

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 杉原 諒彦  
 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)

### 論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	上口 美弥子
委 員	名古屋大学教授	芦 苺 基行
委 員	名古屋大学教授	佐塚 隆志
委 員	名古屋大学教授	榊原 均
委 員	名古屋大学准教授	野田口 理考
委 員	名古屋大学助教	大井 崇生

## 論文審査の結果の要旨

杉原諒彦は、ジベレリン (GA) によるイネ葉鞘伸長応答を解析することで、新たな GA シグナル伝達機構の可能性、ならびに GA と糖の共輸送について明らかにした。以下にその要旨を記載する。

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。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に利用された。

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二リン酸 (GGDP) から合成される。GGDP は、プラスチドにて *ent*-copalyl diphosphate synthase (CPS) と *ent*-kaurene synthase (KS) によって、エントカウレンに変換されたのち、小胞体膜で 2 つのチトクローム P450 酸化酵素、*ent*-kaurene oxidase (KO) と *ent*-kaurenoic acid oxidase (KAO) によって前駆体である GA<sub>12</sub> へ変換される。その後、細胞質にて 13 位非水酸化経路または 13 位水酸化経路を経て GA<sub>12</sub> から活性型 GA が生成される。前者の経路では、13 位の炭素に水酸基を持たない GA<sub>12</sub> が GA20 酸化酵素 (GA20ox) を介した反応により GA<sub>15</sub>、GA<sub>24</sub>、GA<sub>9</sub> に変換され、GA<sub>9</sub> は GA3 酸化酵素 (GA3ox) により活性型 GA である GA<sub>4</sub> に変換される。後者の経路では、GA<sub>12</sub> の 13 位の炭素が水酸化され GA<sub>53</sub> へ変換されたのち、GA20ox の触媒反応により GA<sub>44</sub>、GA<sub>19</sub>、GA<sub>20</sub> に順次変換され、GA<sub>20</sub> は GA3ox によって活性型 GA である GA<sub>1</sub> へと変換される。2 つの生合成経路のどちらが主要経路として使われるかは植物種によって異なる。イネは栄養成長期には 13 位水酸化経路が主要な活性型 GA の合成経路であるのに対し、葍などの生殖器官では 13 位非水酸化経路が主に利用される。

GA のシグナル伝達は活性型 GA が GA 受容体 GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) に結合することで始まる。GID1-GA 複合体は、DELLA ドメインを介して GA シグナル抑制因子である DELLA タンパク質と相互作用し、DELLA タンパク質と SCF 複合体の結合を促進する。その結果、DELLA タンパク質は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る。そして、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 依存的な GID1 との結合に関わる。C 末端側は GRAS ファミリー転写因子に共通した GRAS ドメインを持ち、様々な転写因子と相互作用する。

DELLA タンパク質には、ターゲットの違いにより 2 種類の転写調節があると考え

## 論文審査の結果の要旨

## 別紙 1-2

られている。1つは、DELLAがPHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF) や MYB などの転写因子と相互作用し、転写因子がプロモーター領域に結合することを阻害する働きであり、ターゲットは GA 誘導遺伝子と考えられる。他方は、DELLA が INDETERMINATE DOMAIN (IDD) 等を介してプロモーター領域に結合し転写のコアクティベーターとして働くものである。DELLA タンパク質の DELLA/TVHYNP ドメインは強い転写活性を持つことから、GA 生合成遺伝子や *GID1* のような GA でフィードバックを受ける遺伝子をターゲットとして、正の転写制御を行うとされる。

DELLA は、どのようにして上記のような転写抑制と転写促進という、いわば真逆な転写制御を可能にしているのだろうか。杉原はこの疑問に答えるためには、まず GA 応答遺伝子の正確な同定が必要であると考えた。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。しかしながら、Claeys H.ら (2014) はシロイヌナズナで行われたシュートや根の GA に関連するトランスクリプトームデータの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、唯一共通していた少数のものは GA のフィードバック遺伝子関連であったと報告している。これは、同じ組織における様々な発達段階にある細胞が混在している状態で解析しているためであると考えられた。そこで、杉原は、イネシュートの各発生・発達段階に分けたトランスクリプトーム解析を行うことにした。

第二章では、GA 生合成遺伝子 *OsKO2* のウィーク変異アリ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 GA 処理および無処理の葉鞘を各々分裂帯、伸長帯、成熟帯に分け KEGG Pathway 解析に供した。その結果、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、1 mm ずつに分けた第二葉鞘のグルコース、スクロース、デンプンの定量分析から、GA 処理区では未処理区と比較してデンプンとスクロースの量が減少していることが分かった。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。

第三章では、イネの DELLA タンパク質 (SLENDER RICE1 (SLR1)) について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行い、イネ葉鞘における 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により、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る一方、成熟帯

## 論文審査の結果の要旨

では蓄積していることが分かった。これは、成熟帯では SLR1 タンパク質の分解を受けにくく、GA シグナルが流れにくいためと考えられた。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い性質を示した。また、トランスクリプトームにおける GA 処理により発現が変動した遺伝子の Heat map から、GA 処理と無処理では、発達段階に依存する発現パターンはほぼ相似しており、GA 処理はその発現量の変動を増強していると考えられた。さらに、DELLA タンパク質の N 末側と C 末側を見分ける抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、N 末の転写活性化ドメインを持たないと考えられる SLR1 の C 末断片がの検出に違いが見られ、この断片は DELLA の全長と同様に GID1 や GID2 依存的に GA により分解されることを見出した。杉原は、この N 末の転写活性化ドメインを持たない SLR1 の C 末端断片が直接クロマチンに作用し転写抑制している可能性を考察した。

GA の局在と輸送は生合成やシグナル伝達と合わせ GA 応答において重要なプロセスである。近年菅野ら (2016) によって、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が報告された。第四章では、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っているかどうかを 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。なかでも、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出したところ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 GA<sub>20</sub> 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ものである。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に乏しいことを確認した。このことは *ossweet3a* 変異体では、GA のみならずグルコースの輸送も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。合わせて 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に限定されていた。

## 論文審査の結果の要旨

別紙 1-2

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 GA<sub>20</sub> の葉原基や若い葉への輸送を行い、OsGA3ox2 が活性型 GA である GA<sub>1</sub> に変換すると考えられた。併せて、OsSWEET3a はグルコースの輸送に関わることで、植物成長調節物質とエネルギー源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も、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 GA<sub>4</sub> 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偶発的に獲得してきたと考えられる。

本研究では、GA が糖代謝の制御を介してシュート伸長を促進すること、ならびに GA が糖とともに植物体基部から地上部へと輸送されることを明らかにした。GA は種子にて  $\alpha$ -アミラーゼの発現を誘導することで胚乳のデンプン分解、さらに発芽を促進することが知られている。本研究成果は、シュート伸長においても同様に GA と糖が密接にかかわっていることを示した。さらに、X 線マイクロ CT スキャンとトランスクリプトームを組み合わせることにより、葉鞘の分裂・伸長・成熟部分における GA 応答遺伝子群を同定した。これらの遺伝子は、GA 有る無しに関わらず、同じ様な部位に発現していたが、GA 処理はその発現量の変動を増強していることを明らかにした。また、これら遺伝子の GA 応答には、転写活性化ドメインが欠損している SLR1 の C 末断片がクロマチンに結合することで転写をより抑制しているという可能性を示した。この結果は、今後の GA のシグナル伝達研究の新たな方向性を与えるものである。

したがって、本委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。