

論文内容の要旨

小川 幹弘

植物ホルモンの一つであるジベレリン (GA) は種子発芽促進、葉条の伸長成長促進、その他様々な生理作用を植物体に及ぼすことが知られており、植物が生育していく上で重要な役割を担っている。GAの作用に関しては多くの生理学的、生化学的研究がなされている一方で、分子レベルでの解析は、穀類の種子発芽時におけるGAによる α -amylase遺伝子の転写制御といった一部の現象に限られていた。単子葉植物 (特に穀類) の葉条の伸長成長におけるGA作用の分子レベルでの解明は、耐倒伏性植物体を作ることを可能にするなど、農業的にも有効と考えられる。

本研究では、葉条の伸長成長に与えるGAの作用を分子レベルで調べるために、トウモロコシの芽生えからGAに応答する遺伝子群の単離をめざした。その過程で*ZmGR1a*、*ZmGR2a*を得た。*ZmGR1a*、*ZmGR2a*はGA処理後、少なくとも1時間、6時間で各々のmRNA蓄積量が顕著に増加した。*ZmGR1a*は、いくつかの植物から単離されているプロリンに富むタンパク質と相同性を示し、N末端にシグナルペプチドを、C末端に膜貫通領域を有することから膜タンパク質であると推定された。*ZmGR2a*は、N末端に12アミノ酸からなる繰り返し配列を持ち、非常に親水性に富む新規タンパク質である。*ZmGR1a*、*ZmGR2a*をプローブとして、RNAブロット解析、*In situ* ハイブリダイゼーションを行った。伸長成長や細胞分裂の活発な組織や器官で、*ZmGR1a*および*ZmGR2a* mRNAの蓄積がみられた。この発現場所は、GAの作用部位と一致し、*ZmGR1a*、*ZmGR2a*がGAの生理作用に関わっていることを強く支持する。

アラビドプシスを用いた突然変異体の解析から、GAが葉条の伸長を促進する際の情報伝達経路に関わる遺伝子が単離されている。*GAI* (*GA Insensitive*) はGA非感受性突然変異体から単離された遺伝子で、VHIID型の新規転写調節因子をコードすると想定される。*SPY* (*Spindly*) は恒常的にGAに応答している突然変異体から単離された遺伝子で、その遺伝子産物はO-linked N acetylglucosamine transferaseをコードすると考えられる。遺伝学的な解析から、*GAI*と*SPY*は同一のGA情報伝達経路で、負の調節因子として働いていると推定された。しかし、現在のところ*GAI*や*SPY*の機能に関する報告は無い。本研究の後半では、単子葉植物 (特に穀類) におけるGAの情報伝達経路を明らかにするために、イネから*GAI*ホモログ (*OsGAI*) を単離し、遺伝子発現の特徴付けと遺伝子産物の機能解析を行った。*OsGAI*はGA処理により、mRNA蓄積量が増大すること、その際、新規タンパク質の合成は必要でないことがわかった。*OsGAI*-GFPを生産した植物では、核でのみ蛍光が観察されたことから、*OsGAI*が転写制御因子である可能性を裏付けた。そこで、Gal4を用いたTwo hybridの系を用いて、植物細胞で転写活性化能を調べたところ、*OsGAI*は転写活性化能をもつことが明らかになった。さらに、その転写活性化領域は*OsGAI*の69-276アミノ酸の間に存在することが分かった。この領域はSerに富む配列を含み、それは転写制御因子であるOct-1の転写活性化領域の配列とよく一致する。さらに興味深いことに、この*OsGAI*のSerに富む配列は、*SPY*が糖鎖を付加するターゲットの配列になりうる。このことは*SPY*による糖鎖付加が、*OsGAI*の転写活性化を調節している可能性を示唆する。

本研究により、トウモロコシの葉条伸長の際に機能すると考えられる2種のGA応答性遺伝子を明らかにすることができた。GAは細胞壁を弛めるのと同時に、細胞内の溶質濃度を高め、水を吸水することで細胞の伸長を促すことが知られている。*ZmGR1a*は細胞膜に局在し、この細胞壁の伸展性の増大に関与しているかもしれない。一方、*ZmGR2a*は親水性のタンパク質で、細胞質に局在すると推定されることから、細胞内の浸透圧を高める役割を担っているかもしれない。次に、これらの遺伝子上流にあるGA情報伝達経路を調べるために、イネから*GAI*ホモログである*OsGAI*を単離し、その遺伝子産物が転写活性化能を有することを見出した。つまり、*OsGAI*が転写活性化因子もしくは転写のコ・アクティベーターとして機能することを示唆する。このことは、*OsGAI*が何らかの遺伝子を活性化することで、伸長成長を抑制していると考えられる。この*OsGAI*の標的遺伝子として、リプレッサー様のタンパク質が挙げられる。*OsGAI*はリプレッサータンパク質の転写を活性化し、その遺伝子産物がGA応答遺伝子の転写を抑制するという仮説が成り立つ。いずれにしても、*OsGAI*の標的遺伝子の探索が必至である。以上明らかにしてきた穀類でのGAの作用機構の解明は、農業上重要な意義をもつであろう。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 小川幹弘

ジベレリンは種子発芽促進、葉条の伸長生長促進など様々な生理作用を植物に及ぼす。その作用機構について多くの生理学的、生化学的研究がなされているが、分子レベルでの解析は遅れている。穀類種子の発芽時に α -アミラーゼ遺伝子がジベレリンによって転写制御を受けることははっきり示されているものの、単子葉植物、特に穀類の葉条が伸長生長する時にジベレリンがどのように作用するか、などの課題は多く不明のまま残っている。

本研究の前半では、トウモロコシのジベレリン応答変異株を用いてジベレリン応答遺伝子群の単離とカタログ化を目指した。この過程で2個の特異遺伝子、*ZmGR1a*、*ZmGR2a*を単離した。*ZmGR1a*は、プロリンに富むタンパク質で、N末端にシグナルペプチドを、C末端に膜貫通領域を持つことから膜タンパク質と推定された。*ZmGR2a*は、N末端に12アミノ酸からなる繰り返し配列を持ち、親水性に富む新規タンパク質であった。RNAブロット解析、*In situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、伸長生長および細胞分裂の活発な組織や器官で、両者の mRNA の蓄積が見られた。こうした発現場所は、ジベレリンの作用部位と一致し、*ZmGR1a*、*ZmGR2a*がジベレリンの標的であることが示唆された。

ジベレリンが葉条の伸長を促進する時の情報伝達経路に関わる遺伝子がいくつか単離されている。*GAI* (*GA Insensitive*) はシロイヌナズナのジベレリン非感受性突然変異株から得られた遺伝子で、ジベレリン情報伝達系を抑制するリプレッサーをコードするのではないかと考えられた。しかし、機能に関する実験報告はない。本研究の後半では、単子葉植物、特に穀類におけるジベレリンの情報伝達系を明らかにするために、イネから *GAI* ホモログ (*OsGAI*) を単離し、その遺伝子産物の機能解析を行った。*OsGAI*-GFP を生産した植物では、核でのみ蛍光が観察されたことから、*OsGAI* が転写制御因子である可能性が示された。事実、two-hybrid系を応用した実験で *OsGAI* は転写活性化能を持ち、転写活性化領域は *OsGAI* の 69-276 アミノ酸の間に存在することが分かった。

ジベレリンは細胞壁を弛めるのと同時に、細胞内の溶質濃度を高め、吸水することで細胞の伸長を促す。*ZmGR1a* は細胞膜に局在するので、細胞壁の伸展性の増大に寄与する可能性がある。*ZmGR2a* は親水性のタンパク質で、細胞質に局在するらしいので、細胞内の溶質濃度を調節する役割を担っているのかもしれない。これらの遺伝子の上流で働くジベレリン情報伝達系に含まれる *OsGAI* は転写活性化因子であった。*OsGAI* の標的遺伝子の同定も含めて、一連の転写制御系を解明することで、これまで未知であった穀類でのジベレリンの作用機作が分かってくるだろう。さらに、本研究で得られた遺伝子群は農業上、有用な形質を付与するための分子育種にとってもたいせつな材料になると考えられた。

以上のように、本論文はジベレリンの作用機構の本質に迫るもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。