

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 Analysis of the transcriptional regulatory complexes for
phytohormone signaling pathways
(植物ホルモンのシグナル伝達を制御する転写調節複合体の解析)
氏名 吉田 英樹

論文内容の要旨

植物ホルモンは植物の生長や発達の過程を司っている化学物質である。20世紀前半にオーキシシン、アブシジン酸、サイトカイニン、ジベレリン、エチレンといった代表的な植物ホルモンが単離されて以降、現在までにブラシノステロイドやジャスモン酸、サリチル酸、そしてストリゴラクトンなど 10 種類前後の物質が植物ホルモンとして認識されている。これらのホルモンが持つ生理作用、および直接的な認識にかかわる受容機構が解明されてきている一方で、受容機構と生理作用を繋ぐもの、つまり遺伝子発現調節を含むシグナル伝達機構の解析は困難を極めている。何故ならば、ホルモンの生理作用として考えられているものの多くは「開花」や「伸長」などであり、それはおよそ 1 つや 2 つのタンパク質で説明がつけられるものではないためである。これを解決するためには網羅的な関連遺伝子の探索、および多数の転写制御因子を含む転写複合体の存在を踏まえた解析が必要であり、未解明の点が多く残されている。

ジベレリンは、植物の伸長、種子の発芽や開花の促進など様々な成長過程を正に制御する植物ホルモンである。約 90 年前、ジベレリンは「馬鹿苗病」と呼ばれるイネの病気を引き起こす病原菌 *Gibberella fujikuroi* が持つ病原物質として単離された。最初にジベレリンが単離されてから、130 種類以上の類縁体が、植物を始め菌類や細菌から発見されてきているが、その中で植物体内において活性を持っているものはごく僅かである。

ここ数十年、イネやシロイヌナズナの変異体を使った遺伝学的研究によってジベレリンの受容とシグナル伝達に関わる多くの遺伝子が明らかにされ、その受容・伝達メカニズムがわかってきた。ジベレリンシグナル伝達に関わる因子の中で最も重要な因子の 1 つと考えられているのは DELLA と呼ばれる一群のタンパク質である。DELLA は植物特異的な転写制御因子で、GRAS ファミリーと呼ばれる一群の転写制御因子ファミリーのサブファミリーと位置づけられている。シロイヌナズナは DELLA を

GA-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF *ga1-3* (RGA), RGA-LIKE 1 (RGL1), RGL2, RGL3 の 5 種類、イネは SLENDER RICE 1 (SLR1) の 1 種類を持っている。数多くの GA 関連変異体の解析により DELLA の分解については、GA の受容体である GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) が GA と結合することで DELLA と結合し、DELLA のユビキチン化および分解を導くことで GA 応答が起きるという機構が詳細に明らかにされている。一方で、DELLA タンパク質がどのように下流の遺伝子発現を制御して GA 応答を抑えているのかについてはまだ多くの謎が残されている。これまでの研究により、DELLA タンパク質は明確な DNA 結合ドメインを持たないにも関わらず、様々な下流遺伝子の制御を行っていることから、2 通りの制御機構を持っていることが提唱されている。

1 つは転写因子と結合することにより、その転写因子と DNA の結合を阻害する機構である。2008 年に de Lucas らおよび Feng らは光シグナルに応答して胚軸の伸長を担う転写因子である PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF) が DELLA タンパク質と結合し、その結果 PIF の DNA 結合能が失われ、胚軸伸長が妨げられることを発見した。その後、PIF ファミリーだけでなく様々なファミリーに属する数多くの転写因子がこのメカニズムによって DELLA および GA シグナル伝達の制御を受けていることが提唱されている。

もう 1 つのメカニズムは DELLA が他の転写因子を介して DNA と間接的に結合することである。DELLA それ自身が強い転写活性化能を持つことは DELLA が単離されたころから明らかになっており、また DELLA タンパク質が GA シグナルを抑制する機能の他に、GA 合成酵素や受容体、およびシグナル伝達を正に制御する因子の発現を上昇させることで GA シグナル伝達のフィードバック機構も担っていることがわかってきた。しかし、具体的にどの因子が DELLA と結合してこのフィードバック機構を担っているのか、また DELLA が本当に間接的に DNA と結合することがあるのかは明らかになっていなかった。

第 1 章では、この GA シグナル伝達研究において残された重要な課題の 1 つである DELLA によるフィードバック機構の解明を目指して研究を行った。転写因子ライブラリーを用いたスクリーニングを行った結果、INDETERMINATE DOMAIN (IDD) ファミリーと呼ばれる一群のファミリーに属する転写因子が DELLA タンパク質および DELLA の下流遺伝子のプロモーターと結合することがわかった。その後の解析により、DELLA タンパク質が IDD を介して DNA と結合することで転写活性化能を発揮し、GA シグナル伝達のフィードバック機構を担っていることが明らかとなった。また、その下流遺伝子の 1 つである SCL3 についても機能解析を行い、この SCL3 も IDD と結合すること、そしてその結合は DELLA と拮抗していることがわかった。このことから GA シグナル伝達のフィードバック機構には co-activator/co-repressor exchange system が存在しており、DELLA と SCL3 が IDD を介して拮抗的に下流遺伝子を調節することで GA シグナルのフィードバック制御を担っていることが明らかとなった。

オーキシシンとブラシノステロイドは共に植物の細胞伸長などの重要な生理作用を持つ植物ホルモンである。オーキシシンは最初に植物ホルモンとして認識された化学物質であり、ギリシャ語で成長を意味する *auxein* にちなみ *auxin* と命名された。植物が主に生体内で利用しているものはインドール-3-酢酸(IAA)であるが、これ以外にも2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)や1-ナフタレン酢酸(NAA)などが合成オーキシシンとして農業利用されている。一方、ブラシノステロイドはステロイド構造を持つ植物ホルモンである。置換基の異なる様々なブラシノステロイドが存在するが、活性の最も高いものはブラシノライドであり、これが最初に単離されたブラシノステロイドでもある。

古くからこの2つのホルモンのシグナル伝達のクロストークについては広く研究が行われている。最近の研究結果によればシロイヌナズナにおいては、オーキシシンもブラシノステロイドも胚軸の伸長を担っており、そのクロストークはオーキシシンの下流で働いている転写因子である AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) とブラシノステロイド下流の転写因子 BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1)が直接結合し、複合体として下流遺伝子の制御を行っていることによると示されている。単子葉植物であるイネについてはオーキシシンとブラシノステロイドのクロストークによって引き起こされる特徴的な形質として、葉の角度が制御されていることがわかっている。葉の角度は、光合成効率に直結する重要な農業形質であり、育種の対象となっている重要な形態である。しかしながら、イネにおいてはこの2つの植物ホルモンのクロストークを担っている分子メカニズムについては殆ど知見がなかった。

イネのオーキシシンシグナル伝達に関して、安益らにより *small organ size1 (smos1)* という葉や根を始めとした様々な器官が小さくなる変異体の原因遺伝子として AP2 型の転写因子をコードする *SMOS1* 遺伝子が単離されている。オーキシシンはこの *SMOS1* の発現を上昇させることで下流遺伝子である *OsPHI-1* の発現を誘導し、器官の大きさを制御することが示されていた。

第2章では、上記 *smos1* 変異体と非常によく似た表現型を示すイネ突然変異体 *smos2* の解析を行った。その結果、原因遺伝子 *SMOS2* は過去の研究によりブラシノステロイドによって活性が正に制御される GRAS ファミリーに属する転写制御因子であることが明らかとなった。*smos1* と *smos2* の表現型が非常によく似ていたことを踏まえ研究を進めた結果、*SMOS1* と *SMOS2* は複合体を形成し、協同して *OsPHI-1* の発現を誘導することを明らかにした。そして、遺伝子発現だけでなく、*SMOS1*-*SMOS2* 複合体がオーキシシンとブラシノステロイドによる器官の大きさの制御や葉の角度の制御に関わっていることを示した。以上の結果は *SMOS1* と *SMOS2* が複合体を形成することが、イネにおけるオーキシシンシグナルとブラシノステロイドシグナルのクロストークポイントであることを意味する結果であり、イネにおいて始めてこの2つのシグナル伝達のクロストークの分子実体を明らかにすることができた。また *SMOS1* が *SMOS2* 以外の複数の GRAS タンパク質と結合することも明らかとなり、複雑な転写制御ネットワークの存在が示唆された。