

学 位 論 文 題 名

Molecular and Genetic Studies
on Gibberellin Signal Transduction in Rice.

(イネにおけるジベレリン情報伝達に関する分子遺伝学的研究)

学位論文内容の要旨

高等植物において、植物ホルモンの一種であるジベレリン (GA) は細胞の伸長・分裂を促進し、その結果として茎、葉および根といった器官の形態形成を制御する。またGAは、種の保存形態である「種子休眠」から「発芽」を開始するトリガーとしても作用する。さらにGAの作用には、様々な応用例があり、農業的にも有効な生長調節物質として利用されている。従って、GAが媒介する高等植物の生長制御の理解は極めて重要である。しかし、活性型GAが合成されて受容するといった、いわばGA情報のインプットから、アウトプットといえる細胞伸長・分裂の促進、発芽の開始といったGA応答に至る過程はほとんど解明されていないのが現状である。この分野の進展を目的とし、本研究を遂行した。

1・恒常的ジベレリン反応性突然変異体、 *slender rice* の解析と原因遺伝子、*SLR1* の機能解析

植物ホルモンの生合成経路およびシグナル伝達機構の解明には、分子遺伝学的なアプローチが考えられる。これらに異常をきたした突然変異体を作成し、その生理作用の解明および原因遺伝子の単離は、最も有効な手段の一つである。第2章では、恒常的にGAに反応しているイネの突然変異体“*slender rice*”を単離し、これを用いたGAの情報伝達経路の解明を試みた。

イネ品種日本晴にガンマ線を照射して得られた *slender rice* (*slr1-1*) を用いた解析により、この変異体では(1) 発芽直後から著しい茎葉部の伸長が促進されること、(2) GA依存型の α -アミラーゼが内生GA量と無関係に誘導されること、(3) 内生GA量は野生型イネに対して減少していること、などが明らかとなった。これらから *slender rice* が示す表現型は、内生GA量に依存せず、GAのシグナル伝達経路に異常をきたした突然変異体であるものと結論づけた。*slender rice* の原因遺伝子

(*SLR1*) はGAのシグナル伝達における負の調節因子と考えられ、この機構に異常が生じたことからGAのシグナル伝達が常に活性化されているものと推察された。

SLR1 遺伝子を単離した結果、GA非感受性突然変異体であるコムギの *RHT1-Da*、トウモロコシの *D8*、シロイヌナズナの *GAI* および *RGA* の原因遺伝子と相同性を有し、推定されるアミノ酸配列からはGRASファミリーと称される植物特有の転写調節因子群に属するものと考えられた。*slender* 変異体 (*slr1-1*) では核局在配列に1塩基の欠失が認められた。また *SLR1* 遺伝子をコードする領域を含む6 kbのゲノムDNA断片を *slender rice* に導入を行った結果、得られた形質転換体は正常なGA応答を示した。

この結果は *slender rice* が SLR1 タンパク質の機能を完全に失った loss of function 型の変異が原因であることを示している。さらに *RHT1-Da*、*D8* および *GAI* などの突然変異体は、推定されるアミノ酸配列の N 末端側に共通して認められる DELLA モチーフ付近が欠損しており、この領域が GA の受容機構と何らかの関連性が推測できた。そこで、SLR1 タンパク質の DELLA モチーフをコードする塩基配列を欠損したコンストラクトの野生型イネへの導入を試みた。その結果、得られた形質転換体は、GA に対する感受性を喪失しており、草丈の伸長が抑制された矮性の表現型を示した。従って、DELLA モチーフの欠損は、SLR1 遺伝子の変異に認められた徒長と相反する表現型を示すことを明かとした。これらの実験より、SLR1 タンパク質は、(1) GA シグナルの受容と、(2) 負の転写調節因子の二機能性を持つタンパク質であることを明らかにした。

2・恒常的ジベレリン反応性突然変異体、*slender rice* におけるアブシジン酸生合成能の解析

GA を媒介とする胚発生や休眠およびその打破には、植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) が拮抗的に作用する。第 3 章では、恒常的に GA シグナルが活性化した *slender rice* を用いて ABA の生合成能におよぼす影響を検討した。

slender rice に認められる GA 独立的に誘導された α -アミラーゼおよび顕著な茎葉部の徒長は、野生型イネと同様、ABA によって抑制された。このことから、*slender rice* は ABA に対して正常に応答することが明かとなった。また茎葉部における *slender rice* の内生 ABA 量は、野生型イネに対して約 10 高いこと、ABA 依存的に発現する *Rab16A* 遺伝子の発現量も約 10 倍程度高いことを明かし、*slender rice* では ABA 生合成量が増加している可能性を示した。

ABA 生合成経路の律速反応を触媒する酵素をコードする *OsNCED* 遺伝子をプローブとして、根を取り除き乾燥ストレス処理を施した茎葉部での発現解析を試みた。その結果、*slender rice* では野生型イネに対して急速かつ急激な発現量の増加 (約 5 倍) が認められた。これらの実験結果を総合して、SLR1 の遺伝子変異は、植物体がホメオスタシスを維持するために、GA の拮抗作用を有する ABA の生合成能力を高めているものと推測した。これら一連の研究により、GA のシグナル伝達系の異常が他の植物ホルモンの生合成にも影響を与えることを初めて明らかにした。

3・ジベレリン促進型遺伝子 *GASR1* が媒介とする根のオーキシンの効果と形態形成の解析

第 4 章ではトマトで単離された *GAST1* 遺伝子の相同性遺伝子として、イネ cDNA ライブラリーより単離した *GASR1* 遺伝子の解析を行った。*GASR1* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列から、*GAST1* と同じくトマトの *RSI-1*、シロイヌナズナの *GASA1*~5 などと相同性を有していた。またこれらに共通して見られる特徴には (1) 100 前後のアミノ酸残基よりなり、(2) シグナルペプチドと推定される領域が存在しており、(3) C 末端側のシステイン 12 残基が完全に保存されている、などが示された。

GASR1 タンパク質の組織局在性および植物ホルモンによる影響を検討した結果、*GASR1* タンパク質は根において特異的に発現し、その分子量は SDS-PAGE 上で約 13 kD の分子量で検出され、オーキシンの一種である α -naphthalene acetic acid (NAA) の添加により、分子量が約 13 kD から約 40 kD に増大することが明らかとなった。またオーキシンの極性移動阻害剤である 2,3,5-triiodobenzoic acid の添加により、NAA による

分子量の増大は抑制されること、さらにGASR1抗体の添加によっても同様な分子量の増大が抑制されることが認められた。通常、過剰なオーキシンの存在下では、植物の根は伸長および発根の抑制といった生育の阻害が認められる。しかし、GASR1抗体を添加した結果、これらの抑制が完全に解除されることが明かとなった。これらの結果からGASR1 がオーキシンを媒介する根の形態形成に深く関係している可能性を示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 口 淳 二

副 査 教 授 米 田 好 文

副 査 助 教 授 加 藤 敦 之

副 査 教 授 佐 野 芳 雄 (北海道大学大学院農学研究科)

学 位 論 文 題 名

Molecular and Genetic Studies on Gibberellin Signal Transduction in Rice.

(イネにおけるジベレリン情報伝達に関する分子遺伝学的研究)

高等植物において、植物ホルモンの一種であるジベレリン (GA) は細胞の伸長・分裂を促進し、その結果として茎、葉および根といった器官の形態形成を制御する。また GA は、種の保存形態である「種子休眠」から「発芽」を開始するトリガーとしても作用する。さらに GA の作用には、様々な応用例があり、農業的にも有効な生長調節物質として利用されている。従って、GA が媒介する高等植物の生長制御の理解は極めて重要である。しかし、活性型 GA が合成されて受容するといった、いわば GA 情報のインプットから、アウトプットといえる細胞伸長・分裂の促進、発芽の開始といった GA 応答に至る過程はほとんど解明されていないのが現状である。この分野の進展を目的とし、本研究を遂行した。

イネ品種日本晴にガンマ線を照射して得られた *slender rice* (*slr1-1*) を用いた解析により、この変異体では (1) 発芽直後から著しい茎葉部の伸長が促進されること、(2) GA 依存型の α -アミラーゼが内生 GA 量と無関係に誘導されること、(3) 内生 GA 量は野生型イネに対して減少していること、などが明らかとなった。これらから *slender rice* が示す表現型は、内生 GA 量に依存せず、GA のシグナル伝達経路に異常をきたした突然変異体であるものと結論づけた。*slender rice* の原因遺伝子 (*SLR1*) は GA のシグナル伝達における負の調節因子と考えられ、この機構に異常が生じたことから GA のシグナル伝達が常に活性化されているものと推察された。

SLR1 遺伝子を単離した結果、GA 非感受性突然変異体であるコムギの *RHT1-Da*、トウモロコシの *D8*、シロイヌナズナの *GAI* および *RGA* の原因遺伝子と相同性を有し、推定されるアミノ酸配列からは GRAS ファミリーと称される植物特有の転写調節因子群に

属するものと考えられた。*slender* 変異体 (*slr1-1*) では核局在配列に 1 塩基の欠失が認められた。また *SLR1* 遺伝子をコードする領域を含む 6 kb のゲノム DNA 断片を *slender rice* に導入を行った結果、得られた形質転換体は正常な GA 応答を示した。この結果は *slender rice* が *SLR1* タンパク質の機能を完全に失った loss of function 型の変異が原因であることを示している。さらに *RHT1-Da*、*D8* および *GAI* などの突然変異体は、推定されるアミノ酸配列の N 末端側に共通して認められる DELLA モチーフ付近が欠損しており、この領域が GA の受容機構と何らかの関連性をもつものと推測できた。そこで、*SLR1* タンパク質の DELLA モチーフをコードする塩基配列を欠損したコンストラクトの野生型イネへの導入を試みた。その結果、得られた形質転換体は、GA に対する感受性を喪失しており、草丈の伸長が抑制された矮性の表現型を示した。従って、DELLA モチーフの欠損は、*SLR1* 遺伝子の変異に認められた徒長と相反する表現型を示すことを明らかとした。これらの実験より、*SLR1* タンパク質は、1) GA シグナルの受容と、2) 負の転写調節因子の二機能性を持つことを明らかにした。

GA を媒介とする胚発生や休眠およびその打破には、植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) が拮抗的に作用する。*slender rice* に認められる GA 独立的に誘導された α -アミラーゼおよび顕著な茎葉部の徒長は、野生型イネと同様、ABA によって抑制された。このことから、*slender rice* は ABA に対して正常に応答することが明らかとなった。また茎葉部における *slender rice* の内生 ABA 量は、野生型イネに対して約 10 高いこと、ABA 依存的に発現する *Rab16A* 遺伝子の発現量も約 10 倍程度高いことを明かとし、*slender rice* では ABA 生合成量が増加している可能性を示した。

ABA 生合成経路の律速反応を触媒する酵素をコードする *OsNCED* 遺伝子をプローブとして、根を取り除き乾燥ストレス処理を施した茎葉部での発現解析を試みた。その結果、*slender rice* では野生型イネに対して急速かつ急激な発現量の増加 (約 5 倍) が認められた。これらの実験結果を総合して、*SLR1* の遺伝子変異は、植物体がホメオスタシスを維持するために、GA の拮抗作用を有する ABA の生合成能力を高めているものと推測した。これら一連の研究により、GA のシグナル伝達系の異常が他の植物ホルモンの生合成にも影響を与えることを初めて明らかにした。

これを要するに、著者は分子遺伝学的手法も用いてジベレリンのシグナル伝達に関する原因遺伝子の単離とその生物学的意味の解明に成功した。これは、植物科学の基礎研究としてだけでなく、応用研究としても多大な貢献である。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認める。