

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 Study on Gibberellin Signaling and Transport in Rice
(イネにおけるジベレリンのシグナル伝達および輸送に関する研究)

氏名 杉原 諒彦

論文内容の要旨

ジベレリン (GA) は、黒沢栄一により馬鹿苗病の原因物質として発見され、藪田貞治郎により単離・命名された植物ホルモンである。現在では、植物、菌類、細菌から 130 種以上の GA が同定され、茎の伸長、種子の発芽、開花など、植物の様々な生理作用に関わることが報告されている。そのため、農業においても GA は植物成長調節物質として種なしブドウの作出などに広く利用されている。なかでも、1940 年代から 1960 年代にかけて穀物の増産を成し遂げた「緑の革命」では、複数の穀物にて GA 関連遺伝子の半矮性変異体品種が耐倒伏性を向上させるため利用された。

GA は植物体内において多段階の酵素反応によってゲラニルゲラニルニリン酸 (GGDP) から合成される。GGDP は、*ent*-copalyl diphosphate synthase (CPS) と *ent*-kaurene synthase (KS)、*ent*-kaurene oxidase (KO)、*ent*-kaurenoic acid oxidase (KAO) による多段階の反応を経て活性型 GA 前駆体である GA₁₂ へと変換される。その後の生合成経路は、13 位非水酸化経路と 13 位水酸化経路に分岐する。前者では、13 位の炭素に水酸基を持たない GA₁₂ が GA20 酸化酵素 (GA20ox) により GA₁₅、GA₂₄、GA₉ に変換され、GA₉ が GA3 酸化酵素 (GA3ox) により活性型 GA である GA₄ が合成される。後者の経路では、GA₁₂ の 13 位の炭素が水酸化され GA₅₃ へ変換されたのち、GA20ox を介した反応により GA₄₄、GA₁₉、GA₂₀ に順次変換され、GA₂₀ は GA3ox によって活性型 GA である GA₁ に変換される。

2 つの生合成経路のうち、どちらが主に働くかは植物種によって異なる。シロイヌナズナでは 13 位非水酸化経路が主に働き、エンドウでは 13 位水酸化経路である主に用いられる。一方で、イネは栄養成長期には 13 位水酸化経路を、葯などの生殖器官では 13 位非水酸化経路をそれぞれ利用し、2 つの経路を器官により使い分けている。

活性型 GA が受容体である GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) と結合することで GA のシグナル伝達は始まる。GID1-GA 複合体は、GA シグナル抑制因

子である DELLA タンパク質と結合する、DELLA タンパク質と SCF 複合体の相互作用を促進する。その結果、DELLA タンパク質は SCF 複合体によりポリユビキチン化され、最終的に 26S プロテアソーム系によって分解される。この DELLA タンパク質の分解、つまり、GA シグナル抑制因子の分解により、GA 応答が起こる。

上記のように、DELLA は GA シグナルの重要な制御因子であり、その配列は高度に保存されている。N 末端側には DELLA モチーフと TVHYNP モチーフを含む DELLA ドメインを持ち、GA 依存的に *GID1* と結合する。C 末端側は GRAS ドメインを持ち、様々な転写因子と相互作用し GA 応答の抑制に関与しているとされる。

DELLA には、2 種類の転写調節機構が知られている。第一に、DELLA タンパク質が PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR) や MYB などの様々な転写因子と相互作用し、これらの転写因子の DNA への結合と転写活性を阻害する機構である。第二に、DELLA タンパク質が INDETERMINATE DOMAIN (IDD) を介して DNA と結合し転写のコアクティベーターとして働く機構である。DELLA タンパク質の DELLA/TVHYNP ドメインは強い転写活性を持つ。この転写活性により、DELLA は GA フィードバック制御に関与していると考えられている。

GA のトランスクリプトーム解析は数多く報告されているが、GA によるシュート伸長のメカニズムはいまだ解明されていない。Claeys H.ら (2014) はシロイヌナズナにてシュートや根の GA に関連するトランスクリプトームデータについてメタアナリシスを行ったところ、共通した発現変動遺伝子は少なく、その多くは GA のフィードバック遺伝子であったと報告している。そこで、私は GA による伸長機構を解明するためには、各発生段階に分けてトランスクリプトーム解析を行う必要があると考えた。

第二章では、GA 生合成遺伝子 *OsKO2* のウィークアイルを持つ短銀坊主の第二葉鞘を実験に使用し、分裂帯、伸長帯、成熟帯を分けてトランスクリプトーム解析を行った。この際に、第二葉鞘の各部位を各発生段階に区分するため、X 線マイクロ CT (computed tomography) スキャンを利用した。これにより、第二葉鞘を非破壊的に三次元構造と縦断面の解析することに成功し、第二葉鞘は、基部に分裂帯を持ち、上部へ向かうにつれて細胞が伸長することが分かった。X 線マイクロ CT スキャンの結果と RNA-seq 解析によるマーカー遺伝子の発現と合わせて分裂帯、伸長帯、成熟帯に分け KEGG Pathway 解析を行うと、GA が糖代謝、細胞壁合成、TCA サイクルなどに関わるパスウェイの遺伝子の発現を誘導することが分かった。また、葉鞘のグルコース、スクロース、デンプンの定量分析をとおして、GA 処理区ではデンプンとスクロースの量が少なく、分解されていることが確認された。これらの結果は、GA が糖代謝を調節することにより、植物の成長を促進することを示唆している。

第 3 章では、イネの DELLA タンパク質 (SLENDER RICE1 (SLR1)) についてのウェスタンブロットティングおよびトランスクリプトーム解析を用いて、イネ第二葉鞘における GA シグナル伝達について報告している。ウェスタンブロットティングでは、イネ第二葉鞘では分裂帯と伸長帯において SLR1 タンパク質がより分解され、成熟帯では蓄積していた。これは、成熟帯では SLR1 タンパク質の分解を受けにくく、GA シ

グナルが流れづらいためと考えられる。このような成熟帯での GA シグナルの弱さは主成分分析でも認められ、GA 処理区の成熟帯のサンプルは GA 無処理区の成熟帯のサンプルと近しい性質を示した。

GA の局在と輸送は生合成やシグナル伝達と合わせ GA 応答において重要である。近年菅野ら (2016) は、シロイヌナズナにて糖輸送体である SWEET タンパク質が、ジベレリンを輸送していることを報告した。第 4 章では、イネにおいても SWEET タンパク質がジベレリンの輸送に関わるか 16 種類のイネの SWEET ファミリータンパク質について yeast three-hybrid 法と LC-MS/MS 法にて調べた。その結果、グルコース輸送体である OsSWEET3a が GA の輸送活性を持つことを明らかにした。とりわけ、OsSWEET3a は 13 位に水酸基を持つ GA に高い輸送活性を有した。さらに、*ossweet3a* ノックアウト変異体を作成し、その表現型を野生型とすると幼苗期の生育に遅延がみられ、この生育の遅延は地上部への GA 処理、特に前駆体である GA₂₀ の投与により回復した。OsSWEET3a が 13 位水酸化型の GA に高い輸送活性を示す点と幼苗期の生育に遅延がみられる点は、イネが栄養成長期に主要な活性型 GA の合成経路として 13 位水酸化経路を利用している知見とも一致する。また、*ossweet3a* 変異体と野生型の茎頂付近のデンプンの蓄積をヨウ素デンプン反応にて確認したところ、*ossweet3a* 変異体では維管束周辺のデンプン蓄積が少なかった。このことは *ossweet3a* 変異体ではグルコースの輸送が妨げられていることを示唆している。

つぎに、*OsSWEET3a* の遺伝子発現を quantitative real-time reverse transcription PCR 法と *in situ* hybridization 法にて調べたところ、*OsSWEET3a* の発現は、幼苗の基部に位置するメソコチルの維管束組織で高い発現を示した。併せて GA 前駆体合成酵素である *OsGA20ox1* と活性型 GA の最終合成酵素である *OsGA3ox2* の遺伝子発現部位を *in situ* hybridization 法にて調べた。すると、*OsGA20ox1* の遺伝子発現が *OsSWEET3a* と重なる一方で、活性型 GA の最終合成酵素である *OsGA3ox2* の遺伝子発現は葉原基と若い葉で見られた。

以上の結果から、OsSWEET3a が幼苗の基部において OsGA20ox1 により合成された GA 前駆体合 GA₂₀ の葉原基や若い葉への輸送を行い、OsGA3ox2 が活性型 GA である GA₁ に変換する。併せて、OsSWEET3a はグルコースの輸送に関わることで、GA とエネルギー源である糖の共輸送体として機能し、イネの初期成長を促進していることが分かった。

さらに、他のイネ科植物 (パイナップル、オオムギ、ウマゴヤシ、ソルガム、トウモロコシ) の SWEET3 タンパク質について、yeast three-hybrid 法を用いて GA の輸送活性を調べたが、GA 輸送活性を持つものはソルガムの SWEET3a のみであった。また、ソルガムの SWEET3a は 13 位非水酸化型の活性型 GA である GA₄ の輸送活性を示し、OsSWEET3a とは輸送する GA の種類が異なった。シロイヌナズナにて GA 輸送活性が報告された AtSWEET13, 14 がスクロースの輸送体であることを考慮すると、SWEET タンパク質の GA 輸送活性は植物が進化の過程で散発的に獲得してきたと考えられる。