

主論文の要約

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)

杉原 諒彦

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、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 GA₁₂ 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 GA₁₂ から活性型 GA が生成される。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) を介した反応により GA₁₅、GA₂₄、GA₉ に変換され、GA₉ は GA3 酸化酵素 (GA3ox) により活性型 GA である GA₄ に変換される。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 の触媒反応により 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。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 位水酸化経路が主要な活性型 GA の合成経路であるのに対し、葯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) と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提案されている。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、私はイネのシュートにおける伸長の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 のウィークアリア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 解析に供した。すると、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から、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ブロットリ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。ウェスタブロットリングでは、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っているか 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。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。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。

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、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。

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と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 α -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ている。さらに、本研究にて用いたX線マイクロCTスキャンは形態観察にて強力な手段であった。とりわけ切片製作の難しい縦断面の観察において、パソコン上の三次元データから任意の断面画像を抽出可能な点は本手法の大きな強みである。本研究は植物科学分野においてX線マイクロCTスキャンを活用した先駆けになりうると考える。