

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on brassinosteroid biosynthesis involved in tracheary element differentiation

(管状要素分化に伴うブラシノステロイド合成の研究)

氏名 山本 亮

<序論>

植物ホルモンであるブラシノステロイドを植物に与えると、茎の伸長促進、根の成長促進または阻害、葉身の屈曲といった現象が観察される。近年、いくつかのブラシノステロイド合成または受容の変異体が見出され、それら全てが矮性を示し、いくつかの変異体では雄性不稔や脱黄化現象、根の成長阻害、葉の形態異常などの変異を示す。これらのことからブラシノステロイドは植物の成長や分化において重要な働きをしていることが明らかになってきた。

木部分化もまたブラシノステロイドが関与していると考えられている。いくつかのブラシノステロイド欠失変異体では維管束の形態異常が観察される。また Clouse と Zurek はキクイモの外殖片にブラシノライド (BL) を与えると管状要素を誘導できることを示し、岩崎と柴岡はハクニチソウ管状要素分化系を用いて矮化剤であるウニコナゾールが管状要素分化を抑制し、ブラシノステロイドがその抑制効果を打ち消して分化を誘導することを明らかにした。ハクニチソウ *in vitro* 分化系は、その分化過程が3つのステージ (ステージ1: 葉肉細胞の脱分化の過程、ステージ2: 脱分化した細胞が管状要素前駆細胞へと変化する過程、ステージ3: 二次壁形成と細胞死の過程) に分けられている。修士課程において私は、ウニコナゾールがステージ3特異的な遺伝子発現のみを抑制し、BLがその抑制を打ち消すことを示した (図1)。このことから内生BLが管状要素分化のステージ2からステージ3の移行に関与していることが示唆された。しかしながら、これらの結果は人為的に外からブラシノステロイドを与えたときの結果であり、ハクニチソウの系における内生ブラシノステロイドと管状要素分化との関係は不明なままであった。そこで本研究では管状要素分化過程での内生ブラシノステロイドの合成及びその調節機構を解析することでブラシノステロイドによる管状要素分化制御機構に迫ることを目的とした。

<結果と考察>

1. ハクニチソウ *in vitro* 分化系におけるブラシノステロイド活性

修士課程でのウニコナゾールを用いた内生ブラシノステロイド阻害の結果は、ジベレリン合成などに対するサイドエフェクトである可能性を排除できないことから、最近開発されたブラシノステロイド合成特異的阻害剤ブラシナゾールの管状要素分化抑制効果を調べた。その結果ブラシナゾールは濃度依存的に管状要素分化を抑制することがわかった (図2)。またブラシナゾールによる分化抑制はBLの濃度依存的に打ち消され、分化が回復した (図3)。以上の結果から、管状要素分化には分化過程でのブラシノステロイド合成が必須であることが確認された。また、同濃度のウニコナゾールとブラシナゾールはほぼ同程度の分化阻害効果を持つことから、ウニコナゾールの管状要素分化抑制作用はブラシナゾール同様ブラシノステロイド合成の抑制によることが示された。

ブラシノステロイドは図4に示すように一般的な植物ステロールであるカンベステロールから2つの経路を通過して合成されると考えられている。この系の利用は種や組織の違いによって経路の利用が異なると考えられている。ブラシノステロイドはBLまたはカスタステロンに代謝されて活性を持つと考えられているので、ウニコナゾール (ブラシナゾール) 存在下で、ある中間体を添加したときに活性が得られるならば、その中間体より下流の代謝経路は機能してい

ると予想される。そこで、ウニコナゾールまたはブラシナゾールと共に様々なブラシノステロイド合成の中間体を与え、それらの活性を調べ、ヒャクニチソウ管状要素分化系におけるブラシノステロイド合成系の概要を調査した(図5)。その結果、早期C6酸化経路に属する3DT以降の中間体と後期C6酸化経路に属するD3DT以降の中間体を添加したときに十分な活性が得られたことから、ヒャクニチソウ管状要素分化過程で早期C6酸化経路、後期C6酸化経路の二つがほぼ均等に機能していることが示唆された。

2. ヒャクニチソウ分化系における内生ブラシノステロイドの同定と定量

そこで、次にヒャクニチソウ分化細胞中のブラシノステロイドの同定を試みた。まず、ヒャクニチソウ分化系におけるウニコナゾールによる管状要素分化抑制効果を打ち消す活性をバイオアッセイ系として用い、活性画分の絞り込みを行った。ステージ3直前の細胞及び培地を集め、クロロホルム可溶画分を抽出し、続いてシリカゲルカラムで分配した画分を用いてアッセイを行い、活性が得られた画分を更にHPLCを用いて逆層分配しアッセイを行った(図6)。この結果から、活性物質がいくつかのオーセンティックなブラシノステロイドと同じ画分に分配されること、最も高い活性を示す物質を同定するには数g~数十gの細胞または数Lの培地が必要であることが分かった。そこで培養54時間目の細胞を60gと培地を2L集め、これらを出発材料としてシリカゲルカラム、HPLCにより分配した画分をGC-MSで解析した。その結果、細胞からTY、DCS、培地からCS、TY、DCSをそれぞれ同定できた。

このようにCS、TY、DCSが細胞あるいは培地に存在することが明らかになったので、より精度を上げて分化過程各時期の細胞と培地中のブラシノステロイド各種(BL、CS、TY、TE、DCS、DTY、DTE)の変化をGC-MSを用いて調べた(図7)。その結果、培養期間を通じてBL、TE量は検出限界以下であった。単離直後の葉肉細胞にはわずかのCS、DCS、DTY、DTEが含まれるだけだが、培養後30から54時間目にかけて細胞中のCS、TY、DCS、DTY、DTEが増加し、特にDTYとDCSが著しく増加した。以上のことから、ステージ3に先立ってCS、TY、DCS、DTYが急激に合成されることが明らかになった。TEやDTEに比べ下流のブラシノステロイドの増加が著しいことから、少なくともCTからTYまでとDCTからDTYまでの代謝がステージ3直前に短時間で効率よく行われていると考えられた。また培地中のブラシノステロイドも培養後30から54時間目にかけて急激に増加した。しかし、細胞中と異なり培地中では活性型ブラシノステロイドのCSを含むCS、TY、DCS、DTYがほぼ同レベルで存在していた。計算から、培養54時間目のCS、TY、DCS、DTYはそれぞれ総量の91.0%、64.5%、20.8%、1.9%が培地に存在していることがわかり、この結果はCSやTYがDCSやDTYに比べ選択的に培地へ放出されていることを示した。また、活性型ブラシノステロイドと考えられるCSに近いブラシノステロイドほど高い割合で培地に存在し、かつ細胞外に存在するブラシノステロイドの総和が0.3 nM以上と、添加実験での有効濃度を超えることから、細胞外でブラシノステロイドが作用する可能性が示唆された。

3. ブラシノステロイド合成関連遺伝子の単離と解析

2.で示されたステージ3に先立つブラシノステロイド合成上昇の調節機構を明らかにするために、ブラシノステロイド合成関連遺伝子の発現調節を解析した。図4に示すように、これまでにブラシノステロイド合成に関わる遺伝子がいくつか単離されている。そこで、これら遺伝子のヒャクニチソウホモログの単離を行い、STE、DIM、DWF4、CPD、DWARFのホモログと予想されるクローンの部分配列を得た。DWARF以外の遺伝子については、部分配列をもとにcDNAライブラリーから全長を単離した(図8)。CPD遺伝子はシロイヌナズナにおいて1コピーしか存在しないが、ヒャクニチソウからはZeCPD1、ZeCPD2と名付けたアミノ酸レベルで76.0%の相同性を示す2つのクローンを得た。どちらも酸素分子結合ドメインやステロイド結合ドメイン、ヘム結合ドメインが保存されているのでステロイドの酸化反応に関わっていると予想された。

次に単離したクローンの全長または一部のcDNAを鋳型としてRNAプローブを作製し、RNAゲルプロット解析により管状要素分化に伴うmRNAの蓄積を調べた(図9)。この結果、遺伝子によって発現パターンが異なるものの、ZeCPD2以外のクローンは内生ブラシノステロイドの蓄積に先立ってmRNAの蓄積が見られることがわかった。次にこれらの遺伝子発現が管状要素分化特異的かどうか調べるために、対照培地で48時間培養したときのmRNAの蓄積を調べた(図10)。ZeSTEとZeDIM、ZeCPD2はC0、CB、培地でも発現が見られるのに対し、ZeDWF4とZeCPD1はC0、CB、CNでの発現は弱く、CP、特にD培地で強い発現が見られた。ZeDWF4とZeCPD1はブラシノステロイドが急増する培養36から48時間目に高いレベルのmRNAを蓄積し、かつ、管状要素分化誘導条件で著しいmRNAの蓄積が見られることから、これらの遺伝子の転写レベルでの制御が管状要素分化過程でのブラシノステロイド合成のキーステップになっていると考えられた。

以上の結果をもとに、ヒャクニチソウ管状要素分化系において予想されるブラシノステロイド合成系とシグナル伝達モデルを図11に示した。ブラシノステロイドは早期・後期C6酸化経路の2つの経路を経てステージ3に先立って積極的に合成される。合成されるブラシノステロイドのうち、DCSとDTYはほとんどが細胞内に蓄積するがCSとTYは選択的に培地へ放出される。分泌された活性型のブラシノステロイドは、ブラシノステロイドを分泌した細胞に(autochrine)、あるいは分泌しなかった細胞に(paracrine)、またはその両方に受容される。ブラシノステロイドのシグナルを受容した細胞はステージ3へと分化を進め、管状要素に分化すると考えた。

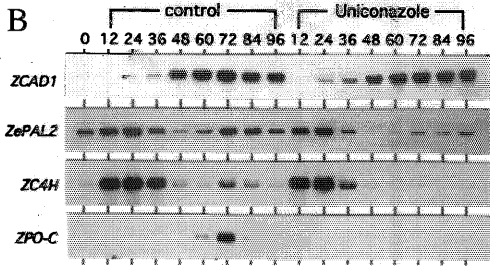
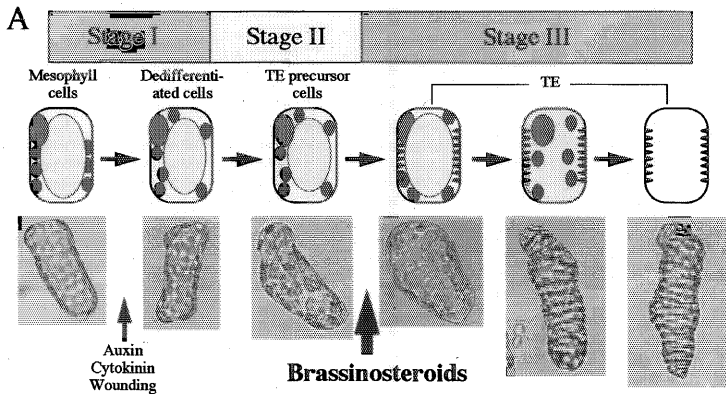


図1. ヒヤクニチソウの管状要素分化過程のモデル。A、管状要素の分化過程は、脱分化のステージであるステージ1、分化の方向が制限され、管状要素になる準備が整うステージ2、最終的な分化の決定に続いて、細胞死や二次壁肥厚が起こるステージ3の3つのステージに分けられる。

B、ウニコナゾールはステージ3から新たに発現が誘導される遺伝子群のmRNAの蓄積を抑制するが、ステージ2から継続して発現する遺伝子群のmRNAの蓄積には影響しない。このことから、ブラシノステロイドはステージ2からステージ3への移行に関与していると考えられている。

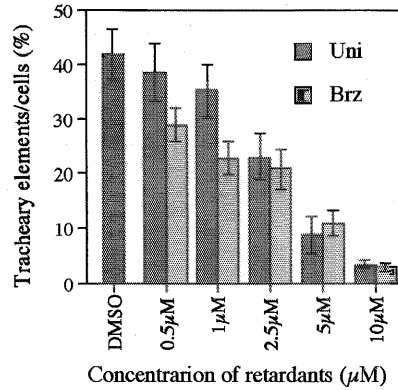


図2. 管状要素分化におけるウニコナゾールとブラシナゾールの阻害効果。培養開始時から濃度の異なる阻害剤を添加し、96時間後に分化率を測定した。ブラシナゾールとウニコナゾールの活性に違いは見られない。また光学顕微鏡下の細胞の形状にも違いは見られない。

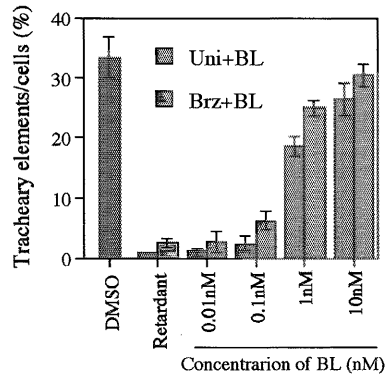


図3. 阻害剤に対するブラシノライドの効果。培養開始時から5μMの阻害剤と共にブラシノライドを添加し、96時間後に分化率を測定した。ブラシノライドによって分化が回復する。その効果にはほとんど違いは見られない。

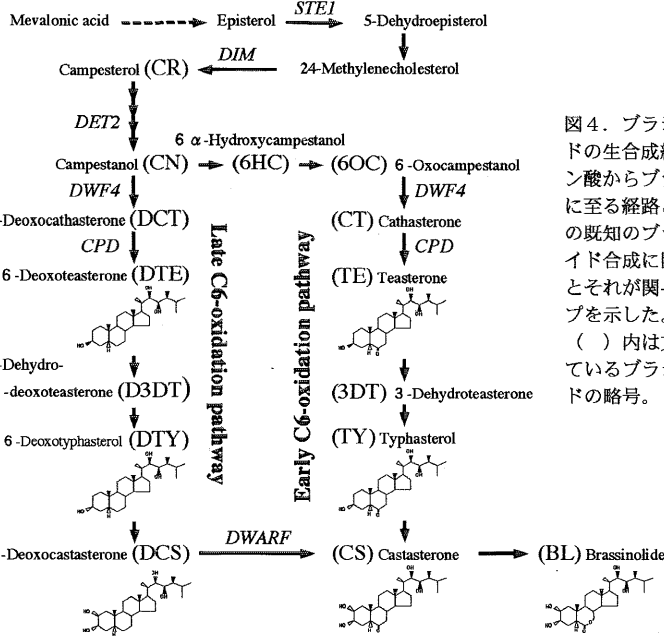


図4. ブラシノステロイドの生合成経路。メバロン酸からブラシノライドに至る経路と、いくつかの既知のブラシノステロイド合成に関わる遺伝子とそれが関与するステップを示した。()内は文中で使用しているブラシノステロイドの略号。

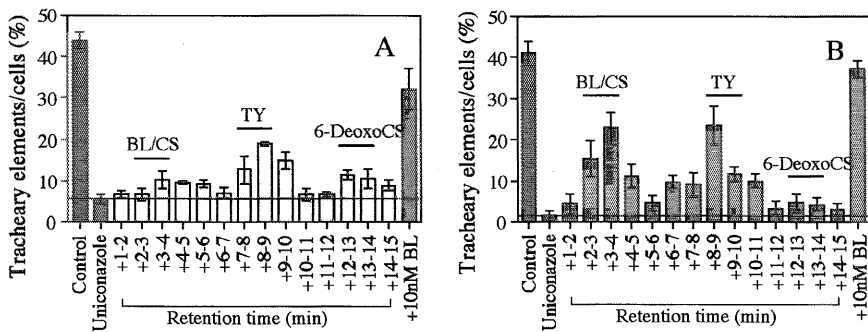


図6. 細胞・培地中のブラシノステロイド活性。培養54時間目の細胞3gと培地500mlから得たクロロホルム可溶画分をシリカゲルカラムで分離した後、HPLCで更に分配し、それぞれの画分に含まれるブラシノステロイド活性を示した。含まれることが予想されるブラシノステロイドをグラフ中に併せて示した。A；細胞、B；培地

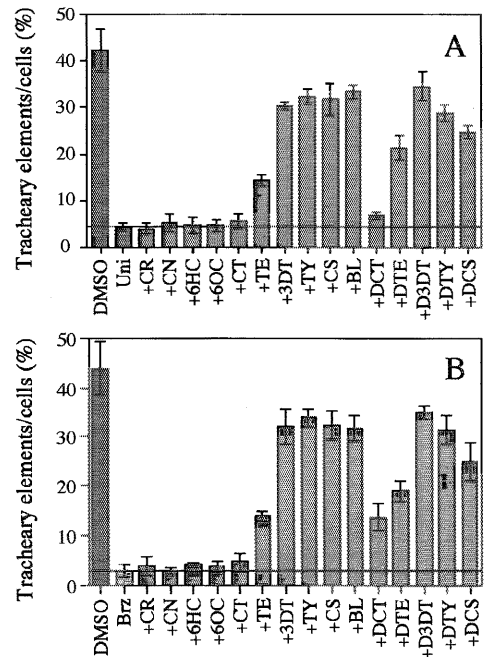


図5. ブラシノステロイド合成の中間体の添加実験。培養開始時から阻害剤と共にブラシノステロイドを添加し、96時間の培養の後に分化率を測定した。A：ウニコナゾール、B：ブラシナゾール

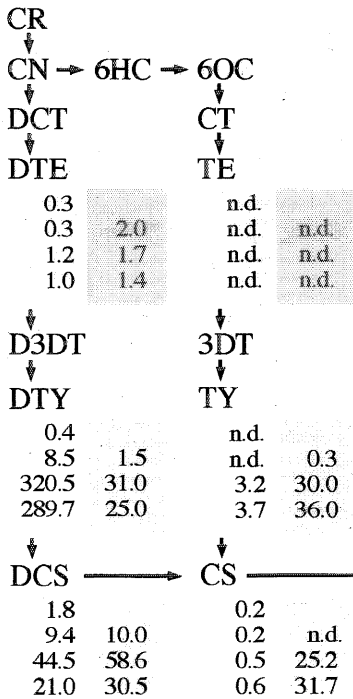


図7. ヒヤクニチソウ管状要素分化過程の細胞と培地のブラシノステロイド量。0、30、54、78 時間後の培地 1 L 中には、それぞれ約4.0、4.0、5.0、6.3 gの細胞が存在する。n.d.=検出限界以下

A

Clone	Genes showing highest homology
ZeSTE	Nt. Δ^7 sterol C5 desaturase (78.2%)
	At. Δ^7 sterol C5 desaturase:STE1 (77.3%)
ZeDIM	Ps.DIM-homologue (82.6%)
	At.DIM (79.2%)
ZeDWF4	At. Steroid 22 α -hydroxylase:DWF4 (69.1%)
	At. CYP90A1:CPD (40.6%)
ZeCPD1	At. CYP90A1:CPD (68.3%)
	Vr. P450 (67.9%)
ZeCPD2	At. CYP90A1:CPD (70.2%)
	Vr. P450 (69.6%)
ZeDWARF	Ly.CP85:DWARF (72.2%)
	At.CP85 homologue (60.0%)

B

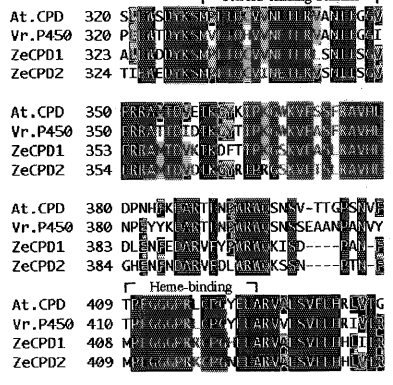


図8. 単離したブラシノステロイド合成関連遺伝子。A、ZeDWARFのみ部分配列、他は全長の予想アミノ酸配列をBLAST検索し、相同性の高かった遺伝子名を示した。()内はアミノ酸レベルの相同率。B、ZeCPD1とZeCPD2の予想されるステロイド結合ドメインとヘム結合ドメインのアミノ酸配列。

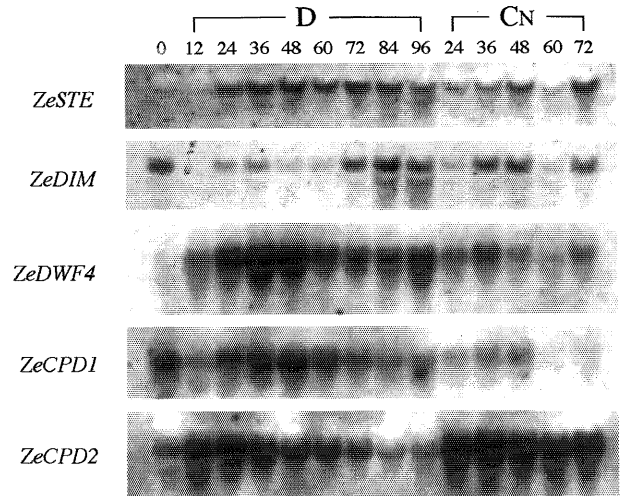
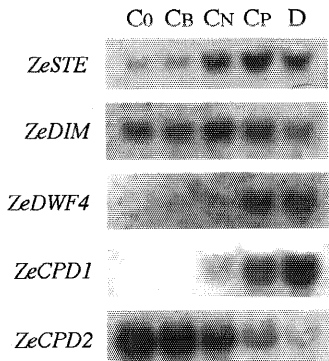


図9. ブラシノステロイド合成関連遺伝子の分化誘導培地におけるmRNAの蓄積。D培地で0、12、24、36、48、60、72、84、96時間培養した後に回収した細胞から得たトータルRNA 15 μ gに対してRNAゲルブロット解析を行い、これらのmRNA量の経時的変化を調べた。対照として分化の誘導されないCN培地の細胞から得たトータルRNAを用いた。



培地	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	分化	分裂
C0	0	0	-	-
CB	0	0.2	-	-
CN	0.1	0	-	+
CP	0.1	0.001	(+)	++
D	0.1	0.2	++	++

図10. ブラシノステロイド合成関連遺伝子の対照培地における発現解析。オーキシンとサイトカイニン含有量の異なる対照培地でそれぞれ48時間培養した細胞から得たトータルRNA 15 μ gを用いてRNAゲルブロット解析を行った。対照培地のホルモン含量と分化・分裂の頻度を右の表に示した。

図11. ヒヤクニチソウ管状要素分化系において予想されるブラシノステロイドの合成とシグナル伝達系のモデル。ブラシノステロイドはステージ2に早期と後期C6酸化経路の二つの経路を使って合成される。DCSやDTYは多くが細胞内に蓄積するのに対して、CSやTYは選択的に培地中に放出される。分泌された活性型のブラシノステロイドは、ブラシノステロイドを分泌した細胞に (autocrine)、しなかった細胞に (paracrine)、あるいはその両方にBRI1様のレセプターを介して受容され分化のステージを2から3へ進める。図中の黄色い円は54時間目のブラシノステロイドのおよその量比を示す。

