することができていると考えられる。

以上の結果から、DELLA の蓄積によって細胞質分裂異常が引き起こされることが、DELLA を欠失させると塩ストレスによる細胞質分裂異常が起きないことが

明らかとなった。このように塩ストレス下において DELLA が細胞周期の制御に関わっており、そこでは MYB3R を介した G2/M 期制御が関連している可能性が浮上した。

(3) PAC 処理は G2/M 期遺伝子の発現低下を誘導しない

PAC 処理及び DELLA 過剰発現体を用いた実験により、DELLA の蓄積が細胞質分裂異常を引き起こす事が示された。また、DELLA の欠失変異体では塩ストレスによる細胞質分裂の異常が見られないことも明らかになった。以上のことから、塩ストレス下で見られる細胞質分裂の異常は DELLA の蓄積によって引き起こされていると考えられた。一方、前述の通り、塩ストレスで見られる細胞質分裂の異常には G2/M 期遺伝子の発現低下を伴うことも分かっている。そこで次に、DELLA の蓄積が G2/M 期遺伝子の発現に影響を示すのか検討を行った。野生型植物を 7 日間生育した後、PAC (10 μ M) 存在下で 24 時間育成させ、qRT-PCR により転写産物量の解析を行った。しかしながら、塩ストレス下での観察とは異なり、PAC 処理された植物では、解析した G2/M 期遺伝子の発現に大きな変化は見られなかった。ストレス下で見られた G2/M 期遺伝子の発現低下は、PAC 処理による単純な DELLA の蓄積だけでは再現することができなかった。

3-3. 結言と考察

ホルモンに関連した変異体や過剰発現体を用いた実験により、エチレン及びジベレリン信号伝達系が塩ストレスにより引き起こされる細胞質分裂異常に影響を及ぼすことが明らかになった。また、DELLA タンパクの蓄積を誘導する薬剤である PAC を処理した植物や、DEX 処理により DELLA の機能が誘導された *p35S::gai-GR* 系統では細胞質分裂の異常が生じることや、DELLA の欠失変異体では塩ストレスによる細胞質分裂異常が見られないことも明らかになった。塩ストレス下における成長抑制には、成長抑制因子 DELLA の安定性をエチレンやジベレリン情報伝達系が制御する機構が働いていると報告されており (Achard *et al.*, 2006)、本研究の結果によって、これらのネットワークが細胞周期の制御を行っている可能性が示唆された。つまり、塩ストレス下ではエチレン情報伝達系の活性化とジベレリン量の低下により、DELLA タンパク質が安定化/蓄積することで細胞周期を負に制御し、その結果、細胞質分裂の異常や成長の抑制が引き起こされていると考えられる。

このような塩ストレス下において働くエチレン及びジベレリン情報伝達系と DELLA を介した成長抑制機構は Achard らによって報告されており (Achard *et al.*, 2006)、関連の研究が行われてきた。エチレンは一般的に植物の成長を抑制する作用を持つことが知られているが、Achard らはこの成長抑制の一因が DELLA

の蓄積であるという事を明らかにした (Achard *et al.*, 2003)。通常、DELLA はジベレリンが存在するとタンパク質の分解が誘導されるが、エチレン処理された植物や恒常性エチレン応答株である *ctrl* 変異体においては DELLA の安定化が誘導され、ジベレリンによる分解が抑制されることを示している。また、*della* の欠失変異体株ではエチレン前駆体 ACC 処理による成長抑制の効果が緩和されることも明らかにしている (Achard *et al.*, 2003)。さらに、Achard らは、シロイヌナズナの DELLA の 1 つとして知られる RGA の GFP 融合タンパク質が植物に塩ストレスを与えると蓄積することを明らかにしており (Achard *et al.*, 2006)、前述した通り、塩ストレス下ではジベレリン量の低下が見られることも示している (Achard *et al.*, 2006)。従って、塩ストレス下ではエチレン情報伝達系の活性化と、ジベレリン量の減少の二つの経路によって DELLA の安定性を高めていると予想される。また、これらの経路のうち、塩ストレスとジベレリン量の低下を繋ぐメカニズムとして、ジベレリン不活性化酵素 GA2ox の転写誘導が報告されている (Magome *et al.*, 2008)。AP2/ERF 型の転写因子をコードする *DWARF AND DELAYED FLOWERING1 (DDF1)* 遺伝子は、その発現が塩ストレスにより誘導されることが分かっている (Magome *et al.*, 2008)。DDF1 の標的遺伝子の中にはジベレリンの不活性化反応を担う GA2ox の 1 つ GA2ox7 が存在することから、塩ストレスにより発現誘導された DDF1 が GA2ox7 遺伝子の発現を誘導すること

で、活性化型 GA のレベルを低下させ、結果として DELLA を安定化させているのではないかと考えられている。DDF1 のような AP2/ERF 型転写因子と GA2ox を介したジベレリン量の制御は、塩ストレス以外の環境ストレスでも機能していることが知られている。低温ストレス下で誘導される AP2/ERF 型転写因子 C-repeat binding factor 1 (CBF1) の標的遺伝子として *GA2ox3* と *GA2ox6* が存在すること (Achard *et al.*, 2008a)、また、浸透圧ストレス下で誘導される Ethylene responsive factor 6 (ERF6) は標的遺伝子 *GA2ox6* を制御することが報告されている (Dubois *et al.*, 2013)。このように、AP2/ERF 型転写因子と GA2ox を介したジベレリン量の制御が多くのストレスが成長を抑制する仕組みに共通に関わっていることがわかっている。

上記のような AP2/ERF 型転写因子と GA2ox に関する報告は種々のストレス下において DELLA が働き、その安定性を高める機構が存在することを示しているが、一方でタンパク質の安定化とは異なった DELLA の制御機構も存在することが示唆されている。本研究では、塩ストレス下で見られる細胞質分裂の異常には G2/M 期遺伝子の発現低下が伴うことを示した。しかしながら、PAC 処理した植物では G2/M 期遺伝子の発現低下を確認することができなかった。このことから、単純な DELLA タンパクの蓄積だけでは G2/M 期遺伝子の発現低下を引き起こすためには不十分であると考えられ、塩ストレス下における G2/M 期遺

伝子の発現低下に DELLA が関わっているとすれば、塩ストレス下での DELLA はタンパク質の安定化とは異なった何らかの制御を受けることで質的な変化を引き起こし、塩ストレス特異的な遺伝子発現を実現している可能性がある。この考えと一致して、Achard からも塩ストレス特異的に DELLA の制御を受ける遺伝子が存在することが報告している(Achard *et al.*, 2008)。*gal-3* はジベレリン合成遺伝子が欠失した変異体であり、内在性のジベレリン量の低下に伴って DELLA の蓄積が引き起こされた結果、矮化した表現型が観察される。この報告ではジベレリン合成変異体 *gal-3* と、この変異体に *della* 欠失変異を組み合わせた *gal-3 della* 変異体を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、両者を比較することで DELLA によって制御される遺伝子を同定している。さらに、両者の網羅的遺伝子発現解析の結果を非ストレス下と塩ストレス下において比較し、塩ストレス下では DELLA によって制御される遺伝子の数や種類が変化することが示されている。このような塩ストレス特異的な DELLA の機能を考えれば、G2/M 期遺伝子や MYB3R についても塩ストレス特異的な DELLA の制御機構下にある可能性が考えられる。

DELLA と細胞周期の関連について考えられるもう一つの可能性は、DELLA がストレスとは関係なく、細胞質分裂に関連する遺伝子を制御しているということである。PAC 処理した植物では G2/M 期遺伝子のグローバルな発現低下は起

きていないが、細胞質分裂の異常は確認されている。この結果は DELLA が G2/M 期遺伝子のグローバルな制御とは独立して、細胞質分裂に関連する遺伝子を制御することを示唆している。前述したように、活性化型 MYB3R が欠失した *myb3r1,4* 変異体で見られる細胞質分裂異常の表現型の原因遺伝子として所属研究室では G2/M 期遺伝子の一つである *KNOLLE* を報告している(Haga *et al.*, 2007)。一方で、この *myb3r1,4* 変異体や *knolle* 変異体で確認される特徴的な表現型と類似した表現型を示す変異体は数多く報告されている(Falbel *et al.*, 2003, Söllner *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 1999)。その一つの例として、*STOMATAL CYTOKINESIS DEFECTIVE 1(SCD1)* 遺伝子は小胞輸送において機能する RAB guanine nucleotide exchange factor をコードしていると予想されており、シロイヌナズナの細胞質分裂と細胞増殖に必要な遺伝子であることが明らかにされている(Falbel *et al.*, 2003)。*SCD1* 遺伝子が欠損した *scd1* 変異体では葉の表皮細胞における細胞壁のギャップや細胞質分裂に失敗したような気孔が観察される(Falbel *et al.*, 2003)。また、SCD と複合体を形成し機能する *SCD2* 遺伝子も同定されており、*scd2* 変異体においても同様の表現型が確認されている(McMichael *et al.*, 2013, Mayers *et al.*, 2017)。さらに、GFP-SCD1,2 系統を用いた発現解析では、細胞板に両タンパクが局在することが示されているが、分裂期ではない細胞においても発現が確認されており、細胞周期特異的な制御は受けていないと予想される

(McMichael *et al.*, 2017)。SCD1,2 遺伝子の様に G2/M 期遺伝子ではない因子が細胞質分裂の制御に影響を与えるケースが多数存在すると予想され、DELLA がこのような因子を介して細胞質分裂の異常を引き起こしている可能性も考えられる。

以上の結果を踏まえると、DELLA タンパクの蓄積を誘導することにより見られた細胞質分裂の異常は G2/M 期遺伝子や MYB3R とは独立した経路により実現している可能性が考えられる。一方、塩ストレス下での細胞質分裂の異常には抑制型 MYB3R と DELLA が必要であること、DELLA には塩ストレス特異的な働きが存在する可能性が示唆されていることから、DELLA と MYB3R を介した G2/M 期遺伝子制御との関連についても塩ストレス特異的なものであると予想された。しかし、この考え方はまだ仮説の段階であり、まだ課題も多く残されており、今後慎重に検証していく必要がある。一方、以上のような研究の過程で、抑制型 MYB3R は塩ストレス下の現象に限らず、DELLA の担う多くの働きに対して影響を与えていることを示唆する結果が得られた。次章では、非ストレス条件下における抑制型 MYB3R と DELLA との関連について行った研究について述べる。

4-3. 図表

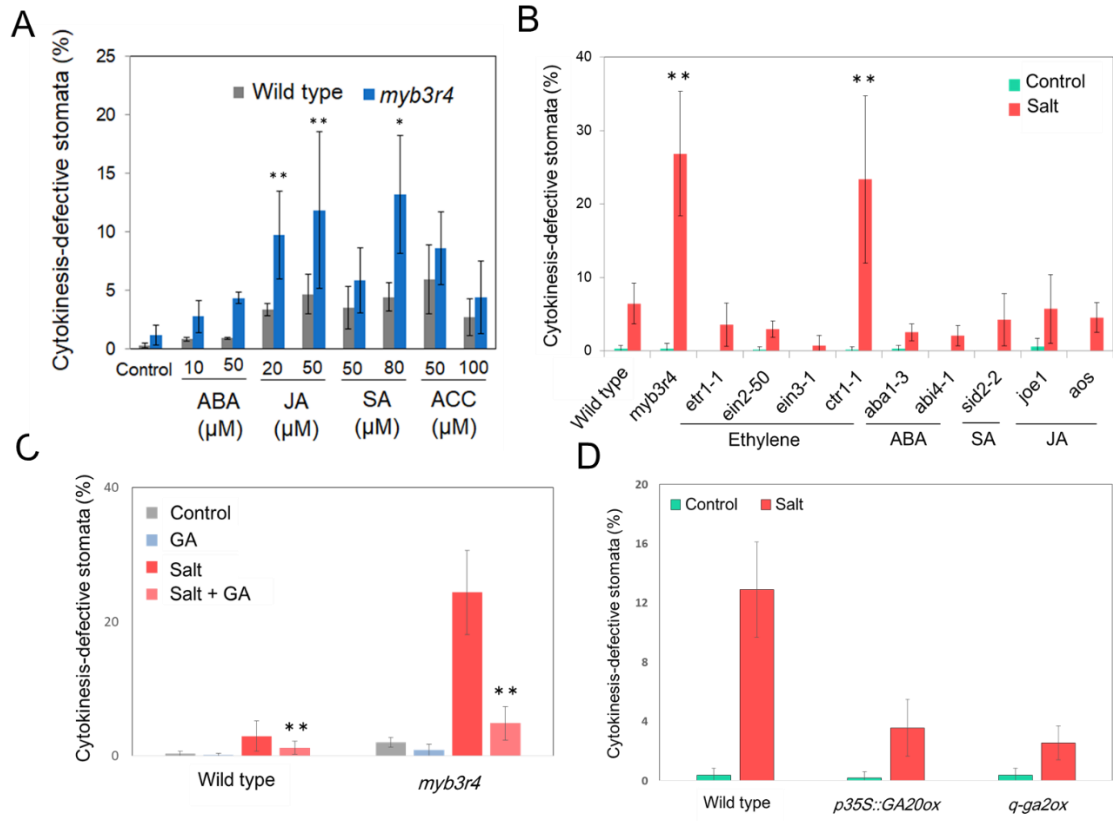


図 12.

図 12. 塩ストレス下での細胞質分裂異常に影響を与える植物ホルモン

(A) ストレス性ホルモンの処理が及ぼす影響

種々のストレス性ホルモンを含む 1/2MS 培地で 14 日間生育し、子葉に生じた形態異常を示す気孔の割合を解析した。

(B) ストレス性ホルモン関連の変異が及ぼす影響

種々のストレス性ホルモンに関連した変異体を NaCl (75 mM) を含む 1/2MS 培地で 14 日間生育し、子葉に生じた形態異常を示す気孔の割合を解析した。コントロールとして、NaCl を含まない培地で育成した植物を解析した。

(C) 外生的に与えた GA の影響

野生型植物及び *myb3r4* 変異体を NaCl (75 mM)、GA (10 mM)、または両方を含む 1/2MS 培地で 14 日間生育し、子葉に生じた形態異常を示す気孔の割合を解析した。コントロールとして、NaCl を含まない培地で育成した植物を解析した。

(D) 内生的な GA 過剰生産の影響

q-ga2ox 変異体及び *p35S::GA20ox* 過剰発現体を NaCl (75 mM) を含む 1/2MS 培地で 14 日間生育し、子葉に生じた形態異常を示す気孔の割合を解析した。コントロールとして、NaCl を含まない培地で育成した植物を解析した。

エラーバーは標準偏差を示しており、*は $p < 0.05$, **は $p < 0.01$ を表している ($n=5$)。

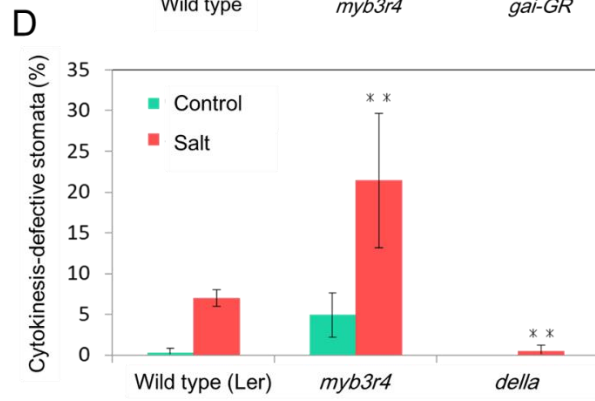
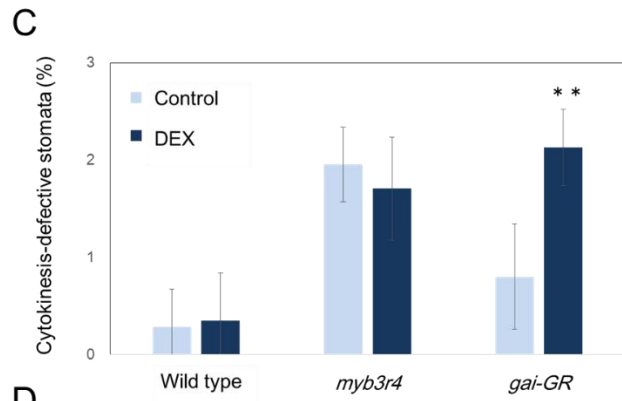
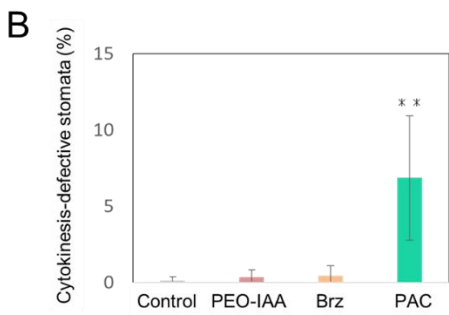
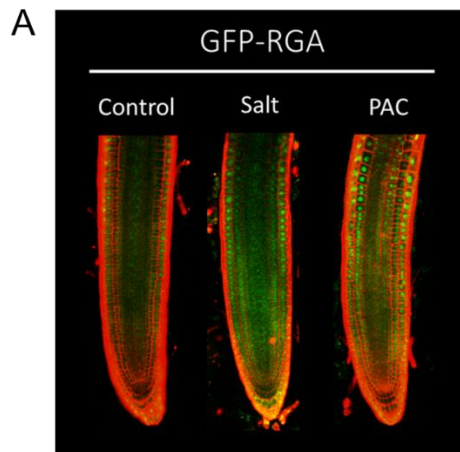


図 13. 塩ストレス下での細胞質分裂異常は GA 信号伝達の影響を受ける

(A) 塩ストレス及び PAC 処理下における RGA タンパクの蓄積

GFP-RGA 系統を 1/2MS 培地にて 3 日間生育した後、PAC (1 μ M)又は NaCl (150mM)を含む培地に移し、24 時間後に共焦点顕微鏡を用いて根端における GFP の蛍光観察を行った。細胞のアウトラインを可視化するため、Propidium Iodide (PI) により細胞壁を赤色に染色した。

(B) 種々の成長ホルモン阻害剤の影響

PAC (1 μ M)、PEO-IAA (50 μ M)、Brz (3 μ M)を含む 1/2MS 培地上で野生型植物を 14 日間生育し、子葉に生じた形態異常を示す気孔の割合を解析した。

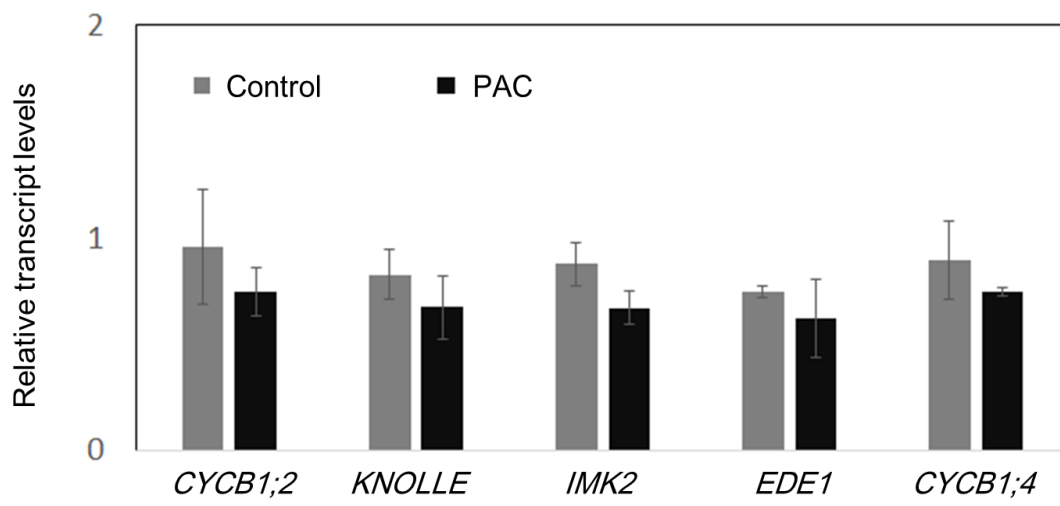
(C) *gai-GR* 系統における細胞質分裂の異常

野生型植物及び *gai-GR* 系統を 1 mM DEX (Dexamethasone) を含む 1/2MS 培地で 14 日間生育し、子葉に生じた形態異常を示す気孔の割合を解析した。コントロールとして、DEX を含まない培地で育成した植物を解析した。

(D) 塩ストレス下の *della* 多重変異体における細胞質分裂の異常

野生型植物 (Ler)、*myb3r4* 変異体 (Ler 背景)及び *della* 変異体 (Ler 背景)を NaCl (75 mM)を含む 1/2MS 培地で 14 日間生育し、子葉に生じた形態異常を示す気孔の割合を解析した。コントロールとして、NaCl を含まない培地で育成した植物を解析した。

エラーバーは標準偏差を示しており、*は $p < 0.05$, **は $p < 0.01$ を表している
($n=5$)。



☒ 14.

図 14. PAC 処理した植物における G2/M 期遺伝子の発現解析

野生型植物を 1/2MS 培地上で 10 日間生育した後、PAC (1 μ M)を含む 1/2MS 培地に移し、24 時間後にサンプリングした。qRT-PCR により G2/M 期遺伝子の転写産物量を解析した ($n = 3$)。UBQ7 遺伝子の発現を内部標準として用い、それぞれの遺伝子の転写産物量を相対値で示している。エラーバーは標準偏差を示している。

第4章 ジベレリン信号伝達系と抑制型 MYB3R

4-1. 緒言

本研究では、塩ストレスと細胞周期制御の間で働く因子として、エチレンやジベレリン情報伝達系が存在し、その中心では DELLA が働いている可能性を示した。塩ストレス下ではエチレン量の上昇とジベレリン量の減少が見られ、その結果 DELLA が安定化/蓄積し成長抑制を引き起こすと説明されていたが (Achard *et al.*, 2006)、PAC 処理による単純な DELLA の蓄積だけでは塩ストレス下で見られた G2/M 期遺伝子の発現低下を再現することはできなかった(図 14)。一方、転写因子としての DELLA の働きは、塩ストレス下特異的な制御を受けることが示唆されており (Achard *et al.*, 2008)、抑制型 MYB3R を介した G2/M 期遺伝子制御に DELLA が直接関連しているとすれば、同様に塩ストレス下特異的なものである可能性が考えられた。

DELLA は植物の成長だけではなく、各々のステージにおける植物の発達においても重要な役割を持つことが知られており、例えば、ジベレリン生合成遺伝子が欠失した *gal-3* 変異体では矮性の表現型が観察されるが、種子発芽の阻害や花成の遅れ、異常な花の形成が等も観察される (Silverstone *et al.*, 1997)。また、これらの表現型は DELLA の一つである *rga* 変異を加えることによって緩

和されることも分かっており (Silverstone *et al.*, 1997)、このような成長抑制以外の種々の形質も DELLA の制御を受けていると考えられている。

DELLA は転写制御因子であることが知られており、植物の様々な現象に影響を与えるため、その下流には多くの遺伝子が存在していると考えられている。一方で、DELLA は自分自身では DNA 結合ドメインを持っていないため、DNA 結合能を有するその他の転写因子と相互作用することで転写制御を実現させると考えられている。代表的な DELLA の相互作用因子として、PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF) や JASMONIC ACID ZIM-DOMAIN PROTEIN (JAZs)、BRASSINAZOLE RESISTANT1 (BZR1) が報告されており、これらの転写因子は DELLA との相互作用によって DNA 結合が阻害され、転写機能が抑制されることが知られている (Lucas *et al.*, 2008, Feng *et al.*, 2008, Bai *et al.*, 2012, Hou *et al.*, 2010)。また、DELLA はトランスアクチベーションドメインを持っており、INDETERMINATE1 DOMAIN PROTEIN (IDD) や TYPE-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARRs) 等の転写因子を介して DNA に間接的に結合し転写を活性化することも報告されている (Yoshida *et al.*, 2014, Marin *et al.*, 2015)。このように DELLA は、タンパク質間相互作用によって転写因子を捕捉し転写機能を阻害する方法と、他の転写因子を足場とし

て自ら転写活性化を行う方法の2種類の機構により転写制御を行っていると考えられている。

本研究におけるこれまでの結果から、DELLAが塩ストレス下におけるG2/M期遺伝子の制御と細胞質分裂の実行に関わる可能性が考えられること、そして、前述した様にDELLAは転写因子との相互作用により機能することから、G2/M期の制御を行う転写因子であるMYB3RとDELLAとの関連について着目した研究を行った。本章の研究により、抑制型MYB3RはDELLAの持つ広範囲の機能に影響することが示された。興味深いことに、このような影響は塩ストレス下に限らず非ストレス下においても見られること、また、DELLAの成長抑制以外の機能にも影響することから、抑制型MYB3RとDELLAが密接に関連して機能している可能性が考えられた。

4-2. 結果

(1) *myb3r1,3,5* 三重変異は DELLA の蓄積による成長抑制を緩和する

PAC 処理された植物では成長抑制が見られるが、これは DELLA タンパクの蓄積により引き起こされていると説明されている。本研究では PAC 処理下においては G2/M 期遺伝子のグローバルな発現低下が見られないことを示した。このことから、PAC 処理による成長抑制には抑制型 MYB3R を介した G2/M 期遺伝子制御が関わっていないと予想される。しかしながら、この予想に反して、*myb3r1,3,5* 三重変異体では PAC 処理による成長抑制が緩和されることが、本章で行った研究により分かった。

野生型植物、*myb3r4* 変異体及び *myb3r1,3,5* 三重変異体を PAC 含有 1/2MS 培地にて生育し、植物体の観察と葉の面積の測定を行った(図 15A,B)。その結果、野生型植物や *myb3r4* 変異体では PAC 処理によって植物体全体の矮化とそれに伴った葉の面積の低下が観察された(図 15A,B)。また、葉の柵状細胞数、根端のメリステムサイズについても同様に PAC 処理によって減少されていることが分かった(図 15C,D)。しかし、このような PAC の効果を *myb3r1,3,5* 三重変異体において解析したところ、野生型植物が PAC 処理下で示す成長の抑制が、調べた全ての指標において緩和されていることが明らかになった(図 15 A-D)。

これらのことから、PAC 処理による G2/M 期遺伝子の発現低下を伴わない成

長抑制に対しても、抑制型 MYB3R が何らかの仕組みにより影響を与えていると考えられた。

PAC 処理による成長抑制は DELLA の蓄積によって説明されているが、薬剤処理による副作用が影響している可能性も考えられる。このような可能性を排除するために、*p35S::gai-GR* 系統及び *gal-3* 変異体を *myb3r1,3,5* 三重変異と交配し、*myb3r1,3,5* 三重変異の背景で *gai* 過剰発現や *gal* 変異の効果を検討した。*p35S::gai-GR* 系統は DEX によって DELLA の機能誘導が可能な過剰発現系統であり、DEX 処理条件で生育した場合では未処理条件と比べて顕著に成長抑制が観察される(図 16A)。しかし、*p35S::gai-GR / myb3r1,3,5* 系統に DEX 処理した場合では、部分的ではあるが野生型背景の *p35S::gai-GR* と比較して成長抑制が緩和されていることが分かった(図 16A)。一方、GA 欠乏変異体である *gal-3* では植物体が顕著に矮化するのに対して、*gal-3 myb3r1,3,5* 変異体では矮化が部分的に回復していた(図 16B)。以上の結果から、PAC 処理や DELLA の蓄積による成長抑制に対して、*myb3r1,3,5* 変異が DELLA の機能発現を緩和する効果を持つと考えられた。また、PAC 処理下では細胞数の低下やメリステムサイズの低下が見られることから、PAC 処理による成長抑制には細胞周期の抑制が伴っていると考えられる。PAC 処理が G2/M 期遺伝子の発現に影響しないことを踏まえると、非ストレス下において DELLA は G2/M 期遺伝子とは別の経路を介して細胞

周期を制御していると考えられる。そして、この G2/M 期遺伝子を介さない細胞周期制御に対しても抑制型 MYB3R が関与する可能性が考えられる。

(2) PAC 処理下で見られる種々の形質が *myb3r1,3,5* 三重変異体では緩和される

PAC 処理や GA 合成遺伝子の変異による DELLA の蓄積、DEX 処理による DELLA の機能誘導によって引き起こされる植物の成長抑制に対して、*myb3r1,3,5* 変異が緩和する効果を有することが分かった。このことから、塩ストレスに限らず DELLA による成長抑制に対して抑制型 MYB3R が関わっている可能性が考えられた。

前述した通り、DELLA は成長抑制以外にも植物の様々な現象において機能することが示されており (Silverstone *et al.*, 1997)、DELLA の蓄積を誘導する PAC を処理することによって種子の発芽の阻害や、花成の遅れ、花の形態異常等を観察することができる(図 17,18)。*myb3r1,3,5* 変異は DELLA の蓄積による成長の抑制を緩和する作用を有することを示したが、興味深いことに *myb3r1,3,5* 変異体では PAC 処理による種子発芽の阻害、花成の遅れ、花の形態異常についても緩和されていることが分かった(図 17,18)。この結果は、抑制型 MYB3R は成長抑制以外の DELLA の機能に対しても関係することを示唆しており、抑制型 MYB3R

は DELLA の広範囲の機能発現に共通の仕組みに関連している可能性が考えられる。

(3) 抑制型 MYB3R は DELLA タンパクと相互作用する

DELLA タンパクの蓄積によって、野生型植物では細胞周期や成長の抑制、種子の発芽の阻害、花成の遅れ、花の形態異常が観察されたが、*myb3r1,3,5* 三重変異体では、これらの種々の現象が緩和されることが分かった。このことから、抑制型 MYB3R は DELLA による転写制御機構に密接に関わっていると予想され、両者の関係の分子メカニズムに興味を持たれる。

第一章に示したように、抑制型 MYB3R の発現量は塩ストレスに応答した変化を示さないことが分かっている(図 11A-C)。PAC 処理下における抑制型 MYB3R の発現についても MYB3R3-GFP 系統を用いて確認を行ったが、DELLA の一つである RGA の発現は上昇するのに対して、系統抑制型 MYB3R の発現はやはり変化しなかった(図 19A)。従って、抑制型 MYB3R は PAC 処理下で見られる成長抑制に対する機能についても、塩ストレス下と同様に量的な制御ではなく、その性質が変化するような何らかの制御を受けていると予想された。前述した通り、DNA 結合能を持つ他の転写因子との相互作用によって DELLA は転写制御を行うことが知られており、抑制型 MYB3R と DELLA との相互作用の可

能性が予想された。

また、過去の報告により DELLA の一つである *REPRESSOR OF GAI-3 (RGA)* の GFP 融合タンパクを用いた ChIP 解析によって DELLA のターゲットとされる遺伝子が同定されており (Rosa *et al.*, 2015)、これらの遺伝子群と所属研究室により同定された抑制型 MYB3R のターゲット遺伝子群 (Kobayashi *et al.*, 2015) との比較を行うと、両者の重複が有意に過剰提示されることが分かった (図 19B)。

これらの結果から、抑制型 MYB3R と DELLA とのタンパク質間相互作用について着目し、Yeast Two Hybrid 法を用いた解析により検討を行った。DELLA は転写活性化ドメインを持っており、GAL4-Binding Domain と融合させた場合に自己活性による疑陽性検出が予想される。そのため、DELLA を GAL4-Activation Domain (Prey) と、MYB3R を GAL4-Binding Domain (Bait) とを融合させ、相互作用解析を行った。また、既に DELLA タンパク質の相互作用因子として報告されている *INDETERMINATE DOMAIN 3 (IDD3)* (Yoshida *et al.*, 2014) をポジティブコントロールとして用いた。その結果、代表的な DELLA タンパク質として知られる GAI 及び RGA を、抑制型の MYB3R5 との組み合わせで Yeast Two Hybrid 法により解析すると、レポーター遺伝子 *HIS3* の発現によりヒスチジン非存在下での酵母の増殖が確認された (図 19C)。この結果は RGA-MYB3R5 および GAI-MYB3R5 間でタンパク質間相互作用があることを示唆している。一方で、もう

一つの転写抑制因子である MYB3R3 については、酵母の増殖を確認することができなかつたため、DELLA との相互作用は MYB3R5 のみが担っている可能性がある。また、活性化型の MYB3R4 についても DELLA との相互作用を確認することができた。MYB3R1 に関しても酵母の増殖は確認されたが、ベクターコントロールにおいてもコロニーが形成されているため、DELLA との相互作用についてはさらなる検討を行う必要がある。以上の結果から、MYB3R5 と MYB3R4 が DELLA と相互作用することが示され、この相互作用を介して MYB3R は何らかの制御を受けており、それを通じて下流の遺伝子の発現に影響していると考えられる。

4-3. 結言と考察

ジベレリン生合成阻害剤である PAC を処理された植物や、DELLA の蓄積を引き起こす変異体及び過剰発現体では、植物の成長抑制が顕著に観察されるが、抑制型 MYB3R の変異を導入することによって成長抑制作用が緩和されることを明らかにした。一方で、成長抑制以外の DELLA の働きとして種子発芽や花成の抑制などが知られていたが、興味深いことに、これらの制御に関しても抑制型 MYB3R の変異が影響を示すことが分かった。*myb3r1,3,5* 変異体では、PAC 処理による種子発芽の阻害や花成の遅れ、花の形態異常といった種々の影響が緩和されていた。従って、抑制型 MYB3R は DELLA による細胞周期制御を介在する因子であると同時に、DELLA に対しても何かしらの影響を与えている可能性が予想される。DELLA は DNA 結合ドメインを持たないことから、他の転写因子と相互作用することによって転写制御を行う事が知られており、DELLA と抑制型 MYB3R との相互作用が予想された。また、DELLA の標的遺伝子について既に報告されており、抑制型 MYB3R の標的遺伝子との重複について調べると、いくつかの遺伝子が一致していることが分かった。そして、実際に Yeast Two Hybrid 法を用いた解析結果から、MYB3R と DELLA との相互作用を確認することができた。

MYB3R と DELLA の相互作用は種々の方法により検証する必要があるが、

もし *in vivo* においてもタンパク質間相互作用があるとするれば、抑制型 MYB3R は DELLA との相互作用を介して何らかの制御を受けており、それにより下流の遺伝子の発現を変化させていると考えられる。また、抑制型 MYB3R はこの相互作用によって直接あるいは間接的に DELLA に対しても何らかの影響を与えていると予想される。

本研究では MYB3R と DELLA との相互作用の可能性を示したが、DELLA との相互作用を介して MYB3R がどのような仕組みで影響を受けるのか未解明である。前述した通り DNA 結合ができない DELLA はその転写制御機構として一般的に、他の転写制御因子を相互作用によって捕捉し転写を阻害する方法や、他の転写因子を足場として DNA と結合し転写活性化する方法(コアクチベーター)が知られている。転写活性化因子である MYB3R4 については、DELLA による捕捉を受け転写を阻害している可能性が考えられる。一方、抑制型 MYB3R については DELLA との相互作用を通じて転写を抑制する方向へ働いていると予想されるため、上述した DELLA の転写制御機構とは異なったメカニズムによる制御を受けていると予想される。このような制御の実例として、DELLA がコリプレッサーとして機能し、転写抑制を行うことが報告されている(Park *et al.*, 2013)。この報告では、先ず、シロイヌナズナの RING タンパク質として同定されていた BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 INTERACTOR (BOI)や

BOI-RELATED GENE1 (BRG1)、BRG2、NRG3 が DELLA と相互作用することが示されており、BOI 及び BRG の欠損変異体では、成長抑制等の PAC 処理による種々の影響が緩和されることや、反対に BOI の過剰発現体では PAC 処理あるいは DELLA の蓄積が起きた植物で見られる成長抑制や種子発芽の阻害など種々の現象が引き起こされることを明らかにしている。また、これらの変異体や過剰発現体に対して、DELLA の変異を導入した遺伝学的手法や ChIP による結合配列解析等を用いることで、DELLA が BOI との相互作用を介して下流の遺伝子の発現抑制を行うことを示しており、このことから DELLA がコリプレッサーとして働くと結論付けている(Park *et al.*, 2013)。

一方、本研究では PAC 処理による成長抑制や種子発芽の阻害など種々の作用が *myb3r1,3,5* 三重変異体において緩和することや、DELLA と抑制型 MYB3R の ChIP による標的遺伝子の解析結果で重複が見られることを明らかにしたが、これらは BOI に関する報告で示された結果(Park *et al.*, 2013)と共通している。従って、BOI と同様に DELLA が抑制型 MYB3R と相互作用し、コリプレッサーとして働くことで遺伝子の発現を抑制しているか、あるいは、この BOI と DELLA の制御系に対して抑制型 MYB3R が関与している可能性が予想される。

また、抑制型 MYB3R が種々の DELLA の機能に影響を与える機構として、

上記とは別に DELLA によるジベレリンのフィードバック制御経路に関わる可能性についても考えられる。GAI ASSOCIATED FACTOR1 (GAF1) 転写因子は DELLA の相互作用因子として同定されており (Fukazawa *et al.*, 2014, 2017)、ジベレリンのフィードバック制御を担うことが明らかにされている。これらの報告では、GAF1 が DELLA と相互作用することを示すと同時に、両者の相互作用によってジベレリン生合成遺伝子である *GA20ox* の転写が促進されることを示している。このことから、DELLA が GAF1 と結合し、ジベレリン生合成遺伝子の発現を促進し、GA 量を増加させることによって、自身の分解を誘導させるようなネガティブなフィードバックが存在すると説明されている。また、この報告では GAF1 の過剰発現体を用いた解析も行われている。DELLA の蓄積によって見られる種子発芽の阻害等の種々の影響が GAF1 の過剰発現により緩和されることが示されており、*myb3r1,3,5* 三重変異による作用と類似していることが分かった。このことから、GAF1 とは作用の方向は異なるが、抑制型 MYB3R についても、例えば、その下流に GA 生合成遺伝子が存在しており、*myb3r1,3,5* 三重変異体では GA 生合成遺伝子の転写抑制が外れて内在の GA 量が上昇している可能性が考えられる。そして、この内在性の GA 量の増加が PAC 処理による GA 量の減少と拮抗することで、見かけ上 PAC 処理による種々の作用が緩和されている様に観察されていると解釈することができる。この可

能性を検証するためには、今後、*myb3r1,3,5* 三重変異体における GA の定量実験などが必要になると考えられる。

4-4. 図表

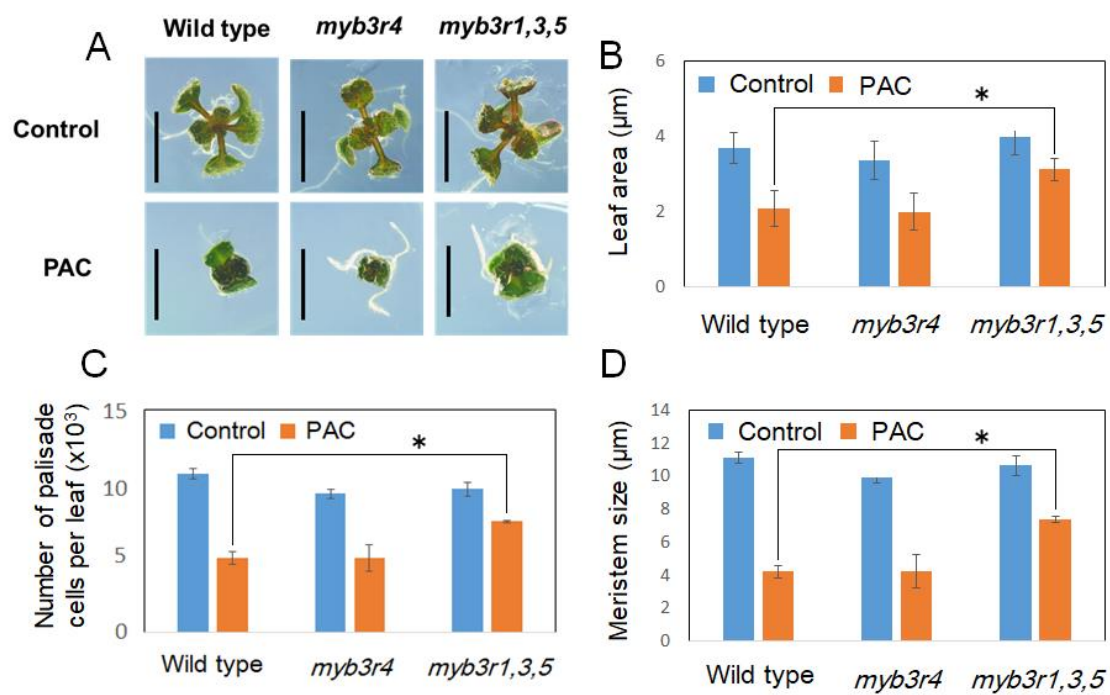


図 15.

図 15. PAC 処理下における *myb3r* 変異体の成長解析

野生型植物、*myb3r4* 変異体及び *myb3r1,3,5* 三重変異体に PAC 処理を行い、種々の成長パラメーターの解析を行った。

(A) PAC 存在下で育成させた植物の様子

それぞれの遺伝子型の種子を PAC (1 μ M) を含む 1/2MS 培地に播種し、14 日間育成させた植物を撮影した。コントロールとして、PAC を含まない 1/2MS 培地で育成した植物を撮影した。

(B) 葉の面積

PAC (1 μ M) を含む 1/2MS 培地で 15 日間育成させた植物の第 1,2 葉の面積を測定した($n \geq 6$)。

(C) 葉 1 枚当たりの柵状細胞の数

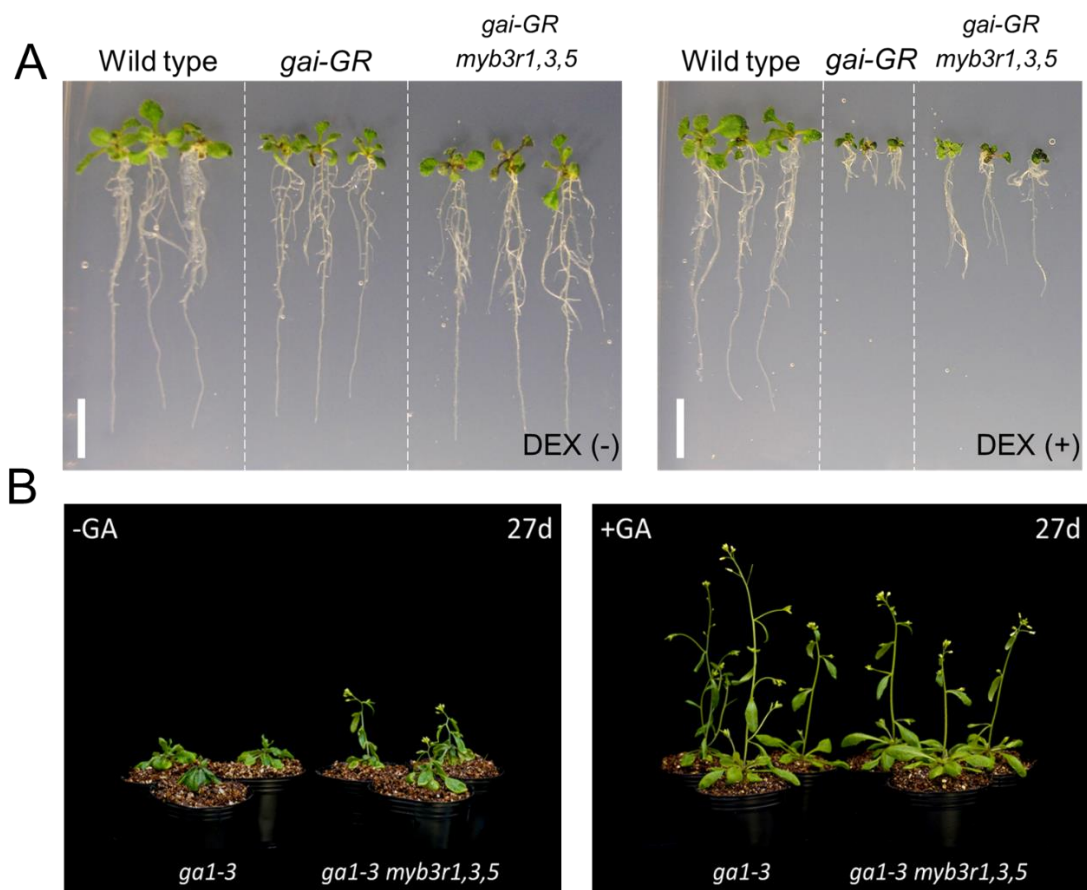
PAC (1 μ M) を含む 1/2MS 培地で 15 日間生育した植物の第 1,2 葉における柵状細胞数を測定した($n \geq 6$)。

(D) 根のメリステムサイズ

1/2MS 培地で 7 日間生育した植物を、PAC (1 μ M) を含む 1/2MS 培地に移し、4 日間生育させた後、根のメリステムサイズを測定した($n \geq 10$)。

コントロールとして、PAC を含まない 1/2MS 培地に移して育成した植物を用いた。エラーバーは標準偏差を示している。スケールバーは 2 mm を表している。

*は $p < 0.05$ を表している。



☒ 16.

図 16. *gai-GR / myb3r1,3,5* 及び *gal-3 myb3r1,3,5* 系統の成長

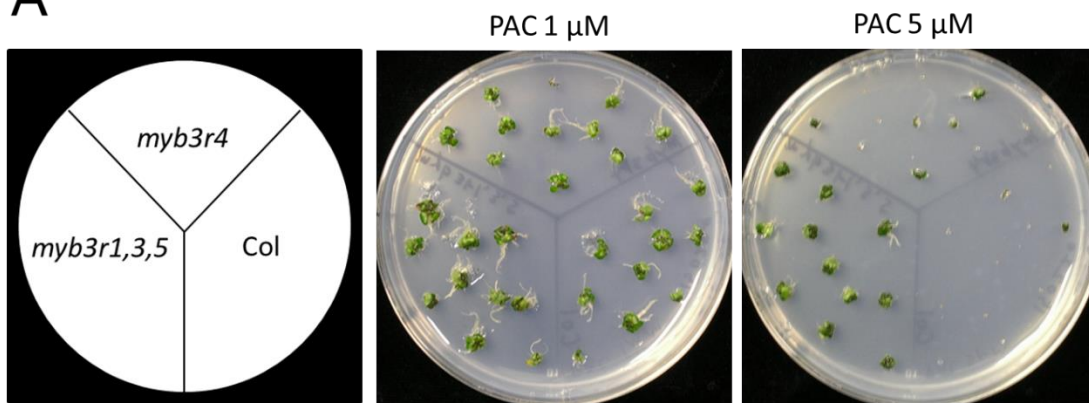
(A) *gai-GR / myb3r1,3,5* 植物の成長の様子

gai-GR 系統及び *gai-GR / myb3r1,3,5* 系統の植物を 1 mM DEX を含む 1/2MS 培地上で 7 日間生育させた後、撮影を行った。コントロールとして DEX を含まない培地で育成した植物を用いた。

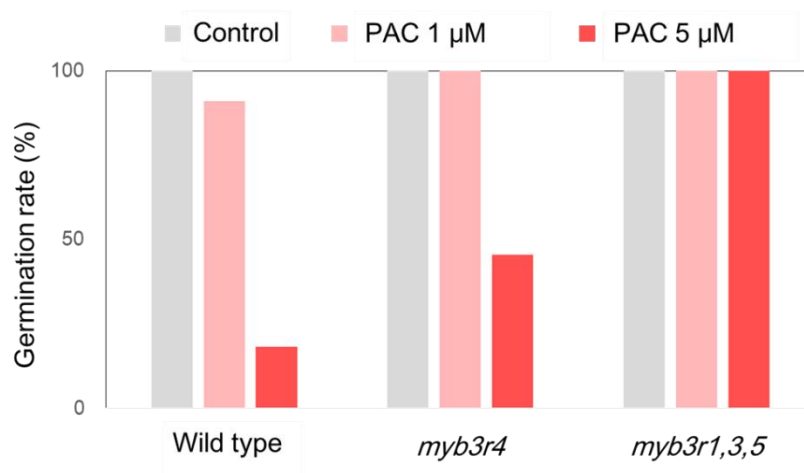
(B) *gal-3 myb3r1,3,5* 植物の成長の様子

gal-3 変異による GA 欠乏により種子の発芽が阻害されるため、*gal-3* 系統及び *gal-3 myb3r1,3,5* 系統の種子を GA (1 μ M) を含む 1/2 MS 培地に播種し発芽させた。14 日間、培地上で生育させた後、植物を培養土へ移し、GA 溶液 (10 μ M) を噴霧して生育した植物 (左図)、および GA 噴霧を行わずに育成した植物 (右図) の様子を播種後 27 日目に撮影した。

A



B



☒ 17.

図 17. PAC 処理下における *myb3r* 変異体の種子発芽率の解析

PAC 処理による発芽阻害について野生型植物、*myb3r4* 変異体及び *myb3r1,3,5* 三重変異体を用いて解析を行った。

(A) 種子の発芽の様子

(B) 種子の発芽率

コントロールとして、PAC を含まない 1/2MS 培地を用いて実験した。

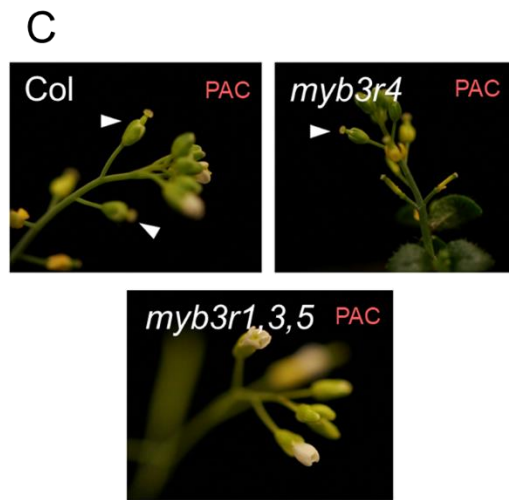
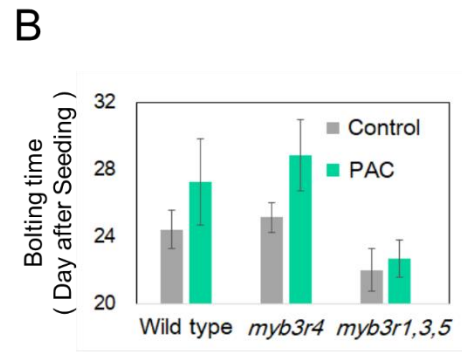
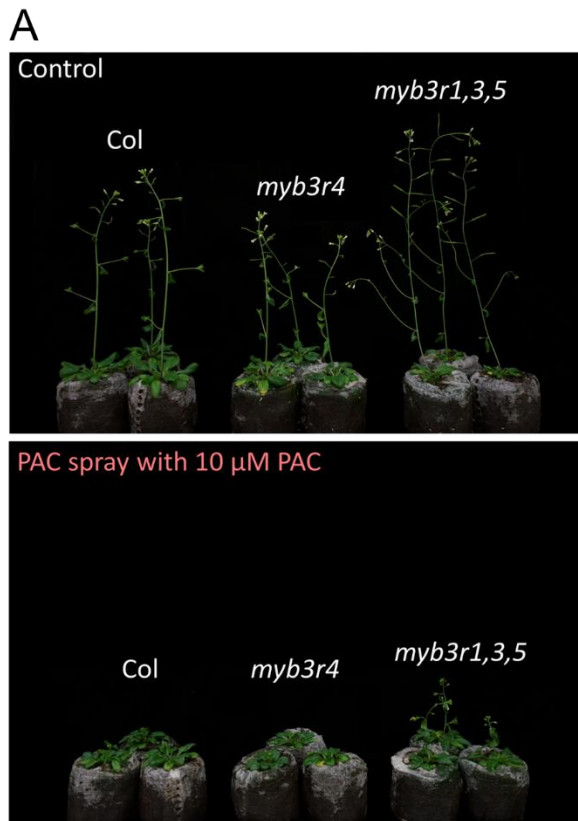


図 18. PAC 処理下における *myb3r* 変異体の花成及び花の形態解析

PAC 処理下において野生型植物、*myb3r4* 変異体及び *myb3r1,3,5* 三重変異体を用いて花成及び花の形態を解析した。

(A) 花成の様子

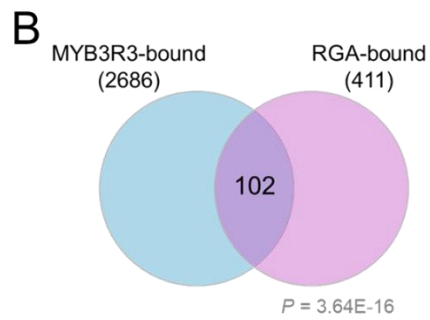
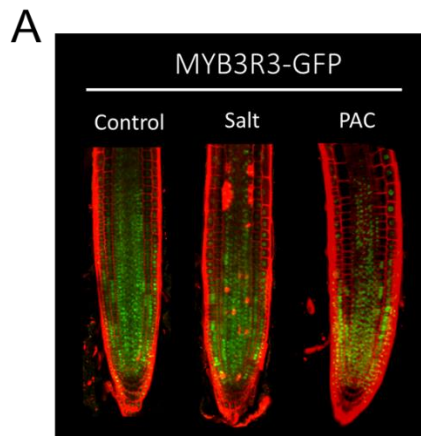
1/2MS 培地で 7 日間生育した植物を培養土に移し、その後、植物の地上部に PAC 水溶液 (10 μ M) を噴霧し、花成の遅れについて観察を行った。右図は PAC 処理した植物を、左図はコントロールの植物 (PAC 未処理) を示している。

(B) 花成の遅延

植物を(A)と同じ条件で育成し、播種から抽苔までの日数を測定した($n \geq 5$)。

(C) 花の形態

1/2MS 培地で 7 日間生育した植物を培養土に移し、抽苔させた後、花芽に PAC 水溶液(10 μ M)を噴霧し、花の形態に与える影響について観察を行った。



MYB3R3-bound
ChIP : MYB3R3-GFP
(Kobayashi *et al.*, 2015)

RGA-bound
ChIP : GFP-RGA + PAC
(Rosa *et al.*, 2015)

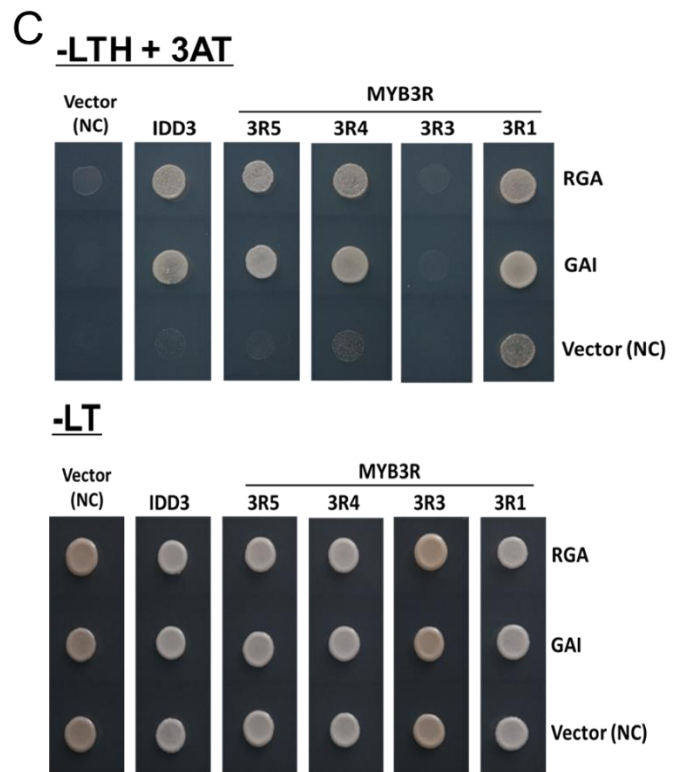


図 19. MYB3R と DELLA が協調して作用する仕組みの検討

(A) PAC 存在下および塩ストレス下での MYB3R3-GFP の発現

1/2MS 培地上で 3 日間生育した植物を、PAC (10 μ M)を含む培地に移し、24 時間後に共焦点顕微鏡を用いて根端における GFP の蛍光観察を行った。細胞のアウトラインを可視化するため、Propidium Iodide (PI) により細胞壁を赤色に染色した。

(B) DELLA 標的遺伝子と MYB3R3 標的遺伝子の重複

PAC 存在下で ChIP-seq 解析により同定された DELLA 標的遺伝子 411 個 (Rosa *et al.*, 2015)と所属研究室において MYB3R3 の ChIP-seq により同定された 2,686 遺伝子 (Kobayashi *et al.*, 2015)の重複を示すベンダイアグラムを作成した。

(C) DELLA と MYB3R のタンパク質間相互作用

Yeast Two Hybrid 法により DELLA と MYB3R の間の相互作用解析を行った。

DELLA を Prey、MYB3R を Bait として、両遺伝子を酵母へ形質転換し、ヒスチジン要求性に対する相補能によりタンパク質間の相互作用を解析した。形質転換の確認はロイシン/トリプトファン欠損培地 (-LT)を、タンパク質間を相互作用はロイシン/トリプトファン/ヒスチジン要求性培地にヒスチジン合成阻害剤である 3-アミノ-1,2,4-トリアゾール(3AT)を 50 mM の濃度で加え培地 (-LTH+3AT)を用いて行った。

第 5 章 結論と展望

ストレスによる積極的な成長抑制には、細胞周期の負の制御が関わっていると考えられていたが、どのような細胞周期制御因子が関わっているのかについては非常に限られた情報があるのみであった。本研究の第 2 章では、塩ストレスと成長抑制を繋ぐ経路として MYB3R 経路が位置することを示し、細胞周期制御を担う MYB3R 転写因子が G2/M 期遺伝子の発現を制御することで、細胞分裂が抑えられ、塩ストレスによる植物の成長抑制が引き起こされることを明らかにした。

塩ストレスに曝された植物では、葉や根などの成長抑制、細胞分裂の抑制、それに伴った細胞数の低下、細胞質分裂の異常、メリステムサイズの低下や G2/M 期遺伝子の発現低下が観察された。しかし、抑制型 MYB3R の変異により、これらの塩ストレスによる作用の全てが緩和されることから、これらの塩ストレスによる成長抑制は抑制型 MYB3R を介して引き起こされていると考えられる(図 20)。

植物のストレス応答の制御には植物ホルモンが重要な役割を持つことが知られている(Colcombet *et al.*, 2008)。第 3 章では、種々のホルモンに関連した変異体や過剰発現体を用いた解析から、ジベレリン情報伝達経路とそこで働く

DELLA が塩ストレス下で見られる細胞質分裂異常に対して影響を示すことを明らかにした。実際に、DELLA タンパク質の蓄積を引き起こす Paclobutrazol(PAC) を処理した植物や、DELLA の過剰発現株では、塩ストレス下と同様に細胞質分裂の異常が引き起こされていた。しかしながら、PAC 処理された植物では G2/M 期遺伝子の発現低下は確認できず、DELLA の蓄積だけでは、塩ストレス下で見られた G2/M 期遺伝子の発現低下を再現することができなかった。このことから、過去の文献(Achard *et al.*, 2008)からも示唆されているように、塩ストレス特異的な DELLA による転写制御機構が存在し、G2/M 期遺伝子の発現抑制もその制御下で働いている可能性が考えられた(図 21)。しかし、MYB3R による G2/M 期遺伝子の制御とは独立に、DELLA が細胞質分裂に必須な因子の制御に関わっている可能性なども考えられ、今後、これらの仮説を慎重に検証していく必要がある。

DELLA と抑制型 MYB3R との関連について行った研究の過程で、抑制型 MYB3R はストレス下に限らず、DELLA の様々な機能に関わることを示す結果が得られた。第 4 章では、このような DELLA の広範囲にわたる機能と MYB3R の関連について研究した。PAC 処理された植物では塩ストレス下と同様に、細胞分裂の抑制やそれに伴った成長の抑制が観察されるが、抑制型 MYB3R の変異ではこれら全てが緩和されることが分かった。また、抑制型 MYB3R 変異は、

DELLA が制御する種子の発芽や花成、花の形態形成といった成長以外の形質に対しても影響を示すことが分かった。従って、抑制型 MYB3R は成長抑制だけではなく、DELLA の種々の機能において何らかの関わりを持っていると予想された(図 20)。

DELLA は DNA 結合ドメインを持たないと考えられており、DNA 結合が可能な他の転写制御因子と相互作用することによって遺伝子の発現制御を行うことが知られていた。また、抑制型 MYB3R についても、その発現量は、塩ストレス下及び PAC 処理下においても全く変化せず、何らかの因子が作用することでその性質が変化していると予想された。以上のことから、抑制型 MYB3R と DELLA との相互作用が予想されたが、既に報告されている DELLA の標的遺伝子と抑制型 MYB3R の標的遺伝子とで多くの重複があることもこの相互作用の可能性を支持するものとなった。そして、Yeast Two Hybrid 法を用いた解析から、実際に DELLA と抑制型 MYB3R との相互作用を確認することができ、抑制型 MYB3R は DELLA と相互作用することで、その性質及び下流の遺伝子の発現が変化している可能性が示唆された。

本研究をまとめると、塩ストレス下の植物で見られる成長抑制は細胞周期制御を担う転写因子 MYB3R を介して引き起こされることを明らかにした。また、塩ストレスによる成長抑制では成長抑制因子 DELLA を中心とした、ジベレリン

やエチレンとのネットワークが働いていることが知られていたが、これらが、細胞周期の制御に影響することを示した。一方で、種々のストレス下において成長抑制を担う DELLA と MYB3R との関連についても検討し、抑制型 MYB3R は成長抑制に限らず、種々の DELLA の機能に対して関わることや、実際に抑制型 MYB3R と DELLA が相互作用することを示した。

しかしながら、抑制型 MYB3R と DELLA との関係については未解明な部分や一部プレリミナリーなデータもあり課題が多い。まずは、BiFC 法などによって *in vivo* における抑制型 MYB3R と DELLA との相互作用を検証する必要があると考えている。また、抑制型 MYB3R を介した転写制御に対して DELLA がどのような影響をもたらすのか、培養細胞系を用いた Transient assay などにより確かめる必要もある。加えて、*gal-3 myb3r1,3,5* 変異体を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、過去に報告されているデータと比較することで、ジベレリン応答や DELLA と抑制型 MYB3R に関係する遺伝子群を明らかにすることができるかもしれない。塩ストレス下において DELLA と G2/M 期遺伝子との関係をより直接的に示す結果についても得る必要があるため、DELLA の欠失変異体等を用いて塩ストレス下での G2/M 期遺伝子の転写産物量の測定を行いたいと考えている。塩ストレス下特異的な DELLA と抑制型 MYB3R との関係については、両者に加えさらに別の因子が介在すると考えられるが、今のところ手掛かりは得られて

いない。まずは、上述した実験によって、非ストレス下における DELLA と抑制型 MYB3R の詳細な関係を明らかにしてから、解明を進めて行く必要があると考えている。抑制型 MYB3R と DELLA との関係についてより詳細な解析を行うことで、塩ストレス下での成長抑制のみならず、未だ謎が多い基本的な DELLA の機能についても明らかにすることができるかもしれない。

以上、本研究ではまだ多く未解明な部分が残っており、より解析を進めて行く必要があるが、本研究が発展することによって、ストレス環境に強い作物の開発や、植物生理学上の中心的な課題である植物の環境応答機構の解明、未だ謎が多い DELLA の制御機構の解明に繋がることが期待される。

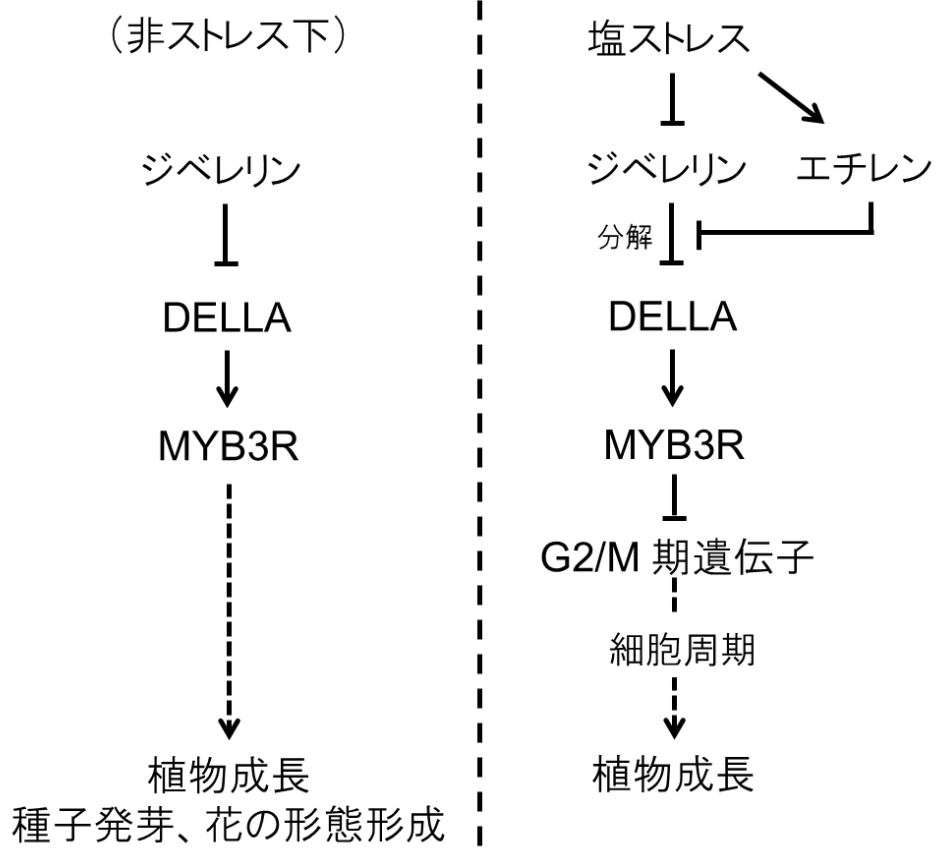
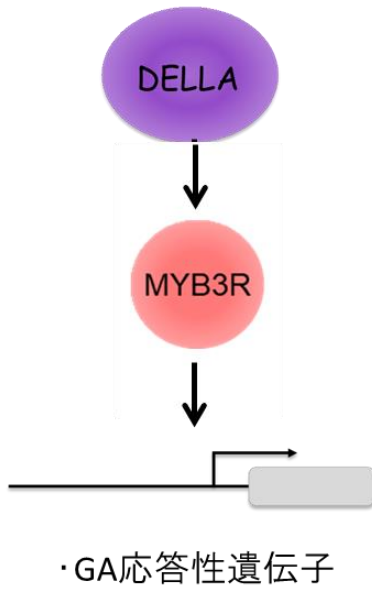


図 20.

図 20. 抑制型 MYB3R と DELLA を介した成長抑制に関する仮説

塩ストレス下では、エチレン量の増加やジベレリン量の低下が引き起こされ、DELLA タンパクが安定化される。これにより蓄積した DELLA タンパクは抑制型 MYB3R に結合し、何らかの作用をもたらし、抑制型 MYB3R を介して G2/M 期遺伝子の発現が抑制される。その結果、細胞周期が負に制御され、植物の成長が抑制されていると予想される。一方で、塩ストレス以外の条件、例えば PAC 処理によって DELLA の蓄積が引き起された場合においても、抑制型 MYB3R は DELLA と共に働き、成長抑制を行っていると考えられるが、PAC 処理下では塩ストレス下とは異なり、G2/M 期遺伝子のグローバルな制御を介していないと予想される。また、PAC 処理下では抑制型 MYB3R は成長抑制以外の DELLA の機能(種子の発芽や花の形態形成等)にも関わっていると考えられる。

非ストレス(PAC処理)



塩ストレス

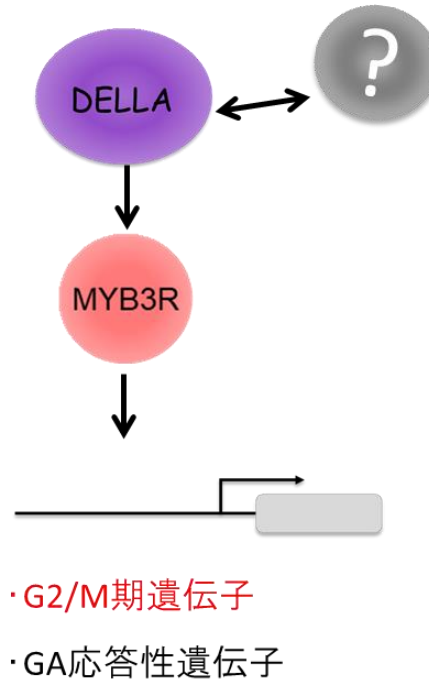


図 21.

図 21. 塩ストレス及び非ストレス下における DELLA と MYB3R を介した遺伝子制御モデル

DELLA は抑制型 MYB3R と相互作用することで、植物の成長や種子の発芽、花成や花の形態形成を担う種々のジベレリン(GA)応答性遺伝子の転写制御を行うと予想される。一方、塩ストレス下においては DELLA が抑制型 MYB3R に対してさらに何らかの作用をもたらし、塩ストレス下特異的に G2/M 期遺伝子の発現低下が引き起こされていると可能性が考えられる。

研究材料及び実験方法

(1) 植物材料

本研究ではシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の Columbia (Col) 及び Landsberg (Ler) 系統を実験材料として用いており、特別に記載のないものは全て Col 背景の植物である。*MYB3R* 遺伝子破壊株は以下に示す Salk Institute Genomic analysis laboratory (Alonso *et al.*, 2003) 及び German Plant Genomics research program (GABI-kat Lines, Rosso *et al.*, 2003) の T-DNA 挿入変異株と、それをもとに研究室内で交配により作出された株を用いた。

- ・ *myb3r1* 変異株 SALK_018482
- ・ *myb3r3* 変異株 GABI-kat line 546A07
- ・ *myb3r4* 変異株 SALK_059819
- ・ *myb3r5* 変異株 SALK_031972

細胞分裂活性の解析に用いた *CYCB1;1-GUS* 形質転換体では、G2/M 期遺伝子である *CYCB1;1* 遺伝子のプロモーター下においてユビキチン化の標的配列であるデストラクションボックス (D-box) を含む GUS タンパク質が発現するように設計されている。従って当該形質転換体では GUS 染色法により G2/M 期特異

的な細胞を観察することができる (Colon-Carmona *et al.*, 1999)。

MYB3R タンパク質の発現解析で用いた GFP-MYB3R4 及び MYB3R3-GFP 形質転換体は、それぞれのネイティブなゲノム背景に GFP を挿入し N 末端及び C 末端に GFP が融合するように設計したコンストラクトが導入されており、所属研究室と杉本慶子 教授 (理化学研究所) と共同作出された系統である。

MYB3R と種々のホルモンとの関連を検討するために次の変異体及び形質転換体を用いた。

- *etr1-1* 変異体(Chang *et al.*, 1993)
- *ein2-50* 変異体(Alonso *et al.*, 2003)
- *ein3-1* 変異体(Chao *et al.*, 1997)
- *ctr1-1* 変異体(Kiebar *et al.*, 1993)
- *aba3-1* 変異体(Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996)
- *abi4-1* 変異体(Finkelstein *et al.*, 1994)
- *sid2-2* 変異体(Dewdney *et al.*, 2000)
- *aos* 変異体(Song *et al.*, 1993)
- *joe1* 変異体(Jensen *et al.*, 2002)
- *q-GA2ox* 変異体(Rieu *et al.*, 2008)

- *p35S::GA20ox* 過剰発現体(Coles *et al.*,1999)
- *gai-GR* 過剰発現体(Claeys *et al.*, 2012)
- *della* 変異体(Achard *et al.*, 2006) (Ler 背景)
- *myb3r4* 変異体(Ler 背景)

Col 背景の *myb3r4* 変異体と野生型 Ler との五回の戻し交配により作出した。

- *gal-3* 変異体(Silverstone *et al.*, 1997)

(2) 生育条件

種子を滅菌溶液 (5% Plant preservative mixture [Plant cell technology 社], 0.005% Tween20) に懸濁した後、4°Cで2日間静置することで種子の滅菌を行った。その後、滅菌済みの種子をクリーンベンチ内で培地に播種した。基本培地として用いた 1/2 MS 寒天培地の作製方法については、最初に 500×B5 ビタミン 4 mL, スクロース 40 g, ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 1 袋 (1 L 分) を水に溶かし、1 M NaOH で pH 5.8 になるように調節した。その後、溶液の量が 2 L になるように水を用いてメスアップし、12 g の寒天を加えてオートクレーブを行った。最後に、溶液を厚さ 5 mm 程度になるようにシャーレに流し込み 1/2 MS 寒天培地 (1/2 MS, 1×B5 ビタミン, 2% スクロース, 0.6% アガロース) を作製した。液体培地を作成する際には上記の方法から寒天を加える過程を省いた。その他、種々の

化合物を含む培地については、上記と同様の手順で溶液を調製し、オートクレーブした後、培地の温度が 50℃程度まで低くなったところで目的の濃度になるように種々の物質を加えた。

播種後のプレートは 22℃の人工気象器内で生育した。植物に対してストレス及びホルモン阻害剤処理を行う際には (i) ストレス性培地に直接播種を行い生育する方法(長期的処理)と、(ii) 特定の期間まで 1/2 MS 寒天培地で生育し、その後、ストレス性の液体培地へと移動させ、ストレスを与える方法(一過的処理)の 2 種類を用いた。アブシジン酸(ABA)については種子の休眠を誘導する作用を有するため ABA 処理を行う際には一度 1/2 MS 寒天培地に播種した後、発芽してすぐの植物を ABA 培地へと移動させた。植物を土に移し替える場合には、2 週間 1/2 MS 培地上で生育した後、芽生えを Giffy7 (サカタのタネ) に植え替え、22℃、連続光の人工気象器内で生育した。

(3) DNA 抽出

本葉 2 枚が展開した植物から子葉一枚をサンプリングし、液体窒素を用いて凍結させた後、-80℃で保存した。子葉一枚に対して CTAB buffer (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH8.0, 30% Hexadecyltrimethylammonium bromide, 0.2% β-メルカプトエタノール) 200 μL を抽出バッファーとして加えた。その後、

マイクロペッセルを用いて子葉を破碎し、クロロホルム 200 μL を加え、攪拌した後、遠心 (10,000 r.p.m, 5 min, 室温) を行った。分離した水層のみを分取し、そこにイソプロパノール 150 μL を加え、転倒混和し、再度遠心 (10,000 r.p.m, 10 min, 室温) することで DNA を沈殿させた。得られた沈殿に 70% エタノール 150 μL を加え、洗浄を行い、最後に沈殿物を 5 分間真空乾燥させ、TE (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA) または水 20 μL に溶解し、 -20°C で保存した。

(4) 表現型の観察

(i) 透明化処理による気孔の細胞質分裂異常の観察

植物 1 個体から子葉を 1 枚サンプリングし、1 サンプルとした。サンプリングした子葉を透明化用固定液 (90% エタノール, 10% 酢酸) に浸し、これをデシケーター中に静置した状態で、真空ポンプを用いて 5 分間減圧処理を行い子葉の脱気処理を行った。その後、90%, 70%, 50%, 30% エタノールの順に子葉をそれぞれ 15 分ずつ浸して平衡化した。最後に、Hoyer's solution に入れ替え 30 分から 1 時間程度静置することにより透明化処理を行った。微分干渉顕微鏡 (OLYMPUS BX51) を用いて調製したサンプルの気孔の観察を行った。Hoyer's solution は水 30 mL にグリセロール 5 mL を加えたものに、抱水クロラール 100 g とアラビアゴム 7.5 g を溶解させることにより調製した。

(ii) 葉の面積及び葉の細胞数の測定

植物の葉を透明化処理した後、葉の全体や細胞の写真を撮影し、画像処理ソフト Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて、得られた画像から葉の面積と柵状細胞 20 個当たりの面積を算出した。葉全体の面積を細胞 1 個当たりの面積で割ることで、葉の細胞数を求めた。

(iii) 根の長さの測定

垂直に立てた 1/2 MS 培地 (1.0% 寒天) で 7 日間生育した植物を 1/2 MS 及び、50, 75, 100, 150 mM NaCl 培地 (1.0% 寒天) に移動させ、5 日後に植物の主根の長さを測定した。

(iv) 共焦点顕微鏡を用いた GFP 蛍光の観察

GFP マーカーの発現と細胞の形を同時に観察するために Propidium iodide (PI) を用いて細胞壁の染色を行った。植物を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI (Invitrogen 社) に 15 秒間浸して染色した後、水でスライドガラスにマウントして共焦点顕微鏡 (Olympus FV1000) を用いて観察を行った。GFP マーカーは 475nm の波長により励起させ、

500-520nm の緑色蛍光を検出した。PI は 559nm の波長により励起させ、600-620 の赤色蛍光を検出した。

(v) プロイディ解析

Haga et al., 2007 にて以前報告した手法を用いた。CyStain UV Precise P (Sysmex 社) にて若い本葉の細胞核の染色を行った後、CyFlow Ploidy Analyzer (Sysmex 社) を用いて核相毎の細胞数を検出・集計を行った。

(5) リアルタイム PCR による mRNA 量の解析

(i) サンプルリング

1/2 MS 寒天培地にて 7 日目まで植物を生育させた後、種々の物質を含む液体培地に移し処理を行った。5 個体分の芽生えを 1 サンプルとし、液体窒素を用いて急速凍結させ、-80°C にて保存した。

(ii) RNA 抽出

凍結状態の芽生えに、TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific 社) 400 μ L を加え、マイクロペッセルを用いて芽生えを破砕した。これを攪拌した後、5 分間室温で静置した。クロロホルム 80 μ L を加え攪拌した後、遠心 (15,000 r.p.m, 15 min, 4°C)

を行った。分離した水層のみを分取し、そこにイソプロパノール 200 μ L を加え、転倒混和した。これを再び室温で 10 分間静置し、遠心 (15,000 r.p.m, 10 min, 4°C) により RNA を沈殿させた。得られた沈殿を冷えた 75% エタノール 1 mL で洗浄し、真空乾燥させた後、RNase free water 20 μ L に溶解させた。氷浴により低温を維持したまま溶液中の RNA の濃度を Nano Drop 3.01 を用いて求め、RNase free の滅菌水を用いて全てのサンプルの RNA 濃度を一定にした。

(iii) 逆転写反応

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO 社)を用いた。調製した RNA サンプル (100 ng) に 5 \times RT Master Mix を加え、水を用いて 10 μ L にメスアップした。反応液を攪拌させた後、37°C 15 分、95°C 5 分でインキュベートを行った。

(iv) リアルタイム PCR

Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO 社)を用いた SYBR Green によるインターカーレーター法により mRNA の定量を行った。PCR 及び PCR 産物の検出は Step One Plus (Applied Biosystems 社) により行った。反応系や反応条件については次の通りである。

<リアルタイム PCR 反応液>

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix	10 μ L
10 μ M PCR forward primer	0.8 μ L
10 μ M PCR reverse primer	0.8 μ L
DNA Template	2 μ L
滅菌水	6.4 μ L

全量	20 μ L
----	------------

<反応サイクル>

Stage1 初期変性

95°C, 10 min

Stage2 PCR

95°C, 10 sec	} 40 サイクル
60°C, 30 sec	

Stage3 融解曲線分析

95°C, 15 sec

65°C, 15 sec

95°C, 15 sec

<プライマーリスト>

Gene Name	Primer Name	Primer Sequence
CYCB1;2	cyc1b-Q3	TTTGAGCAGTCCATAATCTCAGAC
	cyc1b-Q5	ATTACGACACCTTGACGTTCTGTC
KNOLLE	KNOLLE-Q2	TTCGTAGAAGCCATCTCAAGATC
	KNOLLE-Q6	CTAATCAGAAGAGTGAAAAAGATG
IMK2	imk2-Q1	TTTCTGGTCCTCGAGCGTGAAG
	imk2-Q6	CATTTCTTCACGCTCGAGGACCA
EDE1	474aa-Q1	TCCAAAGAAGGAGTTTGTGACTC
	474aa-Q7	AGAAAGCACAAAGCTGAGAGAATG
CYCB1;4	CycB1;4-Q3	TGTTGCAACATCACGACCAGTGAC
	CycB1;4-Q5	AACGTGGAATCGCAGGTGAAATC
MYB3R4	N18-Q8	AATCGCTTGAGAAAGTAGACC
	N18-Q9	AGTAGACAGGACTGGCTTACCG
MYB3R3	A07-Q3	AGCTCTTGCCTTTAAACGTGTC
	A07-Q5	AGTATCACCTACTCATAGGTAC
MYB3R5	E22S1	AGTCATTAAGCTGACTGGTGATGC
	E22-Q5	AAAACGGGTTTGGAECTCAAAG
RD29A	RD29A-Q3	ACCATAATACATCAAAGACGTC
	RD29A-Q5	TTGAAGAGTCTCCACAATCAC
ACTIN2	ACT2-Q3	AATCCAGCACAATACCGTTGTAC
	ACT2-Q5	TCCTCTTAACCCAAAGGCCAACAG
UBQ8	UBQ7-Q3	CCTCTGTTGATCAGGTGGTATGC
	UBQ7-Q5	TTACTATTCCCATCGCACAGAC

(6) CYCB1;1-GUS マーカー株を用いた細胞分裂活性の解析

1/2 MS 寒天培地にて 8 日間生育した CYCB1;1-GUS 形質転換体を塩ストレス液体培地に移し、一定時間ストレス処理を行った後、GUS 活性を示す細胞を観察するために X-gluc 染色を行った。X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta delta-glucuronic acid) は GUS (β -グルクロニダーゼ) の発色基質であり、GUS による触媒反応を受けることで青色を呈する 4-bromo-3-chloro-indigo を生じるため、GUS の活性を示す細胞を視認することが可能となる。染色の手順を以下に示す。2 mL のエッペンドルフチューブまたは 20 mL コレクションバイアルに 90% アセトンを加え、そこに植物を 15 分間浸すことで固定を行った。90% アセトンは予め 4°C で冷却されたものを用い、固定作業も氷上で行った。アセトンを取り除き、次に 0.1 M NaPO₄ 溶液 (pH7.0) により植物を洗浄した。その後、NaPO₄ 溶液を取り除き、X-gluc 染色液 (0.1 M NaPO₄ pH7.0, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.5 mg/mL X-gluc, 1.0 mM フェリシアン酸カリウム, 1.0 mM フェロシアン酸カリウム) を加えて植物が完全に浸るようにした。フェリシアン酸カリウム及びフェロシアン酸カリウムは GUS の反応物の拡散を防ぐと同時に GUS の活性を抑える働きのある物質である。GUS 染色液に浸した植物を減圧処理し、37°C、遮光条

件にて一晩静置した。最後に GUS 染色液を取り除き、70% エタノール中に植物を浸し保存した。保存したサンプルを 70% エタノール中で実体顕微鏡により観察し、顕微鏡に装着されたデジタルカメラにて芽生えの撮影を行った。また、根での GUS 活性については透明化処理を行った後に微分干渉顕微鏡を用いて観察を行った。

(7) RNA-seq

(i) サンプルング

短期的ストレス処理条件では、7日間 1/2MS 寒天培地にて植物を生育させた後、1/2MS ± 150 mM NaCl 液体培地にて移動し 24 時間後に植物体全体をサンプルングした。長期的ストレス処理条件では 1/2MS ± 75 mM NaCl 寒天培地にて播種し、生育 7 日後にサンプルングを行った。

(ii) シーケンス

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社)にて RNA 抽出を行い、TruSeq RNA Library Preparation Kit v2 (Illumina 社)を用いて cDNA ライブラリーを作製した。シーケンスについては短期的ストレス条件のサンプルでは NextSeq500 sequencer (Illumina 社)を、長期的ストレス条件のサンプルでは

Genome Analyzer IIx (Illumina 社)を用いた。

(iii) データ解析

bcl2fastq (Illumina 社)を用いて未精製のリードからアダプター配列を取り除いた。また、短期的ストレス条件のサンプルでは Q-value が 25 以下のリードあるいは 50 bp 以下の短いリードを除外し、長期的ストレス条件のサンプルでは Q-value が 20 以下のリードあるいは 30 bp 以下のリードを除外した。Langmead *et al.*, 2009 で報告されている“-all-best-strata”パラメーターを cDNA ライブラリーのリファレンスとし、マッピングツール Bowtie を用いて、リードのマッピングを行った。遺伝子発現量の差異については edge R (Version 3.20.9)により算出した adjusted P-value に基づいて選択を行った。尚、全てのリードデータは DRA010790 として DDBJ Sequence Read Archive (DRA)にて登録済である。

(8) Yeast Two Hybrid

pBridge vector (Clontech 社) に MYB3R1,3,4,5 の CDS 配列を導入し、種々の *pBridge-MYB3R* コンストラクトを作製した。DELLA コンストラクトについては名古屋大学 上口教授よりいただいた *pGADT7-RGA* 及び *pGADT7-GAI* (Yoshida *et al.*, 2014)を用いた。これらのコンストラクトについて S. c. EasyComp

Transformation Kit (Invitrogen 社) を用いて *Saccharomyces cerevisiae* AH109 株に形質転換を行い、ロイシン/トリプトファン要求性培地にて 30°C、2 日間培養し、コロニーの形成を確認した。ロイシン/トリプトファン/ヒスチジン要求性培地に対してヒスチジン阻害剤である 3-アミノ-1,2,4-トリアゾール(3AT)を 50 mM の濃度で添加し、そこで形質転換を行った *Saccharomyces cerevisiae* AH109 株を再度培養を行い、コロニーの形成について確認を行った。

参考文献

Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP (2003) Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* 15: 2816-2825.

Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91-94.

Achard P, Gong F, Cheminant S, Alioua M, Hedden P, Genschik P (2008a) The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* 20: 2117-2129.

Achard P, Renou J P, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P (2008b) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr. Biol.* 18: 656-660.

Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster GT, Genschik P (2009) Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 19: 1188-1193.

Alonso J M (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis*

thaliana. Science 301: 653-657.

Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun TP, Wang ZY. (2012)

Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. Nat Cell Biol. 14: 810-817.

Beemster GT, De Veylder L, Vercruyssen S, West G, Rombaut D, Van Hummelen P,

Galichet A, Gruissem W, Inzé D, Vuylsteke M (2005) Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of *Arabidopsis*. Plant Physiol. 138: 734-743.

Boudolf V, Vlieghe K, Beemster GT, Magyar Z, Torres Acosta JA, Maes S, Van Der

Schueren E, Inzé D, De Veylder L (2004) The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in *Arabidopsis*. Plant Cell 16: 2683-2692.

Burssens S, Himanen K, Van De Cotte B, Beeckman T, Van Montagu M, Inzé D,

Verbruggen N (2000) Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. Planta 211: 632-640.

Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) *Arabidopsis* ethylene-

response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. Science 262: 539-544.

- Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89: 1133-1144.
- Chen, P., Takatsuka, H., Takahashi, N., Kurata, R., Fukao, Y., Kobayashi, K., Ito, M. and Umeda, M. (2017) Arabidopsis R1R2R3-Myb proteins are essential for inhibiting cell division in response to DNA damage. *Nat. Commun.* 8: 635.
- Claeys H, Skirycz A, Maleux K, Inzé D (2012) DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in Arabidopsis leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity. *Plant Physiol.* 159: 739-747.
- Colcombet J, Hirt H (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J.* 413: 217-226.
- Coles JP, Phillips AL, Croker SJ, García-Lepe R, Lewis MJ, Hedden P (1999) Modification of gibberellin production and plant development in Arabidopsis by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J* 17: 547–556
- Colon-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T and Doerner P (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20: 503-508.
- De Lucas M, Daviere JM, Rodríguez-Falcon M, Pontin M, IglesiasPedraz JM, Lorrain

- S, Fankhauser C, Blazquez MA, Titarenko E, Prat S. (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*. 451: 480–484.
- De Veylder L, Larkin JC, Schnittger A (2011) Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends Plant Sci*. 16: 624-634.
- Dewdney J, Reuber TL, Wildermuth MC, Devoto A, Cui J, Stutius LM, Drummond EP, Ausubel FM (2000) Three unique mutants of *Arabidopsis* identify *eds* loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *Plant J*. 24: 205-218.
- Dubois M, Skirycz A, Claeys H, Maleux K, Dhondt S, De Bodt S, Vanden BR, De Milde L, Yoshizumi T, Matsui M, Inzé D (2013) Ethylene Response Factor 6 acts as a central regulator of leaf growth under water-limiting conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 162: 319-332.
- Falbel TG, Koch LM, Nadeau JA, Sack FD, Bednarek SY (2003) SCD1 is required for cytokinesis and polarized cell expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 130: 4011–4024.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29: 185-212.
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-

- Pedraz JM, Kircher S. (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*. 451:475–479.
- Finkelstein RR (1994) Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J*. 5: 765–771.
- Fukazawa J, Teramura H, Murakoshi S, Nasuno K, Nishida N, Ito T, Yoshida M, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y (2014) DELLAs function as coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of gibberellin homeostasis and signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26: 2920–2938.
- Fukazawa J, Mori A, Watanabe S, Miyamoto C, Ito T, Takahashi Y (2017) DELLA-GAF1 complex is a main component in gibberellin feedback regulation of GA20 Oxidase 2. *Plant Physiology*. 175: 1395–1406.
- Gonzalez N, Vanhaeren H, Inzé D (2012) Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends Plant Sci*. 17: 332-340.
- Golldack D, Lüking I, Yang O (2011) Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports* 30: 1383-1391.
- Haga N, Kato K, Murase M, Araki S, Kubo M, Demura T, Suzuki K, Müller I, Voß U, Jürgens G, Ito M (2007) R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis

through activation of *KNOLLE* transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 134: 1101-1110.

Haga N, Kobayashi K, Suzuki T, Maeo K, Kubo M, Ohtani M, Mitsuda N, Demura T, Nakamura K, Jürgens G, Ito M (2011) Mutations in *MYB3R1* and *MYB3R4* cause pleiotropic developmental defects and preferential down-regulation of multiple G2/M-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 157: 706-717.

Hou X, Lee LYC, Xia K, Yan Y, Yu H. (2010) DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell.* 19: 884 - 894.

Ito M, Iwase M, Kodama H, Lavis P, Komamine A, Nishihama R, Machida Y, Watanabe A (1998) A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *Plant Cell* 10: 331-341.

Ito M, Araki S, Matsunaga S, Itoh T, Nishihama R, Machida Y, Doonan JH, Watanabe A (2001) G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* 13: 1891-1905.

Ivanov VB, Dubrovsky JG (2013) Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci.* 18: 237-243.

Iwata E, Ikeda S, Matsunaga S, Kurata M, Yoshioka Y, Criqui.C M, Genschik P, Ito M (2011) GIGAS CELL1, a novel negative regulator of the Anaphase-Promoting

Complex/Cyclosome, is required for proper mitotic progression and cell fate determination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 4382–4393.

Jensen AB, Raventos D, Mundy J (2002) Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in *Arabidopsis*. *Plant J.* 29: 595-606.

Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441.

Kobayashi K, Suzuki T, Iwata E, Nakamichi N, Suzuki T, Chen P, Ohtani M, Ishida T, Hosoya H, Müller S, Leviczky T, Pettkó-Szandtner A, Darula Z, Iwamoto A, Nomoto M, Tada Y, Higashiyama T, Demura T, Doonan JH, Hauser MT, Sugimoto K, Umeda M, Magyar Z, Bögre L, Ito M. (2015a) Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J.* 34: 1992-2007.

Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Magyar, Z., Bögre, L. and Ito M. (2015b) MYB3Rs, plant homologs of Myb oncoproteins, control cell cycle-regulated transcription and form DREAM-like complexes. *Transcription* 6:106-111.

Kumari G, Ulrich T, Krause M, Finkernagel F, Gaubatz S (2014) Induction of p21^{CIP1} protein and cell cycle arrest after inhibition of Aurora B kinase is attributed to aneuploidy and reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 289: 16072-16084.

- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10: R25.
- Léon-Kloosterziel K, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JA, Koornneef M (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J.* 10: 655-661.
- Locascio A, Blázquez MA, Alabadí D (2013) Genomic analysis of DELLA protein activity. *Plant Cell Physiol.* 54: 1229-1237.
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K (2008) The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, *GA2ox7*, under high-salinity stress in *Arabidopsis*. *Plant J.* 56: 613-626.
- Marín-de la Rosa N, Pfeiffer A, Hill K, Locascio A, Bhalerao RP, Miskolczi P, Gronlund AL, Wanchoo-Kohli A, Thomas SG, Bennett MJ (2015) Genome wide binding site analysis reveals transcriptional coactivation of cytokinin-responsive genes by DELLA proteins. *PLoS Genet.* 11: e1005337.
- Mayers JR, Hu T, Wang C, Cárdenas JJ, Tan Y, Pan J, Bednarek SY (2017) SCD1 and SCD2 form a complex that functions with the exocyst and RabE1 in exocytosis and cytokinesis. *Plant Cell* 29: 2610–2625.
- McMichael CM, Reynolds GD, Koch LM, Wang C, Jiang N, Nadeau J, Sack FD,

- Gelderman MB, Pan J, Bednarek SY (2013) Mediation of clathrin-dependent trafficking during cytokinesis and cell expansion by Arabidopsis stomatal cytokinesis defective proteins. *Plant Cell* 25: 3910–3925
- Park J, Nguyen TK, Park E, Jeon JS, Choi G (2013) DELLA proteins and their interacting RING finger proteins repress gibberellin responses by binding to the promoters of a Subset of gibberellin-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 927.
- Peres A, Churchman ML, Hariharan S, Himanen K, Verkest A, Vandepoele K, Magyar Z, Hatzfeld Y, Van Der Schueren E, Beemster GT, Frankard V, Larkin JC, Inzé D, De Veylder L (2007) Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *J. Biol. Chem.* 282: 25588-25596.
- Rieu I, Eriksson S, Powers SJ, Gong F, Griffiths J, Woolley L, Benlloch R, Nilsson O, Thomas SG, Hedden P (2008) Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 2420–2436.
- Rosso MG, Li Y, Strizhov N, Reiss B, Dekker K, Weisshaar B (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* 53: 247-259.
- Sadasivam S, DeCaprio JA (2013) The DREAM complex: master coordinator of cell

- cycle-dependent gene expression. *Nat. Rev. Cancer.* 13: 585-595.
- Silverstone AL, Mak PYA, Martinez EC and Sun TP (1997) The New RGA Locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146: 1087-1099.
- Söllner R, Glässer G, Wanner G, Somerville CR, Jürgens G, Assaad FF (2002) Cytokinesis-defective mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 678–690.
- Song WC, Funk CD, Brash AR (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8519-8523.
- Skirycz A, Vandenbroucke K, Clauw P, Maleux K, De Meyer B, Dhondt S, Pucci A, Gonzalez N, Hoerberichts F, Tognetti VB, Galbiati M, Tonelli C, Van Breusegem F, Vuylsteke M, Inzé D (2011) Survival and growth of *Arabidopsis* plants given limited water are not equal. *Nat. Biotechnol.* 29: 212-214.
- Shinozaki-Yamaguchi K, Shinozaki K (1993) Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 236: 331-340.
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2001) The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 447-456.

- Sun TP and Gubler F (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55: 197-223.
- Takahashi, N., Ogita, N., Takahashi, T., Taniguchi, S., Tanaka, M., Seki, M. and Umeda, M. (2019) A regulatory module controlling stress-induced cell cycle arrest in *Arabidopsis*. *Elife* 8: e43944.
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Motoyuki A, Matsuoka M (2007b) Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 183–198.
- Urano K, Kurihara Y, Seki M, Shinozaki K (2010) “Omics” analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 13: 132-138.
- Verkest A, Manes CL, Vercruyssen S, Maes S, Van Der Schueren E, Beeckman T, Genschik P, Kuiper M, Inzé D, De Veylder L (2005) The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *Plant Cell* 17: 1723-1736.
- Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* 15: 501-510.

- West G, Inzé D, Beemster GT (2004) Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiol.* 135: 1050-1058.
- Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EM, Maier A, Schwechheimer C (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:1209-1220.
- Yang M, Nadeau JA, Zhao L, Sack FD (1999) Characterization of a cytokinesis defective (*cyd1*) mutant of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1437–1446.
- Yoshida H, Hirano K, Sato T, Mitsuda N, Nomoto M, Maeo K, Koketsu E, Mitani R, Kawamura M, Ishiguro S, Tada Y, Ohme-Takagi M, Matsuoka M and Ueguchi-Tanaka M (2014) DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the INDETERMINATE DOMAIN family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, 7861-7866.
- Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, Wang XF, Wu FQ, Xu YH, Zhang XY, Zhang DP (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 3019-3036.

謝辞

本研究の遂行及び本論文の執筆、並びに学会発表において、ご指導ご鞭撻を賜りました金沢大学 理工研究域の伊藤正樹博士に心よりお礼申し上げます。また、日常を通じて研究活動に対する支援や御助言を頂きました名古屋大学 大学院生命農学研究科の森仁志博士に深く感謝致します。

本研究に使用した **Yeast Two Hybrid** 用のコンストラクトを提供していただきました名古屋大学 上口美弥子博士に深くお礼申し上げます。研究指針に対して貴重な御助言を下された名古屋大学 大学院理学研究科の吉岡泰博士、並びに水上由紀子博士に心から感謝致します。

最後に、本研究にあたり、終始暖かな激励と親切な御助言を頂きました分化情報制御研究室の皆さんや金沢大学の野本友司博士、高塚大知博士並びに愛知工業大学の西村聡子博士に感謝致します。