

論文題目 Functional and evolutionary analyses of phytohormones in the late developmental and flowering stages of rice floral organs
(イネ花器官の発達後期ならびに開花期における植物ホルモンの機能と進化的解析)

氏名 河合 恭甫

主論文の要約

植物ホルモンは葉や茎、根、花などさまざまな器官の発達を制御する。これまでに発見されている主な植物ホルモンとして、オーキシシンやサイトカイニン、ジベレリン、ジャスモン酸、エチレン、ブラシノステロイド、サリチル酸、ストリゴラクトンなどがある。これらの植物ホルモンは受容体により受容され、それぞれの下流にある転写因子などを介して生理応答を制御する。そして、それらの植物ホルモンの下流応答については現在までに行われてきた数々の研究によって明らかにされつつある。

植物ホルモンのうちジベレリン (GA) は発芽・伸長・花粉の成熟・生殖成長への転換など様々な成長過程を制御する重要な植物ホルモンである。現在までに 130 種類以上の GA 類縁体が発見されているが、そのうち植物体内で生物活性をもつ活性型 GA は受容体 GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) に高い親和性を示し、結合可能な GA₁, GA₃, GA₄, GA₇ の 4 つのみである。GA が GID1 に受容されると、イネの GA シグナル抑制因子である SLR1 が GID1 の lid 部分に結合し、SLR1 のユビキチン化および分解が誘導される。このように転写抑制因子として機能する SLR1 が分解されることにより、GA 下流遺伝子の発現、すなわち GA 応答が起こる。

植物体内で GA は多段階の酵素反応を経て合成されることが知られており、イネ (*Oryza sativa*) やシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では生合成に関わるほぼすべての遺伝子が同定されている。そのうち、直接の前駆体である GA₉ から活性型の GA₄ への酸化反応は gibberellin 3-oxidase (GA3ox) により触媒される。イネゲノム上には 2 つの GA3ox オルソログが存在し、そのうち *OsGA3ox1* は薬に特異的に遺伝子発現する一方で、*OsGA3ox2* は植物体全体に発現する。このように合成された活性型 GA は、GA 不活化酵素である gibberellin 2-oxidase (GA2ox) によりジベレリン骨格上の 2 位の炭素に水酸基を付加されることで GID1 との結合が弱められ、不活化される。

GA は約 95 年前に「馬鹿苗病」の原因である病原菌「*Gibberella fujikuroi*」がイネに感染して合成する原因物質として初めて単離された。「*Gibberella fujikuroi*」は感染した植物体内で活性型の GA₃ を合成する。この GA₃ はジベレリン骨格の 1 位と 2 位の炭素間に二重結合を持つため、上記のような GA2ox による不活化を受けない。そのため、馬鹿苗病を罹患したイネは恒常的な GA 応答により徒長し、最終的には枯死する。植物にとって体内の GA 量を調節することは重要であるため、そのための機構がいくつか存在する。例えば、GA 合成酵素の GA3ox と GA 不活化酵素の GA2ox はともに植物体内の内生 GA 量による遺伝子発現フィードバック制御を受ける場合が多い。また近年、GA 不活化酵素の *OsGA2ox3* は内生

GA の濃度依存的に 4 量体を形成し、アロステリックにその酵素活性を調節することが本研究室の竹原博士らにより報告された。

しかしながら一方で、イネの葯には茎葉部の 100 倍以上の濃度の活性型 GA が存在することが知られており、そのような GID1 受容に必要な量を遥かに超えた多量の GA がどのような下流応答を制御しているのか、またどの酵素がそのような多量の GA を合成しているのかは未だ不明であった。これまでにイネの葯では上記の GID1-GA-DELLA system により制御される下流因子として GAMYB 転写因子が知られている。GAMYB は花粉発達の早期において葯のタペータム細胞のプログラム細胞死およびそれに伴う花粉小胞体表面への花粉外皮成分であるスポロポレニンの供給を誘導する。このように葯と花粉における GA の機能は成熟の早期、すなわち sporophytic な機能が主に知られていたが、花粉の成熟後期における gametophytic な機能や上記のような過剰な GA の機能については不明であった。

第 2 章では上に述べたイネの葯に存在する多量の GA がどのような生理応答を制御しているのかを明らかにすることを目的に、これまで単離されていなかった *osga3ox1* ノックアウト変異体を CRISPR/Cas9 system により作出し、その表現型解析を行った。*OsGA3ox1* の葯での特異的な発現と一致するように *osga3ox1* 変異体では野生型と比較して活性型 GA の GA₄ および GA₇ の葯での内生量が有意に低下しており、また成熟花粉にデンプンが蓄積されないという表現型が観察された。さらに、*osga3ox1* 変異体では野生型と比較して葯に過剰なスクロースが蓄積した。以上から、*osga3ox1* の葯ではスクロース分解酵素のインベルターゼに異常があるためデンプンが蓄積しないと考えられた。これを明らかにするため葯および花粉の細胞成分を分画し各画分のインベルターゼ活性の測定および酵素タンパク質を解析したところ、細胞壁インベルターゼの cell wall invertase 3 (OsCIN3) の適切な細胞壁への保持に異常があることが原因であるとわかった。これらの結果はこれまで知られていた花粉発達の比較的早期における sporophytic な機能とは異なり、発達後期での gametophytic な機能を示すものである。

また第 2 章では竹原博士らとの共同研究により OsGA3ox2 の立体構造および基質、補基質との結合アミノ酸残基を明らかにした。タンパク質一次配列の比較から、OsGA3ox1 では補基質 2 オキシグルタル酸と結合する 1 つの残基が OsGA3ox2 やその他の 2ODD ファミリータンパク質がもつチロシンとは異なりフェニルアラニンに置換していることがわかった。このアミノ酸残基の置換により OsGA3ox1 は前駆体 GA₉ から活性型の GA₄ だけでなく同じく活性型で GA_{2ox} による不活化を受けない GA₇ を多量に合成できることが示唆された。GA₇ は GA₃ と構造的に類似し植物体内で非常に強い生物活性を示すが、これが上記の花へのデンプン蓄積に重要であると考えられた。以上の解析に加え、OsGA3ox1 が持つ多量の GA₇ 合成能の高さの要因を進化的観点から明らかにすることを目的にイネ属植物から単離

した *GA3ox1* を用いて酵素活性および遺伝子発現の解析を行った。その結果、*GA3ox1* はイネ (*O. sativa*) から *O. brachyantha* の共通祖先において GA_7 を多量に合成するために重要なフェニルアラニンを獲得し、 GA_7 合成能を高める進化を遂げたことがわかった。加えて、薬に特異的に遺伝子発現をするという *OsGA3ox1* の発現の特異性についても、イネ属で進化の過程で得られた独自の特徴であることが明らかとなった。これらの結果から、イネは薬で多量の GA_4 と不活化を受けない GA_7 を合成し、そのような多量の活性型 GA が花粉でのデンブレン合成に正に作用するという特徴的な生殖様式およびそれを達成可能な酵素の進化を遂げたと考察した。

osga3ox1 ノックアウト変異体では花粉のデンブレン蓄積の異常に加え、正常な開花が起らず穎花が閉じたまま不稔となるという表現型も観察された。イネの穎花には内穎の基部に鱗被という器官が存在しており、これは双子葉植物の花弁に相当する。イネの開花時刻は野生型の日本晴では通常午前 11 時頃であり、この際鱗被が膨潤することで物理的に外穎を押し出し、開花が駆動されることが知られている。そして開花の約 90 分後には鱗被が収縮し、それに伴って穎花は閉じる。このような比較的短い時間の間に鱗被は膨潤・収縮というダイナミックな形態変化を起こすが、このような鱗被の形態変化にはいくつかの植物ホルモンが関わるということが知られている。オーキシシン (IAA) は胚発生、細胞増殖、細胞伸長などを制御する植物ホルモンである。活性型 IAA 不活化酵素の dioxygenase for auxin oxidation (DAO) のノックアウト変異体の *dao* 変異体では、第 2 章で明らかにした *osga3ox1* 変異体と同様に野生型で観察されるような開花が見られず、花が閉じたまま不稔となる。別の植物ホルモンのジャスモン酸 (JA) の合成酵素 Jasmonate resistant 1 (JAR1) の変異体、*jar1* 変異体では、開花時刻が不定となるほか開花 90 分後の鱗被の収縮が起らず、穎花が開いたままとなる。このようにイネの花と植物ホルモンとの関連はこれまでにいくつか報告されているものの、植物ホルモンがどのように開花・閉花に作用しているのかについては不明な点が多く残されている。

第 3 章では GA 、 IAA 、 JA の関連変異体、*osga3ox1*、*dao*、*jar1* 変異体を用いて、開花前中後における鱗被の形態変化および RNA-seq を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。開花時の鱗被鱗被の形態については 100 年以上前から研究が行われている。しかしながら、内部まで細胞レベルで立体的にとらえた研究はこれまでになかった。これを達成するため、本研究では X 線顕微鏡 (X-ray microscope, XRM) を用いた。XRM は動物分野では頻繁に用いられるものの、植物での形態観察ではほとんど用いられていない手法である。これを用いることにより、開花前中後における鱗被の断面構造を非破壊的に得ることに成功した。開花前において日本晴では鱗被の部位ごとに細胞の大きさが不均一であり、維管束は片側の鱗被に約 20 本が走ることを見出した。また開花前の *jar1* 変異体の鱗被は形態的な異常が観察されなかったものの、細胞内での糖代謝などに関連する遺伝子の発現に異常が見られた。

osga3ox1 変異体と *dao* 変異体では細胞の大きさが部位により比較的均一であり、さらに Ca^{2+} シグナル関連遺伝子の発現に異常があることがわかった。開花中の *jar1* 変異体の鱗被では野生型と比較して形態的な異常が見られなかったものの、開花後においても開花前や開花中から形態的な変化をしておらず、またこの際に K^+ や Ca^{2+} イオンの輸送に関わる遺伝子の発現に異常があった。以上のように本論文では各変異体の形態および遺伝子発現の異常を明らかにした。

本論文ではこれまでほとんど不明であったイネの花粉における GA の gametophytic な機能を明らかにした。本研究成果によりイネの花粉の発達機構の解明がより一層進展することを期待する。また、イネの薬に特異的に発現をする *GA3ox1* の進化に関する知見は重要な作物であるイネの生殖様式の理解に繋がり、将来の食糧危機の回避に貢献する重要な研究成果であると考ええる。さらに、イネ開花時の鱗被の形態変化および遺伝子発現の解析はイネの開花制御技術の開発につながるだけでなく、F1 育種や花器官内部の外環境ストレスからの保護など育種分野への貢献も期待される。さらに、本研究は XRM を用いた形態観察に成功した事例として、植物研究における XRM 利用の先駆けにもなりうるものと考ええる。